



Ministerie van Landbouw,
Natuur en Voedselkwaliteit

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



Directoraat-generaal Agro
Directie Plantaardige Agroketens
en Voedselkwaliteit

Bezoekadres
Bezuidenhoutseweg 73
2594 AC Den Haag

Postadres
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Overheidsidentificatienr
00000001858272854000

T 070 379 8911 (algemeen)
F 070 378 6100 (algemeen)
www.rijksoverheid.nl/Inv

Behandeld door

T 06 [redacted]
[redacted]@minlnv.nl

Ons kenmerk
DGA-PAV / 20020939

Uw kenmerk

Datum 09 april 2020
Betreft Besluit op uw Wob-verzoek d.d. 13 november 2019

Geachte [redacted]

In uw brief van 13 november 2019, ontvangen op 14 november 2019, heeft u met een beroep op de Wet openbaarheid van bestuur (hierna: Wob) informatie verzocht met betrekking tot de opdrachtverstrekking, totstandkoming en discussie over het rapport 'Neonicotinoïden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken', in de periode 7 juli 2011 tot en met 31 december 2012.

Het verzoek richt zich ook op alle documenten en correspondentie aangaande (de voorbereiding op) de beantwoording van vragen van de Tweede Kamer, brieven gericht aan de Tweede Kamer en Kamerdebatten die betrekking hebben op het bovengenoemd rapport.

Procedure

De ontvangst van uw verzoek is schriftelijk bevestigd bij brief van **9 december 2019**, kenmerk DGA / 19288793. In deze brief is tevens de beslistermijn met vier weken verdaagd tot **9 januari 2020**.

Telefonisch en per mail heeft u verzocht om verruiming van de periode waar uw Wob-verzoek zich op richt. Een medewerker van mijn ministerie heeft u laten weten dat dit verzoek is goedgekeurd en dat de periode van uw Wob-verzoek is aangepast naar 31 december 2010 tot en met 31 december 2012.

In de brief van **18 december 2019, kenmerk DGA / 19310023** is aan u medegedeeld dat de beslistermijn is opgeschort tot **3 februari 2020** vanwege het vragen van zienswijzen aan derden over de openbaarmaking van de op dit verzoek betrekking hebbende documenten.

Wettelijk kader

Uw verzoek valt onder de reikwijdte van de Wob. Voor de relevante Wob-artikelen verwijs ik u naar de **bijlage 1**.

Inventarisatie documenten

Op basis van uw verzoek zijn in totaal 91 (inclusief bijlagen) documenten aangetroffen. Deze documenten zijn opgenomen in een inventarislijst die als

bijlage 2 bij dit besluit is gevoegd. In dit besluit wordt verwezen naar de corresponderende nummers uit de inventarislijst, zodat per document duidelijk is wat is besloten.

De documenten met nummers **10a, 11a en 11b** zijn reeds openbaar. De Wob is niet van toepassing op reeds openbare documenten. In de inventarislijst is een verwijzing opgenomen naar de vindplaats van deze documenten.

Zienswijzen

U bent er over geïnformeerd in de brief van **18 december 2019, kenmerk DGA / 19310023** dat er derde belanghebbenden zijn bij de openbaarmaking van de documenten en dat deze in de gelegenheid zijn gesteld hierover hun zienswijze te geven.

De zienswijze van de derde belanghebbende heb ik in mijn belangenafweging meegenomen. Zie het onderdeel Overwegingen van dit besluit.

Besluit

Ik heb besloten aan uw verzoek tegemoet te komen en de door u gevraagde informatie opgenomen in de documenten met nummers **9a, 15a, 17b, 41a en 48** geheel openbaar te maken.

Ik heb besloten de door u gevraagde informatie opgenomen in de documenten met nummers **1, 1a, 1b, 2, 3, 3a, 3b, 6a, 7, 7a, 7b, 8a, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 34, 41, 41b, 42, 42a, 46 en 49** openbaar te maken met uitzondering van de daarin vermelde persoonsgegevens. Voor de motivering verwijs ik naar onderdeel "Overwegingen" van dit besluit.

Ik heb besloten een deel van de door u gevraagde informatie opgenomen in de documenten met nummers **27** deels openbaar te maken. Voor de motivering verwijs ik naar het onderdeel "Overwegingen" van dit besluit.

Ik heb besloten de documenten met nummers **4, 5, 6, 6b, 8, 13a 14, 14a, 16, 16a, 17, 17a, 17c, 18, 18a, 19, 19a, 20, 20a, 20b, 20c, 21, 21a, 22, 22a, 22b, 23, 23a, 24, 24a, 24b, 25, 25a 25b 26, 27a, 28, 29, 29a, 30, 31, 32, 33, 33a, 34a, 35, 35a, 36, 37, 38, 39, 40, 42b, 43, 44, 4 en 47** niet openbaar te maken. Voor de motivering verwijs ik naar het onderdeel "Overwegingen" van dit besluit.

Overwegingen

Allereerst wil ik u wijzen op het volgende. Ingevolge artikel 3, vijfde lid, van de Wob, wordt een verzoek om informatie ingewilligd met inachtneming van het bepaalde in de artikelen 10 en 11.

Het recht op openbaarmaking op grond van de Wob dient uitsluitend het publieke belang van een goede en democratische bestuursvoering. Het komt iedere burger in gelijke mate toe. Daarom kan ten aanzien van de openbaarheid geen onderscheid worden gemaakt naar gelang de persoon of de bedoeling of belangen van de verzoeker. Bij de te verrichten belangenafweging worden dan ook betrokken het algemene belang bij openbaarmaking van de gevraagde informatie

en de door de weigeringsgronden te beschermen belangen, maar niet het specifieke belang van de verzoeker.

Evenmin kent de Wob een beperkte vorm van openbaarmaking. Dit betekent dat openbaarmaking van de gevraagde documenten uitsluitend aan u op grond van de Wob niet mogelijk is. Indien ik aan u de betreffende documenten verstrek, moet ik deze ook aan anderen geven indien zij daarom verzoeken. In dat licht vindt de onderstaande belangenafweging/vinden de onderstaande belangenafwegingen dan ook plaats.

Bedrijfs- en fabricagegegevens

Artikel 10, eerste lid, aanhef en onder c, van de Wob bepaalt dat het verstrekken van informatie achterwege blijft voor zover dit bedrijfs- en fabricagegegevens betreft, die door natuurlijke personen of rechtspersonen vertrouwelijk aan de overheid zijn medegedeeld. Onder bedrijfsgegevens moet blijkens bestendige jurisprudentie worden verstaan: al die gegevens waaruit wetenswaardigheden kunnen worden afgelezen of afgeleid met betrekking tot de technische bedrijfsvoering of het productieproces dan wel met betrekking tot de afzet van producten of de kring van afnemers of leveranciers. Cijfers of gegevens die de financiële bedrijfsvoering en financiële stromen betreffen, worden eveneens als bedrijfs- en fabricagegegevens aangemerkt.

In de documenten met nummers **6b en 43** staan financiële bedrijfsgegevens. Deze gegevens zijn vertrouwelijk aan mij medegedeeld en intern gecommuniceerd. Uit deze gegevens kunnen wetenswaardigheden worden afgeleid met betrekking tot de technische bedrijfsvoering en intern budgetallocatie.

Het betreft onder andere informatie over de afrekening van op opdracht en de interne allocatie van de betreffende gelden binnen het Ministerie. Uit de informatie die in het kader van het project aan mij is overhandigd, kan informatie over tarieven, bedrijfsgegevens en de inkoop door het Ministerie worden afgeleid. Ik zal deze informatie dan ook niet openbaar maken.

De eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer

Op grond van artikel 10, tweede lid, aanhef en onder e, van de Wob blijft verstrekking van informatie achterwege voor zover het belang daarvan niet opweegt tegen het belang dat de persoonlijke levenssfeer wordt geëerbiedigd.

In de documenten met nummers **1, 1a, 1b, 2, 3, 3a, 3b, 6a, 7, 7a, 7b, 8a, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 27, 34, 41, 41b, 42, 42a, 46 en 49** staan persoonsgegevens, zoals namen, telefoonnummers en e-mailadressen. Ik ben van oordeel dat t.a.v. deze gegevens het belang dat de persoonlijke levenssfeer wordt geëerbiedigd, zwaarder moet wegen dan het belang van openbaarheid. Daarom heb ik de persoonsgegevens verwijderd uit deze documenten.

Voor zover het de namen van ambtenaren betreft is hierbij het volgende van belang. Weliswaar kan, waar het gaat om beroepshalve functioneren van ambtenaren, slechts in beperkte mate een beroep worden gedaan op het belang van eerbiediging van hun persoonlijke levenssfeer. Dit ligt anders indien het

betreft het openbaarmaken van namen van de ambtenaren. Namen zijn immers persoonsgegevens en het belang van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer kan zich tegen het openbaarmaken daarvan verzetten. Daarbij is van belang dat het hier niet gaat om het opgeven van een naam aan een individuele burger die met een ambtenaar in contact treedt, maar om openbaarmaking van de naam in de zin van de Wob.

Persoonlijke beleidsopvattingen in een stuk voor intern beraad

Artikel 11, eerste lid, van de Wob bepaalt dat in geval van een verzoek om informatie uit documenten, opgesteld ten behoeve van intern beraad, geen informatie wordt verstrekt over daarin opgenomen persoonlijke beleidsopvattingen.

Uit de wetsgeschiedenis blijkt dat onder het begrip "documenten opgesteld ten behoeve van intern beraad" onder meer moeten worden begrepen: nota's van ambtenaren en hun politieke en ambtelijk leidinggevenden, correspondentie tussen de onderdelen van een ministerie en tussen ministeries onderling, concepten van stukken, agenda's, notulen, samenvattingen en conclusies van interne besprekingen en rapporten van ambtelijke adviescommissies. Ten aanzien van deze stukken moet van de bedoeling om ze als stukken voor intern beraad beschouwd te zien, uitdrukkelijk blijken of men moet deze bedoeling redelijkerwijs kunnen vermoeden. Deze beperking op de informatieverplichting is in de Wob opgenomen omdat een ongehinderde bijdrage van ambtenaren en van hen die van buiten bij het intern beraad zijn betrokken bij de beleidsvorming en -voorbereiding gewaarborgd moet zijn. Zij moeten in alle openhartigheid onderling en met bewindspersonen kunnen communiceren. Staatsrechtelijk zijn slechts de standpunten die het bestuursorgaan voor zijn rekening wil nemen relevant. Onder persoonlijke beleidsopvattingen worden verstaan: meningen, opinies, commentaren, voorstellen, conclusies met de daartoe aangevoerde argumenten.

De documenten met nummers **4, 5, 6, 6b, 8, 13a 14, 14a, 16, 16a, 17, 17a, 17c, 18, 18a, 19, 19a, 20, 20a, 20b, 20c, 21, 21a, 22, 22a, 22b, 23, 23a, 24, 24a, 24b, 25, 25a 25b 26, 27, 27a, 28, 29, 29a, 30, 31, 32, 33, 33a, 34a, 35, 35a, 36, 37, 38, 39, 40, 42b, 43, 44, 4 en 47** zijn opgesteld ten behoeve van intern beraad en bevat persoonlijke beleidsopvattingen. Ik verstrek daarover geen informatie.

Met betrekking tot documenten die conceptversies van rapporten en brieven aan de Tweede Kamer bevatten merk ik het volgende op. Ik ben van oordeel dat de concepten voor zover ze afwijken van de definitieve versies persoonlijke beleidsopvattingen bevatten. Voor zover de concepten overeenkomen met definitieve versies zijn ze reeds openbaar gemaakt en is de Wob daarop niet van toepassing.

Ik acht het niet in het belang van een goede en democratische bestuursvoering indien de standpunten van ambtenaren zelfstandig worden betrokken in de publieke discussie. Ik zie dan ook geen aanleiding om met toepassing van artikel 11, tweede lid, van de Wob in niet tot personen herleidbare vorm informatie te verstrekken over deze persoonlijke beleidsopvattingen.

Voor zover er ook feitelijke informatie in het document staat, is die informatie zodanig verweven met de persoonlijke beleidsopvattingen dat die daar niet los van kan worden gezien. Ik heb daarom besloten dit document in zijn geheel te weigeren.

Wijze van openbaarmaking

De documenten die met dit besluit (gedeeltelijk) openbaar worden gemaakt treft u bij dit besluit in kopie aan.

Dit besluit en de stukken die met dit besluit voor een ieder openbaar worden, worden geanonimiseerd op www.rijksoverheid.nl geplaatst.

Een afschrift van dit besluit zend ik aan belanghebbenden.

Hoogachtend,

De Minister van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit,
namens deze:



mw. E. Heijblom
Wvd. pSG-LNV

Een belanghebbende die bezwaar heeft tegen de weigering om informatie openbaar te maken kan binnen zes weken na de dag waarop dit is bekend gemaakt een bezwaarschrift indienen. Het bezwaarschrift moet door de indiener zijn ondertekend en bevat ten minste zijn naam en adres, de dagtekening, een omschrijving van het besluit waartegen het bezwaar is gericht en de gronden waarop het bezwaar rust. Dit bezwaarschrift moet worden gericht aan de Minister van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit directie Wetgeving en Juridische Zaken, Postbus 20401, 2500 EK 's-Gravenhage. Dit besluit is verzonden op de in de aanhef vermelde datum.

Bijlage 1 – Relevante artikelen uit de Wob

Artikel 1

In deze wet en de daarop berustende bepalingen wordt verstaan onder:

- a. document: een bij een bestuursorgaan berustend schriftelijk stuk of ander materiaal dat gegevens bevat;
- b. bestuurlijke aangelegenheid: een aangelegenheid die betrekking heeft op beleid van een bestuursorgaan, daaronder begrepen de voorbereiding en de uitvoering ervan;
- c. intern beraad: het beraad over een bestuurlijke aangelegenheid binnen een bestuursorgaan, dan wel binnen een kring van bestuursorganen in het kader van de gezamenlijke verantwoordelijkheid voor een bestuurlijke aangelegenheid;
- d. niet-ambtelijke adviescommissie: een van overheidswege ingestelde instantie, met als taak het adviseren van een of meer bestuursorganen en waarvan geen ambtenaren lid zijn, die het bestuursorgaan waaronder zij ressorteren adviseren over de onderwerpen die aan de instantie zijn voorgelegd. Ambtenaren, die secretaris of adviserend lid zijn van een adviesinstantie, worden voor de toepassing van deze bepaling niet als leden daarvan beschouwd;
- e. ambtelijke of gemengd samengestelde adviescommissie: een instantie, met als taak het adviseren van één of meer bestuursorganen, die geheel of gedeeltelijk is samengesteld uit ambtenaren, tot wier functie behoort het adviseren van het bestuursorgaan waaronder zij ressorteren over de onderwerpen die aan de instantie zijn voorgelegd;
- f. persoonlijke beleidsopvatting: een opvatting, voorstel, aanbeveling of conclusie van een of meer personen over een bestuurlijke aangelegenheid en de daartoe door hen aangevoerde argumenten;
- g. milieu-informatie: hetgeen daaronder wordt verstaan in artikel 19.1a van de Wet milieubeheer;
- h. hergebruik: het gebruik van informatie die openbaar is op grond van deze of een andere wet en die is neergelegd in documenten berustend bij een overheidsorgaan, voor andere doeleinden dan het oorspronkelijke doel binnen de publieke taak waarvoor de informatie is geproduceerd;
- i. overheidsorgaan:
 - 1°. een orgaan van een rechtspersoon die krachtens publiekrecht is ingesteld, of
 - 2°. een ander persoon of college, met enig openbaar gezag bekleed.

Artikel 3

1. Een ieder kan een verzoek om informatie neergelegd in documenten over een bestuurlijke aangelegenheid richten tot een bestuursorgaan of een onder verantwoordelijkheid van een bestuursorgaan werkzame instelling, dienst of bedrijf.
2. De verzoeker vermeldt bij zijn verzoek de bestuurlijke aangelegenheid of het daarop betrekking hebbend document, waarover hij informatie wenst te ontvangen.
3. De verzoeker behoeft bij zijn verzoek geen belang te stellen.

4. Indien een verzoek te algemeen geformuleerd is, verzoekt het bestuursorgaan de verzoeker zo spoedig mogelijk om zijn verzoek te preciseren en is het hem daarbij behulpzaam.

5. Een verzoek om informatie wordt ingewilligd met inachtneming van het bepaalde in de artikelen 10 en 11.

Artikel 6

1. Het bestuursorgaan beslist op het verzoek om informatie zo spoedig mogelijk, doch uiterlijk binnen vier weken gerekend vanaf de dag na die waarop het verzoek is ontvangen.

2. Het bestuursorgaan kan de beslissing voor ten hoogste vier weken verdagen. Van de verdaging wordt voor de afloop van de eerste termijn schriftelijk gemotiveerd mededeling gedaan aan de verzoeker.

3. Onverminderd artikel 4:15 van de Algemene wet bestuursrecht wordt de termijn voor het geven van een beschikking opgeschort gerekend vanaf de dag na die waarop het bestuursorgaan de verzoeker mededeelt dat toepassing is gegeven aan artikel 4:8 van de Algemene wet bestuursrecht, tot de dag waarop door de belanghebbende of belanghebbenden een zienswijze naar voren is gebracht of de daarvoor gestelde termijn ongebruikt is verstreken.

4. Indien de opschorting, bedoeld in het derde lid, eindigt, doet het bestuursorgaan daarvan zo spoedig mogelijk mededeling aan de verzoeker, onder vermelding van de termijn binnen welke de beschikking alsnog moet worden gegeven.

5. Indien het bestuursorgaan heeft besloten informatie te verstrekken, wordt de informatie verstrekt tegelijk met de bekendmaking van het besluit, tenzij naar verwachting een belanghebbende bezwaar daar tegen heeft, in welk geval de informatie niet eerder wordt verstrekt dan twee weken nadat de beslissing is bekendgemaakt.

6. Voor zover het verzoek betrekking heeft op het verstrekken van milieu-informatie:

- a. bedraagt de uiterste beslistermijn in afwijking van het eerste lid twee weken indien het bestuursorgaan voornemens is de milieu-informatie te verstrekken terwijl naar verwachting een belanghebbende daar bezwaar tegen heeft;
- b. kan de beslissing slechts worden verdaagd op grond van het tweede lid, indien de omvang of de gecompliceerdheid van de milieu-informatie een verlenging rechtvaardigt;
- c. zijn het derde en vierde lid niet van toepassing.

Artikel 7

1. Het bestuursorgaan verstrekt de informatie met betrekking tot de documenten die de verlangde informatie bevatten door:

- a. kopie ervan te geven of de letterlijke inhoud ervan in andere vorm te verstrekken,
- b. kennisneming van de inhoud toe te staan,
- c. een uittreksel of een samenvatting van de inhoud te geven, of
- d. inlichtingen daaruit te verschaffen.

2. Het bestuursorgaan verstrekt de informatie in de door de verzoeker verzochte vorm, tenzij:

- a. het verstrekken van de informatie in die vorm redelijkerwijs niet gevegd kan worden;
 - b. de informatie reeds in een andere, voor de verzoeker gemakkelijk toegankelijke vorm voor het publiek beschikbaar is.
3. Indien het verzoek betrekking heeft op milieu-informatie als bedoeld in artikel 19.1a, eerste lid, onder b, van de Wet milieubeheer, verstrekt het bestuursorgaan, zo nodig, en indien deze informatie voorhanden is, tevens informatie over de methoden die zijn gebruikt bij het samenstellen van eerstbedoelde informatie.

Artikel 10

1. Het verstrekken van informatie ingevolge deze wet blijft achterwege voor zover dit:

- a. de eenheid van de Kroon in geaar zou kunnen brengen;
 - b. de veiligheid van de Staat zou kunnen schaden;
 - c. bedrijfs- en fabricagegegevens betreft, die door natuurlijke personen of rechtspersonen vertrouwelijk aan de overheid zijn meegedeeld;
 - d. persoonsgegevens betreft als bedoeld in de artikelen 9, 10 en 87 van de Algemene verordening gegevensbescherming, tenzij de verstrekking kennelijk geen inbreuk op de persoonlijke levenssfeer maakt.
2. Het verstrekken van informatie ingevolge deze wet blijft eveneens achterwege voor zover het belang daarvan niet opweegt tegen de volgende belangen:
- a. de betrekkingen van Nederland met andere staten en met internationale organisaties;
 - b. de economische of financiële belangen van de Staat, de andere publiekrechtelijke lichamen of de in artikel 1a, onder c en d, bedoelde bestuursorganen;
 - c. de opsporing en vervolging van strafbare feiten;
 - d. inspectie, controle en toezicht door bestuursorganen;
 - e. de eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer;
 - f. het belang, dat de geadresseerde erbij heeft als eerste kennis te kunnen nemen van de informatie;
 - g. het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling van bij de aangelegenheid betrokken natuurlijke personen of rechtspersonen dan wel van derden.
3. Het tweede lid, aanhef en onder e, is niet van toepassing voorzover de betrokken persoon heeft ingestemd met openbaarmaking.
4. Het eerste lid, aanhef en onder c en d, het tweede lid, aanhef en onder e, en het zevende lid, aanhef en onder a, zijn niet van toepassing voorzover het milieu-informatie betreft die betrekking heeft op emissies in het milieu. Voorts blijft in afwijking van het eerste lid, aanhef en onder c, het verstrekken van milieu-informatie uitsluitend achterwege voorzover het belang van openbaarmaking niet opweegt tegen het daar genoemde belang.
5. Het tweede lid, aanhef en onder b, is van toepassing op het verstrekken van milieu-informatie voor zover deze handelingen betreft met een vertrouwelijk karakter.
6. Het tweede lid, aanhef en onder g, is niet van toepassing op het verstrekken van milieu-informatie.

7. Het verstrekken van milieu-informatie ingevolge deze wet blijft eveneens achterwege voorzover het belang daarvan niet opweegt tegen de volgende belangen:

- a. de bescherming van het milieu waarop deze informatie betrekking heeft;
- b. de beveiliging van bedrijven en het voorkomen van sabotage.

8. Voorzover het vierde lid, eerste volzin, niet van toepassing is, wordt bij het toepassen van het eerste, tweede en zevende lid op milieu-informatie in aanmerking genomen of deze informatie betrekking heeft op emissies in het milieu.

Artikel 11

1. In geval van een verzoek om informatie uit documenten, opgesteld ten behoeve van intern beraad, wordt geen informatie verstrekt over daarin opgenomen persoonlijke beleidsopvattingen.

2. Over persoonlijke beleidsopvattingen kan met het oog op een goede en democratische bestuursvoering informatie worden verstrekt in niet tot personen herleidbare vorm. Indien degene die deze opvattingen heeft geuit of zich erachter heeft gesteld, daarmee heeft ingestemd, kan de informatie in tot personen herleidbare vorm worden verstrekt.

3. Met betrekking tot adviezen van een ambtelijke of gemengd samengestelde adviescommissie kan het verstrekken van informatie over de daarin opgenomen persoonlijke beleidsopvattingen plaatsvinden, indien het voornemen daartoe door het bestuursorgaan dat het rechtstreeks aangaat aan de leden van de adviescommissie voor de aanvang van hun werkzaamheden kenbaar is gemaakt.

4. In afwijking van het eerste lid wordt bij milieu-informatie het belang van de bescherming van de persoonlijke beleidsopvattingen afgewogen tegen het belang van openbaarmaking. Informatie over persoonlijke beleidsopvattingen kan worden verstrekt in niet tot personen herleidbare vorm. Het tweede lid, tweede volzin, is van overeenkomstige toepassing.

Bijlage 2 – Inventarislijst

Nummer	Datum	Soort document	Onderwerp	Beoordeling	Wob	Afzender	Ontvanger
1.	27-9-2011 00:01	E-mail	FW: Bijensterfte en gewasbeschermingsmiddelen - kritisch commentaar literatuurstudie WUR	Deels openbaar	10.2.e	Universiteit Utrecht	Ministerie van EZK Wageningen University & Research Universiteit Utrecht Leiden Universiteit Leeg Agro Vrije Universiteit Amsterdam UGent Tweede Kamer
a.	26-9-2011	Bijlage	Brief_UU_Bijensterfte_Gewasbescherming_Bleker	Deels openbaar	10.2.e	Universiteit Utrecht	Ministerie van EZK Ministerie van LNV
b.	26-9-2011	Bijlage	Detailcommentaar_Neonicotinoïden_TjeerdBlacquire (Conceptversie van het rapport)	Deels openbaar	10.2.e	Universiteit Utrecht	WUR UGent Vrije Universiteit Amsterdam
2.	6-10-2011	Brief	Reactie_op_uw_brief_d_d_26_september_2011_in_zake_literatuuronderzoek_neonicotinoïden_en_bijensterfte	Deels openbaar	10.2.e	Ministerie van EZK Ministerie van LNV	Universiteit Utrecht
3.	2-4-2012 15:01	E-mail	FW: VERTROUWELIJK Reactie RvB op klacht bijenartikel	Deels openbaar	10.2.e	Wageningen University & Research	Ministerie van EZK Ministerie van LNV
a.	19-3-2012	Bijlage	Inhoudelijk-onderzoek-klacht-reviewartikel-bijensterfte	Deels openbaar	10.2.e	Vertrouwenspersoon wetenschappelijke integriteit Wageningen UR	Raad van Bestuur Wageningen University & Research
b.	19-3-2012	Bijlage	Bijlagen bij rapport nav klacht Bijensterfte	Deels openbaar	10.2.e	Vertrouwenspersoon wetenschappelijke integriteit Wageningen UR	Raad van Bestuur Wageningen University & Research
4.	22-5-2012 11:02	E-mail	RE: Financiering literatuur onderzoek	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Wageningen University & Research

5.	11-5-2012 16:11	E-mail	RE: Message from "RNPF3349D"	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Wageningen University & Research Ministerie van LNV	Ministerie van LNV Wageningen University & Research
6.	10-5-2012 22:59	E-mail	FW: Message from "RNPF3349D"	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Wageningen University & Research
a.	16-5-2011	Bijlage	Neonicotinen helpdesk april 2011 versie 16 mei definitief Werkplan van de opdracht	Deels openbaar	10.2.e	Wageningen University & Research	Ministerie van EZK Ministerie van LNV
b.	26-4-2012	bijlage	20120426163430 482 Factuur	Niet openbaar	10.1.c 10.2.e	Wageningen University & Research	Ministerie van EZK Ministerie van LNV
7.	19-4-2012 09:35	E-mail	RE: Rapport afhandelen klacht van	Deels openbaar	10.2.e	Wageningen University & Research Ministerie van EZK Ministerie van LNV	Ministerie van EZK Ministerie van LNV Wageningen University & Research
a.	19-3-2012	Bijlage	Inhoudelijk- onderzoek-klacht- reviewartikel- bijensterfte	Deels openbaar Identiek aan documentn ummer 3a	10.2.e	Vertrouwensperso on wetenschappelijke integriteit Wageningen UR	Raad van Bestuur Wageningen University & Research
b.	19-3-2012	Bijlage	Bijlagen bij rapport nav Klacht bijensterfte	Deels openbaar Identiek aan documentn ummer 3b	10.2.e	Vertrouwensperso on wetenschappelijke integriteit Wageningen UR	Raad van Bestuur Wageningen University & Research
8.	12-4-2012 14:49	E-mail	RE: Vragen uit de TK nav lit onderzoek	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Wageningen University & Research Ministerie van EZK Ministerie van LNV	Ministerie van EZK Ministerie van LNV Wageningen University & Research
a.	16-5-2011	Bijlage	Neonicotinen helpdesk april 2011 versie 16 mei definitief Werkplan van de opdracht	Identiek aan documentn ummer 6a Deels openbaar	10.2.e	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK

9.	29-3-2012 20:48	E-mail	RE: Vragen over rapport - vervolg richting EU	Deels openbaar	10.2.e	Wageningen University & Research Ministerie van EZK Ministerie van LNV	Ministerie van EZK Ministerie van LNV Wageningen University & Research
a.	Maart 2012	Bijlage	Blacquiére Smagghe Van Gestel & Mommaerts 2012 Neonicotinoids and bees online (Engelstalige publicatie PDF definitief rapport)	Openbaar		Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK
10.	27-3-2012 18:17	E-mail	Vragen over rapport - vervolg richting EU	Deels openbaar	10.2.e	Ministerie van LNV Ministerie van EZK	Wageningen University & Research
a.	27-3-2012	bijlage	TKN Bijlage Ibg 19 06 Kamerbrief literatuuronderzoe k neonicotinoïden en sterfte van bijen	Reeds openbaar https://www.tweedekamer.nl/kamerstukken/brieven_regering/detail?id=2012Z06203&did=2012D13403		Ministerie van EZK Ministerie van LNV	Tweede Kamer
11.	27-3-2012 16:13	E-mail	FW: PAV/260513 Literatuurstudie Neonocitinoiden en fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken	Deels openbaar	10.2.e	Ministerie van LNV Ministerie van EZK	Ministerie van LNV Ministerie van EZK Ministerie van AZ Tweede Kamer
a.	27-3-2012	Bijlage	260513 pav tk bijen DOC 06 Kamerbrief literatuuronderzoe k neonicotinoïden en sterfte van bijen	Identiek aan documentn ummer 10a Reeds openbaar		Ministerie van EZK Ministerie van LNV	Tweede kamer
b.	Februari 2012	Bijlage	260513 pav tk bijlage rapport (definitief)	Reeds openbaar https://www.tweedekamer.nl/kamerstukken/brieven_regering/detail?id=2012Z06203		Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK

				&did=2012D13403			
12.	22-3-2012 18:13	E-mail	melding onrust over bijzonderzoek	Deels openbaar	10.2.e	Ministerie van LNV	Ministerie van LNV Ministerie van EZK
13.	13-3-2012 11:51	E-mail	[WARNING : MESSAGE ENCRYPTED]gecor rigeerde rapport	Deels openbaar	10.2.e	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK Wageningen University & Research
a.	Maart 2012	Bijlage	Rapport 439_Totaal_LR corrected maart 12 (conceptversie van het rapport)	Niet openbaar	11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK
14.	9-3-2012 11:23	E-mail	FW: Aanbiedingsbrief TK literatuuronderzoe k Neonicotinoïden	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Ministerie van LNV Ministerie van EZK	Ministerie van LNV Ministerie van EZK Ministerie van BZK
a.	21-2-2012	Bijlage	PDOC01- #260513-v1- Literatuurstudie_ Neonocitinoïden_e n_fipronil_en_ster fte_van_bijen_en _bijenvolken 1 (conceptversie brief aan tweede kamer)	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Ministerie van EZK Ministerie van LNV	Tweede Kamer
15.	21-2-2012 17:28	E-mail	artikelkje Bijenbladen en bijen@wur nieuwsbrief	Deels openbaar	10.2.e	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van WUR
a.	21-2-2012	Bijlage	Blacquièr et al neonicotinoïden en bijen houden	Openbaar		Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK
16.	20-2-2012 14:48	E-mail	RE: concept brief	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Wageningen University & Research Ministerie van LNV Ministerie van EZK	Ministerie van LNV Ministerie van EZK Wageningen University & Research
a.	20-2-2012	Bijlage	Conceptbrief bijen (2 (conceptversie brief aan tweede kamer)	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van EZK Ministerie van LNV
17.	12-2-2012 21:08	E-mail	FW: versie tig: laatste	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Ministerie van LNV Ministerie van EZK Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK Wageningen University & Research

a.	Februari 2012	Bijlage	Rapport 439_binnenwerk corr tj (conceptversie van het rapport)	Niet openbaar	11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK
b.	8-2-2012	Bijlage	Honingbijen en hun	Openbaar		Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK
c.	8-2-2012	Bijlage	Output PRI bijen (5) versie 1 feb (conceptversie van het rapport Neonicotinoïden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken)	Niet openbaar	11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK
18.	10-2-2012 11:08	E-mail	Aan het ministerie EL&I	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Ministerie van LNV	Ministerie van EZK Ministerie van LNV
a.	10-2-2012	Bijlage	Conceptbrief bijen (1) (conceptversie)	Niet openbaar	11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van EZK Ministerie van LNV
19.	9-2-2012 22:14	E-mail	schotschrift	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV WUR
a.	10-2-2012	Bijlage	Noten bij de brief van staatssecretaris Bleker van 27 sept 2011 (conceptversie)	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van EZK Ministerie van LNV
20.	8-2-2012 15:59	E-mail	RE: versie tig: laatste	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Wageningen University & Research Ministerie van LNV Ministerie van EZK	Ministerie van LNV Ministerie van EZK Wageningen University & Research Ministerie van VWS
a.	8-2-2012	Bijlage	Rapport 439_binnenwerk corr tj (conceptversie van het rapport)	Niet openbaar	11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK
b.	8-2-2012	Bijlage	Honingbijen en hun (conceptversie) Identiek aan documentnummer 17b	Niet openbaar	11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK

c.	8-2-2012	Bijlage	Output PRI bijen (5) versie 1 feb (conceptversie van het rapport Neonicotinoïden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken)	Niet openbaar	11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK
21.	7-2-2012 16:53	E-mail	RE: versie tig: laatste	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV
a.	7-2-2012	Bijlage	Output PRI bijen (5) versie 1 feb.(PB2) (conceptversie van het rapport Neonicotinoïden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken)	Niet openbaar	11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK
22.	7-2-2012 13:17	E-mail	FW: versie tig: laatste	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Wageningen University & Research	Wageningen University & Research Ministerie van LNV Ministerie van EZK
a.	7-2-2012	Bijlage	Output PRI bijen (5) versie 1 feb.(PB) (conceptversie van het rapport Neonicotinoïden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken)	Niet openbaar	11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK
b.	7-2-2012	Bijlage	Output PRI bijen (5) versie 1 feb (conceptversie van het rapport Neonicotinoïden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken)	Niet openbaar	11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK
23.	6-2-2012 23:14	E-mail	versie tig: laatste	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK Wageningen University & Research
a.	7-2-2012	Bijlage	Output PRI bijen (5) versie 1 (conceptversie van het rapport Neonicotinoïden en Fipronil en	Niet openbaar		Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK

			sterfte van bijen en bijenvolken)				
24.	2-2-2012 09:01	E-mail	FW: rapport volgende versie	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Wageningen University & Research Ministerie van LNV Ministerie van EZK	Ministerie van LNV Ministerie van EZK Wageningen University & Research
a.	2-2-2012	Bijlage	Output PRI bijen (5) (conceptversie van het rapport Neonicotinoïden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken)	Niet openbaar	11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK
b.	2-2-2012	Bijlage	Output PRI bijen (5) versie 1 feb (conceptversie van het rapport Neonicotinoïden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken)	Niet openbaar	11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK
25.	1-2-2012 17:40	E-mail	rapport volgende versie	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK
a.	1-2-2012	Bijlage	Output PRI bijen (5) (conceptversie van het rapport Neonicotinoïden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken)	Niet openbaar	11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK
b.	1-2-2012	Bijlage	Output PRI bijen (5) versie 1 feb (conceptversie van het rapport Neonicotinoïden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken)	Niet openbaar	11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK
26.	31-1-2012 16:16	E-mail	RE: Literatuuronderzoek bijen; reacties graag vanmorgen	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Ministerie van LNV Ministerie van EZK	Ministerie van LNV Ministerie van EZK

27.	26-1-2012 22:20	E-mail	rapport neonicotinoiden	Deels openbaar	10.2.e 11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK Wageningen University & Research UGhent Vrije Universiteit Amsterdam
a.	25-1-2012	Bijlage	Neonicotinoïden en Fipronil 25 jan 2012 accepted (conceptversie van het rapport)	Niet openbaar	11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK
28.	30-11- 2011 13:50	E-mail	RE: Lit. onderzoek bijenstrefte	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Wageningen University & Research Ministerie van LNV Ministerie van EZK	Ministerie van LNV Ministerie van EZK Wageningen University & Research UGhent Vrije Universiteit Amsterdam
29.	26-10- 2011 12:43	E-mail	rapport neonicotinoïden	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK Ministerie van VWS Wageningen University & Research UGhent Vrije Universiteit Amsterdam
a.	26-10- 2011	Bijlage	Neonicotinoïden en Fipronil I corr + MJD accepted (conceptversie van het rapport Neonicotinoïden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken)	Niet openbaar	11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK
30.	24-10- 2011 16:11	E-mail	RE: Eindconcept literatuuronderzoe k en stavaza inbreng	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Ministerie van LNV Ministerie van EZK Wageningen University & Research	Wageningen University & Research Ministerie van LNV Ministerie van EZK
31.	3-10-2011 15:55	E-mail	RE: reactie op	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Ministerie van LNV Ministerie van EZK Wageningen University & Research	Wageningen University & Research Ministerie van LNV Ministerie van EZK

32.	27-9-2011 15:26	E-mail	RE: PDOC01- #233773-v1- Reactie_op_uw_b rief_d_d__26_sep tember_2011_inz ake_literatuurond erzoek_neonicotin oiden_en_	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Ministerie van LNV Ministerie van EZK	Ministerie van LNV Ministerie van EZK Ministerie van VWS
33.	27-9-2011 12:42	E-mail	PDOC01- #233773-v1- Reactie_op_uw_b rief_d_d__26_sep tember_2011_inz ake_literatuurond erzoek_neonicotin oiden_en_	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Ministerie van LNV Ministerie van EZK	Ministerie van LNV Ministerie van EZK
a.	29-9-2011	bijlage	PDOC01- #233773-v1- Reactie_op_uw_b rief_d_d__26_sep tember_2011_inz ake_literatuurond erzoek_neonicotin oiden_en_ (conceptversie brief)	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Ministerie van LNV Ministerie van EZK	Universiteit Utrecht
34.	13-9-2011 16:00	E-mail	kritisch lezen van Neonicotinoïden en bijen rapport	Deels openbaar	10.2e	Wageningen University & Research	Universiteit Utrecht Leiden Universiteit Ministerie van LNV Wageningen University & Research Ministerie van EZK Vrije Universiteit Amsterdam UGhent
a.	13-9-2011	Bijlage	Neonicotinoïden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken versie voor EL&I Sept 2011 (conceptversie van het rapport Neonicotinoïden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken)	Niet openbaar	11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK
35.	11-9-2011 16:32	E-mail	rapport nu met uitleg bij tabel 1	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Wageningen University & Research UGhent Vrije Universiteit Amsterdam

a.	11-9-2011	Bijlage	Neonicotinoïden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken versie voor EL&I Sept 2011 (conceptversie van het rapport Neonicotinoïden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken)	Niet openbaar	11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK
36.	do 8-9-2011 15:39	E-mail	RE: AO 07-09-'11 en literatuuronderzoek	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Wageningen University & Research Ministerie van LNV Ministerie van EZK	Ministerie van LNV Ministerie van EZK Wageningen University & Research Ministerie van VWS
37.	7-9-2011 16:31	E-mail	RE: AO 07-09-'11 en literatuuronderzoek	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Ministerie van LNV Ministerie van EZK	Ministerie van LNV Wageningen University & Research Ministerie van VWS Ministerie van EZK
38.	6-9-2011 14:51	E-mail	RE: Stavaza Neonicotinoiden rapport:	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Wageningen University & Research Ministerie van LNV Ministerie van EZK	Ministerie van LNV Wageningen University & Research
39.	2-9-2011 00:11	E-mail	RE: Stavaza Neonicotinoiden rapport:	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Wageningen University & Research Ministerie van LNV	Ministerie van LNV Wageningen University & Research
40.	24-8-2011 16:15	E-mail	RE: verzoek kritisch te lezen - rapport effecten Neonicotinoiden op bijen	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Ministerie van EZK Wageningen University & Research Ministerie van LNV Universiteit Utrecht	Wageningen University & Research Ministerie van LNV Ministerie van EZK Universiteit Utrecht Leiden Universiteit Vrije Universiteit Amsterdam UGhent Tweede kamer
41.	22-8-2011 11:14	E-mail	Re: verzoek kritisch te lezen - rapport effecten Neonicotinoiden op bijen	Deels openbaar	10.2.e		Universiteit Utrecht Leiden Universiteit Ministerie van LNV Ministerie van EZK Wageningen University & Research Vrije Universiteit Amsterdam UGhent

							Info Bijenonderzoek Tweede Kamer
a.	8-7-2011	Bijlage	Letter DiSTA_Unibo_EN G 080711	Openbaar		Prof. Stefano Maini	Europees Parlement
b.	22-8-2011	Bijlage	Neonicotinen helpdesk plan van aanpak versie aug 2011 Werkplan van de opdracht	Deels openbaar Identiek aan documentn ummer 6a	10.2.e	Wageningen University & Research	Universiteit Utrecht Leiden Universiteit Wageningen University & Research Ministerie van LNV Ministerie van EZK Vrije Universiteit Amsterdam UGhent
42.	18-8-2011 21:06	E-mail	verzoek kritisch te lezen	Deels openbaar	10.2.e	Wageningen University & Research	Universiteit Utrecht Leiden Universiteit Wageningen University & Research Ministerie van LNV Ministerie van EZK Vrije Universiteit Amsterdam UGhent
a.	18-8-2011	Bijlage	Neonicotinen helpdesk plan van aanpak versie aug 2011 Werkplan van de opdracht	Deels openbaar Identiek aan documentn ummer 6a	10.2.e	Wageningen University & Research	Universiteit Utrecht Leiden Universiteit Wageningen University & Research Ministerie van LNV Ministerie van EZK Vrije Universiteit Amsterdam UGhent
b	18-8-2011	Bijlage	Neonicotinoïden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken versie voor EL&I 18 aug 2011 (conceptversie van het rapport)	Niet openbaar	11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK
43.	21-5-2012 16:28	E-mail	FW: Budgetverschuivin gen 2011/2012	Niet openbaar	10.1.c 10.2.e 11.1	Ministerie van LNV Ministerie van EZK	Ministerie van LNV Wageningen University & Research Ministerie van LNV
44.	20-3-2012 15:13	E-mail	RE begeleidingscom missies Bijenonderzoek	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Ministerie van LNV Ministerie van EZK Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK Wageningen University & Research
45.	14-2-2012 10:36	E-mail	RE: Afronden rapport	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK

						Ministerie van LNV Ministerie van EZK	Wageningen University & Research
46.	20-12-2012	Brief	Toezegging_tijdens_AO_gewasbeschermingsmiddelen_van_10_oktober_over_activiteiten_ter_versterking_van_de_bijensector	Deels openbaar	10.2.e	Ministerie van EZK	Tweede Kamer
47.	5-10-2012	Nota	AO_TK_10_oktober_2012_m_b_t_gewasbeschermingsmiddelen	Niet openbaar	10.2.e 11.1	Ministerie van EZK Ministerie van LNV	Ministerie van EZK Ministerie van LNV
48.	13-3-2012	Memo	Toelichting_voor_de_staatsecretariats_brief_Tweede_Kamer_Literatuuronderzoek_bij_Toelichting_voor_de_stas_bij_de_brief_aan_de_Tweede_kamer_over_het_literatuuronderzoek	Openbaar		Ministerie van EZK Ministerie van LNV	Ministerie van EZK Ministerie van LNV
49.	21-2-2012	Brief en eindrapport	Toezenen_eindrapport_Neonicotinoiden_en_Fipronil_en_sterfte_van_bijen_en_bijenvolken_Toezenen_eindrapport_Neonicotinoiden_en_Fipronil_en_sterfte_van_bijen_en_bijen	Deels openbaar	10.2.e	Wageningen University & Research	Ministerie van LNV Ministerie van EZK

Van: 10.2.e
Aan: 10.2.e
Onderwerp: FW: Bijensterfte en gewasbeschermingsmiddelen - kritisch commentaar literatuurstudie WUR
Datum: dinsdag 10 december 2019 11:19:53
Bijlagen: [Brief UU Bijensterfte Gewasbescherming Bleker.pdf](#)
[Detailcommentaar 10.2.e](#) [Neonicotinoïden TjeerdBlacquire MJ250911.pdf](#)

-----Oorspronkelijk bericht-----

Van: 10.2.e 10.2.e @uu.nl>

Verzonden: dinsdag 27 september 2011 00:01

Aan: staatssecretaris@minez.nl

CC: 10.2.e @wur.nl; 10.2.e @uu.nl; 10.2.e @cml.leidenuniv.nl;
 10.2.e @cml.leidenuniv.nl; 10.2.e ; 10.2.e 10.2.e t@minez.nl>;
 10.2.e @minez.nl>; 10.2.e @leeg.agro.nl>;
 10.2.e @minez.nl>; 10.2.e @wur.nl; 10.2.e @wur.nl;
 10.2.e @vu.nl; 10.2.e @ugent.be; 10.2.e @ugent.be; voorzitter@tweedekamer.nl;
 10.2.e @tweedekamer.nl; 10.2.e @tweedekamer.nl; 10.2.e @tweedekamer.nl;
 10.2.e @tweedekamer.nl; 10.2.e @tweedekamer.nl; 10.2.e @tweedekamer.nl;
 10.2.e @tweedekamer.nl; 10.2.e @tweedekamer.nl

Onderwerp: Bijensterfte en gewasbeschermingsmiddelen - kritisch commentaar literatuurstudie WUR

Geachte heer Bleker,

In reactie op uw verzoek om kritisch commentaar op het eindconcept van de literatuurstudie "Neonicotinoïden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken" stuur ik u bijgaande brief en bijlagen.

Ik cc dit bericht naar de wetenschappelijk projectleider en de andere betrokken onderzoekers en naar betrokken kamerleden en verwijs verder naar de inhoud van de bijgaande brief.

Hoogachtend,

10.2.e

--

10.2.e

Utrecht University
 Faculty of Science
 Copernicus Institute
 Department of Science Technology and Society

Budapestlaan 6
 3584 CD Utrecht
 The Netherlands
 tel +31 30 10.2.e
 fax +31 30 10.2.e
 Email: 10.2.e @uu.nl

Invited Professor at REEDS (formerly known as C3ED) Recherche en Economie-Ecologie, Eco-innovation et ingénierie du Développement Durable Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, France

<http://www.researcherid.com/rid/B-6302-2008>

<http://www.jvds.nl>

<http://www.scopus.com/authid/detail.url?authorId=7003576366>

<http://www.nusap.net>

<http://nws.chem.uu.nl>



Retourgegevens: Budapestlaan 6, 3584 CD Utrecht

Natuurwetenschap & Samenleving
Copernicus Instituut

Aan de Staatssecretaris van Economische Zaken,
Landbouw & Innovatie
de heer H. Bleker

Uw kenmerk
dossier 32372
Ons kenmerk
110926/JvdS

Faxnummer

(030) 10.2.e

Telefoon

(030) 10.2.e

E-mail

10.2.e @uu.nl

Blad

Blad 1 van 5

Datum

26 september 2011

Onderwerp

Neonicotinoïden en bijensterfte

Geachte heer Bleker,

Middels deze brief geef ik mijn commentaar op het eindconcept van de literatuurstudie "*Neonicotinoiden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken*". Ik heb het conceptrapport bestudeerd en heb daarbij een reeks omissies vastgesteld die van zodanige aard zijn dat deze niet te repareren zijn met het simpelweg geven van reviewcommentaar dat vervolgens door de auteurs wordt verwerkt: de studie voldoet niet aan algemene basiseisen van *good scientific practice*.

Voor ik dat toelicht moet mij het volgende van het hart. Tot mijn verbazing vernam ik dat u in het AO gewasbeschermingsmiddelen en bijensterfte van 7 september j.l. het volgende heeft gezegd over mijn betrokkenheid bij deze literatuurstudie:

"Daarbij is ook een soort meeleesgroep, een second opinion-groep, betrokken, inclusief de heer Van der Sluijs van de Universiteit van Utrecht, die meeleeft met de conceptrapportage. Mede op zijn verzoek is ook de periode van meelesen nog met een maand verlengd zodat dit allemaal gedegen kan gebeuren. Dat is ook de reden dat het wat langer duurt dan wij eigenlijk wilden. Dat betekent dat wij het komend najaar de uitkomsten van het literatuuronderzoek aan u kunnen melden."

De feiten liggen anders. Ik ben in het geheel niet betrokken geweest bij betreffende studie en had er nog nooit van gehoord tot dat ik op 22 augustus 2011 een mail ontving van de kennelijke wetenschappelijk projectleider de heer Blacqui re van Plant Research International. In die mail legde hij mij een eindconcept van deze studie voor, deelde mij eenzijdig mede dat ik in een kritische leesgroep zou zitten en schreef me: "*Het ministerie wilde graag dat het geschreven en gedragen werd door een brede en diverse groep schrijvers en kritische lezers van diverse universiteiten. Vandaar de vier auteurs van drie (- vier) universiteiten en een leesgroep van nog eens twee universiteiten.*". In die mail stelde de projectleider voorts dat zijn rapport op 7 september in het AO van de kamer zou worden besproken en dat daarom de volgende dag (23 augustus) het commentaar der kritische lezers binnen moest zijn. In een offerte/werkplan dat was meegestuurd kwam ik tot mijn ontzetting ook mijn naam tegen (overigens foutief gespeld maar ik neem toch aan dat men mij bedoelde), opgevoerd als "*onafhankelijke lezer*" die "*tweede helft april tot 20 mei*" 2011 een tussenversie ter kritische lezing zou krijgen.

Ik ben er ontstemd over dat (a) mijn naam zonder mijn medeweten en zonder mijn consent op deze wijze is misbruikt voor de verwerving van onderzoeksgelden en (b) dat mijn naam is misbruikt voor het ten onrechte wekken van de schijn van mijn "betrokkenheid", en (c) dat ik pas *nadat* de studie was afgerond en een daaruit voortgevloeid Engelstalig artikel kennelijk reeds aan een wetenschappelijk tijdschrift was aangeboden voor het eerst van de studie hoorde en mij vervolgens 1 dag gegeven werd voor een kritische leestaak van het Nederlandstalige eindrapport waarvoor mij overigens geen middelen werden versterkt.

