

Aan de minister van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit
Mevrouw drs. C. J. Schouten
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Betreft: Advies Ctgb bijen-glyfosaat

Geachte mevrouw Schouten,

Hierbij bied ik u de Ctgb-analyse aan inzake twee publicaties over de effecten van glyfosaat op de darmflora van honingbijen. Uw ministerie heeft om deze analyse gevraagd vanwege de Kamervragen van het lid De Groot (D66) naar aanleiding van deze publicaties.

Het Ctgb concludeert dat in de studies niet wordt aangetoond dat blootstelling aan glyfosaat als gevolg van het gebruik van gewasbeschermingsmiddelen negatieve effecten heeft op bijen via negatieve effecten op het darmmicrobioom. De studies kennen ernstige tekortkomingen en zijn daardoor onvoldoende betrouwbaar. Bovendien zijn de resultaten van beide studies niet in overeenstemming met elkaar.

Het College ziet in deze studies geen bewijs voor het beweerde negatieve effect op bijen en dientengevolge zijn deze studies geen grond voor ingrijpen in de Nederlandse toelatingen van glyfosaathoudende gewasbeschermingsmiddelen.

Het Ctgb merkt verder op dat in de EU-beoordeling van de werkzame stof glyfosaat geen risico's voor honingbijen zijn geconstateerd¹. Het Ctgb voert op dit moment een periodieke herbeoordeling van gewasbeschermingsmiddelen op basis van glyfosaat uit, waarbij de beoordeling van eventuele risico's voor bijen een onderdeel is.

Hoogachtend,

Het College voor de toelating van gewasbeschermingsmiddelen en biociden,
voor deze:
de voorzitter,

Ir. J.F. de Leeuw

¹ EFSA (European Food Safety Authority), 2015. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. EFSA Journal 2015;13(11):4302, 107 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.4302

Datum: 7 november 2018

Behandeld door:
dhr. 5.1.2.e Woo

Telefoonnummer:
5.1.2.e Woo

E-mail:
5.1.2.e Woo@ctgb.nl

Kenmerk
201811070031



ctgb

College voor de toelating van
gewasbeschermingsmiddelen
en biociden

Bennekomseweg 41
6717 LL Ede

Postbus 8030
6710 AA Ede

t (0317) 471 810

post@ctgb.nl
www.ctgb.nl

IBAN NL27RABO0397076053
SWIFT/BIC RABONL2U
KvK 092125700000



Aan: de minister van LNV

Van: Ctgb

Betreft: Analyse wetenschappelijke publicaties effect glyfosaat op darmflora van bijen

Datum: 6 november 2018

Aanleiding

In het kader van Kamervragen van het lid De Groot (D66) heeft het ministerie van LNV het Ctgb gevraagd naar een oordeel over twee studies over de effecten van glyfosaat op de darmflora van honingbijen.

Beoordeling Ctgb

Het Ctgb heeft twee publicaties bestudeerd:

1. Motta, E. V. S., Raymann, K., and Moran N. A. 2018. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. PNAS, 2018 115 (41) 10305-10310.
2. Dai P, Yan Z, Ma S, Yang Y, Wang Q, Hou C, Wu Y, Liu Y, Diao Q. 2018. The herbicide Glyphosate Negatively Affects Midgut Bacterial Communities and Survival of Honey Bee during Larvae Reared in Vitro. J Agric Food Chem, 2018 66 (29) 7786-7793.

Beide studies pogen aan te tonen dat blootstelling van honingbijen aan glyfosaat het darmmicrobioom (ook wel darmflora genoemd) verstoort. Motta et al. onderzochten bovendien of verstoring van het darmmicrobioom de gevoeligheid voor een infectie met een voor bijen schadelijk organisme kan vergroten.

Beide studies rapporteren incidentele effecten op individuele soorten van het darmmicrobioom, maar niet op het gehele darmmicrobioom. De bevindingen van beide studies zijn niet met elkaar in overeenstemming. Motta et al. (2018) vinden effecten op één specifieke bacteriesoort (*Snodgrassella alvi*), terwijl Dai et al. (2018) geen effect vindt op de klasse bacteriën waartoe *S. alvi* behoort. Dai et al. (2018) vindt geen effecten op de ontwikkeling en overleving van de bijen. De effecten op het darmmicrobioom die beide studies waarnemen laten geen dosis-respons-relatie zien, wat een aanwijzing is dat de gevonden effecten het gevolg kunnen zijn van natuurlijke variatie tussen (groepen) bijen. Motta et al. (2018) rapporteert verder dat bij bijen die worden blootgesteld aan zowel glyfosaat als een voor bijen schadelijk organisme een hogere sterfte wordt gezien dan bijen die alleen aan glyfosaat of alleen aan het schadelijke organisme worden blootgesteld. De auteurs hebben niet aangetoond dat aantasting van het darmmicrobioom door *glyfosaat* de waargenomen verschillen veroorzaakt. Organismen verbruiken energie voor het vechten tegen stressoren, wat verzwakkend werkt, en de combinatie van het schadelijke organisme met een andere stressor (zoals honger, of een ander pesticide) zou ditzelfde effect ook kunnen laten zien.