Anders dan u de Kamercommissie EL&I meedeelde heb ik ook nimmer verzocht om verlenging van de leestermijn. Ik heb geantwoord dat ik geen kans zag binnen de gestelde termijn van 1 dag te reageren en heb ondermeer gesteld dat ik niet bereid ben mij op enigerlei wijze te committeren aan deze studie en haar bevindingen.

Ik kan u echter de onbehoorlijke werkwijze van de wetenschappelijk projectleider niet aanrekenen en vertrouw erop dat het nimmer uw intentie is geweest de Kamer onjuist te informeren over mijn rol bij deze studie. Ik waardeer het zeer dat u zozeer hecht aan het ontvangen van mijn inhoudelijk commentaar op de voorliggende literatuurstudie dat u mij en de overige kennelijk beoogde "kritische lezers" daarvoor een maand extra de tijd (overigens niet de middelen) hebt aangeboden. Het is mij gelukt enige tijd vrij te maken om gehoor te geven aan uw wens. Ik richt mijn commentaar vanwege het bovenstaande - maar meer nog vanwege de aard van mijn commentaar - rechtstreeks aan u en zal deze brief per cc aan de wetenschappelijk projectleider doen toekomen. Gelet op het belang van het voorliggende vraagstuk cc ik deze brief ook naar Kamerleden die deelnamen aan de beraadslagingen over dossier 32372 (wijzing wet gewasbeschermingsmiddelen).

Zoals reeds aangegeven heb ik het conceptrapport bestudeerd en heb daarbij omissies vastgesteld die van zodanige aard zijn dat deze niet te repareren zijn met het simpelweg geven van reviewcommentaar dat vervolgens door de auteurs wordt verwerkt: de studie voldoet niet aan basiseisen van *good scientific practice*.

Meer specifiek motiveer ik dit oordeel als volgt:

- Ik stel vast dat een verantwoording ontbreekt van hoe de literatuur voor deze review is geïdentificeerd en geselecteerd en aan de hand van welke methodologische standaarden is geëvalueerd of elk van die publicaties de toets de kritiek kan doorstaan en hoe de literatuur vervolgens is geanalyseerd.
Basiscriteria van *good scientific practice* waaraan elke wetenschappelijke literatuurreview hoort te voldoen zijn:
 - o the literature is identified according to an explicit search strategy
 - o selected according to defined inclusion and exclusion criteria
 - o evaluated against consistent methodological standards.Alle drie deze elementen ontbreken in zowel de offerte als in het werkplan als in het nu voorliggende eindrapport.
- Ik stel vast dat er belangrijke studies missen, in een voorlopige inventarisatie mis ik er al 14 die niet gemist hadden mogen worden, ondermeer studie van Tennekes¹ naar chronische toxiciteit inclusief de reactie van Bayer Cropscience op die studie en het repliek van Tennekes op de kritiek van Bayer. Behalve Tennekes mis ik ook het werk van Sanchez Bayo², waardoor het deel over chronische toxiciteit op p9 van het conceptrapport niet *state-of-the-art* is en de plank nogal mis slaat. Ook mis ik een reeks wetenschappelijke studies die onafhankelijk van elkaar aantoonde dat er een wederzijds versterkend effect is (*synergie*) tussen de parasitaire darmschimmel *Nosema ceranae* en blootstelling aan sublethale dosis neonicotinoïden (bijvoorbeeld Vidau e.a. 2011³ maar ook het 2010 Colony Collapse Disorder Progress Report van het US Department of Agriculture). Ik mis ook een bespreking van mijn eigen wetenschappelijke publicaties, met name onze Maxim & Van der Sluijs 2010 studie⁴ die systematisch de vraag adresseert of het verband tussen bijensterfte in de jaren 90 en imidacloprid in de zonnebloem- en maïssteelgebieden in Frankrijk *causaal* is. Onze eerdere Maxim & van der Sluijs 2007 studie⁵ staat wel vermeld in de literatuurlijst maar wordt in de tekst van het rapport niet besproken, noch wordt er naar verwezen. Ook ons overige werk ontbreekt geheel.
- Ik stel vast dat bevindingen uit een aantal studies dat wel in de review bekeken is, selectief en op een eenzijdige wijze zijn gerepresenteerd en verwerkt in het rapport. In het bijzonder betreft dit de besproken veldstudies.

1 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2010.07.005> ; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2010.11.014> ; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2010.11.015>

2 <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-008-0290-1>

3 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0021550>

4 <http://dx.doi.org/10.1088/1748-9326/5/1/014006> en zie ook <http://environmentalresearchweb.org/cws/article/news/41522>

5 <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.12.052>

- Ik stel vast dat "conclusies" uit veldstudies die zelfs door het US Environmental Protection Agency zijn beoordeeld als "invalid" in het voorliggend rapport klakkeloos overgenomen zijn. Dit betreft ondermeer de studie van Cutler & Scott-Dupree 2007⁶, maar de 2001 veldstudie van Richard Schmuck, medewerker van Bayer Cropscience, heeft vergelijkbare manco's.
- Een voorbeeld van een schending van de goede zeden in de wetenschap trof ik aan op blz 26 van het eindconcept van de literatuurstudie: "*Voor clothianidine 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 van uit met clothianidine gecoat zaden geteeld. Ook de overwintering van de volken was normaal nadien. De studie van Cutler & Scott-Dupree (2007) werd in de meta-analyse van Cresswell (2011) als een van de beste aangemerkt, omdat de veld situatie realistisch was en de volken secuur en lang werden gevolgd.*".

Volledig ten onrechte worden hier (gearceerd aangegeven deel van het citaat) opinies over de opzet van de proef toegeschreven aan Cresswell 2011⁷. Dit is uit de dikke duim gezogen, Cresswell doet deze uitspraken in het geheel niet. Hij heeft de betreffende veldstudie ook niet getoetst op de vragen of de veldsituatie "realistisch" is, noch of er "secur" tewerk is gegaan, hij analyseerde alleen wat het statistisch onderscheidend vermogen is van de veldproef. Cresswell stelt in zijn 2011 studie vast dat het statistisch onderscheidend vermogen van de Cutler & Scott-Dupree 2007 veldproef zodanig is dat deze alleen een *reduction in colony performance* zou kunnen kan detecteren als deze reductie groter zou zijn dan 33% en geeft daarnaast aan dat hij op grond van zijn meta-analyse onder *algemene* veldomstandigheden (dus uitdrukkelijk niet bij de *specifieke* veldomstandigheden van de Cutler & Scott-Dupree studie) bij gebruik van dit middel een effect van 20% afname in performance van de kolonie verwacht. Dat ligt onder de detectiegrens die volgt uit de Cutler & Scott-Dupree 2007 *steekproefomvang* (*n*). Hij concludeert dat ook de veldproef van Cutler & Scott-Dupree te weinig statistisch onderscheidend vermogen heeft om als statistisch betrouwbaar bewijs te kunnen dienen dat onder veldomstandigheden geen sublethale effecten zouden optreden.

Bovendien heeft de US Environmental Protection Agency in november 2010 de Cutler & Scott-Dupree 2007 studie geherclassificeerd als "invalid" vanwege vastgestelde ernstige tekortkomingen in de proefopzet (zie bijlage 1). Zo is in deze veldproef de omvang van het proefveld met clothianidine-koolzaad 1 ha, terwijl het foerageergebied waarbinnen een bijenvolk stuifmeel en nectar verzamelt een gebied van ten minste 28000 ha beslaat zodat het overgrote deel van de door de volken in deze veldproef verzamelde stuifmeel en nectar *niet* afkomstig was van het proefveld. Behandeld perceel en controle perceel lagen ca 295 meter uiteen (de vliegafstand van een bij reikt tot 6000 meter van de kast) zodat de bijenvolken uit de controlegroep ook konden foerageren op het clothianidine koolzaad. Men trof ook daadwerkelijk clothianidine residuen aan in de controlegroepen wat een aanwijzing is dat deze ook op het verderop gelegen behandelde proefveld hadden gefoerageerd. Bovendien leggen bijen ruim een half jaar lang een wintervoorraad aan en had ze in de veldproef slechts 3 weken toegang tot het clothianidinehoudend stuifmeel en nectar van het 1 ha proefveld: het overgrote deel (meer dan 99,99%) van de voedselvoorraad voor de overwintering van de volken in de veldproef kwam dus van buiten het behandelde proefveld (reken maar mee: de opbrengst van ruwweg 3 van de 25 foerageerweken maal 1 van de ruwweg 28000 bevlogen hectare foerageergebied kwam wel van die drie weken verzamelen van stuifmeel en nectar van die ene hectare bloeiend clothianidinekoolzaad in de proef, de rest kwam van buiten het proefveld).

Ook is het in strijd met de goede wetenschappelijke zeden dat de Cutler & Scott-Dupree 2007 studie verzuimd heeft in hun wetenschappelijke artikel hun *conflicts of interests* te expliciteren. De verborgen sponsor van de studie is de firma Bayer Cropscience, producent van clothianidine en eigenaar van zaadbedrijven die met clothianidine gecoat zaad op de markt brengen, die een bedrag van 134367 US\$ bijdroeg aan deze studie⁸.

- Ik constateer een opmerkelijke asymmetrie in de analyse waarbij "conclusies" uit studies die de rol van neonicotinen en fipronil bagatelliseren klakkeloos overgenomen zijn (met name methodisch onjuist opgezette veldproeven van ondermeer Bayer Cropscience) en studies die concluderen dat er wel redenen tot zorg zijn opmerkelijk kritisch worden besproken (een voorbeeld is de bespreking van de Alaux et al., 2010 studie op p. 11/12). Deze asymmetrie maakt het rapport gekleurd (*bias*).

6 http://www.biblioteca.leyades.net/archivos_pdf/bees_clothianidin%C2%AD_guelph.pdf

7 <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-010-0566-0>

8 <http://www.uoguelph.ca/research/summaries/2006/table1-oac.shtml>

- Ik stel vast dat de studie behalve een literatuur-review ook een speculatieve becijfering presenteert van verwachte maximale blootstelling van Nederlandse bijen per stof en dat deze vervolgens vergeleken wordt met de acuut dodelijke dosis per stof (LD50) in de vorm van een TER. Daar is veel mee mis: (a) Deze becijfering van de blootstelling berust niet op Nederlandse feiten, (b) noch op Nederlandse omstandigheden, (c) noch is ermee rekening gehouden met dat alle stoffen uit de neonicotinegroep neurochemisch gezien op precies dezelfde acetylcholine receptor aangrijpen in het zenuwstelsel van de bij, dus dat de blootstelling aan alle afzonderlijke neonicotinen moet worden opgeteld in plaats van afzonderlijk beschouwd, (d) noch is daarbij rekening gehouden met het effect van de opstelsom van blootstelling ten gevolge van de meer dan 50 Nederlandse toelatingen voor neonicotinemiddelen voor veel meer dan 50 verschillende gewassen samen (ook alle siergewassoorten, alle bloembolsoorten, enz.⁹) die elk op een verschillend moment in het jaar bijdragen aan de cumulatieve blootstelling van bijenvolken (de hier berekende TER gaat uit van blootstelling ten gevolge van slechts 1 behandeld gewas). Bovendien is de relevante maat waarmee de blootstelling moet worden vergeleken de dosis waarbij de gezondheid van de bijen en de bijenkolonie niet zou worden aangetast (PNEC) en niet de veel hoger liggende acuut dodelijke dosis (LD50). In technische termen: de PEC/PNEC is de relevante risico-index voor *sublethale- en chronische effecten* (zie ook de studie Maxim & Van der Sluijs, 2007⁵) en beslist niet de TER die hier berekend wordt en die *sublethale effecten* volledig buiten beschouwing laat. Toch worden aan deze met de natte vinger berekende TERs vergaande conclusies opgehangen over vermeende veiligheid van de middelen voor bijen in de Nederlandse situatie.
- Ik mis informatie over de (trends in) schaal en omvang van het gebruik van neonicotinen en de biobeschikbaarheid van de werkzame stoffen en metabolieten in het Nederlandse milieu zoals die ondermeer blijkt uit de gemeten aanwezigheid van de stoffen in oppervlaktewater en de trends in de emissies die bekend horen te zijn uit de RAG afzetcijfers per werkzame stof - iedere toepaste hoeveelheid van een chemisch gewasbeschermingsmiddel is immers feitelijk een emissie van die hoeveelheid naar het milieu (deze verdeelt zich over ondermeer de compartimenten bodem, water lucht, plant en ecologisch-voeselweb).
- Ik mis een groot aantal relevante blootstellingsroutes. Van veel blootstellingsroutes neemt de studie speculatief aan dat deze kunnen worden verwaarloosd zonder dat valide evidentie wordt gepresenteerd waaruit *feitelijk* (en niet slechts *retorisch*) blijkt dat die routes werkelijk verwaarloosbaar zijn (voorbeelden: blootstelling via foerageren op oppervlaktewater, via foerageren op guttatie-vocht en dauw, via stuifmeel van wilgen die groeien langs sloten waar al sinds 2004 over alle seizoenen over alle jaren hoge concentraties imidacloprid zijn gemeten).
- Ik stel vast dat zowel de hoofdtekst als de managementsamenvatting bagatelliserend waardegeladen taalgebruik bevat in plaats van dat in neutrale taal de feitelijke bevindingen uit de wetenschappelijke literatuur worden gerapporteerd. Een persoonlijke interpretatie van de beleidsrelevantie van de gepresenteerde wetenschap is iets dat wel een plaats kan hebben in de sectie "discussie" doch uitsluitend als daarbij tevens expliciet blijft dat dit de interpretatie van de auteur is, maar dit hoort beslist niet in de hoofdtekst van een literatuurreview. Of een becijferd risico ernstig is of meevalt is immers een waardeoordeel dat volgt uit een impliciete subjectieve keuze van welk risiconiveau aanvaardbaar wordt geacht en welke waarden op het spel staan en hoe die gewogen worden, dat is wat anders dan een wetenschappelijk objectief feit.
- Ik mis een explicitering c.q. verklaring omtrent potentiële *conflict of interests* van elk van de auteurs respectievelijk hun onderzoeksinstituten *vis a vis* het onderwerp en *vis a vis* eventuele financiële of andere (ondermeer onderzoekssamenwerkings)relaties met de producenten van de betreffende gewasbeschermingsmiddelen.
- Ik stel vast dat uit de rapportage blijkt dat auteurs het internationale wetenschappelijke debat over de rol van neonicotinoiden bij bijensterfte niet goed kennen omdat als zij dat wel kenden zij de omissies in veel van de geciteerde veldstudies niet onbesproken zouden hebben mogen laten.

Ik heb in het bovenstaande aan de hand van enkele losse voorbeelden de vastgestelde omissies toegelicht. Een complete inhoudelijke reactie vraagt echter om een eigen rapportage en het systematisch natrekken van alle aangehaalde studies, waarvoor mij - gezien mijn zeer drukke agenda en veelvuldig verblijf in het buitenland - thans tijd en middelen ontbreken. Ik heb dat nu slechts steekproefsgewijs kunnen doen.

⁹ zie voor een lijst: http://www.bijensterfte.nl/sites/default/files/Toegestane_hoeveelheden_Neonicotinen_NL.pdf

Ik merk op dat de Utrechtse kennis over bijensterfte en gewasbeschermingsmiddelen beter en actiever benut kan worden door uw Ministerie dan nu het geval is. In de literatuurstudie en al eerder in de Ctgb herbeoordeling is deze kennis volledig buiten beschouwing gelaten.

Ik ben graag bereid om samen met **10.2.e** - die als kritisch lezer van hetzelfde conceptrapport tegen dezelfde soort omissies aanliep - en met wie ik deze brief heb afgestemd - een rapport te schrijven waarin we de vastgestelde omissies repareren en ontbrekende literatuur toevoegen. Voor onderdelen zouden we daar ook enkele andere wetenschappers van andere universiteiten, instituten en disciplines bij willen betrekken.

Ter informatie voeg ik ook het commentaar van **10.2.e** bij.

We zien een eventuele opdracht graag tegemoet.

Hoogachtend, in nauw overleg met **10.2.e**

10.2.e

10.2.e (Senior Onderzoeker, Natuurwetenschap en Samenleving, Copernicus Instituut UU)

Bijlagen:

- Bijlage 1 US EPA Reclassificatie als INVALID van de Cutler & Scott-Dupree 2007 veldstudie
- Bijlage 2 Commentaar **10.2.e** op concept eindrapport literatuurreview

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY
WASHINGTON D.C., 20460



Office of Chemical Safety
and Pollution Prevention

PC Code: 044309
DP Number: 383634

MEMORANDUM

SUBJECT: Reclassification of MRID 46907801 Data Package 336888 for
Clothianidin, PC Code 044309

TO: Kable Davis, Risk Manager Reviewer
Venus Eagle, Risk Manager, RM 01
Insecticide Branch
Registration Division (7505P)

FROM: Joseph DeCant, Ecologist
Environmental Risk Branch 5
Environmental Fate and Effects Division (7507P)

Joseph P. DeCant 11-2-10

THRU: Mah Shamim, Branch Chief
Environmental Risk Branch 5
Environmental Fate and Effects Division (7507P)

Mah Shamim 11/2/10

In 2007, the EFED reviewed the study entitled, "An Investigation of the Potential Long-Term Impact of Clothianidin Seed Treated Canola on Honey Bees, *Apis mellifera* L." (MRID 46907801), and classified it as Acceptable and as satisfying the guideline 850.3040 field study for pollinators. Recently, the EFED has reviewed this study again in light of additional field studies that highlight challenges in field study design, and in response to concerns raised by beekeepers. Based on the new review, several deficiencies were identified that lead to the reclassification of this study as Invalid rather than Acceptable.

Control and treated plots were each 1 hectare in size and paired, so that 4 sites were established with a control plot paired with a treated plot. These plots were separated by a minimum of 250 m. The study author states, "Of 23 back-up control nectar samples, 2 (field E1C, July 7; field W3C, July 7) had detectable clothianidin residues, at a maximum of 0.922 ppb, suggesting that workers in control colonies may have foraged on clothianidin-treated canola. This may have occurred because the separation between some pairs of control and treated fields was insufficient or because the forage in some control fields was of lower quality..." The inverse may also have occurred. That is, bees placed on treated fields likely foraged on the control fields, which would have reduced the level of exposure to clothianidin residues due to a lack of separation between sites. Bees have been shown to forage up to 6 km (Visscher and Seeley, 1982) or even twice that

in some instances when no competing forage is present (Ratnieks, 2000). The distance of 250 m is inadequate for this separation. The inadequacy is evident given contamination in some of the nectar samples taken from control hives.

Furthermore, the study authors state that, "Approximately 5 g of pollen was analyzed under a light microscope, which confirmed that bees foraged on canola, while the remainder...". This type of identification simply identifies that canola was present in the pollen samples, but does not quantify the proportion of canola pollen present in the sample. This type of pollen evaluation does not characterize the foraging of the bees. The bees in the treated fields could have foraged disproportionately on other uncontaminated sources relative to bees in the control fields. Furthermore, the study authors simply state that to their knowledge, no other forage was present with a radius of 1 km from the edge of the fields. However, given the ability of bees to forage long distances, this lack of data leaves uncertainty in the exposure and suggests that this study did not provide the worst case exposure scenario necessary for use in characterizing risk.

An addendum (MRID 46907802) was submitted later that presented the results of the overwintering part of the study, which revealed no effects on the hives exposed to clothianidin. However, this addendum does not present any results that would change the outcome of the re-classification of the study. The issue of exposure may confound the results presented in the primary study as well as the addendum.

Table 1. Ecological data requirements for clothianidin.

MRID	Guideline	Study Classification ¹	Remarks
469078-01 469078-02 (addendum)	850.3040	Invalid	This study and associated addendum assessed the toxicity of clothianidin to pollinators using whole hive parameters under field conditions. The study does not satisfy the 850.3040 guideline.
¹ OPPIN Classifications: Acceptable/Guideline; Acceptable/Non-Guideline; Cited; Confirmatory; Decision Deferred; Extraneous submission; In Review; No Decision; Partially Acceptable; Supplemental; Unacceptable/Guideline; Unacceptable/Non-Guideline; Upgradeable.			

Beste Tjeerd,

Je had mij verzocht om de literatuurstudie over Neonicotinoiden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken, die in opdracht was van het Ministerie van EL&I, kritisch te lezen.

Ik kon aan je verzoek gehoor geven toen de deadline naar 26 september was verschoven.

Ik heb de literatuurstudie kritisch gelezen vanuit mijn achtergrond als universitair docent/onderzoeker Biologie én als imker. Daarbij in gedachte houdend dat een literatuurstudie een objectieve en kritische weergave moet zijn van de literatuur. Ik heb gewerkt via 'track changes'; ik heb veranderingen in de tekst aangebracht en ook commentaar gegeven.

Het lijkt me dat deze literatuurstudie veel werk geweest is. Mogelijk dat er daardoor onvolledigheid en fouten ingeslopen zijn. Als deze echter leiden tot foute conclusies dan vind ik dat bezwaarlijk.

Tijdens het lezen ben ik onvolledige citaties van de literatuur tegengekomen, zoals het niet vermelden van de resultaten van Fipronil, foute interpretaties en foute weergaven (zie hiervoor mijn commentaar bij de literatuurstudie). Ik ga ervan uit dat het slordigheden zijn, hoewel ik me niet altijd aan de indruk kan onttrekken dat het hier en daar gekleurd is, ook middels de gebruikte formuleringen, alsof neonicotinoiden voor bijen niet gevaarlijk zijn.

Ik vind dat er best een kritische kanttekening mag komen over het breed inzetten van neonicotinoiden, ook door particulieren in Nederland en dat studies inmiddels aangeven dat het inzetten van die middelen via het treffen van niet-doel insecten, anders dan honingbijen, effecten hebben die de balans van het ecosysteem verstoren.

Ik ben veel tijd kwijt geweest aan het lezen van de geciteerde literatuur. Ik heb natuurlijk niet alle artikels kunnen lezen waardoor ik niet volledig heb kunnen zijn. Dat betekent dat als er geen veranderingen in gedeelten zitten of niet van commentaar is voorzien, dat niet wil zeggen dat ik vind dat het in orde is. Ik heb door tijdgebrek ook een groot deel van het stuk niet kritisch kunnen bekijken. Ik hoop dat specialisten op het gebied van de toxicologie het gedeelte over de berekende blootstelling uit voedselgebruik en residuniveaus en de literatuur per actieve stof wel kritisch hebben kunnen bekijken. Dat brengt mij meteen op de vraag of er in de leescommissie wel een toxicoloog zit.

Wat mij betreft zitten er nog zoveel onvolkomenheden in deze literatuurstudie dat er nog veel werk verzet moet worden voor dat dit naar EL&I kan.

Omdat ik toch rare dingen in de literatuurstudie tegen kwam, heb ik contact opgenomen met Jeroen van der Sluijs voor meer informatie. Ook hij vond ongerijmdheden. Hij was toen bezig om een brief op te stellen met zijn commentaar rechtstreeks gericht aan staatsecretaris Bleker omdat die in de kamer heeft beweerd dat hij betrokken zou zijn bij deze studie en hij daarom rechtstreeks contact wilde leggen met Bleker. Met mijn instemming zal Jeroen ook mijn commentaar bijvoegen als bijlage bij zijn brief aan de Staatssecretaris. Hopelijk krijg je dan wat meer tijd om de slordigheden en fouten uit de studie te halen.

Groeten, 10.2.e

Neonicotinoïden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken

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

Tjeerd Blacqui re¹, Guy Smagghe², Kees van Gestel³ & Veerle Mommaerts²

¹bijen@wur, Plant Research International, Wageningen Universiteit & Research, Wageningen

²vakgroep Gewasbescherming, faculteit Bio-ingenieurswetenschappen, Universiteit Gent

³afdeling Dierecologie, Faculteit der Aard- en Levenswetenschappen, Vrije Universiteit Amsterdam

Contents

Managementsamenvatting	4
1. Sterfte van bijenvolken.....	4
2. Systemische insecticiden: neonicotinoiden en fipronil	4
3. Toelatingsdossier en open literatuur	4
4. Giftigheid en blootstelling.....	4
a. Giftigheid: letale en sub-letale effecten	5
Conclusie:	5
b. Blootstelling.....	5
Conclusie:	5
5. Berekende blootstelling uit voedselgebruik en residuniveaus	5
Conclusie:	6
6. Monitoring van bijensterfte	6
Conclusie:	6
7. Risicoanalyse schema voor neonicotinoiden	6
Conclusie:	7
Inleiding	8
Sterfte van bijenvolken.....	8
Literatuuroverzicht over de relatie tussen neonicotinoiden en fipronil en bijen.	8
Neonicotinoiden en bijen.....	9
Acute letale toxiciteit.....	9
Chronische letale toxiciteit	9
Reproductie.....	10
Gedrag	10
Weerstand tegen ziekten.....	11
Effect op de overwintering van bijenvolken.....	12
Mengseltoxiciteit	12
Concentraties en metabolisme van neonicotinoiden insecticiden in planten en bijen in relatie tot de toepassing	13
Translocatie van residuen in planten, nectar en stuifmeel.....	13
Residuen in door bijen verzameld stuifmeel en in bijen, honing en was	13
Berekende blootstelling uit voedselgebruik en residuniveaus	24
Conclusie:	25
Monitoring van volken van imkers in de praktijk	26
Risk assessment schema voor schade van neonicotinoiden aan bijen.....	27
Conclusies, doelen voor onderzoek en aanbevelingen	30
Verantwoording	30
Beschikbare literatuur per actieve stof.....	31
Imidacloprid.....	32
Toepassingen (CTGB):	32
LD ₅₀ (CTGB)	32
Acute giftigheid literatuur.....	32
Chronische blootstelling	32

Sub-letale effecten (gedrag).....	33
Gevonden concentraties in planten in relatie tot de toepassing	33
Monitoring van bijenvolken inclusief res duen onderzoek.....	34
Verwachte maximale blootstelling vergeleken met LD ₅₀	34
Metabolisme en bioaccumulatie	35
Monitoring van volken van imkers in de praktijk	35
Clothian din.....	37
Toepassingen (CTGB):.....	37
LD ₅₀ (CTGB)	37
Acute giftighe d l teratuur.....	37
Chronische blootstelling	37
Monitoring van bijenvolken inclusief res duen onderzoek.....	37
Verwachte maximale blootstelling vergeleken met LD ₅₀	37
Monitoring van volken van imkers in de praktijk	38
Thiamethoxam	39
Toepassingen (CTGB):.....	39
LD ₅₀ (CTGB)	39
Chronische blootstelling	39
Sub-letale effecten (gedrag).....	39
Gevonden concentraties in planten in relatie tot de toepassing	39
Monitoring van bijenvolken inclusief res duen onderzoek.....	39
Verwachte maximale blootstelling vergeleken met LD ₅₀	40
Monitoring van volken van imkers in de praktijk	40
Thiacloprid	41
LD ₅₀ (CTGB)	41
Acute giftighe d l teratuur.....	41
Monitoring van bijenvolken inclusief res duen onderzoek.....	41
Verwachte maximale blootstelling vergeleken met LD ₅₀	41
Acetamiprid	42
LD ₅₀ (CTGB)	42
Acute giftighe d l teratuur.....	42
Chronische blootstelling	42
Sub-letale effecten (gedrag).....	42
Monitoring van bijenvolken inclusief res duen onderzoek.....	42
Verwachte maximale blootstelling vergeleken met LD ₅₀	42
Metabolisme en bioaccumulatie	43
Flonicam d	43
LD ₅₀ (CTGB)	43
Acute giftighe d l teratuur.....	43
Fipronil.....	44
Toepassingen (CTGB):.....	44
LD ₅₀ (CTGB)	44
Acute giftighe d l teratuur.....	44
Chronische blootstelling	44
Sub-letale effecten (gedrag).....	44

Gevonden concentraties in planten in relatie tot de toepassing	45
Monitoring van bijenvolken inclusief res duen onderzoek.....	45
Verwachte maximale blootstelling vergeleken met LD ₅₀	45
Metabolisme en bioaccumulatie	46
Literatuur	47

Managementsamenvatting

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 grote onderzoeknetwerk "Coloss" (<http://coloss.org/>) benadrukt dat veel oorzaken kunnen bijdragen aan de bijensterfte. Waarschijnlijk staan deze oorzaken ook niet los van elkaar (stapelende of interactie van oorzaken) en kunnen ze ook regionaal verschillend zijn. Onlangs (10 maart 2011) verscheen een overzicht door het United Nations Environment Program (UNEP) http://www.unep.org/dewa/Portals/67/pdf/Global_Bee_Colony_Disorder_and_Threats_insect_pollinators.pdf dat de zaken op een rij zet, ook voor andere bestuivende insecten dan honingbijen (Kluser et al. 2011).

Belangrijke mogelijke oorzaken zijn de parasitaire exotische mijt *Varroa destructor* en allerlei andere ziekten en parasieten, deels gekoppeld aan *Varroa*, verlies van habitat en foerageermogelijkheden (door urbanisatie en schaalvergroting), milieuvontreiniging en pesticidengebruik. Onder de pesticiden worden de neonicotinoiden het meest verdacht. Maar ook een gebrek aan positieve uitdagingen en ontwikkelingen in de imkerij worden genoemd als mogelijke oorzaak.

2. Systemische insecticiden: neonicotinoiden en fipronil

In deze rapportage beperken wij ons tot fipronil en de volgende neonicotinoiden: imidacloprid, clothianidine, thiamethoxam, thiacloprid, acetamiprid en flonicamid, welke neurotoxische stoffen zijn die erg giftig zijn voor insecten. Er zijn legio toepassingen van fipronil en neonicotinoiden in Europa maar ook in Amerika en Australië. Neonicotinoïde als zaadcoating wordt in Europa toegepast voor onder andere mais, zonnebloem, koolzaad en bietenzaad; daarnaast vindt toepassing plaats als bespuiting in de fruitteelt (grootfruit, steenfruit, kleinfruit als bessen enz.) en boomteelt, als dieldoelmiddel bij bollen, en als druppeltoepassing in de voedingsoplossing in veel kasteelten: aubergine, paprika, courgette, pepers, tomaat, diverse siergewassen, en in het niet grasachtige openbaar groen.

Het speciale aan deze groep middelen is dat ze systemisch werken: ze worden door de planten (het gewas) opgenomen waardoor de plant zelf giftig wordt voor de doelorganismen, zoals bijvoorbeeld..... Door ze aan te brengen in de coating van zaden wordt elke plant in het gewas giftig en wordt schade door buitende/zuigende insecten voorkomen.

Naast de toepassing in zaadcoating worden de middelen ook klassiek gespoten, en in kassen via de voedingsoplossing gedoseerd. De risico's zijn dat er contactblootstelling voor niet doel insecten is en dat het in de grond en oppervlaktewater komt, waar ze heel traag afbreken, en daardoor belastend zijn voor het milieu. Ze zijn niet giftig voor zoogdieren.

3. Toelatingsdossier en open literatuur

Een gewasbeschermingsmiddel moet voor toelating op de markt geregistreerd worden. Daarvoor dient een toelatingsdossier opgesteld te worden, dat niet openbaar is en ingediend wordt bij het College voor de toelating van gewasbeschermingsmiddelen en biociden (CTGB). 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:

4. Giftigheid en blootstelling

Een middel is gevaarlijk voor bijen als het (erg) giftig is voor bijen, en als er sprake is van blootstelling. Veel onderzoek is gedaan naar de giftigheid in laboratoriumstudies en in beperkte mate in veldstudies. Blootstelling is lastiger vast te stellen, en kan alleen gebeuren in veldproeven.

Comment [D1]: Dit is een samenvatting van het stuk hierna. Daar staan opmerkingen die hier ook van toepassing zijn.

Field Code Changed

Field Code Changed

Deleted: 0

Deleted: een gebrek aan positieve uitdagingen en ontwikkelingen in de imkerij

Deleted: allerlei andere ziekten en parasieten

Deleted: deels gekoppeld aan *Varroa*

Deleted: milieuvontreiniging en pesticidengebruik

Comment [D2]: Is hier literatuur over? Het staat niet in De La Rue (zie opmerking D10)

Deleted: Onder de pesticiden worden de neonicotinoiden het meest verdacht.

Deleted: .

Deleted: Daarnaast dat ze in het algemeen erg giftig zijn 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' worden meegegeven

Deleted: 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 middelen breken wel heel traag af in de bodem of in water. Ze zijn niet giftig voor zoogdieren.

Comment [D3]: Dit is grootschalig en treft ook niet doel insecten

Deleted: nog wel

Deleted: daarnaast

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

Comment [D4]: Cryptisch. Wat wordt hiermee bedoeld?

Deleted: in onderzoeken van diverse niveaus en grootte.

Deleted: dat gebeurt

a. Giftigheid: letale en sub-letale effecten

Uit de laboratoriumproeven geeft de LD₅₀ 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 langdurigere blootstelling. Na langdurige (lage) blootstelling kan de bij alsnog dood gaan door vergiftiging en dus een verlaagde levensverwachting heeft, wat de chronische letale toxiciteit aan geeft. Als er bij korte of langer durende blootstelling wel een effect optreedt, maar geen sterfte, wordt gesproken van sub-letale toxiciteit. Sub-letale effecten kunnen zijn gedragsveranderingen, verminderde weerstand. Dergelijke effecten kunnen worden onderzocht in:

- laboratorium experimenten: onderzoek aan individuele bijen: effecten op gedrag, weerstand tegen ziekten etc
- veldstudies: onderzoek aan individuele bijen: gedrag, levensverwachting, foerageeractiviteit, etc.
- veldstudies: onderzoek op niveau van bijenvolken (blootstelling kan door direct aanbieden aan volk of via het gewas (nectar en stuifmeel): ontwikkeling en overleving volken (broed, bijen, voorraden); performance (hoeveelheid honing oogst, stuifmeel); evt. aanwezige ziekten

In veldstudies is het vaak lastig om een direct oorzakelijk verband met de toepassing van een bestrijdingsmiddel aan te tonen, omdat de mate van blootstelling minder nauwkeurig te bepalen is en vele andere factoren nog een rol kunnen spelen

Conclusie:

Er is een groot verschil in giftigheid voor bijen tussen de neonicotinoiden: imidacloprid > clotianidin > thiamethoxam > dinotefuran > nitenpyrid >>> acetamiprid > thiacloprid. Fipronil is ongeveer even giftig als imidacloprid. Ook sommige afgeleide metabolieten zijn heel giftig. De stoffen beïnvloeden gedrag, leervermogen, levensverwachting, reproductie. In veldtesten met normale te verwachten concentraties werden echter geen effecten vastgesteld. Effect op overwintering (en wintersterfte) werd slechts in twee studies onderzocht, er werd geen effect gevonden.

b. Blootstelling

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. Dergelijke metingen gebeuren veelal in grote veldproeven. Een ander probleem is dat er vaak sprake kan zijn van meerdere blootstellingsroutes. 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. Dat heeft als consequentie dat met de voorhanden zijnde kennis over voedselgebruik van verschillende groepen/levensstadia de blootstelling slechts te berekenen is (zie §5).

De voor neonicotinoiden en fipronil mogelijke blootstellingsroutes zijn naast directe blootstelling aan een bespuiting of verse spuitvloeistof op bladeren van planten, of aan stof bij zaaien van gebeitst zaad, blootstelling via voedsel: nectar, honingdauw en stuifmeel. Daarnaast via water: oppervlaktewater en plassen op het land na een bespuiting en regen, en guttatiewater van met een zaadcoating behandelde (kiem-) planten kunnen residuen bevatten.

Conclusie:

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

5. Berekening blootstelling uit voedselgebruik en residu-niveaus

Wanneer gevonden residu-niveaus (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. Als deze dosis in de buurt komt van de LD₅₀, is er een groot risico voor acute vergiftiging in het veld. Dat wordt duidelijk in de TER (Toxicity Exposure Ratio: de LD₅₀ gedeeld door de verwachte dosis. Een TER groter dan 10 wordt als geen risico bestempeld. Rortais et al (2005) concludeerden voor imidacloprid dat via stuifmeel van mais en nectar van zonnebloemen bijen soms een dosis tot dichtbij de letale dosis konden oplopen. De TER is 6. 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 van haalbijen de belangrijkste orale blootstellingsroute is.

Resultaat (zie voor meer detail over de berekeningen de hoofdstukken per actieve stof):

Deleted: dat is

Deleted: Die kan blijken u t een verlaagde levensverwachting

Deleted: heet dat

Deleted: de blootstelling hoe groter de schaal wordt steeds minder exact is vast te stellen.

Comment [D5]: Dit is natuurlijk niet waar. Er zijn voorbeelden van grote bijensterftes door het zaaien van met neon cotino den gecoate zaden. Verder zijn er maar een beperkt aantal veldstudies geweest en degene die er zijn, zijn slecht uitgevoerd zodat niet geconcludeerd kan worden dat er geen effecten zijn. M.a.w er zijn acute vergiftigingen bij honingbijen vastgesteld en er is te weinig bekend over subletale effecten in veldstudies. Laboratoriumstudies tonen wel negatieve effecten aan op o.a. leerprocessen van bijen, alsook op de ontwikkeling van het broed.

Comment [D6]: Commentaar op dit hoofdstuk is meer voor experts zoals Jeroen van der Sluijs of Henk Tennekkes.

Imidacloprid: Gevonden concentraties in nectar van zonnebloem zouden een geaccumuleerde dosis geven van maximaal 4 nanogram per bij (Rortais et al., 2005). TER=6.
Via stuifmeel (zonnebloem, mais) zouden vooral de voedsterbijen belast worden, zij consumeren in de 8 dagen dat ze voedster zijn 65 mg stuifmeel. Dat zou 0,2 ng imidacloprid opleveren. TER = 185

Thiamethoxam: geen concentraties beschikbaar in nectar / honing
De ene (heel hoge) waarde van thiamethoxam gevonden in stuifmeel van 53 ppb (Mullin et al., 2010) zou een voedster een dosis van 3,44 ng opleveren. TER = 14,5

Clothianidin: de gevonden 2,24 µg/kg in nectar van koolzaad zou een nectar-foerageerder in de loop van een week foerageren maximaal een geaccumuleerde dosis van 1,25 tot 5,0 ng kunnen opleveren. De TER = 5,6 – 22,3
Via 2,24 ppb in stuifmeel (Cutler & Scott-Dupree, 2003) zou een voedster met 0,15 ng worden belast. TER = 267

Fipronil: geen concentraties beschikbaar in nectar / honing.
1,2 ppb in stuifmeel (Chauzat et al., 2005) zou 0,08 ng opleveren, en een TER van 525. De hoge concentratie gevonden door Mullin (een enkel monster) zou 1,82 ng per bij geven, TER =23.

Conclusie:

In deze worst case benadering (gebaseerd op maximaal ingeschatte gebruik door bijen, en uitgaande van volledige afhankelijkheid van verontreinigde nectar en stuifmeel) ontstaat geen risico voor acute toxiciteit via blootstelling door stuifmeel.
Langdurige blootstelling via nectar zou, bij 100% afhankelijkheid van de verontreinigde nectar, voor nectar foerageerders mogelijk een risico opleveren op sterfte bij imidacloprid (zonnebloem) en clothianidin (koolzaad).

6. Monitoring 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 zo'n monitoring hoe groter de trefkans. Dit onderzoek vindt plaats op provinciaal of landsniveau of zelfs internationaal en overtreft daarmee de schaal van de veldproeven. Het meten van residuen van middelen in de bijenvolken is dan een prioriteit. In Frankrijk, Duitsland en Noord-Amerika zijn een paar van dergelijke grote monitoring-studies gedaan. In de genoemde monitoring studies werden heel veel middelen 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, toegepast door de bijenhouders ter bestrijding van de varroamijt (Amerika). Neonicotinoiden werden af en toe aangetroffen in de bijenvolken, meestal in heel erg lage concentraties. Er werd echter geen verband gevonden tussen aangetroffen residuen en sterfte van volken. In de Franse studie bleek de gezondheidstoestand (ziekten en voeding) van de volken wel met sterfte te correleren. De Duitse monitoring vond alleen een verband met de mate van varroa-besmetting in oktober, met de mate van virusprevalentie (DWV en ABPV) in de herfst (= gekoppeld aan varroa-besmetting), met de leeftijd van de koningin (oude koningin meer risico sterfte) en de grootte van het volk bij inwinteren (kleine volken overwinteren slechter). Er was geen verband tussen sterfte van volken en het eerder gevoerd hebben op koolzaad gekweekt uit met neonicotinoiden gebeit zaad.

Conclusie:

Uit de monitoring bleek geen verband tussen neonicotinoiden en bijensterfte. De gegevens zijn echter ook niet geschikt om te concluderen dat er geen verband is. Als residuen werden aangetroffen waren het diverse, waardoor een oorzakelijk verband aanwijzen lastig is. Wel werd soms verband tussen sterfte en andere factoren aangetoond.

7. Risicoanalyse schema voor neonicotinoiden

Het nieuwe voorgestelde risk assessment schema (Alix et al., 2009) is geschikt voor de beoordeling van neonicotinoiden en fipronil. Wel is het nodig te testen bij veld-realistische concentraties, 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. Micro-volkjes van hommels kunnen een deel van de veld-fase van het onderzoek naar het laboratorium halen.

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 zeker is dat een blootstellingsroute veilig is moet die route worden meegenomen in de beoordeling, dat geldt bijv. voor guttatie.

Comment [D7]: De trefkans waarop?

Deleted: overtreft de schaal van de veldproeven en

Deleted: Er

Comment [D8]: Dit staat al in eerdere zinnen en is dus dubbel.

Deleted: in Frankrijk, in Duitsland en in Noord-Amerika

Deleted: Uit monitoring 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.

Deleted:

Comment [D9]: Begrijp niet wat hiermee bedoeld wordt.

Conclusie:

Het schema is goed, maar er zijn nogal wat leemten in de kennis. Die moeten ingevuld worden. Goede u tgebreide veldstudies blijven de laatste en finale toets.

Inleiding

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 (stapelings- of interactie van oorzaken) en kunnen ze ook regionaal verschillend zijn. Onlangs (10 maart 2011) verscheen een overzicht door het United Nations Environment Program (UNEP)

http://www.unep.org/dewa/Portals/67/pdf/Global_Bee_Colony_Disorder_and_Threats_insect_pollinators.pdf 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), en allerlei andere ziekten en parasieten naast varroa en deels gekoppeld aan Varroa (Genersch, 2010), verlies van habitat en foerageermogelijkheden (door urbanisatie en schaalvergroting, Decourtye *et al.*, 2010), en milieuverontreiniging en pesticidengebruik (Maini *et al.*, 2010). Onder de pesticiden worden de neonicotinoiden het meest verdacht (Decourtye & Devillers, 2010). Een gebrek aan positieve uitdagingen en ontwikkelingen in de imkerij (DelaRúa *et al.*, 2009), waardoor de sector ver grijst en steeds minder vitaal wordt.

Neonicotinoiden en fipronil: systemisch werkende insecticiden.

Neonicotinoiden zijn een groep van synthetische geproduceerde insecticiden waarvan de werking gebaseerd is op de werking van nicotine, het plantaardige insecticide/antivraatstof uit de tabakspant. Het zijn zenuwgifstoffen, die binden aan de receptoren van de zenuwcellen in vele gebieden van het honingbijbrein. Ze blijven partieel of irreversibel daaraan gebonden zitten, zodat er continue ongerichte signalen door de neuronen gaan met als symptomen o.a. trillen en hyperactiviteit, en uiteindelijk worden deze receptoren permanent onklaar gemaakt met verlamming als gevolg. Neonicotinoiden 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. Naast dat deze middelen als contactgif via besuitingen ingezet kunnen worden, werken de neonicotinoiden ook systemisch. Dat wil zeggen dat ze door de plant worden opgenomen en in de plant getransporteerd en in alle plantendelen terecht komen. Als systemisch middel zijn deze stoffen selectiever omdat ze met name de doel insecten treffen. De insecticiden kunnen echter ook in uitdagingdruppels, in stuifmeel en nectar terecht komen en daarmee nuttige insecten zoals de honingbij treffen. Sommige neonicotinoiden zijn erg langdurig stabiel (en actief), en ook in de grond en in water breken ze slechts heel langzaam af.

Literatuuroverzicht over de relatie tussen neonicotinoiden en fipronil en 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 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.

Deze informatie dient als aanvulling op de (niet openbare) dossiers die worden/zijn aangeleverd aan het CTGB in het kader van de registraties.

Field Code Changed

Field Code Changed

Deleted: worden genoemd als mogelijke oorzaak

Comment [D10]: Dit kan ik niet terug vinden in het artikel van De La Rúa. Ik weet ook niet in welk opzicht dit bijdraagt als een oorzaak voor bijensterfte. Zijn er gegevens dat de sector minder vtaal wordt? En wat zijn dan de consequenties voor bijen?

Deleted: en allerlei andere ziekten en parasieten naast varroa en deels gekoppeld aan Varroa (Genersch, 2010)

Deleted: Maar ook milieuverontreiniging en pesticidengebruik worden genoemd als mogelijke oorzaak (Maini *et al.*, 2010). Onder de pesticiden worden de neonicotinoiden het meest verdacht (Decourtye & Devillers, 2010).

Deleted: chemisch gemaakte

Deleted: zijn

Comment [D11]: Dat maakt voor de belasting van het milieu toch niet uit: weinig van een zeer giftig middel, of meer van een minder giftig middel

Deleted: zodat niet veel middel hoeft te worden ingezet

Deleted: . Bovendien

Deleted: 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 milieuovertwegingen, maar daar staat tegenover dat

Deleted: s

Deleted: zijn

Deleted: breken

Deleted: Dat is milieutechnisch gezien juist weer minder gunstig.

Neonicotinoiden en bijen

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 via voedsel. Hiermee wordt een mediane letale dosis of concentratie vastgesteld (LD₅₀ of LC₅₀). In de tabellen zijn de in de literatuur gerapporteerde LD₅₀ en LC₅₀ waarden samengevat voor imidacloprid (tabel 2) en de andere neonicotinoiden + metabolieten van de stoffen (tabel 3). Het blijkt dat:

- De giftigheid hangt af van de blootstellingsroute, contactblootstelling is minder giftig dan orale blootstelling. Het moet hierbij wel worden opgemerkt dat er grote variatie in de LD₅₀s 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 een verschillende dosis binnenkrijgen. Bovendien kunnen hoge doses imidacloprid de opname van de (suiker-) oplossing door de bijen verminderen door een anti-eet effect (Nauen et al., 2001).
- Bij vergelijking van de stoffen blijkt dat via contactblootstelling de n tro-groep bevattende neonicotinoiden (dat zijn imidacloprid, clothianidin, thiamethoxam, nitenpyram en dinotefuran) veel giftiger zijn dan de Cyano-groep bevattende neonicotinoiden (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 (Mommaerts et al., 2010). De lagere toxiciteit van de cyano-groep neonicotinoiden wordt verklaard door het bestaan van verschillende nAChR subtypen (Jones et al., 2006) en door de snelle biotransformatie van deze groep (Suchail et al., 2004a; Brunet et al., 2005). Bij contact applicatie (LD₅₀ na 24 uur) werd de giftigheid van de stoffen door Iwasa et al., (2004) als volgt gerangschikt: voor de n tro 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). Fipronil sluit aan bij de giftigste uit de groep (LD₅₀ contact blootstelling, met 13 ng/bij, Mayer et al., 1999). Ook de enantiomeren van fipronil bleken giftig, LD₅₀ van 3,4 ng/bij na 48 u (Li et al., 2010).
- De afbraakproducten (metabolieten) van neonicotinoiden 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-metaboliet en 6-chloronicotinezuur (Nauen et al., 2001). De metaboliet van thiamethoxam, clothianidine (ook apart als neonicotine actieve stof op de markt), is erg giftig voor bijen (Nauen et al., 2003).
- 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: sub-optimale eiwitvoeding (Wehling et al., 2009) en een besmetting door *Nosema ceranae* (Alaux et al., 2010). Stark et al., (1995) zagen geen effect van het genus van de bijen, ze vonden dezelfde contact LD₅₀ in sociale bijen (*A. mellifera*) en solitaire bijen (*Megachile rotundata*, *Nomia melanderi*) (Tabel 2). Vergelijkbare conclusies werden getrokken voor thiamethoxam met een LD₅₀ 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 hommels (*Bombus impatiens*) echter minder gevoelig dan *Osmia lignaria* en *Megachile rotundata*.

Deleted:

Deleted: oplopen

Deleted:

Deleted:

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 werkers (Aliouane et al., 2009). Laboratorium tests met imidacloprid toonden hoge verliezen aan werkers als ze verontreinigd stuifmeel (40 µg/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 werkers wanneer bijenvolken 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 werkers veroorzaakte. Een mogelijke verklaring voor deze discrepantie tussen laboratorium en veldstudies kunnen verschillen in methodologie zijn. Het

Comment [D12]: Waarom staan de gegevens over Fipronil er niet bij. Uit de studie van Aliouane blijkt dat 0.1 ng wel significant verschil met de controle en 0.01 ng niet. Met andere woorden Fipronil geeft wel mortaliteit.

Comment [D13]: De studie van Schmuck et al 2001 was geen veldstudie maar een semi-veldstudie met microbijenvolkjes (start met 500 bijen) die in een kooi buiten opgesteld waren en die als suikerbron een bakje met zonnebloemhoning kregen waaraan imidacloprid was toegevoegd. Voor elke dosis was één volkje beschikbaar, waardoor voor elke dosis n=1. Dit is geen representatieve veldstudie en er zou dus zeer kritisch met dit artikel omgegaan moeten worden.

toxische effect van een stof op een individuele bij kan worden beïnvloed door de initiële fysiologische toestand, en door de levensduur van nestgenoten (Decourtye & Devillers, 2010). 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 met micro-colonies (Mommaerts and Smagghe, 2011).

Comment [D14]: Hoe werkt dat?

Deleted:

Comment [D15]: Op welke manier?

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 stel oudere werksters (haalbijen) (Decourtye and 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 taak specialisatie 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 voedster bijen aanwezig zijn. Een paar studies hebben een negatief effect laten zien op de larvale ontwikkeling na blootstelling van hommels en honingbijenvolkjes 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 micro-volkjes oraal werden blootgesteld aan suikerwater met 10 µg/kg imidacloprid plus stuifmeel met 6 µg/kg imidacloprid (Tasei et al., 2001a,b).

Deleted: Voortplanting is een

Comment [D16]: Ik begrijp de essentie niet van deze zin

Comment [D17]: In de literatuurlijst staat maar een Tasei et al 2001

Deleted:

Deleted:

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 (Thomson 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, bestaande uit een plastic doos met een transparante verlichte plaat, waarop het mogelijk is de verplaatsing van de bijen vast te stellen. Een contactblootstelling aan imidacloprid van 1,25 ng/bij en aan acetamiprid van <0,5 µg/bee stimuleerde de bewegingsactiviteit van de bijen, terwijl imidacloprid bij 2,5 ng/bij juist de bewegingsactiviteit significant remde (Lambin et al., 2001). wat te beginnen is uit de werking van de insecticiden zoals beschreven bij de introductie van neonicotinoïden. 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 hoewel in alle gevallen de behandelde bijen minder actief waren (El Hassani et al., 2008; Aliouane et al., 2009). Topical behandeling met Fipronil 0,01 ng/bij resulteerde wel in een significant grotere immobiliteit (Aliouane et al., 2009).

Deleted: middelen

Deleted: maar veel lastiger

Deleted: b

Deleted:

Deleted:

Deleted: negatieve

Comment [D18]: Waarom Fipronil niet genoemd? Aliouane gaf in zijn artikel aan dat in alle gevallen de behandelde bijen minder mobiel waren, maar het was niet significant.

Deleted: eindpunt

Een ander gedrag dat wordt beïnvloed door neonicotinoïden (acetamiprid and thiamethoxam) is de proboscis extension reflex (PER: uitsteken van de tong bij het aanbieden van 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 conditoneren 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 (winterbijen: 48 µg/kg; oraal), aan de metaboliet 5-hydroxy-imidacloprid (winterbijen: 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

Deleted:

Deleted:

Deleted: o

LD₅₀) 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 termijn geheugen 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 oxidatieve 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 neonicotinoiden het proces van het leren 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 neonicotinoiden kunnen ook interfereren met oriëntatieprocessen van honingbijen. Associatief leren van een zichtbare markering via een beloning (suikerooplossing) 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 500 m afstand 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 and 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 neonicotinoiden bij dergelijke concentraties de foerageer capaciteiten van de bijen beïnvloeden. Echter de verschillende (semi-)veld studies 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 gebeste 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 slechts tot 48 uur na behandeling wat minder (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 bevoeiing, 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 geïrrigeerde met imidacloprid behandeld onkruid een significant verminderde nestontwikkeling hadden (aantal broed kamers, honingpotten en biomassa aan werksters) en een verminderde foerageer activiteit (Gels et al., 2002). Uit de voorgaande waarnemingen wordt duidelijk dat er een discrepantie bestaat tussen veld en laboratorium testen van subletale 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. 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 verminderde foerageeropbrengst) zoals door Cresswell (2011) werd afgeleid uit statistisch gefitte 'performance' gegevens (afname van 6 tot 20%). Onlangs werd aangetoond dat bijen blootgesteld kunnen worden aan neonicotinoiden via de guttatie van planten gekweekt uit behandelde zaden. Echter na drinken van dauw of guttatie druppels werd geen mortaliteit van honingbijen gezien. Daarentegen veroorzaakte directe blootstelling aan stof van de zaaimachines hoge mortaliteit (Marzaro et al., 2011). In die experimenten bereikten residu niveaus van clothianidine in dode bijen gemiddeld 279±142 ng/bij bij hoge vochtigheid en 514±174 ng/bij bij lage vochtigheid. Deze getallen overtreffen vele malen de LD₅₀ van 21.8 µg/bij. Vergelijkbare resultaten werden ook gevonden door Girolami et al. (2011), die bijen blootstelde aan het stof van met clothianidin en imidacloprid behandelde zaden. Hun studie liet zien dat de mortaliteit van de honingbijen alleen optrad bij hoge luchtvochtigheid.

Weerstand tegen ziekten

In de publieke en populaire pers wordt vaak gesproken over de effecten die sub-letale doses van neonicotinoiden en fipronil zouden hebben op de ziekte weerstand van honingbijen. Het is goed voorstelbaar dat bijen die verzwakt zijn door een sub-letale dosis van een middel, daardoor minder weerstand tegen een ziekte hebben. De link met *Nosema* (een cellige darmparasiet) en *Varroa* (parasitaire mijt) 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 stof.

Deleted: cytochroom oxidase activiteit, in verband met beïnvloeding van het

Deleted: zonneklaar

Comment [D19]: Zijn daar geen ideeën over? Het moge duidelijk zijn dat als de hersenen beïnvloed worden, dat ook in de kolonie en dus in het veld zal plaatsvinden.

Deleted:

Deleted:

Deleted:

Deleted: gemarkeerde

Deleted:)

Deleted:

Comment [D20]: De auteurs hadden veel volken, echter de volken stonden relatief dichtbij elkaar op de koolzaadvelden (295 m) en maar 30 m van elkaar af op de winterstandplaats, waardoor bijen naar het behandelde koolzaad konden vliegen, respectievelijk vervliegen. Met als mogelijk resultaat dat het geen aparte groepen meer betrof.

Comment [D21]:

Comment [D22]: Vanwege een n=1 is dit onderzoek niet representatief.

Comment [D23]: Dit is niet waar. In het artikel van Girolami et al 2009 werd geconcludeerd dat guttatedruppels op maisplanten waarvan het zaad gecoat was, hoge concentraties neonicotinoiden bevatten en honingbijen na het drinken ervan binnen enkele minuten stierven.

Comment [D24]: Niet in de literatuurlijst

Comment [D25]: Dit is vreemd. Er wordt in het artikel van Marzaro geschreven dat bij een hoge luchtvochtigheid meer sterfte is, maar het residu niveau is lager. Uit figuur 1 in het artikel van Marzaro blijkt dat zowel bij een lage als een hoge luchtvochtigheid de mortaliteit significant verhoogd is. Het lijkt dat bij een lage luchtvochtigheid de mortaliteit hoger ligt, maar de auteurs geven geen statistische data. Er kan dus niet gesteld worden dat de mortaliteit alleen bij een hoge luchtvochtigheid plaats vindt. In de discussie geven de auteurs aan dat het verschil in verhoogde mortaliteit bij het gebruik van clothianidine bij lage of hoge luchtvochtigheid niet significant verschillend is.

Comment [D26]: Niet in de literatuurlijst. Het blijkt dat bij inzaaien met gecoate mais zaad er een verhoogde mortaliteit bij de bijenkast is. De auteurs geven aan dat voorjaarssterfte mogelijk daaraan gerelateerd kan worden.

Deleted: gerept

Deleted:

Deleted: voorbeelden

Studies waarin verhoogde vatbaarheid voor ziekten wordt aangetoond na blootstelling aan neon cotinoiden hebben wij niet gevonden. Wel is er een goede laboratorium studie van Alaux et al., (2010), waarin wordt aangetoond dat chronisch aangeboden lage concentraties (0,7, 7 en 70 µg/kg) imidacloprid een lagere levensverwachting geven. 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 significant 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 (hoewel de titel van de publicatie dat wel suggereert). Ook in een studie van Wehling et al., (2006, abstract proceedings EURBEE Prague), bleek in het laboratorium dat bijen die minder gezond zijn, in dit geval door ze op een eiwit-arm dieet te zetten, gevoeliger zijn voor imidacloprid.

Veld Studies die 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.

Comment [D27]: Wordt hiermee veldstudies bedoeld?

Comment [D28]: Zijn er niet meer studies over dit onderwerp?

Deleted: navenant

Comment [D29]: Er is een significant verhoogde mortaliteit gevonden van de combinatie *Nosema* en imidacloprid. Maar uit de resultaten is niet gebleken wat de oorzaak is want HPG, hoeveelheid *Nosema*sporen, GOC en hemocyten toonden geen verschillen.

Comment [D30]: Een ziekteverwekker maakt geen keuze! Er kan ook andersom geredeneerd worden. Een verzwakte gastheer heeft minder mogelijkheden om de parasiet de baas te kunnen worden.

Deleted: Het is overigens ook niet per definitie logisch dat een ziekteverwekker vooral verzwakte organismen zou infecteren: een ziekteverwekker is meer gebaat bij een gezonde sterke gastheer, om zich goed te verspreiden.

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 neon cotinoiden 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 geïmagineerd 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 honingbij volken van blootstelling aan veld relevante concentraties neonicotinoiden.

Deleted: effect

Mengseltoxiciteit

Hier worden onderzoeken behandeld waarin synergistische effecten zijn gevonden wanneer organismen werden blootgesteld aan mengsels van stoffen die neon cotinoiden 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 LD₅₀ 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 neonicotinoiden (Iwasa et al., 2004). Voor bijen zijn geen andere voorbeelden van mengseltoxiciteit in de literatuur gevonden. Voor andere organismen zijn wel wat voorbeelden gevonden maar die laten we hier buiten beschouwing. Het is uitermate onzeker in hoeverre die gegevens kunnen worden doorgetrokken naar voor bijen relevante blootstellingen, hoewel moet worden bedacht dat uit de monitoringstudies van Mullin et al. (2010), Genersch et al. (2010), Bernal et al. (2010) en Chauzat et al. (2006, 2009, 2011) 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.

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

Translocatie van res duen in planten, nectar en stuifmeel

Verscheidende 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 ¹⁴C-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 res duen 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-metaboolt werd gemeten (Schmuck et al., 2001). Slechts 5% van de ¹⁴C-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 ¹⁴C) samen met drie metabolieten (30-50% van het ¹⁴C). 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 mais- 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 mais. 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).

Comment [D31]: Is dit wel de juiste literatuur referentie?

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, worteldiepte en de waterpotentiaal van de bodem (Tapparo et al., 2011). Tijdens de eerste drie weken na kieming kunnen de imidacloprid concentraties 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 guttatedruppels 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) and 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.

Deleted: and

Deleted: guttationvloeistof

Comment [D32]: Zo'n opmerking hoort niet thuis een literatuurstudie

Deleted: was ook interessant

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 evenals een studie 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 anderen 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 gaven niet aan hoeveel monsters werden genomen en geanalyseerd (Cutler and 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 neon cotinoiden richtten. Een paar studies onderzochten ook metabolieten.

Deleted: een studie

Deleted: y

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-chloor-nicotinezuur 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-chloor-nicotinezuur 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 mais was behandeld met imidacloprid, leverde evenmin 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 mais geen nectar levert, en er geen zonnebloemteelt in de buurt was aangetroffen.

Van de andere geanalyseerde neon cotinoiden 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 neon cotinoïde, 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) (Smoldis Skerl et al., 2009).

De beste maat voor 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-chloor-nicotinezuur 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 ¹⁴C-imidacloprid/kg honingbij, bleek de halfwaardetijd van ¹⁴C-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 (Suchail et al., 2004a). Imidacloprid was de belangrijkste stof in het abdomen (38% van de geaccumuleerde ¹⁴C) 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). 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

Comment [D33]: Moet er niet een kanttekening gemaakt worden dat met name de vrije insecticiden bepaald kunnen worden en dat de aan receptoren gebonden insecticiden moeilijk aantoonbaar zijn. De halfwaarde betreft dan ook de vrije insecticide terwijl intussen de receptoren bezet zijn door de insecticiden en hun giftige werk doen.

belangrijkste metabooliet had een piekwaarde na 8 uur, overeenkomend met ongeveer 48% van de dosis, de andere metaboolieten bereikten maximale niveaus van 22-25%. Na 72 uur bevatten de bijen slechts metaboolieten. Het metaboolisme van acetamipr d lijkt weefsel specifiek en vertoont een vergelijkbare verdeling over het lichaam van de bij als dat van imidaclopr d (Brunet et al., 2005).

Fipronil:

Girolami et al. (2009) vonden geen fipronil in de guttatievloeistof van jonge maisplanten, 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 mais en zonnebloemen worden verbouwd en dus een grote kans is op blootstelling. In 2 van de 60 monsters werden fipronil en de desulfinyl metabooliet (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 metaboolieten werden 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 sulfone metaboolieten 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 metaboolieten in honing (93 monsters van 73 imkers in noord-west 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 metaboolieten aan in stuifmeel uit pollenvallen noch uit de raat (bijenbrood, Bernal et al., 2011). De LOQ was 0,5 µg/kg, de LOD 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 LD₅₀ kan worden opgelopen via deze weg. Opmerkelijk was dat de varroa-besmetting 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 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).

CONCEPT

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

product	N monsters	stof	% positieve monsters	concentratie (µg/kg) range	gemiddelde#	referentie
stuifmeel	185	im dactoprid	40,5	>0,2-5,7	0,9	Chauzat et al. (2006, 2009, 2011)
	61	im dactoprid	0		<0,4	Higes et al. (2010)
	1021	im dactoprid	0		<0,4	Bernal et al. (2010)
	350	im dactoprid	2,9	<2,0-912	3,1	Mullin et al. (2010)
	215	im dactoprid	0,47*		3	Genersch et al. (2010)
	350	thiacloprid	5,4	<1,0-115	1,3	Mullin et al. (2010)
	215	thiacloprid	33	>1,0-199		Genersch et al., 2010
	215	clothianidin	0		<1,0	Genersch et al. (2010)
	?	clothianidin	enkele	<0,5-2,59		Cutler & Scott-Dupree (2007)
	350	thiamethoxam	0,29*		53,3	Mullin et al. (2010)
	350	acetamiprid	3,1	<5,0-124	1,9	Mullin et al. (2010)
	215	acetamiprid	0,93	>1,0		Genersch et al. (2010)
honing	239	im dactoprid	21,8	>0,3-1,8	0,7	Chauzat et al. (2006, 2009, 2011)
	109	im dactoprid	4,6		<0,084	Pirard et al. (2007)
	48	im dactoprid	8,4	>0,05-<0,5	0,275	Nguyen et al. (2009)
	91	im dactoprid	0		<2,33	Garcia-Chao et al. (2010)
	?	clothianidin	enkele	<0,5-0,93		Cutler & Scott-Dupree (2007)
honingbijen	91	thiamethoxam	0		<0,51	Garcia-Chao et al. (2010)
	187	im dactoprid	11,2	>0,3-11,1	1,2	Chauzat et al. (2006, 2009, 2011)
	99	im dactoprid	0		<0,1	Pirard et al. (2007)
	48	im dactoprid	0		<0,05	Nguyen et al. (2009)
	5	im dactoprid	60	14-39	27	Bacandr tsos et al. (2010)
	104	im dactoprid	0		<2,0	Mullin et al. (2010)
	140	thiacloprid	0		<1,0	Mullin et al. (2010)
	5	clothianidin	0		?	Bacandr tsos et al. (2010)
	5	thiamethoxam	0		?	Bacandr tsos et al. (2010)
	104	thiamethoxam	0		<1,0	Mullin et al. (2010)
	5	acetamiprid	0		?	Bacandr tsos et al. (2010)
	140	acetamiprid	0		<5,0	Mullin et al. (2010)
bijenwas	98	im dactoprid	0		<0,1	Pirard et al. (2007)
	48	im dactoprid	0		<0,05	Nguyen et al. (2009)
	208	im dactoprid	0,96	2,4-13,6		Mullin et al. (2010)
	208	thiacloprid	1,9	<1,0-8,0	0,1	Mullin et al. (2010)
	?	clothianidin	enkele	<0,5		Cutler & Scott-Dupree (2007)
	208	thiamethoxam	0		<1,0	Mullin et al. (2010)
	208	acetamiprid	0		<5,0	Mullin et al. (2010)

*slechts één monster pos tief

? geen informatie

*als geen residuen gevonden zijn is de LOD gegeven

CONCEPT

CONCEPT

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 (no observed effect concentration=NOEC, hoogste concentratie waarbij geen effect waarneembaar is; lowest observed effect concentration=LOEC, laagste concentratie waarbij nog een effect is waargenomen; proboscis extension reflex=PER).

Honingbijen	Hommels	Solitaire bijen	Referenties
<p><u>Acute orale toxiciteit</u> (ng/bij): LD₅₀-48u: 3; 4-41; 5,7; 30; >81</p> <p><u>Acute contact toxiciteit</u> (ng/bij): LD₅₀-48u: 18; 30</p>	<p><u>Acute contact toxiciteit</u>: LC₅₀-48u: 322 mg/l</p>	<p><u>Acute contact toxiciteit</u>:</p> <ul style="list-style-type: none"> <i>Megachile rotundata</i>: LC₅₀-48u: 17 mg/l; LD₅₀-24u: 0,04 µg/bij <i>Osmia lignaria</i>: LC₅₀-48u: 7 mg/l; LD₅₀-24u: 0,04 µg/bij <i>Nomia melanderi</i>: LD₅₀-24u: 0,04 µg/bij 	<p>Stark et al. (1995); Ruzhong et al. (1999); Nauen et al. (2001); Schmuck et al. (2001); Suchail et al. (2001); Decourtye et al. (2003); Iwasa et al. (2004); Scott-Dupree et al. (2009)</p>
<p><u>Chronische orale toxiciteit</u></p> <ul style="list-style-type: none"> NOEC: >20 µg/kg LOEC bij winter-bijen: 24 µg/kg 50% worker mortaliteit: 0,1-10 µg/l 		<p><u>Chronische orale toxiciteit</u>:</p> <ul style="list-style-type: none"> voeren met 300 µg/kg in pollen geen letaal effect op larven van <i>Osmia lignaria</i> en <i>Megachile rotundata</i> in laboratorium- en veldtesten 	<p>Kirchner, (1999); Suchail et al. (2001); Decourtye et al. (2003); Maus et al. (2003); Abbott et al. (2008)</p>
<p><u>Laboratorium: gedrags effecten op: mobiliteit:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> LOEC, acute contactappliedatie: 1,25 ng/bij Reductie door contactappliedatie van 2,5-20 ng/bij <p><u>associatief leren via PER-test:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> LOEC, chronisch oraal (µg/kg): 24; 48 (winterbijen), 12 (zomerbijen) Reductie door acute contactappliedatie en door orale toediening van 12 ng/bij PER habituatie: LOEC, acuut contact: 1,25 ng/bij <p><u>voedselopname:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Repellent: 500-1000 µg/l Reductie van het aantal bezoeken aan een voederstation bij concentraties >20 µg/l 		<p><u>Laboratorium: effect op reproductie:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> larven gevoed met 300 µg/kg pollen: kleine effecten op ontwikkelingstijd <p><u>(Semi-) field: effect on reproduction:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> larven gevoerd met 30-300 µg/kg pollen (chronisch): gering effect op ontwikkelingstijd van vrouwtjes en mannetjes van <i>Osmia lignaria</i> en <i>Megachile rotundata</i> 	<p>Kirchner (1999); Lambin et al. (2001); Decourtye et al. (2003, 2004a,b); Maus et al. (2003); Abbott et al. (2008)</p>

Tabel 3. Letaal effect concentraties van neonicotinoiden (moeder-stof en metabolieten) voor werksters van de honingbij (*Apis mellifera*) via orale en contactblootstelling zoals gevonden in verschillende laboratoriumonderzoeken.

Neonicotinoïde	Orale LD ₅₀ (µg/bij)	Contact LD ₅₀ (µg/bij)	Referenties
Moederstof			
Acetamiprid	14,5	8,09; 7,07(24u)	Iwasa et al. (2004); Decourtye & Devillers (2011)
Clothian din	0,003 (48h)	0,044; 0,022 (24u); 0,003 µg/l (indirect via res du)	Iwasa et al. (2004); Decourtye & Devillers (2011); Laurino et al. (2011)
Dinotefuran		0,023; 0,075 (24u)	Iwasa et al. (2004); Decourtye & Devillers (2011)
Nitenpyram		0,138	Iwasa et al. (2004)
Thiacloprid	17,3	14,6; 24,2; 38,8	Elbert et al. (2000); Iwasa et al. (2004) ; Decourtye & Devillers (2011)
Thiamethoxam	0,005; 0,004	0,024; 0,03; 0,003 µg/l (indirect via residu)	Senn et al. (1998); Iwasa et al. (2004); Decourtye & Devillers (2011); Laurino et al. (2011)
Metaboliet			
N-dimethyl acetamiprid		> 50	Iwasa et al. (2004)
6-chloro-pyridilmethyl alcohol		>50	Iwasa et al. (2004)
6-chloro-nicotinezuur		>50	Iwasa et al. (2004)
Oleofin	0,028; 0,003; >0,036 (48u)	0,04	Stark et al. (1995); Nauen et al. (2001); Suchail et al. (2001); Decourtye et al. (2003)
5-OH-imidacloprid	0,153; 0,256; 0,159 (48u)		Nauen et al. (2001); Suchail et al. (2001); Decourtye et al. (2003)
Di-OH-imidacloprid	> 0,049 (48u)		Nauen et al. (2001)
Urea-metaboliet	>100 (48u)		Nauen et al. (2001)
6-chloron cotinezuur	>122 (48u)		Nauen et al. (2001)

Tabel 4. Overzicht van de concentraties imidacloprid die letale en sub-letale effecten veroorzaken op (m cro-)-volksniveau bij honingbijen (*Apis mellifera*) and hommels (*Bombus terrestris*, *Bombus impatiens*), vastgesteld in verschillende onderzoeken via orale en contact blootstelling onder laboratorium- en (semi-) veldomstandigheden (no observed effect concentration=NOEC).

Honingbijen	Hommels	Referenties
Chronische orale toxiciteit <ul style="list-style-type: none"> • NOEC: 5 µg/l • geen effect bij: 24 µg/kg in suikeroplossing; 2-20 µg/kg in zonnebloemnectar 	Chronische orale toxiciteit <ul style="list-style-type: none"> • NOEC: 10 µg/l; LC₅₀: 59 µg/l • Continu voeren met 10-25 µg/kg in suikeroplossing en met 6-16 µg/kg in pollen: toegenomen werkster mortaliteit na 30 dagen 	Schmuck et al. (2001); Tasei et al. (2001a); Decourtye et al. (2004); Faucon et al. (2005); Mommaerts et al. (2010)
Chronisch sub-letaal effect Laboratorium: <ul style="list-style-type: none"> • 48 µg/kg in sucrose; reductie van de siroopconsumptie, foerageeractiviteit en broedoppervlakte • 100 µg/l: geen effect op de terugkeer snelheid • 500-1000 µg/l: bijen bleven weg van de voederplek of de kast tot wel 24u (acuut; oraal) • >50 µg/l: toename van het tijdsinterval tussen de afzonderlijke bezoeken aan een voedertafel (oraal) • 20 µg/l: afname van de foerageeractiviteit • >100 µg/l: afname van de foerageeractiviteit gedurende 30-60 min (Semi-)veld: <ul style="list-style-type: none"> • NOEC voor broed, foerageeractiviteit van de werksters, populatieomvang adulte bijen, aantal ramen met broed na overwinteren en de algemene vitaliteit van het volk: 5 µg/l • 24 µg/kg verminderde de foerageeractiviteit, de activiteit op de vliegplank, de suikeropname en de hoeveelheid broed in het volk • Er werd geen relatie gevonden tussen met imidacloprid behandelde mais velden en bijensterfte op bijenstanden 	Chronisch sub-letaal effect Laboratorium: <ul style="list-style-type: none"> • Continu voeren met 10-25 µg/kg in suikeroplossing en met 6-16 µg/kg in pollen: geen effect op de voedselopname en op het verschijnen van de jonge mannetjesdieren; wel was er vanaf 10 µg/kg in suikeroplossing en 6 µg/kg in pollen een verminderde hoeveelheid broed • NOEC voor reproductie: 20 µg/l in een klassieke toxiciteitstest; EC₅₀=37 µg/l, <NOEC 2,5 µg/l in een foerageer/gedragstest; EC₅₀=3.7 µg/l • NOEC in stuifmeel voor hoeveelheid broed, aantal mannetjes, werksters en koninginnen, gewicht van de werksters, stuifmeelconsumptie, foerageervaardigheid op complexe kunstmatige bloemen: 7 ng/g (Semi-)veld: <ul style="list-style-type: none"> • NOEC voor broed, volkswontwikkeling en foerageeractiviteit: 2 µg/l • 0.45 kg/ha als granulaat + bespuiting: geen effect op de vitaliteit van de volken en op het gedrag van de werksters • 0.34 kg/ha via bespuiting + irrigatie: geen effect op de vitaliteit van de volkjes en op de defensieve reactie van de bijen • 0.34 kg/ha via bespuiting zonder irrigatie: afname van het aantal broedkamers, het aantal honingpotten, aantal werksters en het gewicht van het volkje • Foyerageren op planten gekweekt uit met imidacloprid behandelde zonnebloemzaden: geen effect op het foyerageren en op de vitaliteit van de volkjes 	Schmuck (1999); Tasei et al. (2001a,b); Gels et al. (2002); Bortolotti et al. (2003); Morandin & Winston (2003); Decourtye et al. (2004); Faucon et al. (2005); Ramirez-Romero et al. (2005); Yang et al. (2008); Nguyen et al. (2009); Mommaerts et al. (2010); Mommaerts & Smagghe (2011)

CONCEPT

Berekende blootstelling uit voedselgebruik en residuniveaus

Comment [D34]: Commentaar over dit stuk laat ik graag over aan een specialist zoals Jeroen van der Sluijs of Henk Tennekkes.

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 via stuifmeel van mais en nectar van zonnebloemen bijen 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 u t de publicatie van Rortais et al (2005) duidelijk wordt dat nectar / honing vanwege de hoge suiker/energieconsumptie de belangrijkste orale blootstellingsroute is.

Resultaat:

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). D t is het worst case scenario, want gebaseerd op volledig voeden op nectar met de genoemde concentratie aan imidacloprid, en op het gebruik door een nectar foerageerder. Foerageren voor nectar is de meest energie intensieve taak in het bijenvolk, een nectar foerageerder 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 im dactoprid op van 1,06 - 4,27 ng/bij, dus maximaal 4,27/7 = 0,61 ng/bij per dag. De Tox city Exposure Ratio (TER) is dan LD₅₀ (oraal) / PEC (Probable Exposure Concentrat on), in dit geval: **TER = 3,7 ng / 0,61 = 6,07 (-24,28)**. Een TER > 10 wordt als een laag tot geen ris co gerekend.

Clothian din, Thiamethoxam en Fipronil:

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

Clothian din: de gevonden 2.24 µg/kg in nectar van koolzaad, met een suikergehalte van 470g/kg (Creswell, 1999), zou een nectar-foerageerder 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**

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

A: Stof	B: % suiker nectar	C: nectar behoefte mg	D: Conc. stof in nectar	E: dosis totaal (=C*D) ng/bij	F: PEC (E/7) ng/bij.dag	G: LD ₅₀ (oraal) ng/bij	TER (=G/F)
Imidacloprid	40%	560-2248	1,9 µg/kg	1,06-4,27	max: 0,61	3,7 ng	6,07
Clothian din	47%	476-1912	2,24 µ/kg	1,07-4,28	max: 0,61	4 ng	6,56
Thiamethoxam			--				--
Fipronil			--				--

Stuifmeel:

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.

Imidacloprid:

D t 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**.

Thiamethoxam:

Eén heel hoge waarde van thiamethoxam gevonden in stuifmeel van 53 µg/kg (Mullin et al., 2010) zou een voedster een dosis van 3,44 ng opleveren. **TER = 14,5**

Clotian din:

Via 2,24 ppb in stuifmeel (Cutler & Scott-Dupree, 2003) zou een voedster met 0,15 ng worden belast. **TER = 267**

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 (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 risico vormt voor honingbijen.

Conclusie:

In deze worst case benadering (gebaseerd op maximaal ingeschatte gebruik door bijen, en uitgaande van volledige afhankelijkheid van verontreinigde nectar en stuifmeel) ontstaat geen risico voor acute toxiciteit via blootstelling door stuifmeel.

Comment [D35]: Hoe zit het dan met sub-letale effecten?

Blootstelling via nectar zou, bij 100% afhankelijkheid van de verontreinigde nectar, voor nectar foerageersters mogelijk een risico opleveren op acute sterfte bij imidacloprid (zonnebloem) en clothianidine (koolzaad).

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 monitoringstudie 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 neonicotinoiden) 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: 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 neonicotinen). 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 (Mullin *et al.*, 2010) liet zien dat er 98 stoffen konden worden aangetoond in bijen, in was, in stuifmeelvoorraden, in honing. Daaronder waren neonicotinen, 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 mais 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.nl (nog te publiceren).

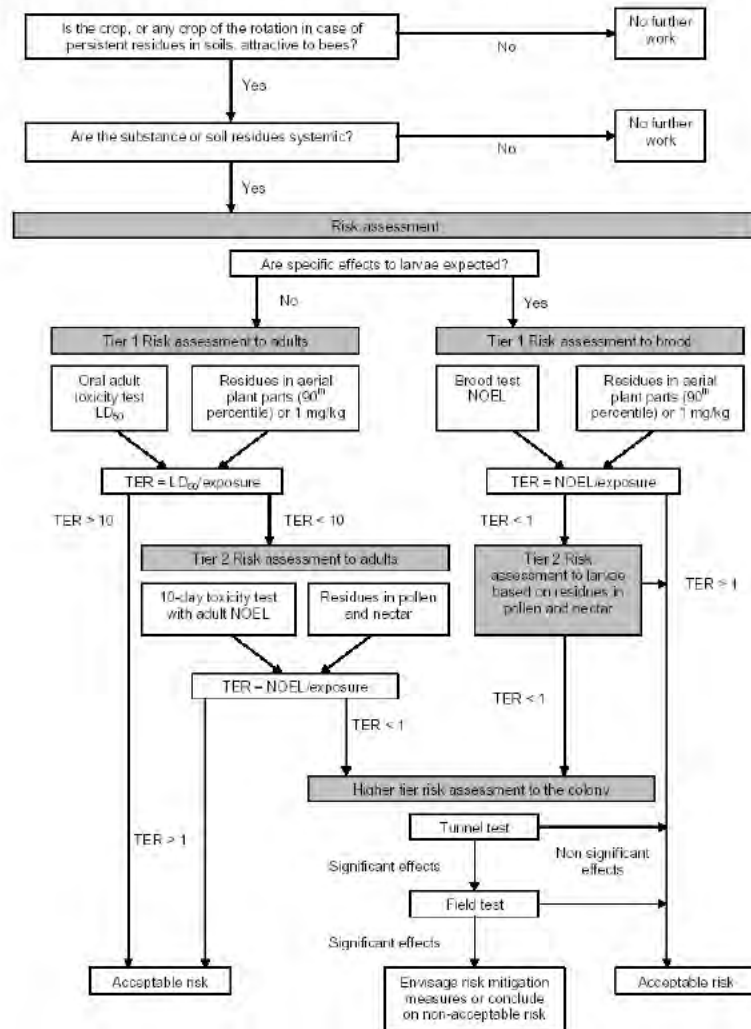
Voor clothianidine kon de veldstudie van Cutler & Scott-Dupree (2007) geen schade in de bijenvolken (bijen en broedontwikkeling) aantonen na foerageren van de bijen op bloeiend koolzaad van uit met clothianidine gecoate zaden geteeld. Ook de overwintering van de volken was normaal nadien. De studie van Cutler & Scott-Dupree (2007) werd in de meta-analyse van Creswell (2011) als een van de beste aangemerkt, omdat de veld situatie realistisch was en de volken secuur en lang werden gevolgd.

In de grote monitoring studie van Mullin *et al.* (2010) werd clothianidine niet aangetroffen, in geen van de bijen matrices, hoewel er wel op werd geanalyseerd. Thiamethoxam werd in slechts 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 jarenlange grote monitoring in Duitsland (Genersch *et al.*, 2010) werden vele pesticiden (waaronder de acariciden tegen varroa) teruggevonden in bijenvolken. Clothianidine 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 varroa-besmetting in oktober; 2) infectie met het deformed wing virus (DWV) 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 bij de gezondheid op lange termijn van bijenvolken vast te stellen.

Risk assessment schema voor schade van neonicotinoiden aan bijen

Zoals aangegeven in de figuur (uit Alix et al., 2009) begint een risicoanalyse voor systemische middelen met het vaststellen van de kans op blootstelling (Alix et al., 2009; Thompson et al., 2010). Mocht blootstelling waarschijnlijk zijn, doordat bijen aangetrokken worden door het betreffende gewas en doordat de stof naar nectar en stuifmeel wordt getransloceerd, is een verdere vaststelling van het risico nodig. Zoals eerder al beschreven hebben neonicotinoiden (en tot op zekere hoogte ook Fipronil) goede systemische eigenschappen, en worden ze ook teruggevonden in nectar en stuifmeel, zodat het voorgestelde schema kan worden toegepast voor deze stoffen.



Het huidige schema vereist op Tier-1 acute toxiciteitstests op adulte bijen en op broed. Om echter de impact van neonicotinoiden in het veld in te schatten moeten de testen ook met veldrelevante concentraties worden uitgevoerd. Voor neonicotinoiden is inmiddels aangetoond dat ze in het voedsel van bijen worden opgenomen (nectar, stuifmeel) en in de kast terecht komen, in opslag of voor direct gebruik als voedsel voor bijen en hun larven. 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 neonicotinoiden (in lage concentraties). Het is ook niet uitsluitend dat de vervuilde raten ziektekiemen bevatten. Het is dus nodig dat de neveneffecten van neonicotinoiden 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 48u-LD₅₀ van 25 ng/bij niet verschilde tussen beide (Decourtye and 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 zeer incomplete meting. Daarom moeten potentiële neveneffecten na langdurige blootstelling aan neonicotinoiden 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 µg/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 veel 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 neonicotinoiden 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 neonicotinoiden in nectar, omdat het lastig en gevaarlijk is toxiciteitsgegevens verkregen met stuifmeel te vertalen naar nectar. Halm et al. (2003) bevestigden de noodzaak van een betere standaardisatie van de bijen-categorieën in de risk assessment, omdat op grond van literatuur gegevens de blootstelling aan imidacloprid hoger was voor winterbijen, nectarhaalsters en voedselbijen dan voor larven, was producerende bijen en stuifmeelhaalsters. Deze auteurs stellen voor om in plaats van de LD₅₀ of LC₅₀ 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 interactie tussen individuen mee te nemen. De higher tier fase van de 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 de 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 subletale 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 subletale effecten van imidacloprid op foeragegedrag mee te nemen, zoals van vrij vliegende hommels in kassen.

Zoals al opgemerkt bij Tier-1, zal de betrouwbaarheid 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 veld risicoanalyse moet alle mogelijke routes van blootstelling meenemen. Blootstelling aan neonicotinoiden via stof uit de zaaimachines is een veel gerapporteerde oorzaak van bijensterfte, vooral bij hoge luchtvochtigheden (Girolami et al., 2011; Marzaro et al., 2011). Zoals blijkt uit figuur 1 zou blootstelling ook kunnen optreden doordat bijen guttatiedruppels van bladeren van planten opnemen. Hoewel deze blootstellingsroute als belangrijk wordt beschouwd zijn de data nog niet duidelijk. Zoals gerapporteerd door Thompson (2010) is de vloeistof voornamelijk 's morgens vroeg aanwezig en het is 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 guttatiedruppels een bron van blootstelling blijven.

Deleted: a

(Thompson, 2010). Tapparo et al. (2011) rapporteerden dat imidacloprid concentraties in guttatiewater geen logisch verband hielden met de op de zaden aangebrachte dosis. Daarom, zolang geen eind conclusies kunnen worden getroffen is het raadzaam deze blootstellingsroute mee te nemen in het risico analyse schema voor neonicotinoïden en fipronil.

Ten slotte: het vaststellen van de risico's van het optreden van negatieve neven-effecten van neon cotinoiden 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 interactie tussen de bijen: bij andere sociale bijen dan honingbijen zoals hommels, kan dit al in een eerdere fase van de risk assessment, onder Tier-1 worden meegenomen. Een gestandaardiseerde test met micro-volkjes maakt het mogelijk letale en sub-letale effecten van neon cotinoiden op reproductie en gedrag te evalueren.

Conclusies, doelen voor onderzoek en aanbevelingen

Neonicotinoiden 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 wereldmarktwaarde van \$ 1 miljard, is te danken aan het selectieve werkingsmechanisme bij lage doseringen (Alouane et al., 2009). Neonicotinoiden werken als neurotoxinen in op het zenuwstelsel van de insecten via interactie met de nACholinereceptoren. Met de bedoeling om potentiële gevaren van neonicotinoiden voor bijen vast te stellen hebben we in dit rapport alle beschikbare gegevens samengevat.

Neonicotinoiden 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 giftigheids niveaus; er is echter een groot tekort aan betrouwbare data omdat analyses zijn uitgevoerd vlakbij de detectiegrenzen. Ook de niveaus gevonden in door bijen verzameld (en opgeslagen) en geproduceerde matricies waren laag, hoewel we aandringen op meer onderzoeken naar residuen omdat de gegevens nu voornamelijk zijn gebaseerd op een paar grotere studies uitgevoerd aan bijenstanden in Frankrijk, Duitsland en de Verenigde Staten. Bovendien kunnen we er van uit gaan dat de grootschalige toepassing van neonicotinoiden op termijn zal leiden tot accumulatie van neonicotinoiden in de omgeving.

Veel letale en sub-letale effecten van neonicotinoiden zijn beschreven in laboratorium studies, in het veld werden echter geen effecten gevonden bij veld-realistische doseringen.

We concluderen dat het huidige voorgestelde risk assessment schema voor systemische pesticiden adequaat is voor neonicotinoiden, omdat het effecten op diverse stadia (larvaal en adult) en op zowel individueel als heel volk niveau meeneemt. Echter voelen we de noodzaak om meer te testen met veld-relevante concentraties, en veld-relevante blootstellings- en beoordelingsperiodes. Met name bij honingbijen moeten bij neveneffect beoordeling de volken over de winter gevolgd worden, inclusief de voorjaarsontwikkeling daarna.

Het moet echter gezegd dat het scoren van sub-letale effecten op foeragegedrag en leergedrag / geheugen heel lastig en intensief is. Omdat de genomen van de honingbij (*A. mellifera*) en hommels (*B. terrestris*, *B. impatiens*) bekend zijn kan daaruit veel extra informatie gehaald worden om de complexe (net-werk) mechanismen onder natuurlijke omstandigheden te begrijpen. Dan kunnen behandelingen met pesticiden zoals neonicotinoiden 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). Na validatie kunnen zulke gen-transcriptoom responsen worden benut als moleculaire ecotoxicologische markers, die op hun beurt de risk assessment kunnen verbeteren. Deze moleculaire markers kunnen complementair worden gebruikt aan de klassieke meer robuuste eindpunten zoals mortaliteit en reproductie die worden bepaald met hele insecten of volken, afhankelijk van het Tier-niveau. Deze nieuwe moleculaire inzichten kunnen ook bijdragen aan beter begrip van het actiemechanisme van neonicotinoiden zoals hun interactie met verschillende nAChR's in bijen, in relatie tot hun farmacokinetiek en metabolisme. De nieuwere en veiligere neonicotinoiden, zoals de cyano-groep ten opzichte van de nitro-groep, is een goed voorbeeld van verdere ontwikkeling van milieuvriendelijke stoffen die het voorkomen van verschillende nAChR's in bijen benut. Hierbij moeten we opmerken dat de giftigheid van neonicotinoiden kan toenemen door synergistische effecten met andere stoffen, zoals aangetoond door Iwasa et al. (2004) voor mengsels met daarin een cyano-groep neonicotinoiden. Daarom moet het zoeken naar veiligere stoffen meteen gepaard gaan met onderzoek van de potentiële synergistische effecten van mengsels van andere stoffen met neonicotinoiden. 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 communicatie tussen industrie, universiteiten en overheid wat kan leiden tot een betere risk assessment. Dat zal op zijn beurt helpen om heldere antwoorden te geven op de vragen en zorgen van de maatschappij en media.

Verantwoording

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

Comment [D36]: Moet er geen stuk bij over het grootschalige gebruik van insect des d.m.v bespuiting waar bij de kans groot is dat ook niet doel insecten getroffen worden? Er is inmiddels literatuur over de gevolgen van het gebruik van insectides zoals de aantasting van parasitaire sluipwespen die een belangrijke bijdrage leveren aan een evenwichtig ecosysteem.

Comment [D37]: Geen tijd om dit intensief te lezen met de bijbehorende literatuur.

Beschikbare literatuur per actieve stof

Hieronder wordt de literatuur per stof behandeld vanaf de geregistreerde toepassingen, de in de toelating gebruikte getallen voor de acute giftigheid (LD_{50}) (gegevens van de toelatingsinstantie CTGB).

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

Vervolgens wordt gekeken welke concentraties van het middel en eventuele metabolieten aangetroffen worden in voor bijen relevante matricies: stuifmeel, nectar, guttatie druppels. 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 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.

Imidacloprid

Toepassingen (CTGB):

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

LD₅₀ (CTGB)

Acute contact toxiciteit: LD₅₀ = 0,081 µg a.s./bij (in formulering: 0,042 µg a.s./bij).

Acute orale toxiciteit: LD₅₀ = 0,0037 µg actieve stof / bij (in formulering: 0,0056 µg a.s./bij).

Acute giftigheid literatuur

Een studie uitgevoerd door 7 verschillende onderzoekscentra in Europa rapporteerde volgende acute toxiciteitsgegevens voor imidacloprid: LD50 (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 LD₅₀-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 imidacloprid concentraties (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 LD50-waarden (oraal) zijn >36 ng/bij, >49 ng/bij en 159 ng/bij terwijl metabolieten zonder deze farmacofoor (urea-metabooliet, 6-chloronicotinic acid) niet toxisch zijn; de respectievelijke LD50-waarden (oraal) waren >99.500 ng/bij en 121.500 ng/bij (Nauen et al., 2001).

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 die verschillend was met 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-OH-imidacloprid na chronische orale blootstelling van winterbijen.

In een semi-veldproef waarbij honingbijkasten chronisch blootgesteld werden gedurende 39 dagen aan zonnebloemnectar aangerijk met imidacloprid aan 0,002; 0,005; 0,010 en 0,020 mg/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.

Deleted: was

Comment [D38]: Ik denk niet dat je kunt spreken van veilig. De andere concentraties gaven dus wel een significant verhoogde mortaliteit

Deleted: veilig

Deleted: (mortaliteit niet significant verschillend van de controle). ¶

Sub-letale effecten (gedrag)

Naast toxiciteit veroorzaakt imidacloprid wanneer toegediend aan subletale dosissen/concentraties neveneffecten op belangrijke processen zoals het oriëntatie- en leervermogen. Door middel van de "olfactory learning en memory" biotoets toonden Decourtye et al. (2004a) aan dat het leerproces negatief beïnvloed wordt gedurende de conditionering van de reflex (=uitduwen van de proboscis) wanneer honingbijen gevoed werden met een sucrose oplossing behandeld met imidacloprid aan 24 µg/kg. 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 48 µg/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 'muschrroom body'. Decourtye et al. (2004b) toonden via de PER biotoets een effect aan op het middenlange maar niet op het korte geheugen met imidacloprid aan 12 ng/bij. Gebruik makend van eenzelfde biotoets 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 (topisch: 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.

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 meer is dan de gemiddelde gerapporteerde veldconcentratie aanwezig in de pollen van zonnebloemen.

In tegenstelling tot de waarnemingen in het laboratorium rapporteerden verschillende semiveldstudies geen effecten op de kolonies. Chronische orale blootstelling tot 0.020 mg/kg veroorzaakte geen neveneffecten (Schmuck et al., 2001). Ook in een andere semiveldstudie waarbij honingbijkasten chronisch blootgesteld werden aan een sacharosesiroop aangerijkt 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 aangerijkt 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.

Gevonden concentraties in planten in relatie tot de toepassing

Translocatie van residuen in planten

Verscheidende 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 ¹⁴C-imidacloprid per zaadje (Gaucho; 700 g/kg WS) een gemiddeld gehalte aan imidacloprid van 3.9±1.0 µg/kg pollen 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 dezelfde dosering geen imidacloprid teruggevonden in nectar, pollen 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). In dezelfde veldstudie werden ook zonnebloemen verbouwd op gronden die in de jaren daarvoor een imidacloprid behandeling hadden gehad en nog <2 tot 18 µg/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 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 de pollen 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 de pollen aangetroffen (< 1 µg/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 µg/kg (Laurent & Rahahao, 2003).

Girolami et al. (2009) vond 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 blad uiteinde 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. Girolami 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 ± 9.96 mg/l; in een ander experiment werd gemiddeld 83.8 ± 14.1 mg/l gemeten. Hoewel ook melding wordt gemaakt van monstername 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 Kruschik 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 µg/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 'geextraheerd' van bijen, maar onduidelijk is hoe lang de bijen op het gewas konden foerageren.

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-chloor-nicotinezuur 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 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 zonnebloemen teelt 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 metabooliet chloor-nicotinezuur 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).

Verwachte maximale blootstelling vergeleken met LD₅₀

Wanneer gevonden residu-niveaus (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 via stuifmeel van mais en nectar van zonnebloemen bijen 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: 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 nectar foerageerder. Foerageren voor nectar is de meest energie intensieve taak in het bijenvolk, een nectar foerageerder gebruikt 224-899 mg suiker in 7 dagen. Omdat zonnebloemnectar ongeveer 40% suiker bevat, heeft een bij $2,5 \times (224-899) = 560-2248$ mg nectar. 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 voedsierbijen belast worden, zij consumeren in de 8 dagen dat ze voedsier 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 $3,7/0,02 = 185$.

Metabolisme en bioaccumulatie

Imidacloprid wordt vlot gemetaboliseerd door de honingbij *Apis mellifera*. Na blootstelling via suikerwater aan doseringen van 20, 50 of 100 µg ¹⁴C-imidacloprid/kg bij werden halfwaardetijden gemeten van 4-5 uur (Suchail et al., 2004a,b). Deze dosering 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).

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 monitoringstudie 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 neon cotinen) 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 neonicotinen). 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 (Mullin et al., 2010) liet zien dat er 98 stoffen konden worden aangetoond in bijen, in was, in stuifmeelvoorraden, in honing. Daaronder waren neonicotinen, 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 (zware metalen) door [bijen@wur](mailto:bijen@wur.nl) (nog te publiceren).

Clothianidin

Toepassingen (CTGB):

Clothianidin wordt toegepast onder de merknamen 'Poncho Bèta' en 'Poncho Rood' voor de coating van bietenzaad en zaad voor snij- en korrel-mais. Clothianidin heeft geen niet-professionele toepassingen en wordt niet als biocide gebruikt. Poncho Bèta bevat naast clothianidin ook bèta-cyfluthrin.

LD₅₀ (CTGB)

Acute contact toxiciteit: LD₅₀ = 0,04426 µg a.s./bij

Acute orale toxiciteit: LD₅₀ = 0,00379 µg a.s./bij. LD₅₀ metaboliet TZNG = 3,9 µg/bij

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 residu's. Volgens Bailey et al. (2005) veroorzaakten residu's 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.

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 clothianidine 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.

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 clothianidine, 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 clothianidine gevonden in bijen, suiker of 'sugar patty' (Bacandritos et al., 2010).

Girolami et al. (2009) vonden 23.3±4.2 mg/l clothianidine 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 Clothianidine 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.

Verwachte maximale blootstelling vergeleken met LD₅₀

Wanneer gevonden residuiveaus (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 via stuifmeel van maïs en nectar van zonnebloemen bijen 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 nectar-foerageerster in de loop van een week foerageren maximaal een geaccumuleerde dosis van 1,07 tot 4,28 nano-g kunnen opleveren, per dag 0,153 - 0,611 ng/bij. De orale LD₅₀ is 4 ng/bij. Dat resulteert in een TER = 6,56 - 26,3. Een TER van > 10 geldt als geen of laag risico. 1,07 tot 4,28 ng kunnen opleveren.

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 = $4/0,015 = 267$.

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 van uit met clothianidine gecoate zaden geteeld. 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 beste aangemerkt.

In de grote monitoring studie van Mullin et al (2010) werd clothianidine niet aangetroffen, in geen van de bijen matrces, hoewel er wel op werd geanalyseerd. Ze vonden wel 98 andere pesticiden en metabolieten in mengsels tot concentraties van 214 ppm 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. Clothianidine werd niet gevonden (werd wel op geanalyseerd). Er werden in deze studie geen verbanden ontdekt tussen de residuen en de wintersterfte. Dergelijk verband werd wel gevonden met: 1) hoge varroa-besmetting in oktober; 2) infectie met het deformed wing virus (DWV) 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 bij de gezondheid op lange termijn van bijenvolken vast te stellen.

Thiamethoxam

Toepassingen (CTGB):

Thiamethoxam wordt toegepast voor gewasbehandeling (bespuiting) onder de naam 'Actara' bij aardappelen, bol- + knolbloemgewassen, bloemisterij gewassen, boomkwekerij en vaste planten, tevens voor grondbehandeling bij aardappel. Onder de naam 'Cruiser' voor zaadbehandelingen van mais, erwten, peulen en kapucijners, bieten, sla en andijvie. Voor niet-professioneel gebruik in sierplanten binnenshuis is er 'Axoris'.

LD₅₀ (CTGB)

Acute contact toxiciteit: LD₅₀ = 0,024 µg a.s./bij

Acute orale toxiciteit: LD₅₀ = 0,005 µg a.s./bij

NB ook getallen voor hommels beschikbaar: Contact LD₅₀: 0,11 µg formulering (WG 25%) per werkster;

LD₅₀ oraal: 0,02 µg formulering (WG 25%) per hommel werkster.

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.

Sub-letale effecten (gedrag)

Blootstelling aan subletale dosissen/concentraties resulteert in subletale effecten op de honingbij. Acute contact en orale blootstelling aan subletale dosissen (0,1; 0,5; 1 ng/bij) had geen effect op de "locomotor activiteit", "sucrose en water responsiviteit" (El Hassani et al., 2008). Topische blootstelling aan 1 ng/bij (= 1/5 van de LD₅₀-waarde) had een significant effect op het leervermogen en 0,1 ng/bij (topisch) had een significant effect op het geheugen van honingbijen na 24u (Aliouane et al., 2009). Daarnaast was er ook een significante daling van de "sucrose responsiviteit" 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 responsiviteit" en waterconsumptie.

Gevonden concentraties in planten in relatie tot de toepassing

NB In de toelatingsdossiers over thiamethoxam zitten goede studies met heel veel gegevens over concentraties in stuifmeel enz, ook goede monitoringen van bijenvolken, langdurig. Moeten gepubliceerd worden!!!!

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).

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.

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).

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 via stuifmeel van mais en nectar van zonnebloemen bijen 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: geen concentraties beschikbaar in nectar / honing. De ene (heel hoge) waarde van thiamethoxam gevonden in stuifmeel van 53 ppb (Mullin et al., 2010) zou een voedster een dosis van 3,44 ng opleveren, een belasting per dag van 0,344 ng per bij. Dat levert een TER van $5 / 0,344 = 14,5$. Een TER hoger dan 10 wordt beschouwd als geen of laag risico.

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 ppm 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 monitoring 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.

Thiacloprid

LD₅₀ (CTGB)

Acute contact toxiciteit: LD₅₀ =

Acute orale toxiciteit: LD₅₀ =

Acute giftigheid literatuur

Elbert et al. (2000) rapporteerden een LD₅₀-waarde van 24,2 µg/bij.

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 AI/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: geen verband met sterfte van de volken.

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 via stuifmeel van mais en nectar van zonnebloemen bijen 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:

Thiacloprid: één heel hoge gevonden waarde (Johnson et al, 2011) van 33 ppb in honing zou een maximaal geaccumuleerde dosis geven van 9,24 tot 37,1 nanogram per bij.

Mullin et al., (2010) vonden 1,3 ppb in pollen. Dat zou een belasting geven van 0,08 ng per bij. De hoogst gevonden waarde (115 ppb; Johnson et al., 2011) zou 7,47 ng per bij betekenen.

Acetamiprid

LD₅₀ (CTGB)

Acute contact tox citeit: LD₅₀ =

Acute orale tox citeit: LD₅₀ =

Acute giftigheid literatuur

Studies welke 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-demethyl-acetamiprid, 6-chloro-3-pyridylmethanol en 6-chloro-nicotinezuur. Blootstelling aan deze metabolieten aan 50 µg/bij veroorzaakte geen toxiciteit (Iwasa et al., 2004).

Chronische blootstelling

Alouane et al. (2009) vonden geen significante werkstermortaliteit na chronische (11 dagen) orale en contact blootstelling aan 1 µg/bij acetamiprid. De waargenomen mortaliteit was 29% voor orale blootstelling en 32% na contact.

Sub-letale effecten (gedrag)

Verscheidende studies onderzochten de subletale effecten na blootstelling aan subletale dosissen/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 topisch behandeld waren met subletale dosissen (0,1 en 0,5 µg/bij). Bij orale acute blootstelling werden deze effecten niet waargenomen. Dit werd ook recent bevestigd door Aliouane et al. (2009) na een orale chronische blootstelling (gedurende 11 dagen) aan 0,1 µg/bij acetamiprid, welke een verdunning is van 1/100 van de LD₅₀ waarde.

De "sucrose responsiveness" van bijen welke acuut topisch behandeld werden met subletale dosissen (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" (Alouane 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; Alouane et al., 2009). Contact blootstelling (0,1 en 0,5 ng/bij) resulteerde in een dosisafhankelijke stijging van de "water responsiveness" van de bijen. Op andere subletale eindpunten zoals waterconsumptie werd er geen effect waargenomen na chronische blootstelling aan 0,1 µg/bij (Alouane et al., 2009).

De "olfaction learning en memory" biotoets toonde aan dat acetamiprid (0,1 µg/bij) interfereerde met het 'lange termijn geheugen' (El Hassani et al., 2008).

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).

Verwachte maximale blootstelling vergeleken met LD₅₀

Wanneer gevonden residuiveaus (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 imdacloprid dat via stuifmeel van mais en nectar van zonnebloemen bijen 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:

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.

Metabolisme en bioaccumulatie

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 weefsel specifiek te zijn (Brunet et al., 2005).

Flonicamid

LD₅₀ (CTGB)

Acute contact toxiciteit: LD₅₀ =

Acute orale toxiciteit: LD₅₀ =

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).

Fipronil

Toepassingen (CTGB):

Fipronil is in Nederland geregistreerd onder de naam 'Mundial' voor zaadcoating bij diverse koolsoorten en uien en sjalotten. Onder naam 'Goliath' als biocide tegen kakkerlakken.

LD₅₀ (CTGB)

Acute contact tox citeit: LD₅₀ = 0,00593 µg/bij (=5,9 ng/bij)

Acute orale tox citeit: LD₅₀ = 0,00417 µg/bij (= 4,2 ng/bij) LC₅₀=0,160 mg/kg dieet.

Ook gegevens over twee metabolieten:

MB 46136 (sulfon metaboliet): LD₅₀ acuut oraal = 0,0064 µg/bij

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

Acute giftigheid literatuur

Studies waarbij honingbijen blootgesteld zijn aan acute doses/concentraties zijn beperkt. Mayer et al. (1999) rapporteerden een contact LD₅₀-waarde voor honingbij van 0,013 µg/bij.

De enantioomeren 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).

Chronische blootstelling

Chronische blootstelling aan fipronil resulteerde in een hoge mortaliteit van honingbijwerkers. 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).

Sub-letale effecten (gedrag)

Een oudere studie van Mayer et al. (1999) toonde aan dat orale blootstelling via het suikerwater aan 100 en 500 ppm 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 responsiviteit". Om de "water en sucrose responsiviteit" 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 responsiviteit" bij een dosis van 1,0 ng/bij en dit 1 uur na topische behandeling. 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 responsiviteit" 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 in contact 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 fipronil aan 0,1 ng/bij in de thorax een effect had op het "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 activiteit". De impact op de "locomotor activiteit" wordt geëvalueerd door gebruik te maken van een plexiglasdoos 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 activiteit" bij fipronil aan 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

significante lagere "locomotor activiteit" bij lagere concentraties. Bijvoorbeeld de bijen bleven langer immobiel bij een topische behandeling met fipronil aan 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 adultontwikkeling tot een verhoogde agressiviteit tussen de bijen welke gepaard ging met het frequent wapperen van de vleugels en het verspreiden van het alarmferomoon (Alouane 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 (=LD₅₀/20), 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 aan 0,014 en 0,028 kg ai/ha op *Brassica napus* bloemen.

Gevonden concentraties in planten in relatie tot de toepassing

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

Comment [D39]: Dit vind ik wel een erg kort door de bocht conclusie: als je het niet aantoonst vormt het geen risico. Misschien dat de detectiemethoden niet zo gevoelig zijn, terwijl anderszijds gemeld wordt dat deze middelen zeer giftig zijn en maar lage concentraties nodig zijn voor een effect. Dat moet ook wel als het m ddel in de coating van een zaad nog voldoende effect heeft als in de rest van de plantdelen komt.

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 werden 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 sulfone metabolieten 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 noord-west 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 was 0.5 µg/kg, de LOD 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 LD₅₀ kan worden opgelopen via deze weg. Opmerkelijk was dat de varroa-besmetting 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 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).

Verwachte maximale blootstelling vergeleken met LD₅₀

Wanneer gevonden residu-niveaus (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 im dactloprid dat via stuifmeel van maïs en nectar van zonnebloemen bijen 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 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 (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 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.

Metabolisme en bioaccumulatie

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.

Literatuur

- Alaux C, Brunet J-L, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchan S, Cousin M, Brillard J, Baldy A, Belzunces LP & Le Conte Y. 2010. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environm. Microbiology* 12(3):774-782.
- Alaux C, F Dudoz, D Crauser & Y Le Conte 2010. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters* online doi: 10.1098/rsbl.2009.0986
- Alouane 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.
- Bacandritsos N, Granato A, Budge G, Papanastasiou I, Roinoti 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, Harris 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, Démares F, Couret-Fauvel T, Sandoz JC, Gauthier M. 2009. Effect of fipronil on sense-specific antennal tactile learning in the honeybee. *J Insect Physiology* 109:1099-1106.
- 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, Gonzalez-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 online*, 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 Françaises* 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. *Ecotoxology* 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. *Apologie* 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 M-H. 2004b. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pest c 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. *Ecotoxology* 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. *Apologie* 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 neonicotinoid 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 J-P, Aurières C, Drajnudel 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
- García-Chao M, Jesús Agruna M, Flores Calvete G, Sakas 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, Richter 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. *Apologie* 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.
- 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, Garr do-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 neonotonic acid 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
- 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. www.unep.org; 12 pages
- Krischik VA, Landmark AL, Heimpel GE. 2007. Soil-applied imidacloprid is translocated to nectar and kills nectar-feeding *Anagyrus pseudococci* (Girault) (Hymenoptera: Encyrtidae). *Environmental Entomology* 36:1238-1245.
- 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
- Maxim L & Van der Sluis JP 2007. Uncertainty: cause or effect of stakeholders' debates? Analysis of a case study: the risk for honeybees of the insecticide Gaucho®. *Science of the Total Environment* 376, 1-17
- 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, Ashcraft S, Simonds R, vanEngelsdorp D, Pettis JS. 2010. High Levels of pesticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *Plos One* 5(3).
- Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcroft S, Simonds R, vanEngelsdorp, D & Pettis JS 2010. High levels of pesticides 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 nicotine 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.
- 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, Chauvaud 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, Schoning R, Stork A, Schramel O. 2001. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L. Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Management Science* 57:225-238.
- 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.
- Smoldis 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 effect in the field. *J Econ Entomol*: 1081-1088.
- Suchail S, De Sousa G, Rahmani R, Belzunces LP. 2004a. In vivo distribution and metabolism 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.
- Von Der Ohe, W & Janke M. 2009. Bienen im Stress. Schäden entstehen wenn verschiedene Faktoren zusammen kommen. *Allgemeine Deutsche Imkerzeitung* 2009/4, 10-11.
- 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.
- 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.

Bijlage II



Ministerie van Economische Zaken,
Landbouw en Innovatie

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK DEN HAAG

Universiteit Utrecht

10.2.e

10.2.e

Directie Agroketens en
Visserij

Prins Clauslaan 8
2595 AJ DEN HAAG
Postbus 20401
2500 EK DEN HAAG
www.rijksoverheid.nl/eleni

Onze referentie
233773

Datum - 6 OKT. 2011

Betreft Reactie op uw brief d.d. 26 september 2011 inzake literatuuronderzoek
neonicotinoiden en bijensterfte

Geachte heer 10.2.e,

Uw brief van 26 september jl. heb ik in goede orde ontvangen. In deze brief stelt u mij op de hoogte van het commentaar dat u heeft op het concept-literatuuronderzoek "Neonicotinoiden en fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken". Dit literatuuronderzoek wordt uitgevoerd door onderzoekers van de Universiteit van Wageningen, van de Universiteit van Gent en van de Vrije Universiteit Amsterdam in opdracht van ministerie van EL&I.

Zowel ik, als de onderzoekers, vinden het van groot belang dat de relevante bij dit belangrijke onderwerp betrokken wetenschappers met elkaar een goede gedachtenwisseling hebben over de bevindingen van het onderzoek, alvorens het rapport definitief wordt afgerond. Dat is de reden waarom u -samen met twee andere wetenschappers- bent gevraagd om vooraf een reactie te geven op het concept-rapport. Geconstateerde omissies en verschillen van inzicht kunnen op deze wijze aan het licht komen, bediscussieerd en vervolgens overgenomen of weerlegd worden.

Van de onderzoekers heb ik begrepen dat er nog geen terugkoppeling met hen heeft plaatsgevonden over uw bevindingen naar aanleiding van het concept-rapport. Ik vind het vanuit een zorgvuldige procesvoering verstandig en wenselijk dat dit wel eerst plaatsvindt. De onderzoekers hebben mij laten weten zeer bereid te zijn een gesprek met u aan te gaan.

Ik wens u een goede en constructieve discussie toe.

10.2.e

10.2.e

10.2.e

Staatssecretaris van Economische Zaken, Landbouw en Innovatie



Van: 10.2.e
Aan: 10.2.e
Onderwerp: FW: VERTROUWELIJK Reactie RvB op klacht 10.2.e bijenartikel
Datum: dinsdag 10 december 2019 11:21:19
Bijlagen: [Inhoudelijk-onderzoek-klacht-reviewartikel-bijensterfte.docx](#)
[Bijlagen bij rapport nav Klacht 10.2.e bijensterfte.docx](#)
[image001.png](#)
Prioriteit: Hoog

Van: 10.2.e
Verzonden: maandag 2 april 2012 15:01
Aan: 10.2.e ; 10.2.e
Onderwerp: VERTROUWELIJK Reactie RvB op klacht 10.2.e bijenartikel
Urgentie: Hoog

Beste 10.2.e en 10.2.e,
 Ik hoorde van 10.2.e dat jullie hard bezig zijn voor het vragenuurtje in de 2e kamer.
 Ik wil jullie daarvoor nog als volgt informeren. Zoals jullie bekend had 10.2.e
 een klacht ingediend bij de RvB van Wageningen UR omdat hij vond dat in de
 wetenschappelijke review van Blacquiere et al. belangrijke literatuur niet was
 opgenomen. Ter informatie kan ik jullie bijgaand rapport sturen dat in opdracht van de
 rector van Wageningen UR is opgesteld. De rector heeft via dit rapport en een
 bijbehorende brief eind vorige week de klager, maar ook de auteurs en hun
 universiteiten geïnformeerd dat de klacht als ongegrond wordt beschouwd.
 Ik stuur jullie dit rapport omdat kritische vragen over de wetenschappelijke review ook
 kunnen opgaan voor de studie die i.o.v. EL&I is gemaakt, omdat beide in elkaars
 verlengde liggen. Wellicht geeft deze informatie jullie dus nog wat handvatten bij jullie
 voorbereiding. Ik verzoek jullie wel dit rapport niet te verspreiden, omdat we vanuit
 Wageningen willen dat de (onterechte) klacht van 10.2.e niet meer media-aandacht
 krijgt, dan die tot nog toe al heeft gekregen.

Vriendelijke groet,

10.2.
e



10.2.e

Manager Business Unit 'Biointeractions & Plant Health'
Plant Research International
Wageningen University & Research Centre
P.O.Box 69
6700 AB Wageningen, The Netherlands
T: +31 317 10.2.e
F: +31 317 10.2.e
e: 10.2.e @wur.nl
www.pri.wur.nl

Inhoudelijk onderzoek inzake de klacht van 10.2.e over het niet opnemen van artikelen over blootstelling van insecten aan neonicotinoiden in een review over de mogelijke invloed van neonicotinoiden op bijensterfte, en daarmee samenhangende eventuele schending van wetenschappelijke integriteit door de auteurs van het reviewartikel.

10.2.e, vertrouwenspersoon wetenschappelijke integriteit Wageningen UR

Inleiding en aanpak

Op 28 februari werd door 10.2.e van het bedrijf Experimental Toxicology Services Nederland via de mail een klacht ingediend bij de Raad van Bestuur naar aanleiding van de publicatie van het peer reviewed artikel "Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment" in het wetenschappelijk tijdschrift Ecotoxicology (uitgever Springer). De auteurs zijn Tjeerd Blacquière (Plant Research International, onderdeel van Wageningen UR), Guy Smagghe (Universiteit van Gent), Cornelis A. M. van Gestel (Vrije Universiteit Amsterdam) & Veerle Mommaerts (Universiteit van Gent). De volledige tekst van de klacht, die voor zover we kunnen nagaan alleen bij Wageningen UR is ingediend, is in de bijlagen opgenomen.

Kort samengevat meent 10.2.e dat de auteurs inbreuk plegen op de wetenschappelijke integriteit door – door hem genoemde literatuur – niet in de studie te betrekken.

De Raad van Bestuur – hierbij vertegenwoordigd door 10.2.e – heeft, conform de reguliere procedures, vervolgens opdracht gegeven deze klacht te onderzoeken en over de bevindingen van het onderzoek aan hem te rapporteren. Ook zijn de rectoren van de Vrije Universiteit en van de Universiteit van Gent op de hoogte gesteld van de inhoud van de klacht.

In dit rapport doet 10.2.e (vertrouwenspersoon wetenschappelijke integriteit Wageningen UR) verslag van zijn bevindingen.

Het verslag is opgebouwd aan de hand van een aantal relevante vragen met betrekking tot het fenomeen reviews, literatuurselectie, afwegingen en formuleringen van conclusies. Aangezien 10.2.e op een tweetal uitnodigingen tot een toelichtend gesprek niet is ingegaan, maar volstaan heeft om de tekst van de klacht opnieuw toe te sturen, is besloten om een en ander schriftelijk af te handelen. Hiertoe is per email contact gezocht met Blacquiere c.s., enige externe deskundigen en de editor van het tijdschrift.

Bevindingen

a. Moet een review alle relevante literatuur omvatten?

Een review geeft een gestructureerd en geëvalueerd overzicht van de beschikbare literatuur over een specifiek onderwerp. Dat houdt in dat wetenschappelijke literatuur wordt verzameld, beoordeeld en geselecteerd. Dat houdt dus ook in dat niet alle – over het onderwerp – gepubliceerde literatuur kan worden (en wordt) meegenomen. De auteurs moeten wel aangeven over welke onderwerpen wordt gerapporteerd, welke onderwerpen eventueel buiten beschouwing blijven en welke (typen) literatuur eventueel niet worden meegenomen. Kortom: de selectiecriteria moeten zo transparant mogelijk zijn.

Blacquiere et al. hebben in de inleiding van hun review aangegeven dat het artikel gaat over effecten van neonicotinoiden op bijen en hommels. Dat betekent dat literatuur op basis van dit onderwerp is geselecteerd. Tevens geven ze in hun conclusies aan waarin de momenteel beschikbare (gepubliceerde) onderzoekresultaten tekort schieten en waar aanvullend onderzoek gewenst is.

Ze geven niet in detail aan welke onderwerpen ze buiten beschouwing laten. 10.2.e meent in zijn klacht dat dit een flagrante schending van het geformuleerde doel is en dat een goed literatuuronderzoek alle relevante literatuur zou moeten bevatten. Naar mijn mening en die van enkele geraadpleegde deskundigen is deze door 10.2.e gebruikte omschrijving niet gebruikelijk. Bovendien hebben noch de referenten van het review-artikel, noch de editor van het wetenschappelijke tijdschrift omissies in literatuur geconstateerd, zoals blijkt uit de reactie van de editor op de ook bij het tijdschrift ingediende klacht (bijlage).

Conclusie -1: Er valt Blacquiere et al. niet te verwijten dat niet alle beschikbare literatuur over het onderwerp is meegenomen in de beoordeling. Naar aanleiding van het door mij verrichte onderzoek naar de klacht constateer ik dat de selectie van de in de review gebruikte literatuur voldoende zorgvuldig is gebeurd en verwoord. Er is dan ook geen sprake van flagrante schending van het doel van een review-artikel c.q. literatuuronderzoek geconstateerd.

- b. Is verklaarbaar waarom de auteurs de artikelen van 10.2.e (zie in bijlage opgenomen tekst klacht) niet hebben meegenomen in hun review?

10.2.e lijkt uit te gaan van een veel breder overzicht van 'de effecten van neonicotinoiden op een breed scala aan insecten inclusief de verschillende blootstellingsprocessen'. Indien Blacquiere et al. voor een dergelijke bredere onderwerpkeuze hadden gekozen, had aandacht voor waterorganismen zoals in de artikelen van 10.2.e besproken wordt, op zijn plaats geweest kunnen zijn. Maar het gaat de auteurs – en dat is in hun inleiding van de review expliciet geformuleerd – om de blootstelling van bijenvolken in agrarische landschappen, waar met name toxicodynamiek een rol speelt die nauwelijks in de door 10.2.e aangedragen artikelen aan de orde komt. De artikelen van 10.2.e hebben in deze review dus niet een logische plaats, althans het is alleszins verdedigbaar dat de artikelen niet zijn geselecteerd. Deze mening wordt ook door enige door mij in het kader van de klachtbehandeling geraadpleegde deskundigen gedeeld en ondersteund door de resultaten van de bibliometrische analyse.

Zijn de artikelen van 10.2.e essentieel voor de review?

Ik heb een vooraanstaand aquatisch ecotoxicoloog en een vooraanstaand onderzoeker op het gebied van de blootstellingskinetiek en – modellering geraadpleegd. Deze geven in hun reacties (zie bijlagen) dat zij de aangedragen artikelen van 10.2.e niet als een essentiële verrijking van de bestaande literatuur over blootstellingsmodellering zien. Daarnaast geven zij aan het alleszins verdedigbaar te achten dat Blacquiere et al. de artikelen van 10.2.e niet hebben meegenomen in hun review.

Conclusie- 2: de artikelen van 10.2.e worden door collega's niet als onontbeerlijk gezien, zeker niet in een review met als onderwerp blootstelling van bijen en hommels via bloembezoek en nectarconsumptie.

Gezien het verschil in omstandigheden en blootstellingscondities tussen de situatie waarover Blacquiere et al. rapporteert en blootstellingsprocessen zoals deze relevant zijn voor waterorganismen, ligt het niet in de reden om uitgebreid in te gaan op de artikelen van 10.2.e c.s. en deze op te nemen in de review.

- c. Om welke redenen hebben de auteurs de rapporten en andere artikelen, die 10.2.e in zijn bezwaar noemt, niet opgenomen?

In enkele mails van Blacquiere en van Gestel (zie bijlagen) wordt gedetailleerd aangegeven waarom referenties, zoals deze door 10.2.e worden genoemd in zijn klacht niet zijn opgenomen.

Het gaat om:

- rapporten welke geen peer review procedure hebben ondergaan,
- artikelen die eerst beschikbaar kwamen nadat het reviewartikel van Blacquiere et al. aan het tijdschrift was aangeboden.

Conclusie -3: De door Blacquiere et al. aangedragen argumenten om door 10.2.e genoemde publicaties en rapporten niet op te nemen acht ik valide. Er worden in de klacht van 10.2.e geen verdere wetenschappelijke argumenten aangedragen waarom Blacquiere et al. de genoemde rapporten en artikelen hadden moeten meenemen in de review.

Algemene conclusie

Hebben de auteurs van de review verwijtbaar gehandeld door de publicaties niet mee te nemen?

Naar mijn mening hebben Blacquiere et al. wetenschappelijk integer en acceptabel gehandeld bij de literatuurselectie voor hun artikel en is van een schending van de wetenschappelijke integriteit geen sprake. Een review houdt niet in dat alle beschikbare literatuur over het onderwerp moet worden meegenomen. In het onderhavige geval is er een duidelijke verantwoording afgelegd over de afbakening van het behandelde terrein en de onderwerpkeuze. Daardoor was het begrijpelijk dat de door 10.2.e aangedragen literatuur niet is meegenomen. Ook de claim van 10.2.e dat zijn artikelen onontbeerlijk zijn wijs ik af, rapporten van geconsulteerde deskundigen zowel als de hoofdredacteur van Ecotoxicology, geven aan dat dit niet het geval is.

Daarnaast zijn enige artikelen en rapporten, genoemd door 10.2.e, niet opgenomen omdat deze op het moment van het afsluiten van het review nog niet beschikbaar waren (maar ze zijn wel opgenomen in het later afgeronde Nederlandstalige rapport) of omdat deze rapporten niet peer reviewed waren.

Ik adviseer de Raad van Bestuur de klacht niet gegrond te verklaren

Tenslotte ben ik van mening dat een debat over de aanpak en conclusies van Blacquièrre et al. niet moet worden gevoerd middels een klachtprocedure wetenschappelijke integriteit, maar thuis hoort in de kolommen van het wetenschappelijk tijdschrift waarin betreffend review artikel is gepubliceerd, en waartoe de editor van het tijdschrift ook een uitnodiging heeft doen uitgaan.

10.2.e , Wageningen, 19 maart 2012

Bijlagen

- Klacht 10.2.e verstuurd aan Raad van Bestuur
- Reactie rector magnificus met uitnodiging tot gesprek, vervolguutnodiging van 10.2.e (vanwege onderzoekcommissie) en antwoorden 10.2.e
- Bericht aan 10.2.e inzake verdere aanpak onderzoek
- Emailwisseling 10.2.e <> 10.2.e inzake klacht
- Emailwisseling Blacquièrre <> 10.2.e inzake correctie van één onjuiste term in artikel
- Reacties auteurs review-artikel op aanmerkingen 10.2.e
- Referentenrapportage tijdschrift Ecotoxicology
- Klacht 10.2.e bij Editor-in-chief van tijdschrift Ecotoxicology
- Reactie Editor tijdschrift Ecotoxicology op aan hem toegezonden klacht 10.2.e
- Reacties externe deskundigen

Bijlagen bij inhoudelijke onderzoek inzake de klacht van 10.2.e over het niet opnemen van artikelen over blootstelling van insecten aan neonicotiniden in een review over de mogelijke invloed van neonicotinoiden op bijensterfte, en daarmee samenhangende eventuele schending van wetenschappelijke integriteit door de auteurs van het reviewartikel.

Klacht 10.2.e verstuurd aan Raad van Bestuur en Editor van tijdschrift Ecotoxicology

From: ETS Nederland [mailto:10.2.e@toxicology.nl]
Sent: dinsdag 28 februari 2012 15:35
To: 10.2.e
Subject: FW: Re: Complaint About A Recent Article in Ecotoxicology
Importance: High

Ter attentie van de Raad van Bestuur.

Geacht college,

Volgens de Notitie Wetenschappelijke Integriteit (over normen van wetenschappelijk onderzoek) van 2001 moet het selectief weergeven van resultaten, met name het weglaten van ongewenste uitkomsten worden beschouwd als een inbreuk op de wetenschappelijke integriteit (bijlage). Naar mijn oordeel heeft de heer dr. Tjeerd Blacquiere van Plant Research International met een recente publicatie in het tijdschrift Ecotoxicology zich hieraan schuldig gemaakt. De auteurs van dit artikel beweren alle deugdelijke zogenoemde peer reviewed artikelen van de afgelopen 15 jaar te hebben uitgeplozen op aanwijzingen dat met name het gif neonicotine een hoofdrol zou spelen in de bijenkwestie. Naar mijn oordeel hebben Blacquiere c.s. echter het doel van literatuuronderzoek (een betrouwbaar en volledig overzicht te krijgen van de literatuur die over een bepaald onderwerp is gepubliceerd) flagrant geschonden door een aantal belangwekkende publicaties (bijlage), die tot nieuwe inzichten over de risico's van neonicotinoiden voor insecten en andere geleedpotigen hebben geleid, volkomen te negeren.

Ik hoop dat U deze kwestie nader zult willen onderzoeken.

Hoogachtend

10.2.e
 ETS Nederland bv
 Frankensteeg 4
 NL-7201KN Zutphen, The Netherlands
 +31 575 10.2.e
www.toxicology.nl

Reactie rector magnificus met uitnodiging tot gesprek, vervolguitnodiging van [REDACTED] (vanwege onderzoekcommissie) en antwoorden [REDACTED]

Geachte [REDACTED],

Hartelijk dank voor uw mail van 28 februarari j.l. Ik heb kennis genomen van uw kritiek op de auteurs van de publicatie *Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk Assessment* in de op 18 februari j.l. on line gepubliceerde versie van het wetenschappelijk tijdschrift *Ecotoxicologie*. (uitgever Springer). U stelt dat de auteurs de artikelen voor hun review selectief gekozen zouden hebben. Literatuurselectie is natuurlijk zeer gebruikelijk bij dit type publicatie, maar u suggereert dat 'ongewenste uitkomsten' bewust zijn weggelaten. Dat is een ernstige beschuldiging.

Uit uw mail kan ik niet opmaken of u zich – zoals gebruikelijk in de wetenschap – met uw kritiek al heeft gewend tot de auteurs om navraag te doen en om met hen (wetenschappelijk) debat aan te gaan over de keuzes, criteria en conclusies. Ook via een 'letter to the editor' van het betreffende tijdschrift kan en hoort het door u geëntameerde debat te worden aangegaan. Inhoudelijke kritiek op wetenschappelijk publicaties hoort immers thuis in de wetenschappelijke arena en in wetenschappelijk tijdschriften, zodat ook uw peers zich in het debat kunnen mengen. Het is mij niet duidelijk of u deze stap al heeft gezet.

Ik heb [REDACTED] en [REDACTED] verzocht de zaak aan een nadere beschouwing te onderwerpen en om ook met u op korte termijn van gedachten te wisselen. Mijn secretaresse, [REDACTED], zal daartoe met uw goedvinden een afspraak plannen. Ik zal de discussie volgen en u te zijner tijd – indien nog gewenst – van mijn oordeel op de hoogte stellen.

Hoogachtend

[REDACTED], rector magnificus

[REDACTED]
Rector Magnificus/ Vice President of the Executive Board
Wageningen University and Research Center
Wageningen
The Netherlands
tel: +31 317 [REDACTED]
fax: +31 317 [REDACTED]
[REDACTED]@wur.nl

Reactie [REDACTED]

Geachte [REDACTED]

Mijn argumenten zijn al toegankelijk sinds 27-02-2012, dus al een dag voor mijn mail aan de Raad van Bestuur van Wageningen Universiteit van 28-02-2012, maar ik deel ze U ten overvloede nog een keer mee:

Literatuuronderzoek is een vorm van onderzoek waarbij het doel is om een betrouwbaar en volledig overzicht te krijgen van de literatuur die over een bepaald onderwerp is gepubliceerd (bijlage). Blacquièr et al. beweren alle deugdelijke zogenoemde peer reviewed artikelen van de afgelopen 15 jaar te hebben uitgeplozen op aanwijzingen dat met name het gif neonicotine een hoofdrol zou spelen in de bijenkwastie. De auteurs bestaan het echter voor dit thema zeer relevante wetenschappelijke publicaties (vanaf 2009) van Dr. Francisco

Sanchez-Bayo (universiteit Sidney) en Dr. Henk Tennekes (bijlage) volledig te negeren, iets waarin het Ctgb hen bij de herbeoordeling van de neonicotinoiden is voorgegaan. Dit is een flagrante schending van het doel van literatuuronderzoek. De publicaties van Sanchez-Bayo en Tennekes werpen namelijk een geheel ander (en duister) licht op de risico's van de neonicotinoiden voor honingbijen. Tjeerd Blacquiere is volledig op de hoogte van deze publicaties. Verwijzingen naar het alomvattende CST (Comite Scientifique et Technique) rapport van het Franse ministerie van Landbouw van 2003 (bijlage) en het APENET rapport van reputable Italiaanse instituties (bijlage) van 2011 ontbreken eveneens in het literatuuroverzicht. Ook de recente studies van Pettis et al. en van Krupke et al. (Purdue universiteit), die de gevaren van de neonicotinoiden voor honingbijen nog eens extra accentueren (bijlage), ontbreken in zijn literatuurstudie. De genoemde studies komen zonder uitzondering tot de conclusie dat de neonicotinoiden een belangrijke rol spelen bij de sinds een aantal jaren sterk verhoogde bijenvolksterfte. Blacquiere et al. mogen uiteraard een andere mening zijn toegedaan, maar het kan niet zo zijn dat deze belangwekkende literatuur (die niet strookt met hun oordeel) in een review volledig wordt genegeerd.

Link:

<http://www.boerenlandvogels.nl/content/bijenexpert-blacquiere-et-al-hebben-hun-literatuuronderzoek-belangwekkende-publicaties-volko>

Hoogachtend

10.2.e

Uitnodiging 10.2.e

Geachte 10.2.e ,

Met verwijzing naar onderstaande mailwisseling wil ik u uitnodigen voor een gesprek 10.2.e en mij. In dat gesprek willen wij graag de inhoudelijke argumenten van u vernemen die u ertoe gebracht hebben om uw beschuldiging op deze manier naar buiten te brengen. Gezien de ernst van uw beschuldiging stel ik voor nog deze week ons onderhoud te hebben.

De volgende tijdstippen zijn voor ons beschikbaar:
woensdag 7 maart van 11.00 tot 14.00 uur
donderdag 8 maart vanaf 15.30 uur
vrijdag 9 maart van 14.00 uur tot 16.00 uur.

Ik hoop op uw spoedige reactie.

Vriendelijke groet,

10.2.e



10.2.e

Manager Business Unit 'Biointeractions & Plant Health'
Plant Research International
Wageningen University & Research Centre
P.O.Box 69
6700 AB Wageningen, The Netherlands
T: +31 317 10.2.e
F: +31 317 10.2.e
e: 10.2.e@wur.nl
www.pri.wur.nl

Reactie 10.2.e

Geachte 10.2.e,

De inhoudelijke argumenten zijn U bekend. Ik herhaal ze nog een keer:

Literatuuronderzoek is een vorm van onderzoek waarbij het doel is om een betrouwbaar en volledig overzicht te krijgen van de literatuur die over een bepaald onderwerp is gepubliceerd (bijlage). Blacquiere et al. beweren alle deugdelijke zogenoemde peer reviewed artikelen van de afgelopen 15 jaar te hebben uitgeplozen op aanwijzingen dat met name het gif neonicotine een hoofdrol zou spelen in de bijenkwestie. De auteurs bestaan het echter voor dit thema zeer relevante wetenschappelijke publicaties (vanaf 2009) van Dr. Francisco Sanchez-Bayo (universiteit Sidney) en Dr. Henk Tennekes (bijlage) volledig te negeren, iets waarin het Ctgb hen bij de herbeoordeling van de neonicotinoiden is voorgegaan. Dit is een flagrante schending van het doel van literatuuronderzoek. De publicaties van Sanchez-Bayo en Tennekes werpen namelijk een geheel ander (en duister) licht op de risico's van de neonicotinoiden voor honingbijen. Tjeerd Blacquiere is volledig op de hoogte van deze publicaties. Verwijzingen naar het alomvattende CST (Comite Scientifique et Technique) rapport van het Franse ministerie van Landbouw van 2003 (bijlage) en het APENET rapport van reputable Italiaanse instituties (bijlage) van 2011 ontbreken eveneens in het literatuuroverzicht. Ook de recente studies van Pettis et al. en van Krupke et al. (Purdue universiteit), die de gevaren van de neonicotinoiden voor honingbijen nog eens extra accentueren (bijlage), ontbreken in zijn literatuurstudie. De genoemde studies komen zonder uitzondering tot de conclusie dat de neonicotinoiden een belangrijke rol spelen bij de sinds een aantal jaren sterk verhoogde bijenvolksterfte. Blacquiere et al. mogen uiteraard een andere mening zijn toegedaan, maar het kan niet zo zijn dat deze belangwekkende literatuur (die niet strookt met hun oordeel) in een review volledig wordt genegeerd.

Link:

<http://www.boerenlandvogels.nl/content/bijenexpert-blacquiere-et-al-hebben-hun-literatuuronderzoek-belangwekkende-publicaties-volko>

Vindt U bij deze stand van zaken een gesprek nog noodzakelijk? Zo ja, wat is dan het doel van dit gesprek?

Hoogachtend

10.2.e

Bericht aan 10.2.e inzake verdere aanpak onderzoek

From: 10.2.e
Sent: woensdag 7 maart 2012 11:40
To: 'ETS Nederland'
Cc: 10.2.e ; 10.2.e
Subject: RE: Bijen onderzoek

Geachte 10.2.e ,

Wij hebben kennis genomen van het feit dat dat u niet op onze uitnodiging van een gesprek in gaat, waarin u uw bezwaren nader zou kunnen toelichten. Dat betreuren wij. U geeft echter aan dat u meent al uw argumenten schriftelijk te hebben overgebracht.

Wij zullen deze, op verzoek van de Raad van Bestuur, aan een nadere beschouwing onderwerpen. Daarover rapporteren wij vervolgens aan de Raad van Bestuur. Van de conclusie zult u op de hoogte worden gebracht.

Vriendelijke groet,

10.2.e



10.2.e
Manager Business Unit 'Biointeractions & Plant Health'
Plant Research International
Wageningen University & Research Centre
P.O.Box 69
6700 AB Wageningen, The Netherlands
T: +31 317 10.2.e
F: +31 317 10.2.e
e: 10.2.e @wur.nl
www.pri.wur.nl

Emailwisseling [10.2.e] <> [10.2.e] inzake klacht

From: ETS Nederland [mailto:[10.2.e]@toxicology.nl]

Sent: donderdag 1 maart 2012 9:30

To: [10.2.e]

Subject: FW: Complaint About A Recent Article in Ecotoxicology

Geachte [10.2.e]

Ter attentie van de Raad van Bestuur van Wageningen Universiteit

Ik stel mijn correspondentie met [10.2.e] over het artikel van Blaquiere et al. in Ecotoxicology tot uw beschikking.

Hoogachtend

[10.2.e]

Van: [10.2.e] [mailto:[10.2.e]@mac.com]

Verzonden: donderdag 1 maart 2012 9:18

Aan: ETS Nederland

Onderwerp: Re: Complaint About A Recent Article in Ecotoxicology

[10.2.e]

Sorry, I did not know the background about this matter. Well, they'll have to justify their actions now that you have referred the issue to the editor of the journal.

Best wishes

[10.2.e]

Centre for Ecotoxicology, University of Technology Sydney


Office of Environment & Heritage

Department of Premier & Cabinet, NSW

480 Weeroona Road,

Lidcombe, NSW 2141, Australia

Tel: 61-[10.2.e]

 Think B4U print, 1 ream of paper = 6% of a tree and 5.4kg CO₂ in the atmosphere, 3 sheets of A4 paper = 1 litre of water.

On 01/03/2012, at 7:03 PM, ETS Nederland wrote:

Dear [10.2.e],

Thank you for your comments. Please consider:

1. I debated the issue with Tjeerd Blacquiere at Leiden University (the most reputable university in the country) in June 2009 (around the time when your paper appeared)

http://www.bijensterfte.nl/sites/default/files/Bijensterfte%20en%20Imidacloprid%20SG%20Leiden%202009_0.pdf

2. I presented my case again on 30 October 2009 before the committee “pollinating insects and pesticides’, an advisory body to the Dutch Ministry of Agriculture. Slides 27-30 of that presentation contain our reasoning:

<http://www.slideshare.net/macwlem/bijensterfte-voordracht-Inv-30-10-2009>. Tjeerd Blacquiere was an attending member of that committee.

3. I presented my case again on 3 November 2010 before a select committee of Dutch parliament (meanwhile my Toxicology paper had appeared). Tjeerd Blacquiere attended that meeting.

4. I presented my case again on 25 May 2011 before committee members of the Dutch Board for the Authorisation of Plant Protection Products and Biocides (Ctgb), which had been requested by Dutch parliament to review the safety of neonicotinoids for honeybees. Tjeerd Blacquiere attended that meeting. <http://www.boerenlandvogels.nl/content/henk-tennekes-presentation-dutch-pesticide-board-committee-risk-profile-neonicotinoids-arthr>

As I see it, Tjeerd Blacquiere cannot possibly claim to have been unaware of our work. If he has done his homework, which he should as a reputable scientist, he has been aware of it for nearly 3 years. In his Ecotoxicology paper he claims to have reviewed all relevant papers of the last 15 years, while at the same time omitting our papers and those of Pettis et al and Krupke et al. As I see it, that is a travesty. If we allow this to happen in science, there is absolutely no point in scientific endeavor. That is why I have complained to the Board of Wageningen University about Blacquiere’s behavior.

Cheers

10.2.e

Van: 10.2.e [mailto:10.2.e@mac.com]

Verzonden: donderdag 1 maart 2012 1:31

Aan: ETS Nederland

Onderwerp: Re: Complaint About A Recent Article in Ecotoxicology

Dear 10.2.e,

You may be right in pointing the deficiencies in that review, but please consider:

- i) that paper is a review only on bees, not about the effects of neonicotinoids on other organisms, let alone the aquatic environment. My previous paper showed data for ostracods and aquatic insect larvae only;
- ii) there seems to be a time overlap while the authors wrote their review and we published our latest paper giving a full explanation of the neonicotinoids mode of action.

In any case, it is good you pointed that to the chief editor, because they may be asked to change a few things. Let's see what happens.

Regards

10.2.e

Centre for Ecotoxicology, University of Technology Sydney

Office of Environment & Heritage

Department of Premier & Cabinet, NSW

480 Weeroona Road,

Lidcombe, NSW 2141, Australia

Tel: 61-10.2.e

Emailwisseling 10.2.e <> 10.2.e inzake correctie van één onjuiste term in artikel

From: 10.2.e
Sent: woensdag 29 februari 2012 15:31
To: 10.2.e
Cc: 10.2.e @ugent.be; 10.2.e; 10.2.e 10.2.e @vu.nl)
Subject: RE: error in Ecotoxicology paper

Dear 10.2.e

Thank you very much for this comment. This was a slip of the pen, and it is unfortunate that we did not see, and nobody else saw this before, including the two very good referees who gave a lot of constructive comments on our first draft.

We will try to arrange a possible correction in the print version and discuss with the editor in chief what to do about it. Again, thank you very much for drawing our attention.

Kind regards, 10.2.e

From: 10.2.e [mailto:10.2.e@environment.nsw.gov.au]
Sent: woensdag 29 februari 2012 5:21
To: 10.2.e 10.2.e @ugent.be
Subject: error in Ecotoxicology paper

Dear authors,

I started reading your recent review "Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment" (Ecotoxicology OnlineFirst DOI 10.1007/s10646-012-0863-x) when I came across a statement on the second page saying that neonicotinoids

"...are an important group of neurotoxins specifically acting as **antagonists** of the insect nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) (Matsuda et al. 2001; Elbert et al. 2008)."

That statement is incorrect, because all neonicotinoids, like nicotine itself, are *agonists* of the nAChR. You can check the paper by Matsuda et al. (2001), which says specifically in the first sentence of their abstract: "Imidacloprid is increasingly used worldwide as an insecticide. It is an **agonist** at nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) and shows selective toxicity for insects over vertebrates." (Abstract in Matsuda et al. 2001, Trends Pharmacol Sci 22:573–580). More information on the mode of action of neonicotinoids is found in the Pesticide Manual (BCPC 2009, Surrey, UK), and there you can confirm that all these compounds act as agonists, not antagonists of the nicotinic receptor.

Unfortunately your paper is already published online, but I guess you can still contact the editor and alert him about this mistake. May be there is still time to change the final printed version, or include an Erratum in the next issue.

My best regards

10.2.e
Centre for Ecotoxicology, University of Technology Sydney
Office of Environment & Heritage
Department of Premier & Cabinet, NSW
480 Weeroona Rd,
c/- PO Box 29, Lidcombe NSW 1825, Australia
Tel (02) 10.2.e
Email: 10.2.e @mac.com

Reacties auteurs review-artikel op aanmerkingen 10.2 e

Auteur 1

Ik heb het artikel van Henk samen met Sanchez-Bayo niet gelezen, het stuk van Sanchez-Bayo uit 2009 wel. Dat stuk gaat volledig over waterorganismen, en niet over bijen. Bovendien is de stap om over langdurige chronische via orale weg opgedane blootstelling bij bijen conclusies te trekken op basis van waterorganismen (die in de lage blootstellingsomgeving rondzwemmen, ook nog steeds nadat ze al last van de intoxicatie zouden hebben) een forse stap.

Om die redenen hebben wij S-Bayo 2009 studie niet opgenomen.

Wij hebben onze review beperkt tot die studies die data leverden over neonicotinoiden en effecten op bijen (vooral honingbijen maar ook hommels en een paar over andere bijen), dat betekent automatisch dat sommige studies over neonicotinoiden en andere insecten en andere arthropoden niet zijn meegenomen. Dat zeggen we ook duidelijk in de review. Eigenlijk denk ik dat 10.2.e een ander beeld heeft van het 'bepaalde onderwerp' waarover we een review schreven.

Wat betreft de theoretische artikelen van 10.2.e die voegden geen data toe en zijn daarom niet opgenomen. Mocht het zo zijn als 10.2.e beweert, dat er geen veilige concentraties bestaan (gebleken uit lab-experimenten en zijn theoretische beschouwing) dan zou dat moeten blijken in (semi-) veldtesten en grote monitoringstudies (vermits die natuurlijk sterk genoeg van opzet zijn, zodat ze subtiele effecten kunnen aantonen, daarover maken we overigens wel opmerkingen, mede volgend op de meta analyse van Creswell 2010). Dat was niet het geval.

Bij onze eerste indiening van het artikel kregen we van beide referenten zeer positief commentaar. Een referent gaf aan zelf erg goed in deze literatuur te zitten en toch nog een paar nieuwe via ons manuscript aangereikt te krijgen, hij miste geen relevante artikelen.

Naar aanleiding van de door 10.2.e genoemde, gemiste stukken, het volgende.

CST: dit is een lijvig rapport uit 2003, met heel veel data, die overigens moeilijk traceerbaar zijn. Het is niet peer reviewed. Het rapport is in het Frans (pas une probleme pour moi, bien entendu). Men is zachtjes aan bezig delen te publiceren nu. Overigens komen de getallen in het CST voor neonicotinoiden redelijk overeen met wat in de weinige openbare literatuur voorhanden is.

APENET is een samenwerkingsverband in Italië, vooral rond Bologna. Zij doen heel aardig onderzoek naar de blootstelling aan neonicotinoiden en ook interacties. Een belangrijke invalshoek is de blootstelling aan stof bij het zaaien van gecoate zaden (wat inderdaad een punt van zorg is in Italië, of vooral was..., maar hier al lang is opgelost). Ik heb in november met 10.2.e gesproken (de co-ordinator van APENET; hij hield een goed verhaal in Wageningen op het ICPBR Hazard of Pesticides to bees symposium). Hij liet ook de voor mij eerste redelijke onderbouwde verdenking zien van verhoogde ziekte prevalentie in bijen bij aan neonicotinoiden blootgestelde volken. Er zijn geen peer reviewde publicaties, ik heb er bij hem op aangedrongen te publiceren.

De publicatie van Pettis verscheen on-line op 13 jan 2012, onze review werd geaccepteerd op 18 feb 2012. Helaas, het lukt ons niet een review te schrijven en geaccepteerd te krijgen binnen 5 weken + een dag (Zoiets kan alleen 10.2.e, en dan binnen 16 dagen, maar dan wel met de editor als mede-auteur). Hieronder geciteerd uit het rapport voor EL&I wat ik daarin heb geschreven over de Pettis et al studie:

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 3×10^5 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, toegevend 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.

Daar moet ik aan toevoegen dat ik erg kritisch ben (op grond van literatuur van Fries, en mondelinge communicatie met hem) over de relevantie van laboratorium experimenten waarbij bijen worden besmet met supra-letale doses van een de parasiet *Nosema ceranae* of *Nosema apis*: bij een dosis van 6000 gaan al alle bijen vervroegd dood doordat ze de ziekte ontwikkelen, wat zegt dan een 50-voudige dosis over 'vatbaarheid' voor een ziekte?

De publicatie van Krupke et al (2012): verschenen online 3 januari 2012. Ook meegenomen in de NL rapportage voor EL&I: Het is een beetje een vreemde publicatie, met vreemde veld-experimenten gecombineerd met iets monitoring in het veld. Zij vonden 3,9 µg/kg in stuifmeel van mais (maar dan wel in een experiment waar tijdens de bloei van mais (in juli) nog mais experimenteel werd tussen gezaaid voor het experiment, met sterk loslatend talk-coating met clothianidin): dit getal heb ik gebruikt om het risico op (orale blootstelling) letaliteit te berekenen: leverde een TER van 152. Het Ctgb vereist van een toelatingsaanvrager een veldstudie zodra de TER onder de 10 komt. Wat wel opmerkelijk is in de mid-west van de USA is dat men eindeloze oppervlakten met grote teelten heeft die allemaal wel neonicotinoïden als zaadcoating hebben, en dat men met slechte coating werkt. Daar kan inderdaad nog wel wat aan gedaan worden (zoals hier in EU al lang gedaan is).

Het heel snelle artikel van Tennekes + de Editor Sanchez-Bayo (binnen 16 dagen) van 2012 is geheel theoretisch, gebruikt wel een basisonderzoek aan bijen in het lab (Suchail, 2001) en nog wat review achtige stukken, die wij ook allemaal hebben gebruikt. Het was bovendien te laat om nog mee te nemen.

Auteur 2

Het gaat kennelijk niet om een wetenschappelijke discussie, maar meer om het gelijk krijgen in een politiek debat over de toelaatbaarheid van neonicotinoïde bestrijdingsmiddelen. Ik heb niets tegen de toxicokinetische benadering van 10.2.e en misschien hadden we daar wel aandacht aan moeten besteden. Maar zijn papers voegen geen nieuwe informatie over neonicotinoïden toe en gebruiken alleen data over studies met waterorganismen. De toepasbaarheid van zijn benadering kan alleen maar goed worden beoordeeld wanneer de blootstelling goed in kaart is gebracht. En dat is nog niet zo eenvoudig. Ik ben van mening dat 10.2.e gewoon een commentaar artikel moet sturen naar de editor van Ecotoxicology (en geen brief op hoge poten zoals hij nu heeft gedaan; daar is niemand mee gediend) en daarin goed wetenschappelijk onderbouwd zijn visie moet weergeven. Daartegen kan niemand bezwaar hebben, en ik denk dat Ecotoxicology blij zal zijn met wat wetenschappelijke discussie want dat trekt alleen maar meer aandacht naar het tijdschrift. En misschien krijgen we dan de kans erop te reageren; zo niet, dan is dat wat mij betreft ook goed en heeft hij in ieder geval zijn punt kunnen maken.

Referentenrapportage tijdschrift Ecotoxicology

-----Original Message-----

From: 10.2.e [mailto:10.2.e@editorialmanager.com] On Behalf Of Ecotoxicology (ECTX)
Sent: maandag 19 september 2011 9:53
To: 10.2.e
Subject: Decision on your manuscript #ECTX1790

Dear 10.2.e :

I have received the reports from our advisors on your manuscript, "Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk-assessment.", which you submitted to Ecotoxicology.

Based on the advice received, I have decided that your manuscript could be reconsidered for publication should you be prepared to incorporate major revisions. "Below, please find the comments of the reviewers. If after reviewing the comments you wish to resubmit a revised manuscript, please note that all comments, concerns, and questions of the reviewers must be addressed in the revised manuscript. It is recommended that where applicable, changes made in the revised text be clearly identifiable."

In order to submit your revised manuscript electronically, please access the following web site:

<http://ectx.edmgr.com/>

I look forward to receiving your revised manuscript.

Best regards,

10.2.e , PhD
Editor-in-Chief Ecotoxicology

COMMENTS FOR THE AUTHOR:

Dear Dr Blacquiere, thank you for submitting your paper to Ecotoxicology. I now have two reviews of your manuscript and these make some suggestions for amendments. I also have some editorial comments below. I am inviting you to amend your paper. Please submit a revision online as before within the next two months, and include a point-by-point reply to the comments below with the manuscript.

Yours Sincerely

10.2.e

Editors comments:

Abstract-this tends to describe the structure of the paper rather than the RESULT of your analysis of the literature. Please rewrite stating the scientific problem, aims, main results, concluding sentence. Use impartial past tense (avoid phrase like "we" "our" etc., throughout the manuscript).

In section 3.1, remove the bullets and write in flowing paragraphs (avoid bullet lists in the manuscript).

Section 3.3. revise the heading or remove brood as words in brackets are not permitted in headings.

Figure 1 -the risk assessment flow diagram is already published. In a review we will not re-publish something that is already out there. Instead redraw and up date with the issues specific to bees since Thompson first produced this scheme, or replace it with a table on advantages and disadvantages of the scheme (shortening the main text accordingly).

Table 1 needs a major overhaul to increase the information content: The headings are not clear to the reader, what do you mean by product? Maybe this is the wrong phrase to use. For pollen is there any indication in the dominant plant species in the samples or indication of the type of plants in the study area? There is no indication of what "number of samples" represents. perhaps change this to give more information on "experimental design" (controls, replicates at each location). It would also be useful to know where each study was done (e.g., type of ecosystem, land use, what country). Are the chemical concentrations total concentrations, are units dry or fresh weight. Give the SD or SE (n) in the column for "means". Give the mean column before the range column. The reader needs to know separately the values for controls or reference sites within each study where this information is available, and any statistical analysis in relation to this. Change the ? to No data. LOD in full in the foot note. There is repetition in the table, and it may be best to group the rows by study to remove some of this.

Table 2 is poorly presented, and the reader cannot determine what data comes from what study. Rewrite the table, I suggest the following columns: Species, Exposure (give concentration range and duration, notes on method/route), toxicity (give the lethal values and any comments), author.

Table 3, similar comments to table 2 and you only have one metabolite, so either add more papers or remove the sub-heading in column and just put (metabolite of..) next to the substance name.

Table 4-the same problems as table 2.

In all tables, put the abbreviations and their explanations in a foot note on each table. "mother compound" is incorrect scientific English. It is "parent compound".

English-there are numerous small errors, please ask some one to proof read the language.

Reviewer #1: This manuscript provides a comprehensive and thoughtful review of the literature on neonicotinoids in bees. The organization is quite logical, beginning with the potential for exposure under field conditions and culminating in recommendations for future research. The coverage of the relevant literature is excellent - I am very familiar with this area of research, but even I found one or two papers that I had not yet read. It is my opinion that this manuscript will be widely-read and widely-cited.

In particular, the authors do a very good job suggesting how little we know about the impact of pesticide exposure on the age-based division of labor in the honey bee colony, and how little we know about the lasting effects of the neonicotinoids on insect brain structure and function.

I have two suggestions for revision. The first, I think, is quite important. The second is left to the authors' discretion.

First, at several points in the manuscript that authors note how poorly most laboratory studies predict the field effects of these pesticides. They then note that bumblebee micro-colonies might bridge the gap between traditional lab and field studies. This is such an important point that I think it is required that the authors add a section describe in detail the nature of these micro-colonies and giving examples of how they might be used. How, for example, do such colonies differ from typical greenhouse colonies maintained for pollination? Also, it is impossible to assess how important micro-colonies will be to future research if we don't know what they are.

Second, a fair summary of the literature seems to be that insects exposed to neonicotinoids in the laboratory are more impaired than insects exposed in the field. The authors do a good job describing the unusual circumstances under which neonicotinoids are deadly in the field (e.g. contaminated dust paired with high humidity), and note quite accurately that honey bees can alter their behavior to avoid exposure in the field and thereby limit their own exposure. I would have been interested in the authors' opinions on the emotional expectations established by the effects of neonicotinoids in laboratory (as opposed to field) tests. Is it a case that something that is toxic in the lab will always be harmful in the field? At what point can growers feel confident that they are not harming pollinators? In other words, when is our state of knowledge sufficient to inform policy?

A final point is that the authors overstate current progress toward the development of molecular markers for pesticide exposure. For example, the microarray studies described are expensive and rare, and require more specialized skill in statistical analysis than is available in many research groups. I feel that the emphasis should be placed on relatively low technology approaches to the development of molecular markers rather than high end approaches (for example, color-based immuno or enzyme assays). The approach taken in human medicine (home pregnancy tests, home blood glucose monitoring) seems relevant here.

Reviewer #2: A welcome and timely review! I just have some minor comments. In my opinion the English language in quite some places is lacking precision while the authors evidently are well aware of the details. I find a quick correction of the language therefore necessary, preferably with help of a native speaker, or someone else with much experience in English. At the same time, some errors need to be corrected such as:

Line 68: replace AGONISTS by ANTAGONISTS Line 89: please specify 'THE NEW STEPWISE RISK ASSESSMENT SCHEME'

Line 309: THOMPSON

Line 386: LD50 OF 21.8 NANOGRAM/BEE instead of microgram/bee !

Line 393: CAUSES instead of REASONS

Klacht ^{10.2.e} [redacted] bij Editor-in-chief van tijdschrift Ecotoxicology

Van: ETS Nederland [mailto:^{10.2.e} [redacted]@toxicology.nl]

Verzonden: dinsdag 28 februari 2012 13:29

Aan: ^{10.2.e} [redacted]@lrshugart.com'

Onderwerp: Re: Complaint About A Recent Article in Ecotoxicology

Urgentie: Hoog

**Re: Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment ,
by Tjeerd Blacquière, Guy Smagghe, Cornelis A. M. van Gestel and Veerle Mommaerts**

Dear ^{10.2.e} [redacted]

In your capacity as Editor-in-Chief of the journal Ecotoxicology, I wish to register a formal complaint about above-named article. The authors profess to summarize, for the first time, 15 years of research on the hazards of neonicotinoids to bees including honey bees, bumble bees and solitary bees. A literature review should be reliable and comprehensive, but the authors have completely ignored important recent papers by Dr. Francisco Sanchez-Bayo of the university of Sidney and myself on the hazards of neonicotinoids (attached). Our publications indicate that there are no safe levels of exposure to neonicotinoids for arthropods, which constitutes a very important shift in our understanding of the risk of neonicotinoid insecticides. The omissions lead to biased conclusions which should not be allowed to stand. I hope you will take appropriate action to safeguard the quality standards of your journal.

Yours sincerely

^{10.2.e} [redacted]

ETS Nederland bv

Frankensteeg 4

NL-7201KN Zutphen, The Netherlands

+31 575 ^{10.2.e} [redacted]

www.toxicology.nl

Reactie Editor tijdschrift Ecotoxicology op aan hem toegezonden klacht ^{10.2.e} [redacted]

From: ^{10.2.e} [redacted] [mailto:^{10.2.e} [redacted]@lrshugart.com]

Sent: woensdag 14 maart 2012 22:44

To: ^{10.2.e} [redacted]

Cc: ^{10.2.e} [redacted] ^{10.2.e} [redacted] ^{10.2.e} [redacted]

Subject: Re: re. complaint ^{10.2.e} [redacted]

Prof.dr. ^{10.2.e} [redacted]

Science Integrity Officer

Vrije Universiteit Amsterdam,

The Netherlands

Dear ^{10.2.e} [redacted]

Re: Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment by Tjeerd Blacquière, Guy Smagghe, Cornelis A.M. van Gestel, Veerle Mommaerts

Thank you for your inquiry concerning a complaint by 10.2.e. In his correspondence to me he stated that the above Review Article, just recently published in **Ecotoxicology**, completely ignored his previously published papers.

I have conferred with members of the Editorial Board of **Ecotoxicology** and the Publisher, Springer, asking them to provide their input concerning this complaint. A letter that summarizing the salient comments received has been sent to 10.2.e. In essence his complaint was rejected based on:

1. The paper in **Ecotoxicology** was peer reviewed by external experts in the field;
2. The papers of Dr. Tennekes are mostly on kinetics, do not discuss hazards and are not specifically on bees; and,
3. 10.2.e ' three papers are not on ecotoxicology and their omission does not constitute a lack of coverage of a topic, or a dramatic bias that invalidates a Review Article.

Nevertheless, I give every complaint that brings the scientific integrity of the Journal into question my serious attention. Therefore, as an alternative, I offered 10.2.e the opportunity to respond to the Blacquière, et al paper with a Letter to the Editor of **Ecotoxicology**. There are several qualification associated with this offer:

1. 10.2.e ' Response Letter must be on a major scientific point, not some minor technical detail that will not be of interest to our readers and must be a new point, not made before in his previously published letters.
2. Peer Review of The Response Letter, as well as a Rebuttal Letter if forthcoming, will be conducted by members of the Editorial Board of the Journal; and
3. My final decision as to acceptability or rejection for publication of either the Response or the Rebuttal Letters will be tempered by the fact that I do not want the Journal to become a venue for rebuttals and counter-rebuttals as this is distractive and counterproductive.

In summary, the Review Article by Dr. Blacquière was peer reviewed properly by external experts in the field and the Journal will not be accepting any suggestions to the contrary or withdraw the paper. With regards to your Follow-up paper, **Ecotoxicology** encourages submissions that address the Aims & Scope of the Journal and which further the Science of Ecotoxicology..

Best wishes,

10.2.e, PhD

Editor-in-Chief

Ecotoxicology.

Reacties externe deskundigen

Deskundige 1

Ik heb de wetenschappelijke publikaties van Sanchez-Bayo en Tennekes bekeken. Enkele van de gestuurde artikelen waren me al bekend. De artikelen van Sanchez-Bayo (2009), Tennekes (2010) en Tennekes & Sanchez-Bayo (2011) dragen bij aan het inzicht in de toxicokinetiek van insecticiden (o.a. neonicotinoiden) en andere contaminanten. Ze illustreren dat aan de hand van experimenten met aquatische arthropoden en een conceptueel toxicokinetisch model. Inderdaad kan deze benadering ook voor terrestrische organismen (en bijen) toepasbaar zijn. Hierbij moet wel opgemerkt worden dat naast de toxicokinetiek ook de toxicodynamiek een belangrijke rol speelt bij de voorspelling van lange-termijn effecten (herhaalde blootstellingen; tijdvariabele blootstelling). De artikelen van Sanchez-Bayo en Tennekes gaan nauwelijks in op de toxicodynamiek. Binnen de ecotoxicologie wordt de laatste tijd veel aandacht besteed aan het ontwikkelen van toxicokinetische-toxicodynamische (TK-TD) modellen. Een aantal voorbeelden hiervan zijn:

Jager T, Albert C, Preuss TG, Ashauer R. 2011. General unified threshold model of survival – a toxicokinetic-toxicodynamic framework for ecotoxicology. *Environ Sci Technol* 45: 2529-2540.

Ashauer R, Boxall ABA, Brown CD (2006). Predicting effects on aquatic organisms from fluctuating or pulsed exposure to pesticides. *Environ Toxicol Chem* 25:1899-1912.

In de artikelen van Sanchez-Bayo en Tennekes kon ik geen experimentele data over bijen vinden die als input gebruikt zijn voor het conceptueel toxicokinetisch model. Ik begrijp daarom best dat Blacquiere et al. (2012) niet naar deze artikelen verwijzen in hun review. Dat neemt niet weg dat het onderzoek van Sanchez-Bayo en Tennekes met neonicotinoiden en aquatische organismen ook relevant kan zijn voor het inzicht in de gevolgen van langere-termijn blootstelling van neonicotinoiden op bijen. Dat geldt echter voor meer onderzoek met aquatische organismen (o.a. bovengenoemde artikelen). Over de toxicokinetiek-toxicodynamiek van neonicotinoiden in bijen is relatief weinig gepubliceerd. Naar mijn weten is nog geen specifiek TK/TD model ontwikkeld voor bijen. Belangrijk om te melden is ook dat TK/TD modellen bijdragen aan de risicobeoordeling op individu-niveau. Het specifieke beschermdoel betreft bij bijen echter de populatie (wilde bijen) of de kolonie (honingbij).

Naar mijn idee is het probleem bij de risicobeoordeling van bijen dat chronische lab toxiciteitstesten niet goed uitgewerkt/geïmplementeerd zijn. De gangbare protocoltesten betreffen voornamelijk (semi-)acute testen. Indien goede chronische testen voor bijen ontwikkeld worden dan zullen ook de lange-termijn effecten t.g.v. tijdvariabele en of herhaalde blootstelling aan neonicotinoiden beter geschat kunnen worden (bijvoorbeeld in combinatie met TK-TD modellen).

Kortom, ik denk dat het niet verwijzen naar artikelen van Sanchez-Bayo en Tennekes in het review van Blacquiere et al (2012) niet op gespannen voet staat met de wetenschappelijke integriteit van de auteurs van het review.

Deskundige 2

Eerste reactie op vraag of werk ^{10.2.e} bekend is

Ik moet bekennen dat ik ^{10.2.e} en zijn werk niet ken. Ik heb nog nooit iets van hem gelezen of gehoord, of naar verwezen zien worden (dat zegt overigens misschien meer over mij dan over zijn werk). Op zich vind ik het een rare aanklacht. Bij een review worden er altijd artikelen gemist en/of weggelaten. Als de review over bijen gaat kan ik me voorstellen dat onderzoek (naar m.n. toxicokinetiek) in waterorganismen buiten beschouwing wordt gelaten. Hoewel ik denk dat het zeker mogelijk is om parallellen te trekken, begrijp ik het als men dat in het kader van zo'n review niet wenst te doen.

Tweede reactie naar aanleiding van toezending artikelen

Allereerst wil ik opmerken dat er in een review altijd artikelen gemist kunnen worden. Het niet meenemen van (mogelijk) relevant werk wijst dus niet automatisch op selectieve weergave. Het

review gaat duidelijk over bijen en hommels; dit wordt expliciet en ondubbelzinnig door de auteurs aangegeven. Het niet meenemen van studies over aquatische arthropoden is dus te verdedigen. De blootstellingssituatie is heel anders voor bijen en hommels dan voor aquatische arthropoden. De studies in aquatische arthropoden kunnen relevant zijn, en hadden in het review kunnen worden opgenomen, maar het is heel goed te verdedigen dat dat niet gebeurd is.

10.2.e doelt met “important recent papers” en “important shifts in understanding” op de studies die wijzen in de richting dat effecten irreversibel kunnen zijn (wat betekent dat er in principe geen veilig niveau van blootstelling is). Oftewel, dat blootstellingsduur in overweging moet worden genomen. In zijn algemeenheid onderschrijf ik het belang van blootstellingsduur (daar schrijf ik zelf ook al jaren over). Echter, zelfs als er voor deze stoffen geen veilige externe blootstelling zou zijn, er is vermoedelijk wel een drempel voor de interne concentratie. Het is goed mogelijk dat bij lage en niet-continue blootstelling de interne drempel voor effect niet wordt gehaald tijdens het leven van de bij/hommel. Dan is er in de praktijk wel sprake van een veilig niveau. Het zou dus interessant zijn om de gegevens van aquatische insecten te gebruiken om een model te parameteriseren voor de bij, en, gebruikmakend van een realistisch blootstellingsscenario, te bekijken of er effecten te verwachten zijn. Dat Blacquiere et al. dat niet gedaan hebben is geen zonde; als ze het wel gedaan hadden zou het bijzonder vooruitstrevend geweest zijn.

De studies die 10.2.e aanhaalt gebruiken erg simplistische beschrijvende modellen; een variant op Haber’s law. In feite zijn deze modellen nauw verwant aan het veel oudere werk van Karin Legierse en Henk Verhaar uit 1999, en die modellen waren duidelijk beter onderbouwd. Legierse en Verhaar spreken ook over irreversibele effecten (van AchE inhibitors). Later werk van bijvoorbeeld Roman Ashauer en mijzelf borduren daar meer mechanistisch weer op voort. Eigenlijk gaat dit soort modellerwerk helemaal terug tot de publicaties van Sprague uit 1969 (die pleitte voor het volgen van de LC50 over de tijd totdat een incipient LC50 bereikt was, of totdat blijkt dat de incipient LC50 nul kan zijn), die weer refereert aan nog ouder werk. De aangehaalde studies door 10.2.e bevatten dus wat mij betreft absoluut geen nieuwe inzichten. Verder bewijzen deze studies ook niet dat er geen veilig niveau zou zijn voor stoffen uit deze groep; die conclusie is gebaseerd op het extrapoleren van het model buiten de duur van de experimenten (en zoveel vertrouwen heb ik in ieder geval niet in het gebruikte model).

Het review van Blacquiere et al. is een redelijk traditioneel review van bestaande studies, en refereert aan het huidige risicobeoordelingskader. Ik kan niet beoordelen of alle relevante artikelen opgenomen zijn (daarvoor ken ik de bijen-literatuur te slecht). Dat men de artikelen die 10.2.e noemt niet heeft meegenomen is begrijpelijk, goed te verdedigen, en kan niet worden geïnterpreteerd als selectief weergeven van de resultaten. Ik had zelf ook graag gezien dat er in de huidige praktijk van ecotoxicologie en risicobeoordeling meer aandacht was voor het effect van de blootstellingstijd, en voor dynamische modellen. Helaas is er in de huidige praktijk een focus om standaardtesten met standaard blootstellingsduur te gebruiken. Daarom noem ik dit review ook “traditioneel”, wat ook betekent dat het een volkomen geaccepteerde manier is om dit soort vragen te benaderen. Naar mijn mening is het argument van 10.2.e voor “selectief weergeven van resultaten” absoluut niet houdbaar; tenminste niet op basis van de genoemde artikelen. Zijn waarschuwing voor mogelijke effecten van lage blootstelling na lange blootstellingsduur is op zich valide, maar daar is een “letter to the editor” het perfecte middel voor. Meningen verschillen, daar kan over gediscussieerd worden, en daar biedt het tijdschrift Ecotoxicology ongetwijfeld de ruimte voor.

Deskundige 3

Ik zou kijken of we bibliometrische gronden iets kunnen zeggen over het artikel van Blacquiere en de relatie daarvan tot artikelen van Tennekes en Sanchez-Bayo.

Snelle antwoord: Het artikel van Balcquière is zo jong dat de referenties nog niet in Scopus zijn opgenomen. Het artikel staat er als zogenaamde preprint in. Het betreffende artikel is op dit moment ook nog net opgenomen in Web of Science. Dus via co-citatie analyses, valt er nog niets mee aan te vangen. Het artikel is wel al opgenomen in PubMed en hier kan je via related zoekacties verwante artikelen vinden (Related searches in PubMed werken op basis van sterke overeenkomst van woorden in titel, samenvatting en mesh headings, zie http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3827/#pubmedhelp.Computation_of_Related_Citati). Via de related zoekactie in PubMed worden 101 artikelen gevonden, maar daar zitten de genoemde artikelen Tennekes en Sanchez-Bayo niet bij.

Naast dit korte antwoord zijn er nog wat aanvullende observaties over de artikelen van Tennekes te sanchez Bayo te maken die misschien relevant kunnen zijn.

Tennekes, H. A. (2010). The significance of the Druckrey-Küpfmüller equation for risk assessment--the toxicity of neonicotinoid insecticides to arthropods is reinforced by exposure time. *Toxicology*, 276(1): 1-4 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2010.07.005>

Dit artikel wordt al 4* geciteerd (http://www.scopus.com/results/citedbyresults.url?sort=plf-f&cite=2-s2.0-77956410797&src=s&imp=t&sid=3mSqW-omYFbBeJ3A70lh_Vn%3a120&sot=cite&sdt=a&sl=0&origin=recordpage&txGid=3mSqW-omYFbBeJ3A70lh_Vn%3a12) volgens Scopus, 2 van deze citaties leiden tot "letters to the editor" van het tijdschrift *Toxicology*.

Dit betreft in eerste instantie een letter to the editor van Bayer origine:

Maus, C. & R. Nauen (2011). Response to the publication: Tennekes, H.A. (2010): The significance of the Druckrey-Küpfmüller equation for risk assessment-The toxicity of neonicotinoid insecticides to arthropods is reinforced by exposure time. *Toxicology*, 280(3): 176-177 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2010.11.014>

Deze letter to the editor ontvangt vervolgens een ingezonden letter van 10.2.e aan het adres van 10.2.e en 10.2.e

Tennekes, H. A. (2011). The significance of the Druckrey-Küpfmüller equation for risk assessment-The toxicity of neonicotinoid insecticides to arthropods is reinforced by exposure time: Responding to a Letter to the Editor by Drs. C. Maus and R. Nauen of Bayer CropScience AG. *Toxicology*, 280(3): 173-175 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2010.11.015>

Ik denk dat er misschien argumenten in de letters staan die relevant kunnen zijn.

Opmerkingen bij het artikel van Tennekes & Sanches Bayo (2011)

Tennekes, H. A. & F. Sánchez-Bayo (2011). Time-dependent toxicity of neonicotinoides and other toxicants: implications for a new approach to risk assessment. *Journal of environmental & analytical toxicology*: s-4:001 <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0525.S4-001>

Dit betreft een artikel dat werd gepubliceerd in een zgn Omics journal. Dit is een Open Access tijdschrift van de Omics uitgeverij. Deze staat op de Beals list of predatory, open access publishers <http://metadata.posterous.com/83235355> en dient derhalve met voorzichtigheid beschouwd te worden. Hierbij hebben wij het idee dat Peer review van de artikelen niet altijd de toets der kritiek kan doorstaan. Daarnaast is dit tijdschrift niet opgenomen in gangbare A&I databases zoals Scopus, Web of Science of PubMed en daarom kan het artikel dus niet makkelijk gevonden worden.

Als laatste moet opgemerkt worden dat op dit moment de DOI van het artikel niet naar behoren werkt, dus al vind je de referentie, toegang tot het artikel is lastig.

Wat betreft het derde artikel: Sánchez-Bayo, F. (2009). From simple toxicological models to prediction of toxic effects in time. *Ecotoxicology*, 18(3): 343-354 <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-008-0290-1> Heb ik geen aanvullende opmerkingen.

Neonicotinoïden en sterfte van bijenvolken: causaal verband?

Neonicotinoïden: overzicht van laboratorium-, veld- en monitoringstudies

Het hier beschreven werkplan is de invulling van de helpdeskvraag AKV-189 bijen. De aanleiding is de commotie in de publieke opinie over sterfte van bijen en de mogelijke betrokkenheid van insecticiden, met name neonicotinoïden, en de over dit onderwerp gestelde Kamervragen aan de staatssecretaris van EL&I.

In de Tweede Kamer heeft de staatssecretaris toegezegd dat de bestaande toelatingsdossiers van een aantal neonicotinoïden en fipronil door het CTGB opnieuw zullen worden getoetst op de effecten op de gezondheid van bijen, en expliciet de sub-letale effecten mee te nemen. Daarmee wordt een goed en actueel overzicht van de sub-letale effecten van de middelen en hun risico voor bijen verkregen, voor zover blijkend uit de –niet open toegankelijke- toelatingsdossiers. Ook wordt dan al nagedacht over de risicoverminderende maatregelen die genomen kunnen worden. Naast de toelatingsdossiers is er een wereld van openbare peer reviewed wetenschappelijke literatuur over dit onderwerp, die in de discussie een belangrijke rol speelt, naast niet wetenschappelijke literatuur (artikelen in vakbladen voor bijenhouders, natuurorganisaties, boeren- en tuinders) en informatie op internet. Slechts de toelatingsdossiers en de peer reviewed wetenschappelijke artikelen zijn gezaghebbend om als basis te dienen voor de beleidsdiscussie. Een goed overzicht van beide is daarom nodig. Dat betekent niet dat de andere literatuur genegeerd kan worden, er kunnen belangrijke signalen van uitgaan.

Afbakening 1

De helpdeskvraag wordt beantwoord op basis van de peer reviewed wetenschappelijke literatuur die beschikbaar is over de effecten van neonicotinoïden en fipronil op bijen (honingbijen, hommels en andere bijen).

Inhoud

De discussie in de media spitst zich toe op de vraag hoe je met enige rede insecticiden kunt gebruiken die vele malen giftiger zijn dan DDT vwb bijen. En het gevoel is daarbij dat de sterfte van bijen *dus* wel daardoor moet worden veroorzaakt. Bij de discussie worden diverse publicaties aangehaald, zonder rekening te houden met de context: welk soort studie, welke middelen, welke concentraties enz. Er is veel wetenschappelijke literatuur over het onderwerp, maar die literatuur betreft onderzoek, in te delen naar vier niveau's:

1. laboratoriumonderzoek (zoals de 'kooitjes- testen' voor orale en contact-toxiciteit van de middelen),
2. gedragsonderzoek op laboratorium schaal en semi-veldschaal (individuele bijen),
3. onderzoeken op semi-veldschaal en veldschaal naar overleving en welbevinden van bijen en bijenvolken,

4. monitoringsonderzoek naar welbevinden en overleving van bijenvolken op provincie- of nationale schaal.

In de beantwoording van de helpdeskvraag nemen wij deze verschillende niveaus in ogenschouw.

Omdat ook in de recente publicatie (vorige maand) van de UNEP(http://www.unep.org/dewa/Portals/67/pdf/Global_Bee_Colony_Disorder_and_Threats_insect_pollinators.pdf) werd aangegeven dat '*results obtained in laboratory conditions are hard to compare to field conditions*' gaan we ons concentreren op de discrepantie / slechte vertaalbaarheid van laboratorium- naar veldstudies (tot en met monitoringstudies) en *vice versa*. Op die manier is het zelfs een uitstekend onderwerp voor een officiële review, aan te bieden aan een peer reviewed wetenschappelijk tijdschrift. Het rapport zal ook ingaan op het verschil tussen directe toxiciteit, sub-letale toxiciteit en chronische toxiciteit, hoewel nog geen consensus bestaat over definities van die begrippen. Wij zullen de streven de zo eenduidig en eenvoudig mogelijke definities te gebruiken, maar daarbij uiteraard uitgaan van de meest relevante literatuur (zoals de review van Desneux, DeCourtye et DelPuech, 2007).

Na uitvoering van deze opdracht, heeft de staatssecretaris straks naast elkaar de herbeoordeling van ettelijke dossiers van het CTGB, die gaan over de niet openbare (toelatingsdossiers), en het overzicht van de open wetenschappelijke literatuur. Uiteraard wordt dat aangeleverd als een rapport in helder leesbare taal in het Nederlands (geschikt voor beleid en politiek), naast de wetenschappelijke review in het Engels.

Een klein begin heb ik eerder al eens geschreven voor onze bijen@wur elektronische nieuwsbrief 'Bijennieuws',
[http://enews.nieuwskiosk.nl/more.aspx?e=7786&b=60883&u=\\$uid\\$](http://enews.nieuwskiosk.nl/more.aspx?e=7786&b=60883&u=uid)
om een en ander uit te leggen aan de Nederlandse imkers. Onlangs heb ik dat ten behoeve van het ministerie EL&I aangevuld met wat meer literatuur (meegestuurd als bijlage).

Afbakening 2

De wetenschappelijke literatuur over de effecten van neonicotinoïden en fipronil op bijen wordt gereviewed met de nadruk op de vertaling van de verschillende niveaus waarop de onderzoeken zijn uitgevoerd, en de vertaalbaarheid van de het ene naar het andere niveau.

Producten

1. Een rapport over de effecten van neonicotinoïden op bijen en bijenvolken, gebaseerd op de wetenschappelijke literatuur, dat naast de toelatingsdossiers de open literatuur toegankelijk maakt, en dat duidelijk maakt hoe al die verschillende niveaus ten opzichte van elkaar staan, en wat je er vervolgens wel en niet uit kunt concluderen.
 - a. Managementsamenvatting
 - b. Inhoudelijke behandeling literatuur aan de hand van bovenbeschreven focus
 - c. Conclusies en aanbevelingen
 - d. Literatuurlijst
2. Pdf's van alle literatuur bronnen

3. Een wetenschappelijke peer reviewed review over het onderwerp, met dezelfde focus

Tijdpad

1. Eerste helft april: start bijeenkomst auteurs in België of Nederland: maken schrijfplan en verdeling (bijeenkomst geweest op 20/4)
2. Voor 1 mei: aanleveren overzichtstabel literatuur aan CTGB en EL&I over monitoringen: relatie neonicotinoiden met bijensterfte en gevonden residuen in bijenvolken (uitgevoerd 18 – 21 april, aangeleverd 21 april, definitieve versie 13 mei).
3. Tweede helft april tot 20 mei: schrijven Nederlandstalig rapport. 20 mei opsturen eerste versie naar EL&I en naar drie onafhankelijke lezers ^{10.2.e} (UU), ^{10.2.e} (UU) en ^{10.2.e} (CML UL).
4. Vervolgweken: afronden rapport, schrijven review
5. Eind juni: eerste versie Review, klaar om te laten lezen door diverse interne collega's: opsturen naar tijdschrift ~11 juli.
6. Na afronden review: nog één update maken van het rapport (eind juli beschikbaar).

Begroting

Voor het schrijven van de rapportage en de review heb ik 6 weken werk begroot: vier weken voor bijen@wur van WUR (Dr. Tjeerd Blacquièr), en een week elk voor Zoologie van Universiteit Gent (Prof. Dr. Guy Smagghe) en Vakgroep dierkunde van de Vrije Universiteit Amsterdam (Dr. Ir. C.A.M. (Kees) van Gestel). We willen gedurende het schrijfproces ons een paar dagen gezamenlijk terugtrekken op een plek waar we ongestoord kunnen werken, daartoe zijn wat reis- en verblijfkosten opgevoerd.

Aanvullend zijn 25 uur WO WUR (T Blacquièr) en 25 uur WO Onderzoeker ^{10.2.e} + 30 uur van vier studenten nodig voor het lezen van literatuur en samenstellen van de tabel onder 2.

<i>Omschrijving</i>	<i>tarief</i>	<i>Totaal excl. BTW</i>
144 uur WO WUR	117/uur	16.848,--
72 uur U Gent en VU	137/uur	9.864,--
Reis + verblijfkosten	1800 €	1800,--
WO WUR 25 uur	117/uur	2925,--
WO jr WUR 25 uur	93/uur	2325,--
FacOndersteuning	58/uur	1740,--
TOTAAL		35.502,--

Tjeerd Blacquièr, Wageningen, 6 april 2011, bijgesteld 12 april, inclusief tabel monitoringen voor CTGB: 16 mei 2011.

Van: 10.2.e
Aan: 10.2.e
Onderwerp: RE: Rapport afhandelen klacht van 10.2.e
Datum: donderdag 19 april 2012 09:35:08
Bijlagen: [Inhoudelijk-onderzoek-klacht-reviewartikel-bijensterfte.pdf](#)
[Bijlagen bij rapport nav Klacht 10.2.e](#) [bijensterfte.pdf](#)

Sorry 10.2.e, ik wachtte op de pdf van de brief van onze RvB die ik nog niet heb en toen is het wegezakt. Maar hierbij alvast het definitieve stuk + bijlage; brief komt later.

groet,

10.2.e

-----Original Message-----

From: 10.2.e [mailto:10.2.e@mineleni.nl]

Sent: woensdag 18 april 2012 15:53

To: 10.2.e

Subject: Rapport afhandelen klacht van 10.2.e

Ha 10.2.e,

Ter herinnering: je zou mij nog het definitieve rapport over de afhandeling van de klacht van 10.2.e door 10.2.e op sturen en de brief van 10.2.e. Wellicht is het even aan je aandacht ontschoten of is er ergens een 'kink in de kabel' gekomen?

Groet,

10.2.e

Ministerie van EL& I

E 10.2.e @mineleni.nl (nieuw e-mailadres) M 06 10.2.e T 070 10.2.e

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen. De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message. The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

Van: 10.2.e
Aan: 10.2.e
Cc: 10.2.e 10.2.e 10.2.e
Onderwerp: RE: Vragen over rapport - vervolg richting EU
Datum: donderdag 29 maart 2012 20:48:10
Bijlagen: [Blacquiére Smagghé Van Gestel & Mommaerts 2012 Neonicotinoids and bees online Feb 21.pdf](#)

Hallo 10.2.e ,

Ik ben vanmiddag teruggekomen uit Bonn, waar we de 'Arbeitstagung der Deutschen Bieneninstitute hebben bijgewoond. Dat is elk jaar eind maart, en traditioneel valt vanaf de terugreis het bijenseizoen over ons heen..... Gelukkig is het een beetje kouder geworden, een klein beetje de rem erop.

Ik wist dus nog niet dat het rapport inmiddels naar de TK was, het lukte me niet de mail open te houden (al had ik de laptop meegenomen), en de smart phones zijn bij ons slechts voor de heavy smarts, niet voor de light.

Ik stuur je hierbij alvast de review door. Ik denk dat je em had kunnen vinden, want het is een open access paper.

Ik zal even kijken naar de aanbevelingen. Ik denk niet dat het lastig hoeft te zijn die in het Engels om te zetten (goed geformuleerd, want niet alleen het gif doet er toe, ook de formulering), dus dat moet best voor Pasen lukken.

Ieders aandacht is toch bij Wilders nu? Of is vanwege het buitenspel staan de TK nu juist extra alert op 'andere' zaken?

Je hoort van me. Groet 10.2.e

-----Original Message-----

From: 10.2.e [<mailto:10.2.e@mineleni.nl>]
Sent: dinsdag 27 maart 2012 18:17
To: 10.2.e
Cc: 10.2.e 10.2.e
Subject: Vragen over rapport - vervolg richting EU
Importance: High

Beste 10.2.e

Alles goed? Bijenseizoen al opgestart?

Nav je rapport over literatuur tav van bijen en neonicotinoïden heeft onze staatssecretaris de TK geïnformeerd, zoals je weet.

In de brief aan de Kamer, zie PDF-bijlage, geeft de staatssecretaris aan dat hij een aantal stappen onderneemt (pagina 3/4).

<<TKN Bijlage Ibg 19 06 Kamerbrief literatuuronderzoek neonicotinoïden en sterfte van bijen.pdf>> Voor de stappen richting EU Commissie en EFSA heeft 10.2.e mij gevraagd voor een aantal zaken zorg te dragen. Ik heb daarvoor je hulp nodig:

- zou je me je Engelstalige publicatie kunnen sturen (als PDF)?
- in het rapport doe je een aantal beoordeling/toelating-aanbevelingen, die het EU en EFSA vlak aangaan. Zou je die aanbevelingen (kort) willen vertalen naar het Engels?

Wanneer zou je deze vraag kunnen oppakken en mij dit kunnen opleveren/sturen? Lukt dat vóór Pasen? Wil je me even laten weten, dank alvast.

Groet, 10.2.e

10.2.e
Senior Officer

Ministry of Economic Affairs, Agriculture & Innovation Directorate General Agriculture Plant Health PO Box
20401 NL 2500 EK The Hague The Netherlands tel. **31 (0)70 10.2.e or **31 (0)6 5 10.2.e
e-mail: 10.2.e @mineleni.nl

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen. De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message. The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment

**Tjeerd Blacqui re, Guy Smagghe,
Cornelis A. M. van Gestel & Veerle
Mommaerts**

Ecotoxicology

ISSN 0963 9292

Ecotoxicology

DOI 10.1007/s10646 012 0863 x



Your article is published under the Creative Commons Attribution license which allows users to read, copy, distribute and make derivative works, as long as the author of the original work is cited. You may self-archive this article on your own website, an institutional repository or funder's repository and make it publicly available immediately.

Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment

Tjeerd Blacquière · Guy Smagghe ·
Cornelis A. M. van Gestel · Veerle Mommaerts

Accepted: 28 January 2012

© The Author(s) 2012. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract Neonicotinoid insecticides are successfully applied to control pests in a variety of agricultural crops; however, they may not only affect pest insects but also non-target organisms such as pollinators. This review summarizes, for the first time, 15 years of research on the hazards of neonicotinoids to bees including honey bees, bumble bees and solitary bees. The focus of the paper is on three different key aspects determining the risks of neonicotinoid field concentrations for bee populations: (1) the environmental neonicotinoid residue levels in plants, bees and bee products in relation to pesticide application, (2) the reported side-effects with special attention for sublethal effects, and (3) the usefulness for the evaluation of neonicotinoids of an already existing risk assessment scheme for systemic compounds. Although environmental residue levels of neonicotinoids were found to be lower than acute/chronic toxicity levels, there is still a lack of reliable data as most analyses were conducted near the detection limit and for only few crops. Many laboratory studies described lethal and sublethal effects of neonicotinoids on the foraging behavior, and learning and memory

abilities of bees, while no effects were observed in field studies at field-realistic dosages. The proposed risk assessment scheme for systemic compounds was shown to be applicable to assess the risk for side-effects of neonicotinoids as it considers the effect on different life stages and different levels of biological organization (organism versus colony). Future research studies should be conducted with field-realistic concentrations, relevant exposure and evaluation durations. Molecular markers may be used to improve risk assessment by a better understanding of the mode of action (interaction with receptors) of neonicotinoids in bees leading to the identification of environmentally safer compounds.

Keywords Honey bee · Bumble bee · Solitary bee · Lethal toxicity · Sublethal effects · Reproduction · Behavioral effect · Risk assessment · Neonicotinoids · Residues

Introduction

Bees, including honey bees, bumble bees and solitary bees, are the prominent and economically most important group of pollinators worldwide; 35% of the world food crop production depends on pollinators (Klein et al. 2007; Velthuis and van Doorn 2006), accounting for an annual value of 153 billion Euros (Gallai et al. 2009). In Europe, for instance, the production of 84% of crop species is to some extent depending on animal pollination (Williams 1994). Bees also provide important pollination services to wild plants, of which in Europe 80% need insects for pollination (Kwak et al. 1998), so confirming their ecological importance. The decline of pollinating species, which has grown over the last decades, may lead to a

T. Blacquière (✉)
Plant Research International, Wageningen University &
Research, PO Box 69, 6700 AB Wageningen, The Netherlands
e mail: tjeerd.blacquiere@wur.nl

G. Smagghe · V. Mommaerts (✉)
Department of Crop Protection, Faculty of Bioscience
Engineering, Ghent University, Coupure Links 653, 9000 Ghent,
Belgium
e mail: veerle.mommaerts@ugent.be

C. A. M. van Gestel
Department of Animal Ecology, Faculty of Earth and Life
Sciences, VU University, De Boelelaan 1085, 1081 HV
Amsterdam, The Netherlands

parallel decrease of plant species, or vice versa (Biesmeijer et al. 2006; National Research Council of the National Academies 2007; Goulson et al. 2008). More specifically, there is a great concern about the decline of the honey bee (*Apis mellifera*) in several parts of the world (Oldroyd 2007; Stokstad 2007; VanEngelsdorp and Meixner 2010). It is now accepted that the abundance of pollinators in the environment is influenced by multiple factors, including biotic ones like pathogens, parasites, availability of resources due to habitat fragmentation and loss; and abiotic ones like climate change and pollutants (Decourtye et al. 2010; Neumann and Carreck 2010; Kluser et al. 2011). Although the putative causes are still currently analyzed, the extensive use of chemical pesticides against pest insects for crop protection may have contributed to the loss of pollinators.

To feed the fast growing global population, chemical insecticides are important to crop productivity in intensive farming systems where they preserve about one-fifth of the crop yield (Oerke and Dehne 2004). Good examples are the major staple crops like cereals, soybeans, maize, and many fruit and vegetable crops. Within the different insecticide classes, the neonicotinoid insecticides, which include imidacloprid, acetamiprid, clothianidin, thiamethoxam, thiacloprid, dinotefuran and nitenpyram, are an important group of neurotoxins specifically acting as antagonists of the insect nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) (Matsuda et al. 2001; Elbert et al. 2008). Since the introduction of imidacloprid in the early 1990s, the use of different neonicotinoid insecticides has grown considerably. They are used extensively for the control of important agricultural crop pests by spraying and also widely used in seed dressings and soil additions. In the latter two cases residues of these systemic insecticides can be present at ‘trace’ levels in the plant pollen and nectar. So potentially, bees could be exposed at a large scale to insecticide residues originating from crop seed dressings.

To date in the international scientific literature >100 papers appeared with the keywords “neonicotinoids/imidacloprid” and “bee”, the first being published in 1992, and an impressive cumulative number of citations near to 1,500. In addition many reports have appeared in different types of the public media, highlighting the awareness by the different stakeholders in the field related to pesticides, bees, environment, toxicology, pollination and agriculture.

This review gives, for the first time, a summary of the data published over the last 15 years on concentrations of neonicotinoid insecticides recovered in plants and bees and their products. This analysis of the literature took into consideration the different crops, the methods of application and the importance of metabolism, and covered data from different countries and continents. Second, the publicly available data on side-effects of the different neonicotinoid insecticides towards honey bees, bumble bees and

other bee species are summarized, and critically analyzed with a special emphasis on sublethal effects on reproduction, foraging behavior, memory/learning abilities and overwintering success. A third part focuses on the potential applicability of the new stepwise risk assessment scheme as proposed for systemic pesticides (Alix et al. 2009; Thompson 2010), for more adequately assessing risks for side-effects by neonicotinoid insecticides. The latter assessment took into account the characteristics of doses of neonicotinoid insecticides in their field-realistic range and followed the classical tiered approach from the laboratory to field-related conditions and from exposure of individual bees to the colony level. The importance of the use of adults and larvae (brood) together with the scoring of lethal and sublethal biological endpoints is also discussed. Points of comparison and experimental advantages and difficulties between honey bees, bumble bees and other bees are discussed. Attention is paid to the use of mixtures containing neonicotinoid insecticides that can synergize their hazards for bees. Our paper concludes with some targets for research and recommendations for future risk assessment studies, specifically with the aim to assess the global bee colony health status.

Concentrations and metabolism of neonicotinoid insecticides in plants and bees in relation to pesticide application

Translocation of residues in plants, nectar and pollen

Several studies have examined the translocation of imidacloprid from seed treatment to different parts of sunflower (*Helianthus annuus*) plants. In a greenhouse experiment with sunflowers treated with 0.7 mg ^{14}C -imidacloprid per seed (Gaucho WS, 700 g kg $^{-1}$) average imidacloprid concentrations amounted $3.9 \pm 1.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ in pollen and $1.9 \pm 1.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ in nectar (Schmuck et al. 2001). Nectar contained only imidacloprid and in pollen 85% of the ^{14}C -residues were present as imidacloprid (no metabolites were detected). In a field study at the dosage of 1 mg per seed (i.e. 30% higher than the recommended dose) no imidacloprid or metabolites were found in nectar and pollen, while the leaves of the sunflowers contained imidacloprid at $7 \mu\text{g kg}^{-1}$ and the hydroxy-metabolite at $<5 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Schmuck et al. 2001). Only 5% of the ^{14}C -imidacloprid dose (1 mg per seed) was taken up from the seed after 4 weeks of sunflower growth in a climate-controlled cabinet. At flowering 90% of the dose was estimated to be still present in the soil. In the plant leaves mainly imidacloprid (approximately 50% of total ^{14}C) was found together with three metabolites (30–50% of ^{14}C). Imidacloprid concentrations decreased from the first leaves to the top leaves;

levels in sunflower pollen were <0.5 $36 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Laurent and Rathahao 2003). Sunflower plants showed decreasing imidacloprid levels with time till the moment of capitule (flower head of Asteraceae) formation, but thereafter concentrations increased again. Imidacloprid concentrations in plants differed between sunflower varieties with average concentrations in the flowers between 5 and $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Bonmatin et al. 2003). The latter study also determined imidacloprid residues in pollen samples of maize and sunflower that received a seed treatment. In 58% of the pollen samples imidacloprid was found with an average concentration of $3 \mu\text{g kg}^{-1}$ (range 1 – $11 \mu\text{g kg}^{-1}$) for sunflower. In 80% of the maize pollen samples imidacloprid was found at an average concentration of $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ (5 samples only; range 1 – $3 \mu\text{g kg}^{-1}$) (Bonmatin et al. 2003), while a follow-up of this study reported an average concentration of $3.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Charvet et al. 2004).

When sunflower and maize (without seed treatment) were planted on soils still containing imidacloprid at 2 – $18 \mu\text{g kg}^{-1}$ from earlier treatments, no imidacloprid was detected in pollen and nectar (Schmuck et al. 2001; Charvet et al. 2004).

Girolami et al. (2009) found that part of the imidacloprid taken up by maize seedlings can be eliminated through the guttation fluid, i.e. the droplets on the leaf tip. Excretion of guttation fluid seems limited to the first 3 weeks after germination (Girolami et al. 2009; Thompson 2010) and is affected by humidity, temperature, growth stage, water stress, root depth and soil water potential (Tapparo et al. 2011). During the first 3 weeks after emergence, imidacloprid concentrations can be very high. From a seed treatment of 0.5 mg per seed (Gaucho 350 FS), the imidacloprid concentrations in the guttation fluid of plants grown in the laboratory ranged between 47 ± 9.9 and $83.8 \pm 14.1 \text{ mg l}^{-1}$ (Girolami et al. 2009). Similarly, residues of clothianidin ($23.3 \pm 4.2 \text{ mg l}^{-1}$ from plants treated with 1.25 mg per seed as Poncho) and thiamethoxam ($11.9 \pm 3.32 \text{ mg l}^{-1}$; 1 mg per seed as Cruiser 350 FS) were found in the guttation fluid (Girolami et al. 2009). Tapparo et al. (2011) reported a decline of imidacloprid concentrations in the guttation fluid of maize plants that were dosed at 0.5 mg per seed (Gaucho) and grown in the greenhouse, from 80.1 mg l^{-1} after 1 day to 17.3 mg l^{-1} after 8–10 days, but the concentrations increased again to 60.1 mg l^{-1} during the next 10 days. At a dose of 1.25 mg per seed, imidacloprid concentrations in guttation drops that were collected during the first 6 days after emergence at the top of the leaves, ranged between 103 and 346 mg l^{-1} , while at the crown they amounted 8.2 – 120 mg l^{-1} . In the guttation fluid collected from plants grown in the field during the first day after emergence, imidacloprid concentrations ranged between 77 and 222 mg l^{-1} (Tapparo et al. 2011). Similar patterns were also seen for clothianidin (7.3 – 102 mg l^{-1})

and thiamethoxam (2.9 – 40.8 mg l^{-1}) (Tapparo et al. 2011). Thiamethoxam concentrations in guttation fluid increased with decreasing soil moisture content, from 14 to 155 mg l^{-1} for plants grown under wet conditions to 34 – $1,154 \text{ mg l}^{-1}$ under dry conditions (Tapparo et al. 2011). The guttation fluid from plants growing on a field next to a plot planted with clothianidin-treated maize seeds (1.25 mg per seed; Poncho) always contained $<30 \mu\text{g l}^{-1}$ clothianidin (Marzaro et al. 2011).

Residues in bee-collected pollen, bees, honey and wax

Neonicotinoid residues in plants and plant parts only become of importance for bees once they are exposed. The most relevant measures of exposure are the concentrations in bee-collected plant materials, such as pollen, bee products like bee bread, honey and beeswax, and in the bees themselves. Table 1 summarizes reports on neonicotinoid insecticide concentrations in bee-related products as published in the literature.

Several studies were performed across Europe as well as North America (one study). Some studies involved a large scale analysis of samples collected over an extended area and in different years (Genersch et al. 2010; Chauzat et al. 2011), while others did a more or less nation-wide survey in one or two sampling years (Pirard et al. 2007; Nguyen et al. 2009; Bernal et al. 2010; Garcia-Chao et al. 2010; Mullin et al. 2010). A few studies focused on a limited number of samples (Bacandritsos et al. 2010) or did not mention the number of samples analyzed (Cutler and Scott-Dupree 2007). In some studies, a wide range of pesticides was measured in different bee-related products (Bernal et al. 2010; Chauzat et al. 2009; Mullin et al. 2010; Genersch et al. 2010), while others solely focused on neonicotinoid pesticides. Only few studies did include the analysis of metabolites.

An extensive inventory of imidacloprid in bee-collected pollen, honey and bees was performed by Chauzat et al. (2006, 2009, 2011), involving five sites across France with sampling of bee hives of five beekeepers in each area for 3 years and with four sampling events per year. Imidacloprid was found in 40.5 and 21.8% of the pollen and honey samples, respectively. The metabolite 6-chloronicotinic acid was present in 33.0 and 17.6% of the respective samples. The sampling took place in four agricultural areas and one natural area. Using a χ^2 test, frequency of imidacloprid + metabolite detection in pollen was shown to be significantly higher in 2003 compared to 2005; there was no difference for honey samples (Chauzat et al. 2011). No significance difference was found in the frequency of pesticide residue detection in pollen and honey between the different sampling areas (Chauzat et al. 2006, 2009). It is not known at what scale imidacloprid was applied in the

Table 1 Overview of literature data on neonicotinoid residues in bee-collected pollen, honey and bees

Substrate	Country/area/land use/ecosystem	Dominant crop/plant species	Experimental design and statistical analysis	Chemical	No. of samples	% Samples positive	Concentration ($\mu\text{g kg}^{-1}$ fresh weight)		Notes	References
							Mean ^a	Range in positive samples		
Pollen	France; 4 agricultural + 1 natural region	No data	24 Sites, 120 colonies; 4 \times per year; Oct 2002–Sept 2005; χ^2 analysis to compare frequencies of pesticide occurrence between years and areas	imi	185	40.5	0.9	>0.2–5.7	No significant differences between areas; frequency in 2003 sign. higher than in 2005; many other pesticides found	Chauzat et al. (2006, 2009, 2011)
	Spain, 11 different regions	Sunflower dominant in 11.5%, wild vegetation in 78.7% and mixture in 9.8% of samples	Pollen from comb cells; χ^2 analysis to compare pesticide occurrence in unhealthy (depopulated) and asymptomatic colonies	imi	61	0	<0.4		No significant difference in pesticide residue levels between unhealthy and healthy populations; nine other pesticides detected	Higes et al. (2010)
	Spain, 17 regions	Wild vegetation in 47.8%, crops in 38.3% of samples (10.4% sunflower, 7.8% <i>Medicago</i> , 9.5% cereals)	Stored pollen from 448 + 92 spring and 397 + 84 autumn samples in 2006 + 2007, respectively; statistical analysis not applicable to imidacloprid	imi	1,021	0	<0.4		Many pesticides detected in 42% and 31% of spring and autumn samples, respectively	Bernal et al. (2010)
	USA (Florida, California, Pennsylvania or 13 states) + samples from outside USA and Canada	No data	2007/2008 Survey incl. 13 apiaries in Florida + California, 47 colonies in Pennsylvania orchards and from ‘other’ samples; no further data analysis	imi thm ace thc	350	2.9 0.29 ^b 3.1 5.4	3.1 53.3 1.9 1.3	<2.0–9.12 <5.0–12.4 <1.0–11.5	Many pesticides detected	Mullin et al. (2010)
	Germany, throughout the country	Main nectar flow plants: oil seed rape (<i>Brassica napus</i> ; 11–37%), sunflower (<i>H. annuus</i> ; 3–4%) and corn (<i>Zea mays</i> ; 16–22%)	Nation-wide survey; many beekeepers; 2005 + 2006 (50 apiaries; $n = 105$) and 2007 ($n = 110$ apiaries); sampling after rapeseed flowering; no further data analysis	imi thc clo ace	215	0.47 ^b 33 0 0.93	3 – <0.1 –	 >1.0–199 >1.0	Many pesticides detected	Genersch et al. (2010)
	Guelph, Canada	<i>Brassica napus</i>	1 ha fields; treated 400 g AI kg^{-1} seed ($\approx 32 \text{ g ha}^{-1}$) + control; 4 bee colonies per field for 21 days; sampling at 14 day intervals; samples pooled per field and sampling day; no further data analysis	clo	No data	Few	–	<0.5–2.59 (treated); <0.5 (control)		Cutler and Scott-Dupree (2007)

Table 1 continued

Substrate	Country/area/land use/ecosystem	Dominant crop/plant species	Experimental design and statistical analysis	Chemical	No of samples	% Samples positive	Concentration ($\mu\text{g kg}^{-1}$ fresh weight)		Notes	References
							Mean ^a	Range in positive samples		
Honey	France; 4 agricultural + 1 natural region	No data	24 Sites, 120 colonies; 4× per year; Oct 2002–Sept 2005; χ^2 analysis to compare frequencies of pesticide occurrence between years and areas	imi	239	21.8	0.7	>0.3–1.8	No differences between areas or years	Chauzat et al (2006, 2009, 2011)
	Belgium, different areas	No data	Monitoring; no further details	imi	109	4.6	<0.084			Pirard et al (2007)
	Belgium, different areas	Maize (0.05–2.48% of crop treated)	August–October 2004 (after flowering of <i>Zea mays</i>); no further data analysis	imi	48	8.4	0.275	>0.05 <0.5		Nguyen et al (2009)
	North-West Spain	No data	73 Apiaries; no further data analysis	imi	91	0	<2.33			Garcia-Chao et al (2010)
	Guelph, Canada	<i>Brassica napus</i>	1 ha fields; treated 400 g AI kg ⁻¹ seed (= 32 g ha ⁻¹) + control; 4 bee colonies per field for 21-d; sampling at 14-d intervals; no further data analysis	thm clo	No data	Few	–	<0.5–0.93 (treated); <0.5 (control)		Cutler and Scott-Dupree (2007)
Honey bees	France; 4 agricultural + 1 natural region	No data	24 Sites, 120 colonies; 4× per year; Oct 2002–Sept 2005; χ^2 analysis to compare frequencies of pesticide occurrence between years and areas	imi	187	11.2	1.2	>0.3–11.1	No differences between areas or years	Chauzat et al (2006, 2009, 2011)
	Belgium, different areas	No data	Monitoring; no further details	imi	99	0	<0.1			Pirard et al (2007)
	Belgium, different areas	Maize (0.05–2.48% of crop treated)	August–October 2004 (after flowering of <i>Zea mays</i>); no further data analysis	imi	48	0	<0.05			Nguyen et al (2009)
	USA (Florida, California, Pennsylvania or 13 states) + outside US and Canada	No data	2007/2008 Survey of 13 apiaries in Florida + California, from 47 colonies in Pennsylvania orchard and from 'other' samples; no further data analysis	imi thc thm ace	140	0 0 0 0	<2.0 <1.0 <1.0 <5.0		Many pesticides detected	Mullin et al (2010)
	Greece, Peloponnesus region	No data no data	Apiaries with bees exhibiting atypical behavior; no further data analysis	imi clo thm ace	5 0 0 0	60 0 0 0	27 <LOD <LOD <LOD	14–39	Detection limits not given	Bacandrisos et al (2010)

Table 1 continued

Substrate	Country/area/land use/ecosystem	Dominant crop/plant species	Experimental design and statistical analysis	Chemical	No of samples	% Samples positive	Concentration ($\mu\text{g kg}^{-1}$ fresh weight)		Notes	References
							Mean ^a	Range in positive samples		
Bees wax	Belgium, different areas	No data	Monitoring; no further details	imi	98	0	<0.1			Pirard et al (2007)
	Belgium, different areas	Maize (0.05–2.48% of crop treated)	August–October 2004 (after flowering of <i>Zea mays</i>); no further data analysis	imi	48	0	<0.05			Nguyen et al (2009)
	USA (Florida, California, Pennsylvania or 13 states) + outside USA and Canada	No data	2007/2008 Survey of 13 apiaries in Florida + California; from 47 colonies in Pennsylvania orchard; from 'other' samples; no further data analysis	imi	208	0.96	–	2.4–13.6	Many pesticides detected	Mullin et al (2010)
				thc		1.9	0.1	<10–8.0		
				thm		0	<1.0			
				ace		0	<5.0			
	Guelph, Canada	<i>Brassica napus</i>	1 ha fields; treated 400 g AI kg^{-1} seed ($\approx 32 \text{ g ha}^{-1}$) + control; 4 bee colonies per field for 21-d; sampling at 14-d intervals; no further data analysis	clo	No data	Few	–	<0.5 (treated and control)		Cutler and Scott-Dupree (2007)

ace acetamiprid, *clo* clothianidin, *imi* imidacloprid, *thc* thiacloprid, *thm* thiametoxam

^a When no residues are detected, the limit of detection (LOD) is given

^b Only one sample was positive

agricultural areas where sampling took place. Neither is known what were the main plant species represented by the pollen samples collected.

As presented in Table 1, the average imidacloprid residue levels in positive pollen samples ranged between 0.9 and $3.1 \mu\text{g kg}^{-1}$, while levels in honey and beeswax were generally lower. Concentrations of 6-chloronicotinic acid were only exceeding the limit of detection in the studies of Chauzat et al. (2006, 2009, 2011), with average concentrations of $1.2 (>0.3 \text{ } 9.3) \mu\text{g kg}^{-1}$ and $1.2 (>0.3 \text{ } 10.2) \mu\text{g kg}^{-1}$ in pollen and honey, respectively. Other studies reported in general lower frequencies of imidacloprid presence in pollen, honey and beeswax samples. Nguyen et al. (2009), who sampled in an area with 13.2% of the maize crop receiving seed dressing, detected imidacloprid in 8.4% of the honey samples, but levels were always below the limit of quantification ($0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$). In a study in northern America, thiacloprid and acetamiprid were present in 5.4% of the pollen samples, while thiacloprid was also measured in 1.9% of the beeswax samples (Mullin et al. 2010). Also in Germany, thiacloprid was the most abundant neonicotinoid as it was detected in 33% of the pollen samples at concentration levels up to $199 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Genersch et al. 2010) (Table 1). In pollen collected at 1 and 6 days after spraying of apple trees in Slovenia with Calypso 480 SC at a dose of 0.2 kg ha^{-1} (approximately $0.1 \text{ kg AI ha}^{-1}$), respective thiacloprid levels of 60 and $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ were recorded. In bee bread, no thiacloprid was detected (detection limit $10 \mu\text{g kg}^{-1}$) (Smodis Skerl et al. 2009).

The best measure of exposure and bioavailability are concentrations in honey bees. The study of Chauzat et al. (2011) found imidacloprid in 11.2% of the honey bee samples, while the main metabolite 6-chloronicotinic acid was detected in 18.7% of the samples. Average concentrations were $1.2 (>0.3 \text{ } 11.1)$ and $1.0 (>0.3 \text{ } 1.7) \mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. Also for honey bees, there were no significant seasonal and geographic differences in the frequencies of imidacloprid or 6-chloronicotinic acid residue detection (Chauzat et al. 2011). For honey bees, other studies did not detect imidacloprid in the bees. Only in the study of Bacandritsos et al. (2010) higher imidacloprid concentrations were measured in honey bees. This study however, concerned only five samples. As shown in Table 1, no other neonicotinoid insecticides were detected in honey bees in the other inventories performed across Europe and North America.

The low residue levels in honey bees probably are best explained from the fast imidacloprid metabolism by the honey bee *A. mellifera*. After exposure to sugar water dosed at 20, 50 or $100 \mu\text{g }^{14}\text{C-imidacloprid kg}^{-1}$ honey bee, half-lives were 4–5 h (Suchail et al. 2004a, b). The major metabolites are 4- and 5-hydroxy-imidacloprid and olefin. Olefin peaked after about 4 h, while the hydroxy metabolite(s) appeared either immediately after termination of

exposure and then decreased in concentration (Suchail et al. 2004b) or showed a peak after about 4 h (Suchail et al. 2004a). The total amount of imidacloprid and metabolites in honey bees decreased with a half-life of 25 h (Suchail et al. 2004a). Imidacloprid was the main compound in the abdomen (38% of accumulated ^{14}C) directly after treatment. In the head, four metabolites were detected with imidacloprid levels always being $\leq 5\%$ of the ingested dose, and olefin and 4- and 5-hydroxy-imidacloprid being the main metabolites after 24 and 30 h, respectively. Imidacloprid and its metabolites were also detected in other body parts of the honey bee (hemolymph, midgut, rectum) with highest amounts in the thorax (Suchail et al. 2004a). It should be noted that dosages applied in these metabolism studies are much higher than the levels found in the field and might even be in the toxic range. The relevance of these data for the metabolism at field-realistic concentrations therefore remains uncertain.

Acetamiprid was also rapidly metabolized in bees, with a half-life of 25 min after oral administration with sugar water ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$) and producing four metabolites. The major metabolite had a peak corresponding to approximately 48% of the dose after 8 h, and the other three metabolites reached maximum levels of 22–25%. After 72 h, the bees contained only metabolites. The metabolism of ^{14}C -acetamiprid seems to be tissue specific and showed a similar distribution pattern in the honey bee as imidacloprid (Brunet et al. 2005).

Side-effects of neonicotinoid insecticides in bees

Acute lethal toxicity

To date the evaluation of potential risks of insecticides is directed by guidelines like the Directive 91/414 in Europe and the Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act in the USA. Measurements of lethal toxicity are conducted by scoring the numbers of dead bees after 24–48 h and then the corresponding median lethal dose/concentration (LD_{50} and/or LC_{50}) is calculated. Tables 2 and 3 give an overview of the reported acute LD_{50} and LC_{50} values for neonicotinoid insecticides at the individual (organism) level. Based on this it is clear that several factors play a role:

Toxicity is dependent on the route of exposure with contact being less toxic than oral. The oral LD_{50} s, however, showed large variability over the different studies with neonicotinoids (Decourtaye and Devillers 2010; Laurino et al. 2011). The process of trophallaxis may have contributed to differences in the uptake and accumulation of insecticide among the worker bees, and high imidacloprid doses may cause a reduction of sugar water consumption (Nauen et al. 2001).

Table 2 Overview of the lethal and sublethal side-effects by imidacloprid to individual (organism level) honey bees (*A. mellifera*), bumble bees (*B. impatiens*) and solitary bees as determined in different studies by oral/contact exposure under laboratory and (semi-)field conditions

Species	Exposure	Side-effects	References
<i>A. mellifera</i>	Lab + contact: acute (no information on concentration range), individual bees	LD ₅₀ -24 h: 18 ng bee ⁻¹	Iwasa et al. (2004)
<i>A. mellifera</i>	Lab + oral: acute exposure to 0.12 and 12 ng bee ⁻¹	Reduction of associative learning at 12 ng bee ⁻¹	Decourtye et al. (2004a, b)
<i>A. mellifera</i>	Lab + semi-field: oral exposure: 24 µg kg ⁻¹ in syrup	Decreased foraging activity on the food source and on the hive entrance; effect on the learning performance	Decourtye et al. (2004a, b)
<i>A. mellifera</i>	Lab + oral: acute exposure to 0.2–3.2 mg l ⁻¹	LD ₅₀ -48 h: 30 ng bee ⁻¹	Decourtye et al. (2003)
<i>A. mellifera</i>	Lab + oral: chronic exposure (no information on concentration)	LOEC on survival of winter bees: 24 µg kg ⁻¹	Decourtye et al. (2003)
		LOEC on associative learning via PER assay on winter bees (12 µg kg ⁻¹) and summer bees (12 µg kg ⁻¹)	
<i>A. mellifera</i>	Lab + contact: acute exposure to 1.25–20 ng bee ⁻¹	LOEC for PER habituation: 1.25 ng bee ⁻¹	Lambin et al. (2001)
		LOEC for mobility: 1.25 ng bee ⁻¹ ; mobility reduced at 2.5–20 ng bee ⁻¹	
<i>A. mellifera</i>	Lab + oral: acute exposure to 0.1 and 81 ng bee ⁻¹	LD ₅₀ -48 h: between 41 and >81 ng bee ⁻¹ ; NOED: ≤1.25 ng bee ⁻¹ ; reduced sucrose uptake by 33% at 81 ng bee ⁻¹	Nauen et al. (2001)
<i>A. mellifera</i>	Lab + contact: acute exposure to 40–154 ng bee ⁻¹	LD ₅₀ -48 h: between 49 and 104 ng bee ⁻¹	Nauen et al. (2001)
<i>A. mellifera</i>	Lab + oral: acute exposure to 0.7 mg seed ⁻¹	LD ₅₀ -48 h: 4–41 ng bee ⁻¹	Schmuck et al. (2001)
<i>A. mellifera</i>	Lab + oral: chronic exposure (39 days) to sunflower nectar contaminated with 0.002–0.02 µg kg ⁻¹	NOEC for mortality, feeding activity, wax comb production, breeding performance and colony vitality: 0.02 µg kg ⁻¹	Schmuck et al. (2001)
<i>A. mellifera</i>	Summary of data of more than 30 lab and (semi-)field tests	Repellent antifeedant effect at 500–1,000 µg l ⁻¹	Maus et al. (2003)
		No adverse effects expected at residue levels of <20 µg l ⁻¹	
<i>A. mellifera</i>	Field + oral: chronic exposure	NOEC for the intraspecific communication: 10 µg l ⁻¹	Kirchner (1999)
		NOEC for survival, foraging activity, colony development, brood status and changes in pollen/nectar stores: 20 µg l ⁻¹	
<i>A. mellifera</i>	Lab + oral: acute exposure to 10–10,000 µg l ⁻¹	LD ₅₀ -48 h: 60 ng bee ⁻¹	Suchail et al. (2001)
<i>A. mellifera</i>	Lab + oral: young bees chronically (10 days) exposed to 0.1, 1 and 10 µg l ⁻¹	50% Mortality	Suchail et al. (2001)
<i>B. impatiens</i>	Lab + contact: acute exposure via a Potter spray tower (no information on concentration range)	LC ₅₀ -48 h: 322 mg l ⁻¹	Scott-Dupree et al. (2009)
<i>O. lignaria</i>		LC ₅₀ -48 h: 7 mg l ⁻¹	
<i>M. rotundata</i>		LC ₅₀ -48 h: 17 mg l ⁻¹	

NOEC no-observed effect concentration, NOED no-observed effect dose, LOEC lowest observed effect concentration, PER proboscis extension reflex

Upon topical treatment, nitro-containing neonicotinoids (imidacloprid, clothianidin, thiamethoxam, nitenpyram and dinotefuran) were more toxic than the cyano-group containing ones (acetamiprid and thiacloprid) (Iwasa et al. 2004; Laurino et al. 2011). A similar high toxicity of imidacloprid and thiamethoxam was also found for the bumble bee *Bombus terrestris* (Mommaerts et al. 2010). The lower toxicity of the cyano-group neonicotinoids can be attributed to their fast biotransformation (Suchail et al. 2004a, b; Brunet et al. 2005) and the existence of different nAChR subtypes (Jones et al. 2006). For contact exposure Iwasa et al. (2004) ranked the neonicotinoid insecticides based on their 24-h LD₅₀ as follows: for the nitro-group: imidacloprid (18 ng bee⁻¹) > clothianidin (22 ng bee⁻¹) > thiamethoxam (30 ng bee⁻¹) > dinotefuran (75 ng bee⁻¹) > nitenpyram (138 ng bee⁻¹); and for the cyano-group: acetamiprid (7 µg bee⁻¹) > thiacloprid (15 µg bee⁻¹).

Metabolites of neonicotinoids were shown to contribute to the toxicity (Table 3) (Nauen et al. 2001, 2003; Suchail et al. 2001; Decourtye et al. 2003) except for acetamiprid with none of the metabolites being toxic (Iwasa et al. 2004). So far, most studies were conducted on metabolites of imidacloprid: those with a nitroguanidine-group (oleo-fin-, hydroxy-, and dihydroxy-imidacloprid) were more toxic (oral LD₅₀) compared to the urea-metabolite and 6-chloronicotinic acid (Nauen et al. 2001). The metabolite of thiamethoxam, clothianidin was highly toxic for bees (Nauen et al. 2003).

For imidacloprid the toxicity varied upon insect-related factors such as the age of the bee, the colony, the subspecies used (Suchail et al. 2000, 2001; Nauen et al. 2001; Guez et al. 2003) and the health of the bees with sub-optimal protein feeding (Wehling et al. 2009) or *Nosema ceranae* infestation (Alaux et al. 2010; Vidau et al. 2011) making the bees more sensitive. Stark et al. (1995) found no effect of bee genera as the 24-h-contact LD₅₀s for imidacloprid were similar in both social bees (*A. mellifera*) and solitary bees (*Megachile rotundata* and *Nomia melanderi*) (Table 2). Similar conclusions were also drawn for thiamethoxam with an LD₅₀ of 30 ng bee⁻¹ for *A. mellifera* and 33 ng bee⁻¹ for *B. terrestris* (Iwasa et al. 2004; Mommaerts et al. 2010). Scott-Dupree et al. (2009), however, found that bumble bees (*Bombus impatiens*) were more tolerant to clothianidin and imidacloprid than *Osmia lignaria* and *M. rotundata*.

Chronic lethal toxicity

Chronic oral/contact exposure during 10–11 days to 1 µg bee⁻¹ acetamiprid and 1 ng bee⁻¹ thiamethoxam caused no significant worker mortality (Aliouane et al. 2009). For imidacloprid, laboratory tests showed high worker loss when honey bees consumed contaminated pollen

(40 µg kg⁻¹) (Decourtye et al. 2001, 2003) and sugar water (0.1, 1.0 and 10 µg l⁻¹) (Suchail et al. 2001). These results were in disagreement with field studies. Schmuck et al. (2001) reported no increased worker mortality when honey bee hives were exposed during 39 days to sunflower nectar contaminated with imidacloprid in a range of 2.0–20 µg kg⁻¹. Also Faucon et al. (2005) and Cresswell (2011) concluded that oral exposure to food contaminated with imidacloprid at realistic field concentrations did not result in worker mortality. A possible explanation for this discrepancy between laboratory and field studies may be differences in experimental methodology. Indeed the toxic effect on an individual may depend on its initial physiological state and on the longevity of nest mates (Decourtye and Devillers 2010). In addition, the social interaction should be taken into consideration with exposure of honey bees over a longer period. For bumble bees the chronic toxicity of compounds (exposure time up to 11 weeks) can be determined using micro-colonies (Mommaerts and Smaghe 2011).

Sublethal effects on reproduction

Reproduction is an important process to assure the further existence of the colony. Indeed, a loss of reproduction (brood) might be more detrimental for the colony than the loss of older bees (foragers) (Decourtye and Devillers 2010). This is further supported by studies on the division of tasks in bee colonies. For example in bumble bees (*B. impatiens*) task division is a dynamic process (weak task specialization) and so workers perform multiple tasks during their lifespan (Jandt and Dornhaus 2009). Therefore it is not unlikely that foragers are replaced by other bees when enough nurses are present in the hive. A few studies have demonstrated the adverse effects on larval development following exposure to imidacloprid (Tasei et al. 2000, 2001; Decourtye et al. 2005; Abbott et al. 2008; Gregor and Ellis 2011). Decourtye et al. (2005) reported a delay in the time needed for honey bee larvae to hatch or develop as an adult when fed with food contaminated with imidacloprid at 5 µg kg⁻¹. Similar observations were also made by Abbott et al. (2008) for *O. lignaria* when imidacloprid was dosed at 30–300 µg kg⁻¹ food. Also for bumble bees (*B. terrestris*) a reduction of the brood (larvae) was seen in micro-colonies orally exposed to contaminated sugar water (10 µg kg⁻¹ imidacloprid) + pollen (6 µg kg⁻¹ imidacloprid) (Tasei et al. 2000) (Table 4).

Sublethal effects on behavior

Sublethal effects which interfere with the process of food collection and subsequent social colony life and pollination

Table 3 Lethal effect concentrations of neonicotinoids for workers of the honey bee (*A. mellifera*) by oral and contact exposure as determined in different laboratory studies

Neonicotinoid	Exposure	LD ₅₀ ($\mu\text{g bee}^{-1}$)	References
Parent compound			
Acetamiprid	Contact: individual bee (acute; no info on concentration range)	24 h: 7.07	Iwasa et al. (2004)
Acetamiprid	Contact + oral: individual bee (acute; no information on concentration range)	48 h: 14.5 (oral) + 8.09 (contact)	Decourtye and Devillers (2010)
Acetamiprid	Contact to dry residue + oral: 100 mg l ⁻¹ (acute; 2 days exposure for contact and 3 days for oral exposure)	Harmless	Laurino et al. (2011)
Clothianidin	Contact: individual bee (acute; no information on concentration range)	24 h: 0.022	Iwasa et al. (2004)
Clothianidin	Contact + oral: individual bee (acute; no information on concentration range)	48 h: 0.044 (contact) + 0.003 (oral)	Decourtye and Devillers (2010)
Dinotefuran	Contact to dry residue: 75–1.5 mg l ⁻¹ (2 days exposure)	No LD ₅₀ determined but 100% loss at 15 mg l ⁻¹ after 48 h	Laurino et al. (2011)
	Oral: 75 mg l ⁻¹ to 7.5 $\mu\text{g l}^{-1}$ (acute; 3 days)	48 h: 0.003 $\mu\text{g l}^{-1}$	
	Contact: individual bee (acute; no information on concentration range)	24 h: 0.075	Iwasa et al. (2004)
Dinotefuran	Oral: individual bee (acute; no information on concentration range)	48 h: 0.023	Decourtye and Devillers (2010)
Nitenpyram	Contact: individual bees (acute; no information on concentration range)	24 h: 0.138	Iwasa et al. (2004)
Thiacloprid	Contact: individual bees (acute; no information on concentration range)	24 h: 14.6	Iwasa et al. (2004)
Thiacloprid	Contact: individual bees (acute; no information on concentration range)	24 h: 24.2	Elbert et al. (2000)
Thiacloprid	Contact + oral: individual bees (acute; no information on concentration range)	48 h: 38.8 (contact) + 17.3 (oral)	Decourtye and Devillers (2010)
Thiacloprid	Contact dry residue + oral: 144 mg l ⁻¹ (acute; 2 days exposure for contact)	Harmless	Laurino et al. (2011)
Thiamethoxam	Contact: individual bees (acute; no information on concentration range)	24 h: 0.03	Iwasa et al. (2004)
Thiamethoxam	Contact + oral: individual bees (acute; no information on concentration range)	48 h: 0.024 (contact) + 0.005 (oral)	Decourtye and Devillers (2010)
Thiamethoxam	Contact dry residue: 100–1 mg l ⁻¹ (2 days exposure)	No LD ₅₀ determined but 100% loss at 100 mg l ⁻¹ after 6 h	Laurino et al. (2011)
Thiamethoxam	Oral: 100 mg l ⁻¹ to 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ (3 days exposure)	48 h: 0.004 $\mu\text{g l}^{-1}$	Laurino et al. (2011)
Metabolite (parent compound)			
N-demethyl acetamiprid (acetamiprid)	Contact: individual bees (acute; no information on concentration range)	24 h: >50	Iwasa et al. (2004)
6-Chloro-pyridinylmethyl alcohol (acetamiprid)	Contact: individual bees (acute; no information on concentration range)	24 h: >50	Iwasa et al. (2004)

Table 3 continued

Neonicotinoid	Exposure	LD ₅₀ (μg bee ⁻¹)	References
6-Chloro-nicotinic acid (acetamiprid)	Contact: individual bees (acute; no information on concentration range)	24 h: >50	Iwasa et al. (2004)
Oleofin (imidacloprid)	Oral: acute (no information on concentration range)	48 h: >0.036	Nauen et al. (2001)
Oleofin (imidacloprid)	Oral: 10–10,000 μg kg ⁻¹ (acute)	48 h: 0.028 (acute)	Suchail et al. (2001)
	Oral: 0.1–10 μg l ⁻¹ (chronic: 10 days)	no LD ₅₀ determined (chronic) but 30% mortality with 1 μg l ⁻¹ after 125 h	
5-OH-imidacloprid (imidacloprid)	Oral: acute (no information on concentration range)	48 h: 0.159	Nauen et al. (2001)
5-OH-imidacloprid (imidacloprid)	Oral: 1.25–20 mg l ⁻¹ (acute)	48 h: 0.153	Decourtye et al. (2003)
5-OH-imidacloprid (imidacloprid)	Oral: 10–10,000 μg kg ⁻¹ (acute)	48 h: 0.258 (acute)	Suchail et al. (2001)
	Oral: 0.1–10 μg l ⁻¹ (chronic: 10 days)	no LD ₅₀ determined (chronic) but 40% mortality with 1 μg l ⁻¹ after 125 h	
Di-OH-imidacloprid (imidacloprid)	Oral: acute (no information on concentration range)	48 h: >0.049	Nauen et al. (2001)
Urea-metabolite (imidacloprid)	Oral: acute (no information on concentration range)	48 h: >100	Nauen et al. (2001)
6-Chloronicotinic acid (imidacloprid)	Oral: acute (no information on concentration range)	48 h: >122	Nauen et al. (2001)

need to be considered (Thompson and Maus 2007; Desneux et al. 2007; Mommaerts and Smagghe 2011). Over the past years several laboratory and (semi-) field tests have been developed to investigate the effect of neonicotinoid insecticides on motor and sensory functions linked to the foraging capacity of bees.

Neonicotinoid insecticides act as neurotoxic agents and affect the mobility of bees by inducing symptoms such as knockdown, trembling, uncoordinated movements, hyperactivity and tremors (Lambin et al. 2001; Nauen et al. 2001; Suchail et al. 2001; Medrzycki et al. 2003; Colin et al. 2004). These symptoms are easy to observe at high exposure levels, while the effect of a lower dose might be more difficult to see. El Hassani et al. (2005) therefore developed a new laboratory test consisting of a plastic box with a transparent plate that was illuminated, enabling to record the vertical displacement of the bees. Contact exposure to imidacloprid at 1.25 ng bee⁻¹ and to acetamiprid at ≤0.5 μg bee⁻¹ increased locomotor activity, whereas imidacloprid at 2.5 ng bee⁻¹ significantly decreased bee mobility (Lambin et al. 2001). No negative effects on the locomotor activity were found after acute and chronic (11 days) exposure (oral) to acetamiprid at 0.1 μg bee⁻¹ and after acute exposure (contact and oral) to thiamethoxam at 1 ng bee⁻¹ (El Hassani et al. 2008; Aliouane et al. 2009).

Another sublethal endpoint affected by neonicotinoids (acetamiprid and thiamethoxam) is the proboscis extension reflex (PER) following perception of sucrose and water (El Hassani et al. 2008; Aliouane et al. 2009). The effect was demonstrated to be dependent on the route, duration and dose of exposure (El Hassani et al. 2008; Aliouane et al. 2009). In addition, by conditioning of the PER using an odor, various studies demonstrated changes in the olfaction learning of bees upon exposure to neonicotinoids. Learning was reduced after chronic (up to 11 days) exposure to imidacloprid (winter bees: 48 μg kg⁻¹; oral), the metabolite 5-hydroxy-imidacloprid (winter bees: 120 μg kg⁻¹; oral) and thiamethoxam (0.1 ng bee⁻¹; contact) (Decourtye et al. 2003; El Hassani et al. 2008; Aliouane et al. 2009). By expanding the PER test also more information was gained on how neonicotinoids interfere with the memory process. Oral uptake of 0.1 μg bee⁻¹ acetamiprid induced long-term memory impairments, whereas chronic contact to 1 ng bee⁻¹ thiamethoxam (corresponding with 1/5 of the LD₅₀) did not cause long-term effects as recovery of memory was seen after 48 h (El Hassani et al. 2008; Aliouane et al. 2009). For imidacloprid, different authors reported on medium-term memory effects (Table 2) (Decourtye et al. 2001, 2003, 2004a; Lambin et al. 2001). Decourtye et al. (2004b) documented that such effects may result from an increase of the cytochrome oxidase activity, related with aberrations of the mushroom bodies in the brain. The effects of imidacloprid

Table 4 Overview of the concentrations of imidacloprid causing lethal and sublethal effects on (micro-)colony level in honey bees (*A. mellifera*) and bumble bees (*B. terrestris*, *B. impatiens*) as determined in different studies by oral/contact exposure under laboratory and (semi-)field conditions

Species	Exposure	Toxicity	References
<i>A. mellifera</i>	Field + oral: 0.5–5 $\mu\text{g l}^{-1}$ in syrup (chronic)	NOEC for survival: 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ NOEC for brood, adult foraging activity, adult bee population level, number of frames with brood after overwintering and general colony vitality: 5 $\mu\text{g l}^{-1}$	Faucon et al. (2005)
<i>A. mellifera</i>	Lab + oral: 100–1,000 $\mu\text{g l}^{-1}$ (acute)	500–1,000 $\mu\text{g l}^{-1}$: bees disappeared at the hive/feeding site up to 24 h 100 $\mu\text{g l}^{-1}$: no effect on homing rate	Bortolotti et al. (2003)
<i>A. mellifera</i>	Lab + oral: 0.12 and 12 ng bee $^{-1}$ in syrup (acute) Lab + oral: 24 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in syrup (24 h) Semi-field + oral: 24 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in syrup (24 h)	Increase of the cytochrome oxidase labeling, negative effect on the PER assay with 12 ng bee $^{-1}$ but not with 0.12 ng bee $^{-1}$ Negative effect on the PER assay Decreased foraging activity, hive entrance activity, sucrose consumption and brood size No relation between imidacloprid treated maize fields and bee mortality in apiaries	Decourtye et al. (2004a, b)
<i>A. mellifera</i>	Field + oral: foraging on maize fields treated with imidacloprid (chronic; no information about the dose)		Nguyen et al. (2009)
<i>A. mellifera</i>	Semi-field + oral: 40–6,000 $\mu\text{g l}^{-1}$ in syrup (acute)	LOEC for foraging behavior: 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ >1,200 $\mu\text{g l}^{-1}$ abnormalities in revisiting the feeding site	Yang et al. (2008)
<i>A. mellifera</i>	Lab + oral: >100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (chronic)	NOEC survival: 2–20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in sunflower nectar 20 $\mu\text{g l}^{-1}$: decrease in foraging activity; >100 $\mu\text{g l}^{-1}$: reduce in foraging behavior for 30–60 min >50 $\mu\text{g l}^{-1}$: increase in interval between successive visits at a feeder	Schmuck (1999); Schmuck et al. (2001)
<i>A. mellifera</i>	Semi-field + oral: 48 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in syrup (chronic)	Affected syrup consumption, foraging activity and brood size	Ramirez-Romero et al. (2005)
<i>B. terrestris</i>	Lab + oral: 10–25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in syrup + 6–16 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in pollen (chronic exposure: 85 days)	Increased worker mortality after 30 days No effect on food consumption and male emergence; but 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in syrup + 6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in pollen: reduction in brood size	Tasei et al. (2000)
<i>B. terrestris</i>	Field + oral: foraging on plants grown from imidacloprid-treated sunflower seeds treated with 0.7 mg seed $^{-1}$ (chronic exposure: 9 days)	No effect on foraging and colony vitality	Tasei et al. (2001)
<i>B. terrestris</i>	Lab + oral: 200 mg l $^{-1}$ to 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ in sugar water (chronic 11 weeks: test without foraging: test with foraging:	Test without foraging: LC $_{50}$: 59 $\mu\text{g l}^{-1}$; EC $_{50}$: 37 $\mu\text{g l}^{-1}$; NOEC for reproduction: 20 $\mu\text{g l}^{-1}$ Test with foraging: LC $_{50}$: 20 $\mu\text{g l}^{-1}$; EC $_{50}$: 3.7 $\mu\text{g l}^{-1}$; NOEC for reproduction: <2.5 $\mu\text{g l}^{-1}$	Monmaerts et al. (2010); Monmaerts and Smagghe (2011)
<i>B. terrestris</i>	Semi-field + oral: 20–2 $\mu\text{g l}^{-1}$ in sugar water (chronic 2 weeks)	NOEC for brood, colony growth and foraging activity: 2 $\mu\text{g l}^{-1}$	Monmaerts et al. (2010)
<i>Bombus occidentalis</i> , <i>B. impatiens</i>	Lab + oral: 7–30 ng g $^{-1}$ pollen (chronic: twice weekly)	NOEC for brood, numbers of males, queens and workers, worker weight, pollen consumption, forage ability on complex artificial flowers: 7 ng g $^{-1}$	Morandin and Winston (2003)

Table 4 continued

Species	Exposure	Toxicity	References
<i>B. impatiens</i>	Field + dry residue (acute exposure) Granules + spray: 0.45 kg ha ⁻¹ Spray + irrigation: 0.34 kg ha ⁻¹ Spray + non-irrigated: 0.34 kg ha ⁻¹	No effect on colony vitality and worker behaviour No effect on colony vitality, worker defensive response and on foraging preference Reduction in numbers of brood chambers, honey pots, workers, colony weight and on foraging preference	Gels et al. (2002)

NOEC no-observed effect concentration, LOEC lowest observed effect concentration, PER proboscis extension reflex

on habituation of PER depended on the age of the bees tested and thus on their task within the colony (Guez et al. 2001, 2003). Although it is obvious that neonicotinoids can interfere with the olfactory learning process in different ways, extrapolation of these laboratory effects to a real exposure situation in the field therefore is complex and difficult.

Neurotoxic compounds such as neonicotinoids were also reported to interfere with the orientation process of honey bees. Associative learning between a visual mark and a reward (sugar solution) in a complex maze showed that only 38% of the bees found the food source after oral ingestion of thiamethoxam at 3 ng bee⁻¹ compared to 61% in the control group (Decourtye and Devillers 2010). In another study using marked foragers that were first trained to forage on artificial feeders, Bortolotti et al. (2003) noticed that a 500 m distance between the hive and the feeding area resulted in no foragers at the hive/feeding area up to 24 h after treatment when foragers were fed with imidacloprid at 500 and 1,000 µg l⁻¹ (Table 4). The latter authors also found that a lower concentration (100 µg l⁻¹ imidacloprid) caused a delay in the returning time (to hive or feeding area) of the foragers. This was confirmed by Ramirez-Romero et al. (2005) and Yang et al. (2008). Based on these results it is obvious that neonicotinoids interfere with the foraging capacity of bees. However, the different (semi-)field studies provide a mixed pallet of results. For instance, Cutler and Scott-Dupree (2007) reported no side-effects on honey bees foraging when hives were exposed to flowering canola grown from clothianidin-treated seeds. The same conclusion was drawn for imidacloprid (Schmuck et al. 2001; Faucon et al. 2005; Nguyen et al. 2009), but for thiacloprid foraging was only reduced up to 48 h after treatment (Schmuck et al. 2003). Similarly, there was no negative effect on *B. terrestris* foraging on imidacloprid- and thiamethoxam-treated plants (Colombo and Buonocore 1997; Tasei et al. 2001; Alarcón et al. 2005), and also no side-effects on *B. impatiens* exposed to weedy turf treated with imidacloprid by irrigation, to field residue levels of imidacloprid and to the highest residue level of clothianidin recovered in pollen (6 µg kg⁻¹) (Gels et al. 2002; Morandin and Winston 2003; Franklin et al. 2004). It needs to be remarked that the *B. impatiens* colonies, foraging on non-irrigated imidacloprid-treated weed, showed a significant reduction in nest development (brood chambers, honey pots and worker biomass) and foraging activity (Gels et al. 2002). From these observations it is clear that there exists a discrepancy between field and laboratory tests for sublethal effects. Decourtye and Devillers (2010) documented that this was due to the ability of bees to change their behavior in response to pesticide perception. Indeed, honey bees responded by rejection when they perceived a sucrose solution contaminated with 20 µg l⁻¹ imidacloprid, which resulted in a significant reduction of the foraging activity (Mayer and Lunden 1997;

Kirchner 1999; Schmuck 1999; Maus et al. 2003). This protective avoidance behavior of bees towards contaminated food might reduce risk of pesticide exposure and effects. Such behavior on the other hand contributed to a decrease in general fitness of the bees with 6–20%, as deduced from statistically fitted performance data (Cresswell 2011).

It has recently been shown that bees became exposed to neonicotinoids in seed-coated fragments also via guttation fluid. After feeding on dew no honey bee mortality was observed, but feeding guttation fluid from directly treated plants did result in high mortality (Girolami et al. 2009). Also direct exposure to dust from the planting machine resulted in high bee mortality (Marzaro et al. 2011). In the latter experiments, clothianidin residues in dead bees averaged $279 \pm 142 \text{ ng bee}^{-1}$ at high humidity and $514 \pm 174 \text{ ng bee}^{-1}$ at low humidity, which by far exceed the LD_{50} of 21.8 ng bee^{-1} . Similar findings were also reported by Girolami et al. (2011), exposing honey bees to dust from clothianidin and imidacloprid-treated seeds. Their study showed that mortality of exposed honey bees only occurred at high air humidity.

Effects on overwintering of bees

During the last years a loss of overwintering bee colonies was noticed. Although identification of the causes of this disappearance is difficult, it was argued that reduced bee health might be initially caused by the chronic exposure to pesticides. So far only two studies have been conducted in this context for neonicotinoids. Using 8 honeybee colonies, Faucon et al. (2005) demonstrated that chronic exposure during the summer season (33 days) to 0.5 and $5.0 \mu\text{g l}^{-1}$ imidacloprid in saccharose syrup did not affect the overwintering abilities of honey bees. Similarly, spring assessment of colony development (brood, worker biomass and colony health) was not affected in overwintered colonies that had foraged on flowering canola grown from seed treated with clothianidin at 0.4 mg kg^{-1} , representing the highest recommended rate (Cutler and Scott-Dupree 2007). In conclusion, these studies demonstrated no long-term effects on honeybee colonies of environmentally relevant concentrations.

Mixture toxicity

This section will focus on cases in which synergistic effects were found when exposing organisms to mixtures containing neonicotinoids insecticides.

Only one study is available on the toxicity of neonicotinoids in mixtures to pollinators. Iwasa et al. (2004)

found that addition of piperonyl butoxide and the fungicides triflumizole and propiconazole increased the acute toxicity (24-h LD_{50} , topical application) of acetamiprid and thiacloprid to honey bees (*A. mellifera*) by factors of 6.0, 244 and 105, and 154, 1141 and 559, respectively, but had little effect on the toxicity of imidacloprid (1.5–1.9 times more toxic). The toxicity of acetamiprid was 6.3–84 times increased by the fungicides triadimefon, epoxiconazole and uniconazole-P. All synergists were topically applied at a dose of $10 \mu\text{g bee}^{-1}$ and 1 h before dosing the insecticides (Iwasa et al. 2004).

In grass shrimp larvae (*Palaemonetes pugio*) slightly synergistic effects were found when imidacloprid was applied together with atrazine (Key et al. 2007) with 96-h LC_{50} values ranging between 0.83 and 0.93 toxic units.

The toxicity of mixtures of imidacloprid and thiacloprid for earthworms (*Eisenia fetida*) was sometimes higher than expected from the toxicities of the individual chemicals. This was especially the case for earthworm weight change in a clay loam soil, where a dose-ratio dependent deviation was seen suggesting a shift from antagonism to synergism when thiacloprid accounted for more than 88% of the toxicity of the mixture (Gomez-Eyles et al. 2009). For effects on the reproduction of both nematodes (*Caenorhabditis elegans*) and daphnids (*Daphnia magna*), the mixture of imidacloprid and thiacloprid showed a dose-level dependent deviation from additivity, with synergism at low and antagonism at high exposure levels. For nematodes, the switch occurred at approximately 95% of the EC_{50} (Gomez-Eyles et al. 2009), while for daphnids this was the case at 1.5 times the EC_{50} (Pavlaki et al. 2011). Gene response profiles (transcriptomics, proteomics) in marine mollusks (*Mytilus galloprovincialis*) showed different patterns for the mixture compared to the single compounds, suggesting that the mode of action at the molecular level may be quite distinct (Dondero et al. 2010).

Synergism for effects on the population growth rate of *Ceriodaphnia dubia* was found by Chen et al. (2010) when determining the toxicity of a mixture of the nonylphenol polyethoxylate R11 and imidacloprid. Results of this study are, however, hard to interpret as only one concentration was tested. A mixture of imidacloprid with nickel showed synergistic effects on body length development of *D. magna* (Pavlaki et al. 2011).

It remains unclear how these data can be extrapolated to bee-relevant exposure situations, although it may be noted that studies of Mullin et al. (2010), Genersch et al. (2010) and Bernal et al. (2010) showed the presence of large numbers of different pesticides in bee-collected products like pollen, honey and beeswax. The data do, however, not allow for a quantitative risk analysis of possible mixture exposure.

Risk assessment scheme for hazards by neonicotinoids in bees

A risk assessment for systemic compounds starts by identification of the exposure risk (Alix et al. 2009; Thompson 2010; Fischer and Moriarty 2011). In case exposure is likely to occur because bees are attracted to the crop and the compound can be translocated to the nectar and pollen further assessment is crucial. As given above, neonicotinoids show good systemic properties and are recovered in nectar and pollen, therefore suggesting this scheme for risk assessment can be applied for neonicotinoids.

At present Tier-1 recommends acute toxicity testing on adults and brood. However, to estimate the impact of neonicotinoids in the field a first screening should include environmental relevant doses. For neonicotinoids, contaminated food was already demonstrated to be transported to the hive where it can either be stored or used as food for larvae and adults or where it can enter the wax of the combs. In this context, Wu et al. (2001) found no larval mortality but demonstrated delayed worker development when brood was reared in highly contaminated (including low residue concentrations of several neonicotinoids) brood combs. Consequently, side-effects on brood by neonicotinoids must be assessed and no-observable effect levels (NOEL) need to be determined. When working with honey bees, care is needed as one bee gathers food and transmits it to nest mates by trophallaxis. A first study did not notice a difference between honey bees fed with imidacloprid individually or in a group as the 48-h LD₅₀ of 25 ng bee⁻¹ was equal for both (Decourtye and Devillers 2010). Nonetheless, future studies should give more attention to this as dilution of the product is likely to occur when food is transmitted between nest mates.

In Tier-2 the NOEL as determined under Tier-1 is used to determine the chronic oral toxicity for individual adult bees. Acute toxicity gives a first indication of the real risk but it is still an incomplete measurement. Therefore potential side-effects after long-term exposure (contact and acute) to neonicotinoids need to be evaluated. Honey bees have been exposed for a maximum of 10–11 days and 39 days in the different respective laboratory and field tests reported so far. Indeed the need for a more standardized approach on bee age, colony size and appropriate exposure was also confirmed by the Cox proportional hazard model of Dechaume-Moncharmont et al. (2003) during a 60-day dietary exposure with imidacloprid at 4 and 8 µg l⁻¹. Tier-2 testing requires to consider both adult and larval stages because residues are recovered in their food, which includes pollen and nectar. Adult bees consume more nectar than pollen, while larval stages consume more pollen than nectar (Rortais et al. 2005). For the adults, a good knowledge on their foraging behavior on the crop is

crucial: for instance, is the bee attracted to nectar or pollen or to both? As documented above, neonicotinoids may be translocated to both compartments of nectar and pollen, however, residue analyses so far have mainly focused on pollen. As a consequence, more data on nectar contamination need be collected since it is difficult to extrapolate toxicity data obtained with pollen to nectar. Halm et al. (2006) also confirmed the need for a better standardization of the bee categories in risk assessment as the calculated exposure to imidacloprid was higher for the group of winter bees, nectar foragers and nurses than for the group of workers and drone larvae, wax-producing bees and pollen foragers. The latter authors propose to use the predicted environmental concentration/predicted no effect concentration (PEC/PNEC) ratio approach to determine the risk instead of using LD₅₀ or LC₅₀ values.

Higher tier risk assessments are conducted on the colony level to include the effect of social interaction. This phase of the assessment is needed to enable drawing firm conclusions on the compatibility of the compound under field conditions. The results obtained so far for neonicotinoids (mainly for imidacloprid) under laboratory conditions do not give a good estimation of the real effect on honey bees under field conditions. Indeed honey bees only needed to use a limited number of cues in a complex maze in laboratory studies, whereas visual learning in the field is more complex. Yang et al. (2008) reported on the use of foraging bees that have been trained prior to the risk assessment test, however, the marking is very labor intensive. Alternatively, Decourtye et al. (2011) connected a microchip to the honey bee body to assess sublethal effects on the number of foraging trips by low concentrations of fipronil. For bumble bees specifically, Mommaerts et al. (2010) developed a “foraging behavior” bioassay that allows to assess in the laboratory the sublethal effects on foraging by imidacloprid, as observed in free-flying bumble bee workers in the greenhouse.

As already mentioned at Tier-1, further improvement of the reliability will be obtained when tests can be performed with environmentally relevant concentrations. The field risk assessment studies should cover all potential routes of exposure. Exposure to neonicotinoids in dust from the planting machine has been reported to result in high bee mortality, especially at high air humidities (Girolami et al. 2011; Marzaro et al. 2011). Further, exposure might also occur via the ingestion of contaminated guttation fluid. Although this route of exposure has been considered important, the data so far are not clear. As Thompson (2010) reported, the liquid is mainly present early in the morning and it remains unclear whether that corresponds to the time when bees or other pollinators are active and to what extent they ingest this fluid. In addition, it is not clear whether residues after drying of the liquid on the leaves

remain a source of exposure (Thompson 2010). Tapparo et al. (2011) also reported that imidacloprid concentrations in guttation fluid did show a clear correlation with the dose applied to the seeds. Therefore, as long as no firm conclusion can be drawn, it is advisable to include this route of exposure into a risk assessment scheme for neonicotinoids.

In conclusion, assessment of risks for side-effects by use of field trials remains the final step as the field is a complex environment in which different factors may influence neonicotinoid toxicity. Concerning the effect of social interaction it needs to be remarked that for other non-*Apis* genera such as bumble bees potential side-effects on colony level can be evaluated earlier in the risk assessment, namely under Tier-2. Indeed, a standardized test with micro-colonies allows evaluating lethal and sublethal effects of neonicotinoids on bee reproduction and behavior. Micro-colonies are nests made of 3–5 new-born workers (the same age). Then, after 1 week one worker becomes dominant, like a queen in greenhouse colonies, and starts laying unfertilized eggs that develop into males while the other workers take care of the brood and forage for food. The dominant worker functions as a pseudo queen and the others as nurses and foragers. Food consists of commercial sugar water and pollen. Subsequently, the impact of neonicotinoids can be tested via different routes of exposure, namely contact exposure and orally via the drinking of treated sugar water and by eating treated pollen for 7 weeks. Other advantages of this method are the low cost, the ease of use, the possibility to work with standardized protocols and with multiple replicates resulting in sufficient statistical power to obtain reproducible data. The experimental set-up also allows social interaction to take place. Lethal effects are evaluated by scoring the number of dead workers per nest while evaluation of sublethal effects occurs by scoring the presence of honey pots, the number of dead larvae and the number of males produced per nest (Mommaerts et al. 2006a, b; Besard et al. 2011). Based on the latter endpoints, Mommaerts et al. (2010) could determine that the NOEC values for imidacloprid using such micro-colonies were equal to those obtained when using queenright colonies in the greenhouse test.

Conclusions and targets for research and recommendations

Neonicotinoids are an important group of insecticides effective in the control of economically important pests such as aphids, leafhoppers and whiteflies. The wide application of these insecticides with a worldwide annual market of \$1 billion is attributed to their selective mode of action at low doses (Aliouane et al. 2009). Neonicotinoids act as neurotoxins on the insect nervous system by

interaction with the insect nAChR. In order to identify potential hazards of neonicotinoids to bees this study summarized all available data.

Via the plant sap transport neonicotinoids are translocated to different plant parts. In general, the few reported residue levels of neonicotinoids in nectar (average of $2 \mu\text{g kg}^{-1}$) and pollen (average of $3 \mu\text{g kg}^{-1}$) were below the acute and chronic toxicity levels; however, there is a lack of reliable data as analyses are performed near the detection limit. Similarly, also the levels in bee-collected pollen, in bees and bee products were low. But before drawing a conclusion, it is strongly encouraged to conduct more studies as so far only a few large studies have been undertaken in apiaries in France, Germany and North America. Moreover, the wide and increasing application of neonicotinoids in pest control will likely cause an accumulation of neonicotinoids in the environment in the future.

Many lethal and sublethal effects of neonicotinoid insecticides on bees have been described in laboratory studies, however, no effects were observed in field studies with field-realistic dosages.

The risk assessment scheme for soil-applied systemic pesticides proposed by Alix et al. (2009) and Thompson (2010) seems adequate for assessing the risks of side-effects by neonicotinoids as it takes into account the effect on different stages (adult versus larvae) and on different levels of biological organization (organism versus colony). Nevertheless, there is still a need for testing field-realistic concentrations at relevant exposure and durations and, especially for honey bees, to continue side-effect evaluation over winter and the next year in spring. The scoring of sublethal effects related to foraging behavior and learning/memory abilities, however, is very difficult. As the genomes of honey bees (*A. mellifera*) and bumble bees (*B. terrestris*, *B. impatiens*) are available, these may help to better understand the complex (network) mechanisms under natural conditions in bees. Then, treatment with pesticides like neonicotinoids will indicate which effects and responses take place at the molecular level and can be related to the exposure. A good example is the availability of a microarray of the brain of honeybees (Alaux et al. 2009). After validation, such gene/transcriptome responses can be employed as molecular ecotoxicological markers, which in turn can improve risk assessment. These molecular markers can be complementary to the robust classical endpoints of mortality and reproduction, which are assessed using individual insects and (micro-)colonies in accordance with the tier-level. These new molecular insights can also contribute to better understanding the mechanisms of action of neonicotinoids like their interaction with different nAChR in bees, also in relation to their pharmacokinetics and metabolism. The newer and safer

neonicotinoids, e.g. using the cyano-group instead of the nitro-group, are good examples for further development of environmentally safer compounds employing the existence of different nAChRs in the insect nervous system. The toxicity of neonicotinoids may, however, increase by synergistic effects with other compounds as was demonstrated by Iwasa et al. (2004) for mixtures containing a cyano-group neonicotinoid. Therefore, screening for safer compounds should also include gathering more information on potential synergistic effects of mixtures containing neonicotinoids as this is currently lacking.

Finally, during the preparation of this review it was observed that results/data on concentrations, side-effects and risk assessment studies are available, but that many data are scattered and/or not publicly available. A better communication between industry, academia and government may help for a “better” risk assessment. The latter can also help to provide answers to the questions/concerns as present in the public media/society.

Acknowledgments This work was supported by the Ministry of Economic affairs, Agriculture and Innovation of the Netherlands (Project BO 12.01 001 003 PRI 1) and the Fund for Scientific Research (FWO) Flanders (Belgium).

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

References

- Abbott VA, Nadeau JL, Higo HA, Winston ML (2008) Lethal and sublethal effects of imidacloprid on *Osmia lignaria* and clothianidin on *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae). *J Econ Entomol* 101:784–796
- Alarcón AL, Cánovas M, Senn R, Correia R (2005) The safety of thiamethoxam to pollinating bumble bees (*Bombus terrestris* L.) when applied to tomato plants through drip irrigation. *Commun Agric Appl Biol Sci Ghent Univ* 70:569–579
- Alaux C, Sinha S, Hasadsri 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 link between gene regulation and behavioral evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:15400–15405
- Alaux C, Brunet J L, 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*). *Environ Microbiol* 12: 774–782
- Aliouane Y, Adessalam K, El Hassani AK, Gary V, Armengaud C, Lambin M, Gauthier M (2009) Subchronic exposure of honey bees 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, Klaus Wallner (2009) Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 10: Honeybees proposed scheme. *Julius Kühn Arch* 423:27–33
- Bacandritsos N, Granato A, Budge G, Papanastasiou I, Roinioti E, Caldon M, Falcato C, Gallina A, Mutinelli F (2010) Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies. *J Invertebr Pathol* 105:335–340
- 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. *J Econ Entomol* 103:1964–1971
- Besard L, Mommaerts V, Abdu Alla G, Smagghe G (2011) Laboratory assessment of lethal and sublethal side effects supports a more benign profile of spinetoram compared to spinosad in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Pest Manag Sci* 67:541–547
- Biesmeijer JC, Roberts SPM, Reemer M, Ohlemüller R, Edwards M, Peeters T, Schaffers AP, Potts SG, Kleukers R, Thomas CD, Settele J, Kunin WE (2006) Parallel declines in pollinators and insect pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* 313:351–354
- 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. *Anal Chem* 75: 2027–2033
- Bortolotti L, Montanari R, Marcelino J, Medrzycki P, Maini S, Porrini C (2003) Effect of sub lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. *Bull Insectol* 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 Manag Sci* 61:742–748
- Charvet R, Katouzian Safadi M, Colin ME, Marchand PA, Bonmatin JM (2004) Systemic insecticides: new risk for pollinator insects. *Ann Pharm Fr* 62:29–35
- 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. *J Econ Entomol* 99:253–262
- 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. *Environ Entomol* 38:514–523
- 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. *Environ Toxicol Chem* 30:103–111
- Chen XD, Culbert E, Hebert V, Stark JD (2010) Mixture effects of the nonylphenyl polyethoxylate, R 11 and the insecticide, imidacloprid on population growth rate and other parameters of the crustacean, *Ceriodaphnia dubia*. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:132–137
- Colin ME, Bonmatin JM, Moineau I, Gaimon C, Brun S, Vermandere JP (2004) A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. *Arch Environ Contam Toxicol* 47:387–395
- Colombo A, Buonocore E (1997) Effetto di trattamenti al terreno con imidacloprid sull'attività dei bombi. *L'Informatore Agrario* 53:85–87
- 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
- Dechaume Moncharmont FX, Decourtye A, Hennequet Hantier C, Pons O, Pham Delègue M H (2003) Statistical analysis of the honeybee survival after chronic exposure to insecticides. *Environ Toxicol Chem* 22:3088–3094
- Decourtye A, Devillers J (2010) Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. In: Thany SH (ed) *Insect nicotinic acetylcholine receptors*, 1st edn. Springer, New York, pp 85–95

- Decourtye A, Devillers J, Genecque E, Le Menach K, Budzinski H, Cluzeau S, Pham Delègue MH (2001) Impairment of olfactory learning performances in the honey bee after long term ingestion of imidacloprid. In: Belzunces LP, Pellissier C, Lewis GB (eds) Hazard of pesticides to bees. INRA, Paris, pp 113–117
- Decourtye A, Lacassie E, Pham Deleque 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, Devillers J, Cluzeau S, Charreton M, Pham Delègue MH (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, Armengaud C, Renou M, Devillers J, Cluzeau S, Gauthier M, Pham Delègue M H (2004b) Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pest Biochem Physiol* 78:83–92
- Decourtye A, Devillers J, Genecque E, Le Menach K, Budzinski H, Cluzeau S, Pham Delègue 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, Mader E, Desneux N (2010) Landscape enhancement of floral resources for honey bees in agro ecosystems. *Apidologie* 41:264–277
- 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
- Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol* 52:81–106
- Dondero F, Negri A, Boatti L, Marsano F, Mignone F, Viarengo A (2010) Transcriptomic and proteomic effects of a neonicotinoid mixture in the marine mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lam.). *Sci Total Environ* 408:3775–3786
- 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, Dacher M, Garry V, Lambin M, Gauthier M, Armengaud C (2008) Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Arch Environ Contam Toxicol* 54:653–661
- Elbert C, Erdelen C, Kuehnhold J, Nauen R, Schmidt HW, Hattori Y (2000) Thiacloprid: a novel neonicotinoid insecticide for foliar application. *Proc Brighton Crop Protection Conference, Brighton, UK*. *Pest Dis* 2:21–26
- Elbert A, Haas M, Springer B, Thielert W, Nauen R (2008) Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Manag Sci* 64:1099–1105
- Faucon J P, Aurières C, Drajnudel 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
- Fischer D, Moriarty T (2011) Pesticide risk assessment for pollinators: summary of a SETAC Pellston Workshop. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola
- Franklin MT, Winston ML, Morandin LA (2004) Effects of clothianidin on *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) colony health and foraging ability. *J Econ Entomol* 97:369–373
- Gallai N, Salles JM, Settele J, Vaissière BE (2009) Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol Econ* 68:810–821
- Garcia Chao M, Jesus Agruna M, Flores Calvete G, Sakkas V, Llompard 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. *Anal Chim Acta* 672:107–113
- Gels JA, Held DW, Potter DA (2002) Hazards of insecticides to the bumble bee *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) foraging on flowering white clover in turf. *J Econ Entomol* 95:722–728
- 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. *J Econ Entomol* 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/j.1439-0418.2011.01648x
- Gomez Eyles JL, Svendsen C, Lister L, Martin H, Hodson ME, Spurgeon D (2009) Measuring and modelling mixture toxicity of imidacloprid and thiacloprid on *Caenorhabditis elegans* and *Eisenia fetida*. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:71–79
- Goulson D, Lye GC, Darvill B (2008) Decline and conservation of bumble bees. *Annu Rev Entomol* 53:191–208
- Gregorc A, Ellis JD (2011) Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pest Biochem Physiol* 99:200–207
- 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
- Guez D, Belzunces LP, Maleszka R (2003) Effects of imidacloprid metabolites on habituation in honeybees suggest the existence of two subtypes of nicotinic receptors differentially expressed during adult development. *Pharmacol Biochem Behav* 75:217–222
- 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). *Environ Sci Technol* 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. *Environ Microbiol Rep* 2:243–250
- Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, Roe MR (2004) Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Prot* 23:371–378
- Jandt JM, Dornhaus A (2009) Spatial organization and division of labour in the bumblebee *Bombus impatiens*. *Anim Behav* 77:641–651
- Jones AK, Raymond Delpach 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
- Key P, Chung K, Siewicki T, Fulton M (2007) Toxicity of three pesticides individually and in mixture to larval grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Ecotoxicol Environ Saf* 68:272–277
- Kirchner WH (1999) Mad bee disease? Sublethal effects of imidacloprid (“Gaucho”) on the behaviour of honey bees. *Apidologie* 30:422
- Klein AM, Vaissière BE, Cane JH, Steffan Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc R Soc B* 274:303–313
- Kluser S, Neumann P, Chauzat M P, Pettis JS (2011) UNEP emerging issues: global honey bee colony disorder and other threats to insect pollinators. <http://www.unep.org>. Accessed 1 July 2011

- Kwak MM, Velterop O, van Andel J (1998) Pollen and gene flow in fragmented habitats. *Appl Veg Sci* 1:37–54
- Lambin M, Armengaud C, Raymond S, Gauthier M (2001) Imidacloprid induced facilitation 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. *J Agric Food Chem* 51:8005–8010
- Laurino D, Porporato M, Patetta A, Manino A (2011) Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees laboratory tests. *Bull Insectol* 64:107–113
- Marzaro M, Vivan L, Targa A, Mazzon L, Mori N, Greatti M, Toffolo EP, Di Bernardo A, Giorio C, Marton D, Tapparo A, Girolami V (2011) Lethal aerial powdering of honey bees with neonicotinoids from fragments of maize seed coat. *Bull Insectol* 64:119–126
- Matsuda K, Buckingham SD, Kleiner D, Rauh JJ, Grauso M, Sattelle DB (2001) Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 22:573–580
- Maus C, Curé G, Schmuck R (2003) Safety of imidacloprid seed dressings to honey bees: a comprehensive overview and compilation of the current state of knowledge. *Bull Insectol* 56:51–57
- Mayer DF, Lunden JD (1997) Effects of imidacloprid insecticide on three bee pollinators. *Hortic Sci* 29:93–97
- Medrzycki P, Montanari R, Bortolotti P, Sabatini AG, Maini S, Porrini C (2003) Effects of imidacloprid administered in sub lethal doses on honey bee behaviour. Laboratory tests. *Bull Insectol* 56:59–62
- Mommaerts V, Smagghe G (2011) Side effects of pesticides on the pollinator *Bombus*: an overview. In: Stoytcheva M (ed) *Pesticides of the modern world*. InTech, Rijeka, pp 507–552
- Mommaerts V, Sterk G, Smagghe G (2006a) Hazards and uptake of chitin synthesis inhibitors in bumblebees *Bombus terrestris*. *Pest Manag Sci* 62:752–758
- Mommaerts V, Sterk G, Smagghe G (2006b) Bumblebees can be used in combination with juvenile hormone analogues and ecdysone agonists. *Ecotoxicology* 15:513–521
- Mommaerts V, Reynders S, Boulet J, Besard L, Sterk G, Smagghe G (2010) Risk assessment for side effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing foraging behaviour. *Ecotoxicology* 19:207–215
- Morandin LA, Winston ML (2003) Effects of novel pesticides on bumble bee (Hymenoptera: Apidae) colony health and foraging ability. *Environ Entomol* 32:555–563
- Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, VanEngelsdorp D, Pettis JS (2010) High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS ONE* 5:e9754
- National Research Council of the National Academies (2007) *Status of pollinators in North America*. The National Academies Press, Washington, DC
- 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
- Nauen R, Ebbinghaus Kintscher U, Salgado V, Kaussmann M (2003) Thiamethoxam is neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pest Biochem Physiol* 76:55–69
- Neumann P, Carreck NL (2010) Honey bee colony loss. *J Apic Res* 49(special issue):1–6
- Nguyen BK, Saegerman C, Pirard C, Mignon J, Widart J, Tuirionet 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* 102:616–623
- Oerke E C, Dehne H W (2004) Safeguarding production losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Prot* 23:275–285
- Oldroyd PB (2007) What's killing American honey bees? *PLoS Biol* 5:e168
- Pavlaki MD, Pereira R, Loureiro S, Soares AMVM (2011) Effects of binary mixtures on life traits of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf* 74:99–110
- 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. *J Chromatogr A* 1152:116–123
- Ramirez Romero R, Chauvaud J, Pham Deleue 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
- 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 (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 chloronicotinyl 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* (Hymenoptera: Apidae), *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae), and *Osmia lignaria* (Hymenoptera: Megachilidae). *J Econ Entomol* 102:177–182
- 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. *Bull Environ Contam Toxicol* 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* 88:1081–1088
- Stokstad E (2007) The case of the empty hives. *Science* 316:970–972
- Suchail S, Guez D, Belzunces LP (2000) Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environ Toxicol Chem* 19:1901–1905
- Suchail S, Guez D, 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, De Sousa G, Rahmani R, Belzunces LP (2004a) In vivo distribution and metabolism of C 14 imidacloprid in different compartments of *Apis mellifera* L. *Pest Manag Sci* 60:1056–1062
- Suchail S, Debrauwer L, Belzunces LP (2004b) Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest Manag Sci* 60:291–296
- Tapparo A, Giorio C, Marzaro M, Marton D, Soldà L, Girolami V (2011) Rapid analysis of neonicotinoid insecticides in guttation drops of corn seedlings obtained from coated seeds. *J Environ Monit* 13:1564–1568
- Tasei JN, Lerin J, Ripault G (2000) Sublethal 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 Manag Sci* 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, Meixner MD (2010) A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J Invertebr Pathol* 103: S80–S95
- Velthuis HHW, Van Doorn A (2006) A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie* 37:421–451
- Vidau C, Diogon M, Aufauvre J, Fontbonne R, Viguès B, Brunet J L, 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
- Wehling M, Von der Ohe W, Brasse D, Forster R (2009) Colony losses interactions of plant protection products and other factors. *Julius Kühn Arch* 423:153–154
- Williams IH (1994) The dependence of crop production within the European Union on pollination by honey bees. *Agric Zool Rev* 6:229–257
- Wu JY, Aneli CM, Sheppard WS (2001) Sublethal effects of pesticide residues in brood clomb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PLoS ONE* 6:e14720
- Yang EC, Chuang YC, Chen YL, Chang H (2008) Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol* 101: 1743–1748

Van: 10.2.e
Aan: 10.2.e
Cc: 10.2.e 10.2.e
Onderwerp: Vragen over rapport - vervolg richting EU
Datum: dinsdag 27 maart 2012 18:17:24
Bijlagen: [TKN Bijlage Ibgb 19 06 Kamerbrief literatuuronderzoek neonicotinoïden en sterfte van bijen.pdf](#)
Prioriteit: Hoog

Beste 10.2.e

Alles goed? Bijenseizoen al opgestart?

Nav je rapport over literatuur tav van bijen en neonicotinoïden heeft onze staatssecretaris de TK geïnformeerd, zoals je weet.

In de brief aan de Kamer, zie PDF-bijlage, geeft de staatssecretaris aan dat hij een aantal stappen onderneemt (pagina 3/4).

Voor de stappen richting EU Commissie en EFSA heeft 10.2.e mij gevraagd voor een aantal zaken zorg te dragen. Ik heb daarvoor je hulp nodig:

- zou je me je Engelstalige publicatie kunnen sturen (als PDF)?
- in het rapport doe je een aantal beoordeling/toelating-aanbevelingen, die het EU en EFSA vlak aangaan. Zou je die aanbevelingen (kort) willen vertalen naar het Engels?

Wanneer zou je deze vraag kunnen oppakken en mij dit kunnen opleveren/sturen? Lukt dat vóór Pasen?

Wil je me even laten weten, dank alvast.

Groet, 10.2.e

10.2.e
 Senior Officer
 Ministry of Economic Affairs, Agriculture & Innovation
 Directorate General Agriculture
 Plant Health
 PO Box 20401
 NL 2500 EK The Hague
 The Netherlands
 tel. **31 (0)70 10.2.e or **31 (0)6 10.2.e
 e-mail: 10.2.e@mineleni.nl

Van: 10.2.e
Aan: 10.2.e
Cc: 10.2.e 10.2.e 10.2.e
Onderwerp: FW: PAV/260513 Literatuurstudie Neonocitinoïden en fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken
Datum: dinsdag 27 maart 2012 16:13:31
Bijlagen: [260513_pav_tk_bijen.DOC](#)
[260513_pav_tk_bijlage_rapport.pdf](#)
Prioriteit: Hoog

Aangezien Delphi nu niet goed werkt hierbij het bericht dat deze brief is verzonden naar de TK.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

DC

Van: 10.2.e
Verzonden: dinsdag 27 maart 2012 13:28
Aan: 10.2.e 10.2.e @minaz.nl; 10.2.e @tweedekamer.nl; DC Internet; 10.2.e
 10.2.e @tweedekamer.nl
Onderwerp: PAV/260513 Literatuurstudie Neonocitinoïden en fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken
Urgentie: Hoog

Bijgaand de brief PAV/260513 betreffende "Literatuurstudie Neonocitinoïden en fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken", de schriftelijke versie van de brief zal om 16:00 uur door een EL&I-bode bezorgd worden.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

.....

Directie Communicatie
Ministerie van Economische Zaken, Landbouw en Innovatie
 Prins Clauslaan 8 | 2595 AJ | Den Haag | Kamer VIS 3

.....

T 070- 10.2.e
F 070- 10.2.e
 10.2.e @mineleni.nl

Van: 10.2.e
Aan: 10.2.e
Cc: 10.2.e 10.2.e
Onderwerp: melding onrust over bijenonderzoek
Datum: donderdag 22 maart 2012 18:13:55

Dag 10.2.e

Cc 10.2.e

Hierbij meld ik je dat de Wageningse bijenonderzoeker 10.2.e ervan wordt beschuldigd dat hij in een review bewust sommige artikelen heeft genegeerd. Volgens wetenschapper 10.2.e winkelt 10.2.e selectief en worden onder meer de artikelen van 10.2.e doelbewust genegeerd. Hij noemt dat een 'flagrante' schending van de Notitie Wetenschappelijke Integriteit.

Deze review (=artikel in wetensch tijdschrift) heeft de basis gevormd voor het literatuuronderzoek naar de relatie bijensterfte en neonicotinoiden. Dit literatuuronderzoek wordt binnenkort aan TK gestuurd met standpunt stas (zit in de lijn op dit moment). 10.2.e zal voor de RvB van WUR de klacht onderzoeken, tot die tijd doet WUR geen mededelingen.

10.2.e voert al geruime tijd strijd tegen het gebruik van neonicotinen. Hij rapporteert daarover uitvoerig op zijn website, waaraan ook 10.2.e meewerkt (Universiteit Utrecht, dit is de man die niet in discussie met de onderzoekers wenste te gaan).

Het lijkt me goed dat je DGH hier mondeling van op de hoogte stelt.

Groet, 10.2.e

Van: 10.2.e
Aan: 10.2.e
Cc: 10.2.e 10.2.e
Onderwerp: [WARNING : MESSAGE ENCRYPTED]gecorrigeerde rapport
Datum: dinsdag 13 maart 2012 11:51:54
Bijlagen: [Rapport 439_Totaal_LR corrected maart 12.pdf](#)

Hallo 10.2.e ,

Hoe lopen de zaken met het rapport bij jullie? Ik hoop naar wens. Ik ben er wel redelijk zeker van dat her en der de messen geslepen worden (maar dat is wel goed, dat geeft nette wonden). Dat hoeft natuurlijk bij de TK niet hetzelfde te zijn, maar je weet nooit.

Ik stuur je hierbij een nieuwe versie van de pdf van het rapport, voor het geval je af en toe een pdf nodig hebt om te verspreiden. Niet dat er veel mis was met de vorige (en het gedrukte) rapport, maar er zaten toch een paar dubbele woorden in, één twee keer opgenomen literatuurverwijzing in de lijst, en wat slordigheden met (afwezige) hoofdletters aan begin van een opsomming. Ook bleken soms woorden bij het inlezen aan elkaar te zijn gaan plakken. Het zal nog niet foutloos wezen, maar wel beter nu.

Met vriendelijke groet, 10.2.e

Van: 10.2.e
Aan: 10.2.e
Cc: 10.2.e
Onderwerp: artikelje Bijenbladen en bijen@wur nieuwsbrief
Datum: dinsdag 21 februari 2012 17:28:42
Bijlagen: [Blacquiere et al neonicotinoiden en bijen houden.docx](#)

Hallo 10.2.e ,

Op basis van ons rapport en de review willen wij een artikeltje voor de imkers publiceren: in de bijenbladen (twee stuks, april nummer) en in onze nieuwsbrief 'Bijennieuws' op internet (maart).

Dit stukje moet nog gechecked worden door mijn medeauteurs en door de redactie van het bijenblad op leesbaarheid enz. Dus er zullen nog wel wat zinnnetjes verschuiven.

Zou jij of een van je collega's kunnen kijken of er niks in staat dat jullie in verlegenheid brengt of jullie en ons ongemak gaat opleveren? En ook het tijdschema, is dat akkoord?

Alvast dank, 10.2.e

NB de deadline voor het blad Bijenhouden (aprilnummer) is 1 maart.

Neonicotinoïden en bijen: overzicht van concentraties, neveneffecten en risico assessment

Tjeerd Blacquière¹, Guy Smagghe², Cornelis A.M. van Gestel³ & Veerle Mommaerts²

De bezorgdheid over de sterfte van bijen en bijenvolken en CCD behelst ook gewasbeschermingsmiddelen als een van de mogelijk bijdragende factoren. Vooral de systemische insecticiden, met name de neonicotinoïden en fipronil worden veel genoemd. We presenteren een overzicht van de literatuur over neonicotinoïden en bijen vanaf de introductie van imidacloprid in 1991. Dit overzicht is verschenen als review in *Ecotoxicology*⁴ (zonder fipronil) en als PRI rapport 439⁵ (incl. fipronil). Het werd gemaakt in opdracht van het Ministerie van Economische Zaken, Landbouw en Innovatie (EL&I). De te beantwoorden hoofdvraag voor het beleid was:

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

Vertaald: komen de door de toelatingsinstantie (Ctgb) gebruikte gegevens uit de vertrouwelijke toelatingsdossiers overeen met de gegevens uit de openbare wetenschappelijke literatuur, of zijn er gegevens die strijdig zijn of op (grote) risico's wijzen? Naast dit overzicht van de openbare literatuur heeft het Ctgb vorig jaar de toelatingen van vier neonicotinoïden en fipronil herbeoordeeld.

Aanpak

De boven gestelde vraag is meteen al lastig te beantwoorden, omdat wij geen inzicht hebben in de dossiers en gegevens waarop de toelatingsinstantie tot een oordeel komt (de studiedossiers zijn vertrouwelijk). Daarom hebben wij naar de openbare gegevens gekeken *alsof* dat de enige bestaande gegevens zijn. We hebben wel inzicht in *hoe* de toelatingstoetsing gebeurt, volgens welke systematiek. Daar wijden we een alinea aan. We weten ook wel een beetje welke getallen het Ctgb hanteert: bijvoorbeeld bij welke dosis 50% van de dieren sterft (LD₅₀), die staan op de site van het Ctgb vermeld. We weten niet op welke studies die gebaseerd zijn, maar kunnen wel zien of ze overeenkomen met wat wij in de openbare literatuur aantreffen.

Zoeken en selecteren: Via web of science en google scholar hebben we gezocht met trefwoorden als (honing-) bijen & neonicotinoïden, & fipronil, letale en sub-letale effecten enz. Idem voor hommels en wilde bijen. Na zo'n zoekactie heb je altijd te veel artikelen, en is het zaak de ballast er af te gooien, bijvoorbeeld artikelen die wel (terzijde) je trefwoorden nomen, maar er niet echt over gaan. Vervolgens hebben we de artikelen ingedeeld op onderwerp, en ter lezing verdeeld tussen de auteurs. Ook na het lezen zijn nog veel artikelen afgevallen. We hebben op artikelen geconcentreerd die echt nieuwe gegevens aanleverden, en op artikelen die aan bestaande gegevens iets toevoegden, bijvoorbeeld door ze opnieuw te analyseren. Verder hebben we ons volledig beperkt tot peer reviewed (PR) artikelen, omdat niet PR artikelen niet gezaghebbend zijn. Van de artikelen zijn samenvattingen gemaakt, vooral in de vorm van werktabellen. Op grond daarvan hebben we de volgende onderwerpen besproken aan de hand van de literatuur.

Gebruik en blootstellingsroutes

Neonicotinoïden werken systemisch. Dat betekent dat ze door de plant (kunnen) worden opgenomen en in de plant kunnen worden getransporteerd. De systemische eigenschappen van neonicotinoïden bepalen samen met de relatief hoge specificiteit de methoden van gebruik (ze kunnen 'gewoon' worden gespoten, maar ook aangegoten aan de bodem, of toegepast in zaad coating) en ze bepalen ook de routes waarlangs honingbijen blootgesteld zouden kunnen worden: direct (via contact met spuitvloeistof, stof bij het zaaien van gecoate zaden), en indirect via het consumeren van residuen in oppervlaktewater, in guttatievloeistof, in stuifmeel, nectar en honingdauw. Guttatie is het verschijnsel

¹ Plant Research International, Wageningen University & Research Postbus 69, 6700 AB Wageningen, Nederland

² Vakgroep Gewasbescherming, faculteit Bio-ingenieurswetenschappen Universiteit Gent, Coupure Links 653, 9000 Gent, België

³ Afdeling Dierecologie, Faculteit der Aard- en Levenswetenschappen, Vrije Universiteit, De Boelelaan 1085, 1081 HV Amsterdam, Nederland

⁴ Tjeerd Blacquière, Guy Smagghe, Cornelis A. M. van Gestel & Veerle Mommaerts, 2012: Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* DOI 10.1007/s10646-012-0863-x

⁵ Tjeerd Blacquière, Guy Smagghe, Kees van Gestel & Veerle Mommaerts 2012. Neonicotinoïden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken. Overzicht van open beschikbare peer reviewed laboratorium-, veld en monitoring studies. Rapport 439, Plant Research International. 74 pagina's.

dat er druppels water aan bladranden en toppen van bladeren ontstaan, vooral 's morgens vroeg bij stil en koel weer. De uitscheiding gebeurt door hydathoden (waterklieren). Guttatievloeistof is afkomstig uit de houtvaten van de planten.

Residuen

Residuen van neonicotinoiden en hun metabolieten (stof die ontstaat uit de oorspronkelijke stof) werden aangetroffen in de bovenstaande 'matrices' (nectar, stuifmeel, guttatievloeistof, oppervlaktewater), meestal in de lage (0-5) µg/kg range, maar voor guttatievloeistof in de mg/kg range (dat is 1000 keer zo veel). Residuen werden ook aangetroffen in bijen, in bijenwas, honing en bijenbrood (stuifmeel) in het bijenvolk. De gegevens in de open, peer-reviewed literatuur zijn beperkt, speciaal over nectar, en beperkt tot slechts een paar plantensoorten. Over gehalten in oppervlaktewater, een issue in Nederland, hebben we geen openbare PR gegevens kunnen vinden.

Giftigheid

De giftigheid voor bijen is vastgesteld in veel laboratorium- en (semi-) veldtesten: acute (effect binnen 24 of 48 uur) en chronische (effect na langdurige blootstelling, bijv. 10 dagen of meer) letale (dodelijke) concentraties, maar ook sub-letale (niet-dodelijke) concentraties: effecten op gedrag, reproductie, ziekteverstand en overwintering. Er is een groot verschil in giftigheid voor bijen tussen de verschillende neonicotinoiden. Imidacloprid en Clothianidin zijn bijna 5000 keer zo giftig als Thiacloprid.

Giftigheid + blootstelling: risico

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:

Risico = giftigheid X 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. Berekening van een 'worst case' blootstelling gebaseerd op de concentraties van residuen gevonden in stuifmeel en nectar, gecombineerd met de berekende waarschijnlijke consumptie door bijen, wijst op een mogelijk risico in sommige gevallen (clothianidin in koolzaad nectar en imidacloprid in zonnebloemnectar). Beide genoemde toepassingen zijn in Nederland niet toegelaten. Residuen in nectar geven het meeste risico (meer dan in stuifmeel bijvoorbeeld) omdat nectar veel wordt gebruikt door bijen. Vooral nectarhaalsters verbruiken bij het foerageren zelf heel veel nectar (energie om te vliegen) en zouden met residuen in de nectar een hoge dosis kunnen oplopen.

(Semi-) veldtesten en monitoring studies

Semi-veldtesten zijn onderzoeken op relatief kleine schaal waarbij bijen worden blootgesteld aan een stof, bijvoorbeeld via planten opgekweekt uit gecoatte zaden in tentjes in het veld. Dit gebeurt met veld-realistische concentraties (die normaal ook zouden worden gebruikt bij de commerciële toepassing). In zulke tenten- of kooi-proeven is het verstandig te werken met (heel) kleine bijenvolkjes of minivolkjes van hommels. Veldtesten zijn grotere onderzoeken waarbij (normale) bijenvolken worden blootgesteld aan normale velden (hectares) met behandelde gewassen. (Semi-) veldtesten lieten geen meetbare letale en sub-letale effecten op bijen en bijenvolken zien. Monitoringstudies zijn nog grootschaliger onderzoeken waarbij op provincie, land of zelfs nog groter schaal gekeken wordt naar de sterfte van bijenvolken en de eventuele correlatie met aangetroffen residuen, maar ook met aanwezige ziekten of parasieten. Ook in grote monitoringstudies werd geen overtuigend bewijs gevonden voor de rol van neonicotinoiden bij bijen (volk-)sterfte, ondanks de vaak aangetroffen residuen.

Risk assessment

Het huidige (OEPP/EPPO) en het voorgestelde schema voor toelatingsonderzoek (Alix et al. (2009, JK Archive Ch. 10) is adequaat en toepasbaar voor neonicotinoid insecticiden. Al in de eerste

stappen wordt een speciale weg ingeslagen wanneer een middel systemisch is. Desalniettemin moet het gebrek aan gegevens over residuen in stuifmeel en nectar node worden aangevuld met nieuw PR onderzoek (of door de gegevens uit de toelatingsdossiers peer reviewed te publiceren).

Veldexperimenten moeten worden uitgevoerd met veld realistische concentraties en op een betrouwbare schaal (aantal volken, power analyses) en tijdsduur (met inbegrip van de winter en de uitwintering). Het heeft geen zin conclusies te trekken over wintersterfte van bijenvolken op grond van een veldstudie van zes weken in de zomer.

Opvallend is dat er vaak discrepanties zijn / lijken te zijn tussen laboratorium- en veldstudies. Soms voert dat terug op het gebruik van onrealistische concentraties, soms op te kleine proeven waardoor verschillen niet konden worden aangetoond (ook al zouden ze er kunnen zijn). Een aanbeveling is daarom studies uit te voeren waarmee veldonderzoek en laboratoriumonderzoek wordt gecombineerd binnen één experiment, uitgevoerd met dezelfde groep (proef-) bijen.

Conclusie

Er is op grond van de peer reviewed literatuur geen aanwijzing dat de huidige toegepaste toelatingsbeoordeling belangrijke wetenschappelijke gegevens mist of gemist heeft. Ook de gebruikte basisgegevens zijn overeenkomstig.

Box: Peer review

Peer review is het kwaliteitsbeoordelingssysteem, waarbij wetenschappers anoniem en onafhankelijk elkaars ingezonden wetenschappelijke artikelen beoordelen. De meeste wetenschappelijke tijdschriftredacties sturen een ontvangen artikel naar twee reviewers.

Uiteraard zoeken ze onderzoekers die op een vergelijkbaar of hetzelfde onderwerp actief zijn. Een reviewer kan adviseren het artikel te accepteren, (grondig) aan te passen of eventueel helemaal te weigeren. Meestal wordt een checklist afgewerkt om betere vergelijkbaarheid te krijgen in de beoordelingen. Hoewel ook aan dit systeem nadelen kleven wordt het nog steeds geaccepteerd als de beste en meest onafhankelijke manier om wetenschappelijk werk te toetsen.

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 kastanjebomen).

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.

Geeoogste 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 overvloedige suiker weer uit. Mieren maar ook bijen komen op deze zoetheid af. Honingdauw wordt ook 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.



Van: 10.2.e
Aan: 10.2.e
Cc: 10.2.e
 @vu.nl; 10.2.e @ugent.be
Onderwerp: rapport neonicotinoiden
Datum: donderdag 26 januari 2012 22:20:25
Bijlagen: [Neonicotinoiden en Fipronil 25 jan 2012 accepted.docx](#)

Hallo 10.2.e en alle andere lezers, belangstellenden en mede-auteurs,

Hierbij eindelijk mijn doorzweten zoveelste versie van het rapport voor EL&I en straks de Tweede Kamer leden over Neonicotinoiden en fipronil en bijen.

Ik heb denk ik alle afspraken opgevolgd die we in november / december hadden doorgesproken: leeswijzer, helderder indeling, conclusies helder steeds onderaan. 11.1

Ik heb nog wel een paar inmiddels verschenen relevante artikelen ingevoegd en besproken (Krupke, Pettis, Wu en Köhler), maar hoop dat het eerste relevante artikel dat gaat verschijnen nu eindelijk Blac, Smagghe v Gestel, & Mommaerts is.

Willen jullie reageren via track changes, maar bovenal graag op hoofdlijnen? Nog instructies / wensen voor een colofon? Disclaimer?

Volgende week **donderdag** ga ik dit rapport doornemen met de afdeling vormgeving (die snappen vast ook hoe de nummering goed te krijgen is), dat betekent dat het uiterlijk donderdag of vrijdag 9-10 feb gedrukt kan zijn. Willen jullie overigens het gevormgeefde document volgende donderdag nog zien voor het drukken?

Maandag, dinsdag en woensdag wil ik graag bezig met een ieders commentaar. Alvast dank, hoe vroeger hoe beter.

Groeten, 10.2.e

Van: 10.2.e
Aan: 10.2.e ; 10.2.e @cml.leidenuniv.nl; 10.2.e ; 10.2.e @uu.nl
Cc: 10.2.e ; 10.2.e @vu.nl; 10.2.e ; 10.2.e @ugent.be
Onderwerp: kritisch lezen van Neonicotinoiden en bijen rapport
Datum: dinsdag 13 september 2011 16:00:39
Bijlagen: [Neonicotinoiden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken versie voor EL&I Sept 2011.docx](#)

Hallo 10.2.e , 10.2.e , 10.2.e ,

Ruim twee week geleden vroeg ik jullie om ons draft rapport kritisch te lezen en van commentaar te voorzien. Jullie heel terechte opmerking dat er in eerste instantie veel te weinig tijd werd gegeven om dat goed te doen kon gelukkig gehonoreerd worden met een leestijd tot 26 september. 10.2.e hebben inmiddels gereageerd dat ze zullen reageren in die termijn, bedankt. 10.2.e , zou jij ook nog even kunnen laten weten of je gaat reageren?

Als jullie al begonnen zijn vertel ik met het volgende misschien niets nieuws: tot mijn schrik ontdekte ik onlangs dat ik de hele paragraaf over residuen en blootstelling, horend bij de verzameltabel Tabel 1 vergeten was op te nemen. Ik stuur jullie daarom hierbij een versie waarin dit WEL is opgenomen (in blauw, zodat duidelijk is welk stukje ontbrak). Aan het verdere stuk heb ik niets veranderd.

Mochten er nog vragen rijzen, of onduidelijkheden zijn, laat het me weten (liefst per E-mail). Verder nog ter info: we hebben nog geen uitsluitsel van het tijdschrift op de gesubmitteerde review. Hopelijk krijgen we die nog wel voordat de eindversie van dit rapport moet worden opgeleverd.

Nogmaals heel erg bedankt voor jullie bijdrage aan de inhoud en leesbaarheid van dit rapport,

Met vriendelijke groet, 10.2.e

Van: 10.2.e
Aan: 10.2.e
Cc: 10.2.e @bio.uu.nl; 10.2.e @cml.leidenuniv.nl; 10.2.e ; 10.2.e
 10.2.e ; 10.2.e @rui.vu.nl; 10.2.e ; 10.2.e @ugent.be; 10.2.e 10.2.e
 10.2.e @tweedekamer.nl; 10.2.e @tweedekamer.nl; 10.2.e @tweedekamer.nl; 10.2.e @tweedekamer.nl; 10.2.e @tweedekamer.nl
Onderwerp: Re: verzoek kritisch te lezen - rapport effecten Neonicotinoiden op bijen
Datum: maandag 22 augustus 2011 11:14:35
Bijlagen: [Letter DiSTA Unibo ENG 080711.pdf](#)
[Neonicotinen helpdesk plan van aanpak versie aug 2011.docx](#)

Beste 10.2.e,

Heden ontvang ik je verzoek om een reactie op je concept literatuurstudie "Neonicotinoïden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken.". Ik zie geen kans om binnen de gestelde zeer korte termijn (voor morgen) te reageren op de inhoud.

Ik vind een en ander geen aanvaardbare werkwijze om te voldoen aan de wens van het Ministerie dat je rapport *"geschreven en gedragen werd door een brede en diverse groep schrijvers en kritische lezers van diverse universiteiten."*

Mij zonder enige vooraankondiging nu pas consulteren komt op mij over als last minute surprise strategie en is voor mij niet aanvaardbaar gelet op de voorgeschiedenis en de bekende verschillen van inzicht die binnen de werenschap leven over de impacts van neonicotinen op bijenvolken en de zeer verschillende wijzen waarop beide scholen dezelfde onderzoeksgegevens interpreteren. Het draagt in elk geval niet bij aan een evenwichtig resultaat.

Verder verbaast het me dat je in je mail schrijft dat je ondermeer een review-artikel van Prof. Stefano Maini uit 2009 negeert. Ik wijs er op dat het Italiaanse moratorium op zaadbehandeling met neonicotine insecticiden mede gebaseerd is op onderzoek dat Prof. Maini en zijn groep in opdracht van het Italiaanse Ministerie van Landbouw hebben uitgevoerd. Ik voeg ter informatie een recent viewpoint van Maini en collega bij (brief van 8 Juli 2011 aan het Europees Parlement).

Anders dan het plan van aanpak dat je meestuurde stelt (en dat ik nu voor het eerst ter inzage krijg) is je in opdracht van ELI uitgevoerde review niet voorafgaand aan het insturen naar een tijdschrift aan mij voorgelegd. Het is erg vreemd dat stap 5 van je werkplan "opsturen naar tijdschrift ~11 juli." succesvol lijkt te zijn uitgevoerd een maand voordat stap 3 is uitgevoerd (in het werkplan staat als stap 3: *"Tweede helft april tot 20 mei: schrijven Nederlandstalig rapport. 20 mei opsturen eerste versie naar EL&I en naar drie onafhankelijke lezers (10.2.e (UU), 10.2.e (UU) en 10.2.e (CML UL)."*)

Je hebt me nu bij mail van 18 Augustus pas voor het eerst geconsulteerd, en dat doe je met het verzoek binnen 3 werkdagen mijn inhoudelijke reactie te geven terwijl je studie kennelijk half juli wel al rijp was voor internationale collegiale toetsing door een wetenschappelijk tijdschrift. Deze volgorde wekt verbazing.

Ik ben niet bereid mij op enigerlei wijze te commiteren aan de bevindingen van je review die naar ik heb begrepen als rapport naar de Tweede Kamer zal gaan of in elk geval gebruikt zal worden voor de beantwoording van kamervragen. Ik distantieer mij er expliciet van en ga er niet mee akkoord dat mijn naam op enigerlei wijze genoemd wordt in je tekst.

In het kader van de transparantie cc ik dit bericht aan de Tweede Kamerleden die deelnamen aan de debatten dit voorjaar over bijensterfte. Ik verwijder daarbij de bijlage met je conceptrapportage maar stuur je werkplan wel mee ter informatie en voeg zoals gezegd ter informatie de brief van Prof Maini en collega aan het Europees Parlement bij.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

cc: Tweede Kamerleden Gerdi Verbeet, Ger Koopmans, Lutz Jacobi, Henk van Gerven, Esther

Ouwehand, Janneke Snijder-Hazelhoff;

cc: 10.2.e

On 18/08/2011 21:06, 10.2.e wrote:

Hallo lezers van deze mail:

Afgelopen voorjaar werd aan ons de opdracht gegeven door het ministerie van EL&I om een rapport te schrijven over de effecten van Neonicotinoiden op bijen, aan de hand van de wetenschappelijke literatuur, in verband met de maatschappelijke onrust over het onderwerp en de herbeoordeling van een aantal toelatingen door het CTGB. Het Plan van Aanpak stuur ik hierbij mee. Zoals te lezen in het PvA hebben we ons beperkt tot de peer gereviewde literatuur. Daarbij hebben we zelfs veel geciteerde reviews achterwege gelaten wanneer gereviewde en obscure gegevens niet goed te scheiden/achterhalen waren. Dat geldt bijv. de artikelen van Maini et al (2009) en Johnson et al. (2010).

Het ministerie wilde graag dat het geschreven en gedragen werd door een brede en diverse groep schrijvers en kritische lezers van diverse universiteiten. Vandaar de vier auteurs van drie (- vier) universiteiten en een leesgroep van nog eens twee universiteiten.

Behalve het Nederlandstalige rapport hebben we ook een Engelstalige review geschreven en aangeboden aan een wetenschappelijk tijdschrift (half juli).

Ik realiseer me dat het heel kort dag is met het verzoek aan jullie: zouden jullie mij al as. dinsdag reactie kunnen geven, iig omtrent de hoofdlijnen en aperte fouten of omissies. De medewerkers van het ministerie willen namelijk graag met het rapport aan het werk vanaf volgende week, in verband met een AO in de Tweede Kamer op 7 september.

10.2.e, al vast heel veel dank.

10.2.e, 10.2.e: willen jullie ook alvast kritisch kijken: ook wat betreft de vorm. Kan dit soort samenvatting, of willen jullie dat korter, ...

Collega's van bijen@wur: graag ook jullie blik er over, elk commentaar en verbetering is er een.

10.2.e jij hebt recente ervaring, graag ook jouw commentaar.

Alvast heel veel dank, met vriendelijke groet, 10.2.e

10.2.e
10.2.e @wur Plant Research International
Postbus 69 6700 AB Wageningen
t 0317 10.2.e

10.2.e
10.2.e @wur Plant Research International
PO Box 69 6700 AB Wageningen
The Netherlands
t +31 317 10.2.e

www.bijen.wur.nl

10.2.e @wur geeft acht keer per jaar bijennieuws uit. U kunt zich aanmelden via www.bijen.wur.nl

--

NEW POSTAL ADDRESS FROM 13 DECEMBER 2010:

10.2.e

Faculty of Science
Copernicus Institute
Department of Science Technology and Society

Budapestlaan 6
3584 CD Utrecht

The Netherlands
tel +31 30 10.2.e
fax +31
Email: 10.2.e@uu.nl

Invited Professor at REEDS (formerly known as C3ED)
Recherche en Economie-Ecologie, Eco-innovation et ingénierie du Développement
Durable
Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, France

<http://www.researcherid.com/rid/B-6302-2008>
<http://www.jvds.nl>
<http://www.scopus.com/authid/detail.url?authorId=7003576366>
<http://www.nusap.net>
<http://nws.chem.uu.nl>



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

Bologna, 8 July 2011

Dear Sir/Madam,

We are aware that the Committee of the Environment, Public Health and Food Safety, is preparing a “DRAFT OPINION of the Committee on the Environment, Public Health and Food Safety for the Committee on Agriculture and Rural Development on honeybee health and the challenges for the beekeeping sector (2011/0000(INI))”.

We welcome that the European Parliament has decided to take a stand on this issue, and would like to share with you our testimony of what is the reason for the Colony Collapse Disorder (CCD) in bees, after having studies this phenomena in Italy.

We fully agree with the thesis that the CCD is caused by a number of causes: existence of parasites, few available tools to fight the “varroa disease” but it is also linked to the agricultural model with limited availability of protein crops caused by monocultural agricultural system, as well as the use and abuse of pesticides (Maini *et al.*, 2010).

In September 2008, the Italian Ministry of Health and the Ministry of Agriculture decided to apply the precautionary principle, and suspended on an annual basis the insecticides on maize treated seeds (clothianidin, thiamethoxam, imidacloprid and fipronil).

Monitoring network (Porrini *et al.*, 2008) of the project “Apenet: research and monitoring in apiculture” has shown that the notifications of bee deaths in maize growing areas during the seeding period (March – April), declined and reached zero (Mutinelli *et al.*, 2009). In fact after the 185 cases notified in the spring of 2008 (Porrini *et al.*, 2009), in the following years no damages on bees were notified in connection with maize seeding. (Apenet, 2009; Apenet, 2010). Furthermore, in the same period Italian winter beehives losses, also surveyed. According to the questionnaire COLOSS, losses declined from 37,5% in 2007-2008 to around 15% in 2010-2011.

Together with other tests carried out within Apenet, it could be also established that the direct contact of bees with the dust emitted by the maize seeding machine is lethal for bees (Marzaro *et al.*, 2011), while even the low dose bee contamination by ingestion of pesticides active substances present in treated maize seeds turned out to be more damaging for bee brains than indirect contact (Apenet, 2009; Apenet, 2010).

The two-year Apenet project also established that treated seeds do not increase maize yields (Apenet, 2009; Apenet, 2010; Furlan *et al.*, 2006; Furlan *et al.*, 2007). More than 180 fields were monitored in most important Italian maize producing regions. No major ground-based pest attacks were observed even without using treated seed (also due to the precautionary suspension). The presence of visible attacks (below 10% of plants, with no impact on overall production) affected

ALMA MATER STUDIORUM • UNIVERSITA' DI BOLOGNA

Viale Giuseppe Fanin, 44 - 40127 Bologna – (Italia) - TEL +39 051 2096240 - FAX +39 051 2096241

Codice Fiscale 80007010376 - Partita IVA 01131710376

E-mail: dista@agrsci.unibo.it – web: <http://www.agrsci.unibo.it/dista/>



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

less than 3% of the sample. These results are statistically fully in line with a damage risk below 1%, as demonstrated by previous research.

We therefore continue to stress that the best we can do to reduce the CCD is adopting the principles of integrated production by implementing suitable rotation methods as means to reduce the spread of maize ground-based arthropod pests and using pesticides (including in treated seeds) only in case of real need.

Dr Claudio Porrini

Prof. Stefano Maini

References cited

- PORRINI C., SGOLASTRA F., SABATINI A.G., 2008 - Rete per il monitoraggio dei fenomeni di spopolamento e mortalità degli alveari in Italia (APENET). *Apoidea*, 5 (2): 83-87.
- PORRINI C., SABATINI A.G., MUTINELLI F., ASTUTI M., LAVAZZA A., PIRO R., TESORIERO D., MEDRZYCKI P., SGOLASTRA F., BORTOLOTTI L., 2009 - Le segnalazioni degli spopolamenti e delle mortalità degli alveari in Italia: resoconto 2008. *L'Apis*, 1: 15-19.
- MUTINELLI F., SABATINI A.G., ASTUTI M., PORRINI C., 2009 - Italian government issues precautionary ban on neonicotinoids. *American Bee Journal*, 149 (3): 269-270.
- MAINI S., MEDRZYCKI P., PORRINI C., 2010 - The puzzle of honey bee losses: a brief review. *Bulletin of Insectology* 63 (1): 153-160 (<http://www.bulletinofinsectology.org/pdfarticles/vol63-2010-153-160maini.pdf>).
- MARZARO M., VIVAN L., TARGA A., MAZZON L., MORI N., GREATTI M., PETRUCCO TOFFOLO E., DI BERNARDO A., GIORIO C., MARTON D., TAPPARO A., GIROLAMI V., 2011. Lethal aerial powdering of honey bees with neonicotinoids from fragments of maize seed coat. *Bulletin of Insectology* 64 (1): 119-126 (<http://www.bulletinofinsectology.org/pdfarticles/vol64-2011-119-126marzaro.pdf>).
- APENET, 2009.- "Effects of coated maize seed on honey bees" Report based on results obtained from the first year of activity of the APENET project (English report).- CRA-API [online] URL: <http://www.reterurale.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/4600>.
- APENET, 2010.- "Effects of coated maize seed on honey bees" Report based on results obtained from the second year of activity of the APENET project (English report).- CRA-API [online] URL: <http://www.reterurale.it/apenet>.
- FURLAN L., CANZI S., DI BERNARDO A. EDWARDS C. R., 2006 - The ineffectiveness of insecticide seed coatings and planting-time soil insecticides as *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte population suppressors. *J. Appl. Entomol.* 130(9-10), 485-490.
- FURLAN L., CANZI S., TOFFOLETTO R., DI BERNARDO A. - 2007 - Effetti sul mais della concia insetticida del seme.. *L'Informatore Agrario*, 5, 92 -96.

Van: 10.2.e
Aan: 10.2.e @bio.uu.nl; 10.2.e @uu.nl; 10.2.e @cml.leidenuniv.nl
Cc: 10.2.e
 10.2.e
 10.2.e @raw.vu.nl; 10.2.e 10.2.e @ugent.be; 10.2.e
Onderwerp: verzoek kritisch te lezen
Datum: donderdag 18 augustus 2011 21:06:52
Bijlagen: [Neonicotinen helpdesk plan van aanpak versie aug 2011.docx](#)
[Neonicotinoiden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken versie voor EL&I 18 aug 2011.docx](#)
Prioriteit: Hoog

Hallo lezers van deze mail:

Afgelopen voorjaar werd aan ons de opdracht gegeven door het ministerie van EL&I om een rapport te schrijven over de effecten van Neonicotinoiden op bijen, aan de hand van de wetenschappelijke literatuur, in verband met de maatschappelijke onrust over het onderwerp en de herbeoordeling van een aantal toelatingen door het CTGB. Het Plan van Aanpak stuur ik hierbij mee. Zoals te lezen in het PvA hebben we ons beperkt tot de peer gereviewde literatuur. Daarbij hebben we zelfs veel geciteerde reviews achterwege gelaten wanneer gereviewde en obscure gegevens niet goed te scheiden/achterhalen waren. Dat geldt bijv. de artikelen van Maini et al (2009) en Johnson et al. (2010). Het ministerie wilde graag dat het geschreven en gedragen werd door een brede en diverse groep schrijvers en kritische lezers van diverse universiteiten. Vandaar de vier auteurs van drie (- vier) universiteiten en een leesgroep van nog eens twee universiteiten.

Behalve het Nederlandstalige rapport hebben we ook een Engelstalige review geschreven en aangeboden aan een wetenschappelijk tijdschrift (half juli).

Ik realiseer me dat het heel kort dag is met het verzoek aan jullie: zouden jullie mij al as. dinsdag reactie kunnen geven, iig omtrent de hoofdlijnen en aperte fouten of omissies. De medewerkers van het ministerie willen namelijk graag met het rapport aan het werk vanaf volgende week, in verband met een AO in de Tweede Kamer op 7 september.

10.2.e , al vast heel veel dank.

10.2.e : willen jullie ook alvast kritisch kijken: ook wat betreft de vorm. Kan dit soort samenvatting, of willen jullie dat korter, ...

Collega's van 10.2.e @wur: graag ook jullie blik er over, elk commentaar en verbetering is er een.

10.2.e jij hebt recente ervaring, graag ook jouw commentaar.

Alvast heel veel dank, met vriendelijke groet, 10.2.e

10.2.e
 10.2.e @wur Plant Research International
 Postbus 69 6700 AB Wageningen
 t 0317 10.2.e

10.2.e
 10.2.e @wur Plant Research International
 PO Box 69 6700 AB Wageningen
 The Netherlands
 t +31 317 10.2.e

www.bijen.wur.nl

10.2.e @wur geeft acht keer per jaar bijennieuws uit. U kunt zich aanmelden via www.bijen.wur.nl

Ministerie van Economische Zaken

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Voorzitter van de Tweede Kamer
der Staten-Generaal
Binnenhof 4
2513 AA 's-GRAVENHAGE

Directoraat-generaal Agro
Directie Plantaardige Agroketens
en Voedselkwaliteit

Bezoekadres
Bezuidenhoutseweg 73
2594 AC Den Haag

Postadres
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Factuuradres
Postbus 16180
2500 BD Den Haag

Overheidsidentificatienr
00000001003214369000

T 070 379 8911 (algemeen)
www.rijksoverheid.nl/ez

Behandeld door

10.2.e

T 0317010.2.e

10.2.e @mineleni.nl

Datum 20 december 2012

Betreft Toezegging tijdens AO gewasbeschermingsmiddelen van 10 oktober
over activiteiten ter versterking van de bijensector

Geachte Voorzitter,

Op 10 oktober is tijdens het AO Gewasbeschermingsmiddelen door mijn voorganger toegezegd uw Kamer te informeren over alle (mede) door de overheid genomen maatregelen en opgeleverde producten van de afgelopen twee jaar ten behoeve van de versterking van de bijensector/imkerij. U treft dat overzicht hieronder aan.

BM12383469

Ons kenmerk
DGA-PAV / 12383278

Uw kenmerk

Bijlage(n)

1

1. Inzet van beleidsondersteunend onderzoek naar de bijensterfte

In het beleidsondersteunend onderzoek stonden in de jaren 2010-2012 de volgende vragen centraal:

- De mate van honingbijensterfte door het Nederlands Centrum Bijenonderzoek (NCB)
- Analyse van oorzaken honingbijensterfte, gericht op de relatie vitaliteit van het bijenvolk en de levensduur c.q. overwintering van bijenvolken door het Plant Research Instituut (PRI) en het NCB
- De impact van stuifmeelvoorziening en blootstelling aan imidacloprid op de honingbijensterfte (sinds 2011) door het PRI
- Hoe te anticiperen op honingbijensterfte door het PRI
- Een literatuuronderzoek gedaan naar Neonicotinoïden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken (2012) door het PRI

Ten aanzien van hommels en wilde bijen wordt in deze periode gewerkt aan:

- Welke bestuivers relevant zijn voor de Nederlandse landbouw door Alterra en het European Invertebrate Survey (EIS)
- De populatieontwikkeling van hommels en wilde bijen door Alterra en EIS
- Onderzoek naar mogelijke crossinfecties van honingbijen naar hommels en wilde bijen door Alterra en EIS
- Beheersmaatregelen en drachtverbetering voor honingbijen, hommels en wilde bijen door Alterra en EIS

Het onderzoek heeft tot nu toe geresulteerd in onderzoekspublicaties welke beschikbaar zijn via www.bij1.info/downloads, de titels vindt u in de bijlage. Het genoemde literatuuronderzoek is reeds naar uw Kamer gezonden op 27 maart 2012.

2. Inzet op het Europese honingprogramma

Vanuit het honingprogramma is er sinds de start van de huidige periode in oktober 2010 ingezet op onderzoek en kennisoverdracht over varroa:

- Demonstratie en implementatie van nieuwe bestrijdingsmethoden tegen *Varroa destructor*
- Interactie tussen *Varroa destructor* en omgevingsfactoren, zoals voedselbeschikbaarheid en bijenziekten
- Varroa resistentie via geleide 'natuurlijke' selectie
- Diagnose bijenziekten

Naast de onderzoeksrapportages zijn er tot nu toe diverse wetenschappelijke publicaties opgeleverd, de titels vindt u in de bijlage.

3. Inzet op kennisoverdracht en bewustwording doelgroepen

Vanuit zowel het beleidsondersteunend onderzoek als het honingprogramma is er aandacht voor kennisoverdracht en bewustwording via diverse routes aanvullend op de onderzoekspublicaties. Hier gaat het om:

- Brochure 'Effectieve bestrijding van varroa'. Plant Research International, B. Cornelissen, T. Blacqui re, J. van der Steen, 2010.
- Landelijke presentatie resultaten BIJ-1 onderzoek: 9 april 2011
- Landelijk symposium bijengezondheid: 17 maart 2012
- Nieuwsbrieven, te vinden op www.bijen.wur.nl
- Bijdragen in de imkerbladen 'Bijen', 'Onze Bijen' en 'Bijenhouden'

LTO en de Nederlandse Bijen Vereniging (NBV) hebben onlangs samen een voorstel gemaakt tot oprichting van een Kenniscentrum Bijen. Aan dit initiatief heb ik een subsidie toegekend, om de kennisverspreiding voor verbetering van de juiste aanpak van de imkerij te vergroten.

4. Inzet op Onderwijs

Het thema 'bijen houden' is inpasbaar binnen de onderwijskwalificaties voor dierenhouderij en tuin- en akkerbouw. Onder meer in het kader van het gezamenlijk plan van de Agrarische OpleidingsCentra (AOC) 'Voorop in de vergroening' is aandacht voor bijenhouderij in het kader van een sterkere oriëntatie op duurzaamheid.

5. Inzet op beter voedselaanbod voor de bijen

- Stimuleren terreinbeheerders voor meer bloeiend groen. Een kopie van deze brief is naar uw Kamer gezonden op 15 juni 2012
- De initiatiefnemers van het Jaar van de Bij hebben in oktober 2012 samen met de provincie Zuid-Holland een inspiratiemiddag georganiseerd over het nemen van maatregelen voor een diervriendelijk beheer van openbaar groen, bermen, recreatie-, natuur- en bedrijventerreinen. In Groningen is in november 2012 door Natuur en Milieufederatie Groningen, samen met de Gemeente Groningen en de Gasunie het symposium 'Groenbeheer met oog voor bijen' georganiseerd.
- Provinciale subsidies zijn mogelijk in het in het kader van het Plattelands Ontwikkelings Plan (POP) voor bloeiende akkerranden om het voedselaanbod voor honingbijen en wilde bestuivers te vergroten.

6. Herbeoordeling toegelaten middelen op basis van neonicotinoïden, nationaal en internationaal

In 2011 heeft het Ctgb een herbeoordeling van alle neonicotinoïden gedaan op verzoek van de Staatssecretaris van EZ (destijds EL&I). Op 14 juni 2011 is uw Kamer geïnformeerd over de resultaten daarvan. Totaal 55 toegelaten gewasbeschermingsmiddelen op basis van neonicotinoiden en fipronil zijn opnieuw beoordeeld en bij 14 middelen is het gebruiksvoorschrift aangepast om het risico op effecten op bijen verder te verkleinen. Het College heeft geen aanleiding gezien tot het intrekken van middelen en concludeert: 'Bij toegestaan gebruik treden geen onaanvaardbare risico's op voor bijen'.

Hierna zijn in 2012 enkele wetenschappelijke artikelen verschenen in internationale tijdschriften die effecten beschrijven van neonicotinoïden op bijen of hommels. Deze artikelen zijn voorgelegd aan het Ctgb ter beoordeling en vaak heeft ook de Europese Voedselautoriteit EFSA over de artikelen een uitspraak gedaan. Het gaat om de artikelen van Tennekes & Sanchez-Bayo; Pettis et al; Whitehorn et al en Henry et al. Ctgb heeft de relevantie van de artikelen voor de Nederlandse toelatingssituatie bekeken en geconcludeerd en de onderzochte doseringen niet relevant zijn voor Nederlandse toelatingen.

Ook de EFSA heeft geen aanleiding gezien om in de goedkeuring van deze groep werkzame stoffen communautair per direct in te grijpen. De Europese Commissie heeft EFSA om een volledige herbeoordeling van de werkzame stoffen gevraagd die naar verwachting tussen 10 en 15 januari 2013 wordt gepubliceerd. Daarin worden alle nieuwe wetenschappelijke bevindingen meegenomen door EFSA. De Europese Commissie zal dan direct alle lidstaten informeren; producenten krijgen de kans voor commentaar. Daarna zal de uitkomst eind januari 2013 worden bediscussieerd met de lidstaten met het oog op mogelijke communautaire maatregelen. Indien de uitkomst van deze herbeoordeling en de discussie met de EU-lidstaten daarover aanleiding geeft om aanvullende maatregelen in de Nederlandse toelatingspraktijk te treffen, zal het Ctgb daar terstond om worden verzocht.

7. Internationale inzet

NL heeft in 2011 en 2012 een actieve bijdrage geleverd aan de EU activiteiten en mondiale aanpak van bijensterfte en de relatie met gewasbeschermingsmiddelen.

Binnen de EU ontwikkelt EFSA een nieuw richtsnoer hoe het risico te beoordelen van gewasbeschermingsmiddelen op de gezondheid van bijen. Dit richtsnoer is in ontwikkeling door experts en NL werkt hier intensief aan mee. In de eerste helft van 2013 wordt het nieuwe richtsnoer verwacht. Tot dan toe wordt door EFSA en alle EU-lidstaten conform het huidige richtsnoer gewerkt.

Ook mondiaal werken Nederlandse experts mee aan het herzien van en ontwikkelen van nieuwe methodologie specifiek voor beoordeling van risico voor bijen en bestuivers in de relevante OESO werkgroep, waarbij de EU-kennis wordt ingebracht om deze mondiaal te laten doorklinken. Deze werkgroep stelt ook een

portaal op, waar (bijen-)incidenten met middelen kunnen worden gemeld en waar alle onderzoek op dit specifieke gebied bijeen wordt gebracht. De werkgroep levert in 2013 en 2014 resultaten op die publiek toegankelijk zijn.

Tot slot kan ik u melden dat ik in overleg ben met de Rijksgebouwendienst over de mogelijkheden zoals gevraagd in motie nr. 134 van de heer Graus.

Sharon A.M. Dijk
Staatssecretaris van Economische Zaken

Bijlage

Publicaties vanuit het Beleidsondersteunend- onderzoek:

- Bijensterfte 2009-2010 en toxische invertsuikersiroop. Nederlands Centrum Bijenonderzoek, R. van der Zee, L. Pisa, mei 2010.
- Monitor Uitwintering Bijenvolken 2010. Nederlands Centrum Bijenonderzoek, R. van der Zee, L. Pisa, februari 2011.
- Rapport Regio Verschillen. Plant Research International, J. van der Steen, B. Cornelissen, P. Hendrickx, C. Hok a Hin, april 2011.
- De ontwikkeling van bijenvolken in interacties met de omgeving, stuifmeeldiversiteit, prevalentie en impact van Nosema spp., DWV en ABPV op bijenvolken". Plant Research International, J. van der Steen, B. Cornelissen, P. Hendrickx, C. Hok a Hin, april 2011.
- Pathogen transmission in insect pollinators. Plant Research International/ University of Groningen, J. van der Steen, M. Blom, april 2011.
- Wilde bestuivers in appel- en perenboomgaarden in de Betuwe. Alterra/EIS, M. Reemer, D. Klein, april 2011.
- Tussenrapport "Aanpak achteruitgang wilde bestuivers". Alterra/EIS, J. Scheper, M. Reemer, D. Klein, april 2011.
- Monitor Uitwintering Bijenvolken 2011. Nederlands Centrum Bijenonderzoek, R. van der Zee, L. Pisa, april 2012.
- Nederlands Bijenonderzoek (NBO) 2010. Plant Research International, J. van der Steen, C. Hok-Ahin, B. Cornelissen, oktober 2012.

Wetenschappelijke publicaties vanuit het Europees honingprogramma:

- Van Dooremalen C, Gerritsen L, Cornelissen B, Van der Steen JJM, Van Langevelde F, Blacqui re T. (2012) Winter Survival of Individual Honey Bees and Honey Bee Colonies Depends on Level of Varroa destructor Infestation. PLoS ONE 7(4): e36285. doi:10.1371/journal.pone.0036285.
- Cornelissen B, J Donders, P van Stratum, T Blacqui re, and C van Dooremalen 2012. Queen survival and oxalic acid residues in sugar stores after summer application against Varroa destructor in honey bees (Apis mellifera). Journal of Apicultural Research 51(3): 271-276.
- Van der Steen JJM, B Cornelissen, J Donders, T Blacqui re and C van Dooremalen 2012. How honey bees of successive age classes are distributed over a one storey, ten frames hive. Journal of Apicultural Research 51(2): 174-178.
- Smith ML (2012) The Honey Bee Parasite Nosema ceranae: Transmissible via Food Exchange? PLoS ONE 7(8): e43319. doi:10.1371/journal.pone.0043319.

Toelichting voor de staatssecretaris

In het debat met de Tweede Kamer op 7 september 2011 heeft u toegezegd opdracht te geven voor een literatuurstudie naar de effecten van neonicotinoïden voor bijen en bijenvolken.

Met bijgaande brief stuurt u het rapport aan de Tweede Kamer en u geeft uw standpunt.

De hoofdconclusie van het rapport is: "Er is op grond van peer reviewed literatuur geen aanwijzing dat de huidige toegepaste toelatingsbeoordeling belangrijke wetenschappelijke gegevens gemist heeft".

Wageningen UR heeft laten weten dat de auteurs het conceptrapport hebben aangeboden aan kritische wetenschappelijk meelezers van de Universiteit van Leiden en de Universiteit van Utrecht (UvU). De medewerkers van de UvU gaven echter aan geen bemoeienis met het rapport te willen hebben. U hebt van de UvU ook een brief ontvangen (met kopie aan Wageningen UR) met daarin commentaar op het conceptrapport. Naar de Universiteit van Utrecht heeft u als reactie schriftelijk gemeld dat u van mening bent dat die discussie in het wetenschappelijk domein moet plaatsvinden. Daarom hebt u de wetenschappers van de UvU verwezen naar de onderzoekers van Wageningen UR. Overigens heeft Wageningen UR dat commentaar van de UvU wel meegenomen bij het schrijven van het rapport.



Kh/8/3

Postbus 16 | 6700 AA Wageningen

Ministerie van Economische Zaken, Landbouw en Innovatie
T.a.v. de directeur Plantaardige Agroketens en Voedselkwaliteit
Ir C. Lever
Postbus 20401
2500 EK DEN HAAG

**Biointeracties &
Plantgezondheid**

DATUM
21 februari 2012

ONS KENMERK
12/PRI0143/PMB

POSTADRES
Postbus 16
6700 AA Wageningen

BEZOEKADRES
Wageningen Campus
Gebouw 107
Droevendaalsesteeg 1
6708 PB Wageningen

INTERNET
www.pri.wur.nl

K.V.K. NUMMER
09098104

CONTACTPERSOON
10.2.e

TELEFOON
+31 (0)317 10.2.e

FAX
+31 (0)317 10.2.e

E-MAIL
10.2.e@wur.nl

Geachte heer Lever,

Met genoegen stuur ik u hierbij het eindrapport "Neonicotinoïden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken" van de auteurs Tjeerd Blacqui re, Guy Smagghe, Kees van Gestel & Veerle Mommaerts.

Dit rapport is op uw verzoek tot stand gekomen, omdat er de laatste jaren veel discussie is over de mogelijke rol van systemisch werkende insecticiden bij de toegenomen sterfte van honingbijvolken.

Uw opdracht - uitgezet in de helpdeskvraag-AKV-189 - behelsde twee vragen:

- Breng alle bekende peer-reviewed wetenschappelijke publicaties over dit onderwerp bijeen, zodat er een overzicht komt van wetenschappelijk bewezen feiten, op basis waarvan een conclusie getrokken kan worden over de mogelijke rol van deze systemische insecticiden;
- Evalueer of de open beschikbare peer-reviewed wetenschappelijke literatuur aanwijzingen geeft, dat met de huidige toelatingsbeoordeling ontoelaatbare risico's voor bijen (zijn) ontstaan.

Dit onderzoek is door een team van de Vrije Universiteit Amsterdam, de Universiteit Gent en Wageningen UR uitgevoerd onder regie van Dr. Tjeerd Blacqui re. Om een zo groot mogelijke zorgvuldigheid te betrachten besloot het auteursteam eerst een internationale wetenschappelijke review over dit onderwerp te schrijven [wordt gepubliceerd in Ecotoxicology], om zichzelf te dwingen strikt wetenschappelijke literatuur te scheiden van literatuur zonder harde wetenschappelijke basis.

De wetenschappelijke review is gebruikt als basis voor het onderhavige rapport "Neonicotinoïden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken". Zoals gebruikelijk is het concept-rapport aangeboden aan kritische wetenschappelijke meelezers. Gekozen is voor experts van de Universiteit Leiden en van de Universiteit Utrecht. Het commentaar van de Universiteit Leiden is verwerkt. Medewerkers van de Universiteit Utrecht gaven echter aan, ook na overleg, geen bemoeienis met het rapport te willen hebben. In een brief (d.d. 26.09.11, kenmerk 110926/JvdS) aan de staatssecretaris van EL&I (met een cc naar de auteurs) gaven zij echter wel het nodige commentaar op het concept-rapport, dat door de auteurs is meegenomen in de finale versie.

Ik ben verheugd dat voor het eerst sedert de toelating van deze systemische insecticiden in 1992, een totaaloverzicht van peer-reviewed wetenschappelijke literatuur bijeen is gebracht in dit rapport. Deze gegevens vormen een wetenschappelijke basis voor de getrokken conclusies over de relatie bijensterfte en systemische insecticiden. Uiteraard ben ik of één van de auteurs te allen tijde bereid u een verdere toelichting te verstrekken.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

10.2.e

Manager Business Unit Biointeracties & Plantgezondheid
Plant Research International, Wageningen UR

Wageningen UR (Wageningen University, Van Hall Larenstein University of Applied Sciences and various research institutes) is specialised in the domain of healthy food and living environment.



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



© 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, Bijen.

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 / bijen@wur.nl
Internet : www.pri.wur.nl / 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 Risicotoetsingsschema 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 ₅₀ (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 LD ₅₀	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 ₅₀ (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 ₅₀	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 ₅₀ (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 ₅₀	58
5.3.8	Monitoring van volken van imkers in de praktijk	58
5.4	Thiacloprid	59
5.4.1	LD ₅₀ (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 ₅₀	59
5.5	Acetamiprid	60
5.5.1	LD ₅₀ (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 ₅₀	61
5.5.7	Metabolisme en bio-accumulatie	61
5.6	Flonicamid	62
5.6.1	LD ₅₀ (Ctgb)	62
5.6.2	Acute giftigheid literatuur	62
5.7	Fipronil	63
5.7.1	Toepassingen (Ctgb):	63
5.7.2	LD ₅₀ (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 ₅₀	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* (Blacquière *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 LD₅₀, de dosis waarbij na contact of orale toediening 50% van de bijen sterft. De LD₅₀ 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 gecoate 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 (LD₅₀) 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 neonicotinoiden (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 LD₅₀ 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):	Giftigheid (van stof x). Meestal uitgedrukt in de dosis per bij waarbij de helft van de bijen sterft (= de LD ₅₀)
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 giftigheid, 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.

Geoogste 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 ook 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 'Waldhoning'.

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 parasitaire¹ exotische² mijt *Varroa destructor* en allerlei andere ziekten en parasieten, deels gekoppeld aan *Varroa*, verlies van habitat³ en foerageermogelijkheden⁴ (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.

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

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

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

⁴ 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 maïs, 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 een 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_{50} 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_{50} dan imidacloprid. Thiacloprid is bijna 5000 X minder giftig dan imidacloprid. Fipronil is ongeveer even giftig als imidacloprid. Ook sommige afgeleide metabolieten⁵ 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.

⁵ 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 neonicotinoiden 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 reviewed 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 neonicotinoiden 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 neonicotinoiden werden teruggevonden in het bijenvolk, in opgeslagen stuifmeel (bijenbrood⁶), 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 LD₅₀, is er een risico voor acute vergiftiging in het veld. Dat

⁶ 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 neonicotinoiden 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 neonicotinoiden 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 acariciden⁷ toegepast door de bijenhouders ter bestrijding van de varroamijt en de tracheemijt (Amerika). Neonicotinoiden 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 neonicotinoiden) 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 neonicotinoiden gecoat zaad. Hoewel de monitorstudies vaak aanwijzingen geven voor de rol van andere factoren dan neonicotinoiden (en andere stoffen) bij bijensterfte, hoeft dat niet per definitie te betekenen dat neonicotinoiden 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 neonicotinoiden 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 neonicotinoiden 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 neonicotinoiden aangetoond (ziekten van bijen, besmettingsgraad met parasieten, voeding).

1.8 Risicotoetsingsschema voor neonicotinoiden

Het nieuwe voorgestelde risk assessment schema (OEPP/EPPO, 2010) is geschikt voor de beoordeling van neonicotinoiden 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.

⁷ 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 toelatings van middelen op juiste data gebaseerd zijn. Het betreft vooral de residuenconcentraties 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 toelatingshouder.

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 vergrijsst 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 tabakspplant 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 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, ziekte weerstand 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 geogoste 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 geogoste 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_{50} of LC_{50}). In de tabellen zijn de in de literatuur gerapporteerde LD_{50} en LC_{50} waarden samengevat voor imidacloprid (tabel 2) en de andere neonicotinoïden + metaboliëten 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_{50} 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 (LD₅₀ 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). Flonicamid volgt ver achter de minst giftige met een LD₅₀ van 51,1 mg/bij (gegevens Ctgb).

Fipronil sluit aan bij de giftigste uit de groep (LD₅₀ contact blootstelling, met 13 ng/bij, Mayer *et al.*, 1999). Ook de enantiomeren⁸ van fipronil bleken giftig, LD₅₀ 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 LD₅₀ in sociale bijen (*A. mellifera*) en solitaire bijen (*Megachile rotundata*, *Nomia melanderi*, Tabel 2). Vergelijkbare conclusies werden getrokken voor thiamethoxam met een contact LD₅₀ 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 LD₅₀ 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 gecoate 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 (40 µg/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).

⁸ Enantiomer: 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 and 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 bijen 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 neonicotinoiden (acetamiprid and 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 neonicotinoiden. 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 neonicotinoiden 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 LD₅₀) 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 neonicotinoiden 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 neonicotinoiden kunnen ook interfereren met oriëntatie processen van honingbijen. Associatief leren van een zichtbare markering via een beloning (suiker oplossing) in een complex labirint 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 and 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 neonicotinoiden 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 bevoeiing, 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 artikel in press (Wu *et al.*, 2012) waar bleek dat in zulke raten opgegroeide larven later als volwassen bij 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 3×10^5 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 LD₅₀ 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 ^{14}C -imidacloprid per zaadje (Gaucho WS; 700 g/kg) een gemiddeld gehalte aan imidacloprid van 3.9 ± 1.0 $\mu\text{g/kg}$ stuifmeel en 1.9 ± 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 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 1 mg 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 $\mu\text{g/kg}$ imidacloprid en 5 $\mu\text{g/kg}$ van de hydroxy-metabooliet werd gemeten (Schmuck *et al.*, 2001). Slechts 5% van de ^{14}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 ^{14}C) samen met drie metabolieten (30-50% van het ^{14}C). Imidacloprid concentraties namen af van de eerste bladeren naar de topbladeren; niveaus in stuifmeel waren < 0.5 - 36 $\mu\text{g/kg}$ (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 $\mu\text{g/kg}$ (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 $\mu\text{g/kg}$ 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 $\mu\text{g/kg}$) (Schmuck *et al.*, 2001).

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

Girolami *et al.* (2009) vonden dat een deel van het imidacloprid dat door de maiskiemplant 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) and 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 guttatedruppels 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) and 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 $\mu\text{g/l}$ 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 and 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. $>0.2\text{--}5.7$ (gem. 0.9), $>0.3\text{--}1.8$ (gem. 0.7) en $>0.3\text{--}11.1$ (gem. 1.2) $\mu\text{g/kg}$, terwijl die aan 6-chloornicotinezuur resp. $>0.2\text{--}9.3$ (gem. 1.2), $>0.3\text{--}10.2$ (gem. 1.2) en $>0.3\text{--}1.7$ (gem. 1.0) $\mu\text{g/kg}$ 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 $\mu\text{g/kg}$ (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 $\mu\text{g/kg}$); in 8,4 van de honingmonsters werd imidacloprid gemeten, maar steeds onder de grens van kwantificering (0,5 $\mu\text{g/kg}$) (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 $\mu\text{g/kg}$ (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 $\mu\text{g/kg}$ thiacloprid residuen gevonden. In bijenbrood werd geen thiacloprid aangetroffen (detectiegrens 10 $\mu\text{g/kg}$) (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 ($>0,3\text{--}11,2$) en $>0,3\text{--}1,7$) $\mu\text{g/kg}$. 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 $\mu\text{g }^{14}\text{C}$ -imidacloprid/kg honingbij, bleek de halfwaardetijd van ^{14}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 ^{14}C) meteen na toediening. In de kop werden vier metabolieten gevonden, met imidacloprid altijd $\leq 5\%$ 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 $\mu\text{g/kg}$), 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 $< 0.1 \mu\text{g/kg}$.

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 $0.3 \mu\text{g/kg}$).

Gemiddelde gehalten aan fipronil en de desulfinyl en sulfonmetabolieten bedroegen resp. 1.2, > 1.0 en $1.7 \mu\text{g/kg}$ in pollen en resp. 0.5, 1.2 en $0.4 \mu\text{g/kg}$ 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 $0.011 \mu\text{g/kg}$) (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 $0.41\text{-}0.58 \mu\text{g/kg}$) (Garcia-Chao *et al.*, 2010). In opgeslagen pollen verzameld in diverse regio's in Spanje werd fipronil in 3 van de 61 monsters ($1\text{-}5 \mu\text{g/kg}$) gemeten (Higes *et al.*, 2010). Ook in 3.7% van de 845 voorjaarsmonsters werd fipronil aangetroffen ($1\text{-}4 \mu\text{g/kg}$), maar niet in 176 najaarsmonsters (detectiegrens $0.07 \mu\text{g/kg}$) (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 $0.5 \mu\text{g/kg}$, de LOD (detectiegrens) $0.2 \mu\text{g/kg}$. 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_{50} 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 ($9.9\text{-}3060 \mu\text{g/kg}$), 1 van de 350 pollenmonsters ($28.5 \mu\text{g/kg}$) en 3 van de 208 bijenwasmonsters ($1.1\text{-}35.9 \mu\text{g/kg}$) (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 statistischestof analyses	No. monsters	% monsters positief	concentratie (µg/kg vers opmerkingen gewicht)			referentie	
						Gemiddeld#	range in positieve monsters			
Stuifmeel	Frankrijk; 4 landbouw + geen gegevens 1 natuur regio		24 locaties, 120 volken; 4x per jaar; Okt 2002 - Sept 2005; χ2 analyse om frequenties van pesticide voorkomen te vergelijken tussen jaren en gebieden	imidacloprid	185	40.5	0.9	>0.2-5.7	Geen significante verschillen tussen gebieden; frequentie in 2009, 2011 2003 sign. hoger dan in 2005; veel andere pesticiden gevonden	Chauzat <i>et al.</i> , 2006, 2009, 2011
	Spanje, 11 verschillende regio's	Zonnebloem dominant in 11.5%, wilde vegetatie in 78.7% en gemengd in 9.8% van de monsters	stuifmeel uit raten; χ2 analyse om pesticide aanwezigheid te vergelijken tussen ongezonde (ontvolkte) en symptoomloze volken.	imidacloprid	61	0	<0.4		Geen significante verschillen in pesticiden residuen tussen gezonde en ongezonde groepen volken; 9 andere pesticiden gevonden	Higes <i>et al.</i> , 2010
	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	imidacloprid	1021	0	<0.4		veel pesticides gevonden in 42% en 31% van de lente- en herfstmonsters, respectievelijk	Bernal <i>et al.</i> , 2010
	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	imidacloprid thiamethoxam acetamiprid thiacloprid	350	2.9 0.29* 3.1 5.4	3.1 53.3 1.9 1.3	<2.0-912 53.3 <5.0-124 <1.0-115	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%) en 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	imidacloprid thiacloprid clothianidin acetamiprid	215	0.47* 33 0 0.93	3 - <0.1 -	veel pesticiden gevonden >1.0-199 <0.1 >1.0	veel pesticiden gevonden	Genersch <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; monsters pooled per veld en monsterdag; geen verdere data-analyse	clothianidin	geen gegevens	weinig	-	<0.5-2.59 (behandeld); <0.5 (controle)		Cutler & Scott-Dupree, 2007

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			
Honing	Frankrijk; 4 landbouw + 1 natuur regio	+geen gegevens	24 locaties, 120 volken; 4x per jaar; Okt 2002 - Sept 2005; χ2 analyse om de frequenties van pesticide aanwezigheid te vergelijken tussen jaren en gebieden	imidacloprid	239	21.8	0.7	>0.3-1.8	geen verschillen tussen jaren en gebieden	Chauzat <i>et al.</i> , 2006, 2009, 2011
	België verschillende gebieden	geen gegevens	monitoringgeen verdere details	imidacloprid	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	imidacloprid	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	imidacloprid thiamethoxam	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 AI/kg zaad (=32 g/ha) +control; 4 bijenvolken per veld gedurende 21-d; bemonsterd met 14-d intervallen; geen verdere data-analyse	clothianidin	geen gegevens	weinig	-	<0.5-0.93 (behandeld); <0.5 (controle)		Cutler & Scott-Dupree, 2007
Honingbijen	Frankrijk; 4 landbouw + 1 natuur regio	+geen gegevens	24 locaties, 120 volken; 4x per jaar; Okt 2002 - Sept 2005; χ2 analyse om frequenties van pesticide voorkomen te vergelijken tussen jaren en gebieden	imidacloprid	187	11.2	1.2	>0.3-11.1	geen verschillen tussen gebieden en jaren	Chauzat <i>et al.</i> , 2006, 2009, 2011
	België, verschillende gebieden	geen gegevens	monitoring; geen verdere details	imidacloprid	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	imidacloprid	48	0	<0.05			Nguyen <i>et al.</i> , 2009
	USA (Florida, California, Pennsylvania of 13 staten) + 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	imidacloprid thiacloprid thiamethoxam acetamiprid	140	0	<2.0 <1.0 <1.0 <5.0		veel pesticiden gedetecteerd	Mullin <i>et al.</i> , 2010
	Griekenland, Peloponesus regio	geen gegevens	Bijenstanden met bijen die atypisch gedrag vertoonden; geen verdere data-analyse	imidacloprid clothianidin thiamethoxam acetamiprid	5	60	27 <LOD <LOD <LOD	14-39	Detectiegrenzen niet vermeld	Bacandritsos <i>et al.</i> , 2010

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	
Bijenwas	België, verschillende gebieden,	geen gegevens	monitoring; geen verdere details	imidacloprid	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	imidacloprid	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	imidacloprid	208	0.96	2.4-13.6	veel pesticiden aangetroffen Mullin <i>et al.</i> , 2010
				thiacloprid		1.9	<1.0-8.0	
				thiamethoxam		0	<1.0	
				acetamiprid		0	<5.0	
	Guelph, Canada	<i>Brassica napus</i>	1 ha velden; behandeld 400 g AI/kg zaad (=32 g/ha) +control; 4 bijenvolken per veld gedurende 21-d; bemonsterd met 14-d intervallen; geen verdere data-analyse	clothianidin	geen gegevens	weinig	<0.5 (behandeling en controle)	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).

Soort	Blootstelling	Neveneffecten	Referentie
<i>Apis mellifera</i>	Lab+contact: individuele bijen (acuut; geen informatie over de concentratierange)	LD ₅₀ -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 and semi-veld+oraal: 24 µg/kg in suikersiroop	Reductie associatief leren bij 12 ng/bij Afgenomen foerageeractiviteit bij de voedselbron en bij de ingang van de kast; effect op leervermogen.	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)	LD ₅₀ -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 ₅₀ -48uur: tussen 41 and > 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 ₅₀ -48uur: tussen 49 en 104 ng/bij LD ₅₀ -48uur: 4-41 ng/bij NOEC voor mortaliteit, eet-activiteit, wasraatproductie, broedproductie en volks 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, volksontwikkeling, 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 ₅₀ -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 ₅₀ -48uur: 322 mg/l LC ₅₀ -48uur: 7 mg/l LC ₅₀ -48uur: 17 mg/l	Scott-Dupree <i>et al.</i> (2009)

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

Neonicotinoïde	Blootstelling	LD ₅₀ (µg/bij)	Referenties
Moederstof			
Acetamiprid	Contact+oraal: individuele bij (acuut; geen info over de concentratierange)	24uur: 7,07 48uur: 14,5 (oraal) + 8,09 (contact)	Iwasa <i>et al.</i> (2004); Decourtye & Devillers (2011)
	Contact met droog residu + oraal: 100 mg/l (acuut; 2 dagen blootstelling bij contact en 3 dagen bij orale blootstelling)	onschadelijk	Laurino <i>et al.</i> (2011)
Clothianidin	Contact+oraal: individuele bij (acuut; geen info over de concentratierange)	24uur: 0,022 (contact); 48uur: 0,044 (contact) + 0,003 (oraal)	Iwasa <i>et al.</i> (2004); Decourtye & Devillers (2011);
	Contact met droog residu: 75-1,5 mg/l (2 dagen blootstelling)	/; 100% sterfte bij 15mg/l na 48uur	Laurino <i>et al.</i> (2011)
	Oraal: 75 mg/l-7,5µg/l (acuut; 3 dagen)	48uur: 0,003 µg/l	Laurino <i>et al.</i> (2011)
Dinotefuran	Contact+oraal: individuele bijen (acuut; geen info over de concentratierange)	24uur: 0,075 (contact) 48uur: 0,023 (oral)	Iwasa <i>et al.</i> (2004); Decourtye & Devillers (2011)
Nitenpyram	Contact: individuele bijen (acuut; geen info over de concentratierange)	24uur: 0,138 (contact)	Iwasa <i>et al.</i> (2004)
Thiacloprid	Contact+oraal: individuele bijen (acuut; geen info over de concentratierange)	24uur: 14,6 (contact); 24,2 (contact); 48uur: 38,8 (contact)+ 17,3 (oraal)	Iwasa <i>et al.</i> (2004); Elbert <i>et al.</i> (2000); Decourtye & Devillers (2011)
	Contact droog residu +oraal: 144 mg/l (acuut; 2 dagen blootstelling bij contact)	onschadelijk	Laurino <i>et al.</i> (2011)
Thiamethoxam	Contact+oraal: individuele bijen (acuut; geen info over de concentratierange)	24uur: 0,03 (contact) 48uur: 0,024 (contact)+ 0,005 (oraal)	Iwasa <i>et al.</i> (2004); Decourtye & Devillers (2011);
	Contact droog residu: 100-1 mg/l (2 dagen blootstelling)	/; 100% sterfte bij 100 mg/l na 6 uur	Laurino <i>et al.</i> (2011)
	Oraal: 100 mg/l-10 µg/l (3 dagen blootstelling)	48 uur: 0,004 µg/l	Laurino <i>et al.</i> (2011)
Metabool			
N-demethyl acetamiprid	Contact individuele bijen (acuut; geen info over de concentratierange)	24 uur: >50	Iwasa <i>et al.</i> (2004)
6-chloor-pyridilmethyl alcohol	Contact individuele bijen (acuut; geen info over de concentratierange)	24 uur: >50	Iwasa <i>et al.</i> (2004)
6-chloor-nicotinezuur	Contact individuele bijen (acuut; geen info over de concentratierange)	24 uur: >50	Iwasa <i>et al.</i> (2004)
Oleofin	Oraal: acuut (geen info over de concentratierange)	48 uur: >0,036	Nauen <i>et al.</i> (2001);
	Oraal: 10-10.000 µg/kg (acuut); 0,1-10 µg/l (chronisch: 10 dagen)	48 uur: 0,028 (acuut)/(chronisch); 30% mortaliteit met 1 µg/l na 125 uur	Suchail <i>et al.</i> (2001)
5-OH-imidacloprid	Oraal: acuut (geen info over de concentratierange)	48 uur: 0,159	Nauen <i>et al.</i> (2001);
	Oraal: 1,25-20 mg/l (acuut)	48 uur: 0,153	Decourtye <i>et al.</i> (2003); Suchail <i>et al.</i> (2001)
	Oraal: 10-10.000 µg/kg (acuut); 0,1-10 µg/l (chronisch: 10 dagen)	48 uur: 0,258 (acuut)/(chronisch); 40% mortaliteit met 1 µg/l na 125 uur	
Di-OH-imidacloprid	Oraal: acuut (geen info over de concentratierange)	48 uur: > 0,049	Nauen <i>et al.</i> (2001)
Urea-metabool	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 sub-letale 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) Lab+oraal: 24µg/kg in suikersiroop (24u) Semi-veld+oraal: 24 µg/kg in suikersiroop (24u)	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 Verminderde foerageeractiviteit, activiteit bij de kastingang, saccharoseconsumptie en de grootte van het broednest	Decourtye <i>et al.</i> (2004a, 2004b)
<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 bijenvolken op bijenstanden	Nguyen <i>et al.</i> (2009)
<i>Apis mellifera</i>	Semi-veld+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 voedertafel	Schmuck (1999) en Schmuck <i>et al.</i> (2001)
<i>Apis mellifera</i>	Semi-veld+oraal: 48 µg/kg in suikersiroop (chronisch)	Beïnvloeding van de siroopconsumptie, foerageeractiviteit en de oppervlakte van het broednest	Ramirez-Romero <i>et al.</i> (2005)
<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 Semi-veld+oraal: 20-2 µg/l in suikerwater (chronisch 2 weken)	Test zonder foerageren: LC ₅₀ : 59 µg/l; EC ₅₀ : 37µg/l; NOEC voor reproductie: 20 µg/l Test met foerageren: LC ₅₀ : 20 µg/l; EC ₅₀ : 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</i> <i>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+spuiten: 0,45 kg/ha -spuiten+irrigatie: 0,34 kg/ha -spuiten 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 foerageervoorkeuren Afname van de aantallen broedkamers, honingpotten, aantal werksters, het gewicht van de volkjes en effect op de foerageervoorkeuren	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 foerageerder. Foerageren voor nectar is de meest energie-intensieve taak in het bijenvolk, een nectar foerageerder gebruikt 224-899 mg suiker in 7 dagen. Omdat zonnebloemnectar ongeveer 40% suiker bevat, heeft een bij $2,5 \cdot (224-899) = 560-2248$ 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-foerageerder 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 ₅₀ (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. $TER = 14530 / 0,0124 = 1,2 \cdot 10^6$. 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 ₅₀ (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 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.

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 neonicotinoiden) 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 neonicotinoiden). Slechts drie factoren gaven een significant verband met de sterfte: de hoogte van de varroa-besmetting 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 neonicotinoiden, 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.nl (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 gecoate 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.

4. Conclusies en aanbevelingen

Neonicotinoiden 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). Neonicotinoiden werken als neurotoxinen in op het zenuwstelsel van de insecten via wisselwerking met de nAcetylCholinereceptoren. Met de bedoeling om potentiële gevaren van neonicotinoiden 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 neonicotinoiden 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 neonicotinoiden: 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, alsmede 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 foerageergedrag 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 toetsingsschema's.

De nieuwere en veiliger neonicotinoïden, zoals de cyano-groep ten opzichte van de nitro-groep, is een goed voorbeeld van verdere ontwikkeling van milieuveiligere 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 LD₅₀ (Ctgb)

Acute contact toxiciteit: LD₅₀ = 0,081 µg actieve stof /bij

Acute orale toxiciteit: LD₅₀ = 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: LD₅₀ (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 LD₅₀-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 LD₅₀-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 LD₅₀-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-OH-imidacloprid 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 20 µg/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' biotoets 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 48 µg/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 biotoets een effect aan op het middellange maar niet op het korte geheugen met 12 ng imidacloprid per bij. Gebruik makend van eenzelfde biotoets 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 20 µg/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 ¹⁴C-imidacloprid per zaadje (Gaucho; 700 g/kg WS) een gemiddeld gehalte

aan imidacloprid van 3.9 ± 1.0 µg/kg pollen 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 dezelfde dosering geen imidacloprid teruggevonden in nectar, pollen 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). In dezelfde veldstudie werden ook zonnebloemen verbouwd op gronden die in de jaren daarvoor een imidacloprid behandeling hadden gehad en nog <2 tot 18 µg/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 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 het stuifmeel van 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).

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 µg/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. Girolami *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 ± 9.96 mg/l; in een ander experiment werd gemiddeld 83.8 ± 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 µg/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 'geextraheerd' 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) 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) $\mu\text{g/kg}$ 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 $\mu\text{g/kg}$ (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 $\mu\text{g/kg}$); in honing werd gemiddeld 0.275 $\mu\text{g/kg}$ imidacloprid gemeten (Nguyen *et al.*, 2009). De oorsprong van deze imidacloprid is onduidelijk, omdat maïs geen nectar levert, en er geen zonnebloementeelt 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 $\mu\text{g/kg}$) (Garcia-Chao *et al.*, 2010) of in opgeslagen pollen (diverse regio's in Spanje; 61 resp. 845 voorjaars- + 176 najaarsmonsters; detectiegrens 0.4 $\mu\text{g/kg}$) (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 $\mu\text{g/kg}$) 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 $\mu\text{g/kg}$) en in 2.9% van de pollenmonsters (gemiddeld 3.1 $\mu\text{g/kg}$). In pollen werd ook eenmaal de olefin-metabool gevonden en eenmaal de hydroxy-metabool. In bijen werden geen imidacloprid-residuen gevonden (detectiegrens 2.0 $\mu\text{g/kg}$) (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 $\mu\text{g/kg}$, 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 nectarfoerageerder. Foerageren voor nectar is de meest energie intensieve taak in het bijenvolk, een nectarfoerageerder gebruikt 224-899 mg suiker in 7 dagen. Omdat zonnebloemnectar ongeveer 40% suiker bevat, heeft een bij $2,5 \cdot (224-899) = 560-2248$ 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: $\text{TER} = 3,7 \text{ ng} / 0,61 = 6,07$. Een $\text{TER} > 10$ 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 $\mu\text{g/kg}$ (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 ¹⁴C-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 honingoogst 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 varroa-besmetting 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.nl (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 LD₅₀ (Ctgb)

Acute contact toxiciteit: LD₅₀ = 0,04426 µg a.s./bij

Acute orale toxiciteit: LD₅₀ = 0,00379 µg a.s./bij. LD₅₀ 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 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 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 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 LD₅₀ 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 µg/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. 88 µg/kg). Deze hoge gehalten moeten echter zijn veroorzaakt door het zaaien van gecoate zaden tijdens de bloei (stof-drift) 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 varroa-besmetting 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 LD₅₀ (Ctgb)

Acute contact toxiciteit: LD₅₀ = 0,024 µg a.s./bij

Acute orale toxiciteit: LD₅₀ = 0,005 µg a.s./bij

NB ook getallen voor hommels beschikbaar: Contact LD₅₀: 0,11 µg formulering (WG 25%) per werkster; LD₅₀ 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 24 uur (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 maïsplanten 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 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 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 LD₅₀ (Ctgb)

Acute contact toxiciteit: LD₅₀ = 38.82 µg a.s./bij 480)

Acute orale toxiciteit: LD₅₀ = 17.32 µg a.s./bij

5.4.2 Acute giftigheid literatuur

Elbert *et al.* (2000) rapporteerden een contact LD₅₀-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 LD₅₀ (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 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 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

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 LD₅₀ (Ctgb)

Acute contact toxiciteit: LD₅₀ = ~8.09 µg a.s./bij

Acute orale toxiciteit: LD₅₀ = ~ 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 contactbehandeld 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 LD₅₀ waarde.

De 'sucrose responsiveness' van bijen die acuut contactbehandeld 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 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 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

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. $TER = 14530 / 0,0124 = 1,2 \cdot 10^6$.

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 weefsel specifiek te zijn (Brunet *et al.*, 2005).

5.6 Flonicamid

5.6.1 LD₅₀ (Ctgb)

Acute contact toxiciteit: LD₅₀ = >51.1 mg a.s./bij (getest in formulering Teppeki)

Acute orale toxiciteit: LD₅₀ = >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 LD₅₀ (Ctgb)

Acute contact toxiciteit: LD₅₀ = 0,00593 µg/bij (=5,9 ng/bij)

Acute orale toxiciteit: LD₅₀ = 0,00417 µg/bij (= 4,2 ng/bij) LC₅₀=0,160 mg/kg dieet

Ook gegevens over twee metabolieten:

MB 46136 (sulfonmetaboliet): LD₅₀ 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 LD₅₀-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 plexiglazendoos 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 (=LD₅₀/20), 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

$\mu\text{g/kg}$) (Garcia-Chao *et al.*, 2010). In opgeslagen pollen verzameld in diverse regio's in Spanje werd fipronil in 3 van de 61 monsters ($1\text{--}5 \mu\text{g/kg}$) gemeten (Higes *et al.*, 2010). Ook in 3.7% van de 845 voorjaarsmonsters werd fipronil aangetroffen ($1\text{--}4 \mu\text{g/kg}$), maar niet in 176 najaarsmonsters (detectiegrens $0.07 \mu\text{g/kg}$) (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 $0,5 \mu\text{g/kg}$, de LOD (detectiegrens) $0,2 \mu\text{g/kg}$. 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_{50} kan worden opgelopen via deze weg. Opmerkelijk was dat de varroa-besmetting 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 ($9.9\text{--}3060 \mu\text{g/kg}$), 1 van de 350 pollenmonsters ($28.5 \mu\text{g/kg}$) en 3 van de 208 bijenwasmonsters ($1.1\text{--}35.9 \mu\text{g/kg}$) (Mullin *et al.*, 2010).

5.7.8 Verwachte maximale blootstelling vergeleken met 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: $1,2 \mu\text{g/kg}$ in stuifmeel (Chauzat *et al.*, 2005) zou $0,08 \text{ ng}$ opleveren per 10 dagen ($0,008 \text{ ng/bij}$ per dag), de hoge concentratie gevonden door Mullin (een enkel monster met een concentratie van $28 \mu\text{g/kg}$) zou $1,82 \text{ ng}$ per voedsterbij geven over 10 dagen. Per dag is dat $0,182 \text{ ng/bij}$ 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-metaboliet. 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-PR-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: Dr. Willem Jan de Kogel en Dr. Piet Boonekamp.

6. Literatuur

- Alaux C, Brunet J-L, 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, Démares 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 M-H. 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 J-P, Aurières C, Drajnudel 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/j.1439-0418.2011.01648x
- 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)
- 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 *Anagyrus 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, Ashcraft S, Simonds R, vanEngelsdorp D, Pettis JS. 2010. High Levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *Plos One* 5(3).
- 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 chloronicotinyl 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 metabolism 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 J-L, 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.