Alle experimenten hadden ernstige tekortkomingen waardoor de studies als onvoldoende betrouwbaar beoordeeld worden en de resultaten als niet eenduidig. Zo zijn de effecten waargenomen bij een zeer klein aantal bijen, onder kunstmatige condities, in aanwezigheid van onvoldoende voedsel voor de bijen en bij doseringen van glyfosaat waarvan onvoldoende is onderbouwd dat bijenlarven en net uitgekomen werkbijen aan deze concentraties in de praktijk worden blootgesteld. Het is verder onmogelijk om de resultaten van de studies te vertalen naar meer realistische omstandigheden (van laboratorium naar veld, van individuele bij naar volkniveau). In de uitgebreide studie-evaluaties in bijlage 1 staan de tekortkomingen per studie aangegeven.

Conclusie Ctgb

Alles in aanmerking genomen wordt in de studies niet aangetoond dat blootstelling aan glyfosaat als gevolg van het gebruik van gewasbeschermingsmiddelen negatieve effecten heeft op bijen via negatieve effecten op het darmmicrobioom. De studies kennen ernstige tekortkomingen, zijn daardoor onvoldoende betrouwbaar en de resultaten zijn niet eenduidig.

Bijlage 1: Gedetailleerde analyse en beoordeling studies Motta et al (2018) en Dai et al. (2018)

Motta et al. 2018. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees

Study abstract (gekopieerd van het artikel en daarom niet vertaald): Glyphosate, the primary herbicide used globally for weed control, targets the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) enzyme in the shikimate pathway found in plants and some microorganisms. Thus, glyphosate may affect bacterial symbionts of animals living near agricultural sites, including pollinators such as bees. The honey bee gut microbiota is dominated by eight bacterial species that promote weight gain and reduce pathogen susceptibility. The gene encoding EPSPS is present in almost all sequenced genomes of bee gut bacteria, indicating that they are potentially susceptible to glyphosate. We demonstrated that the relative and absolute abundances of dominant gut microbiota species are decreased in bees exposed to glyphosate at concentrations documented in the environment. Glyphosate exposure of young workers increased mortality of bees subsequently exposed to the opportunistic pathogen *Serratia marcescens*. Members of the bee gut microbiota varied in susceptibility to glyphosate, largely corresponding to whether they possessed an EPSPS of class I (sensitive to glyphosate) or class II (insensitive to glyphosate). This basis for differences in sensitivity was confirmed using *in vitro* experiments in which the EPSPS gene from bee gut bacteria was cloned into *Escherichia coli*. All strains of the core bee gut species, *Snodgrassella alvi*, encode a sensitive class I EPSPS, and reduction in *S. alvi* levels was a consistent experimental result. However, some *S. alvi* strains appear to possess an alternative mechanism of glyphosate resistance. Thus, exposure of bees to glyphosate can perturb their beneficial gut microbiota, potentially affecting bee health and their effectiveness as pollinators.

Inleiding

Het effect van blootstelling aan glyfosaat op de grootte en samenstelling van het darmmicrobioom van de honingbij werd onderzocht in volwassen bijen. Het darmmicrobioom van honingbijen wordt volgens het artikel verondersteld gedomineerd te worden door acht soorten of soortgroepen bacteriën: *Lactobacillus* spp. Firm-4, *Lactobacillus* spp. Firm-5 (phylum Firmicutes), *Bifidobacterium* spp. (phylum Actinobacteria), *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola*, *Frischella perrara*, *Bartonella apis*, en Alpha 2.1 (phylum Proteobacteria)¹. Net uitgekomen werksters hebben vrijwel geen darmbacteriën. Zij verkrijgen hun normale microbiële gemeenschap oraal via sociale interacties met andere werksterbijen tijdens de eerste dagen van hun volwassen leven². Honingbijen die het normale microbioom misten, lieten gewichtsverlies, een veranderd metabolisme, toegenomen gevoeligheid voor pathogenen zoals *Serratia marcescens* kz19 en toegenomen sterfte in het bijenvolk zien³.

Er werden verschillende experimenten uitgevoerd in deze studie, waarvan de resultaten vooral in de *Supplementary Information* gepresenteerd worden.

Resultaten

Experimenten met bijenvolken

¹ Kwong WK, Moran NA (2016). Gut microbial communities of social bees. *Nat Rev Microbiol* 14:374–384.

² Powell JE, Martinson VG, Urban-Mead K, Moran NA (2014). Routes of acquisition of the gut microbiota of *Apis mellifera*. *Appl Environ Microbiol* 80:7378–7387.

³ Motta et al. 2018 and references therein.

Twee experimenten met slechts twee bijenvolken werden uitgevoerd, in de herfst en het voorjaar. In elk experiment werd dezelfde procedure gevolgd: 2000 volwassen bijen werden verzameld uit het volk, in drie groepen verdeeld (controle, 5 en 10 mg glyfosaat/L), en in kooien geplaatst (40 bijen per kooi, in totaal 16 kooien per testgroep). De bijen werden gedurende vijf dagen blootgesteld aan glyfosaat in suikerstroop of aan onbehandelde suikerstroop (controle). Daarna werden uit elke testgroep 15 bijen verzameld (Dag 0) en werden 600 bijen uit elke testgroep teruggebracht naar het volk (het artikel vermeldt niet hoe deze bijen uitgekozen werden, noch wat er gebeurde met de overige 1385 bijen). 3 dagen na het einde van de blootstellingsperiode (Dag 3) werden 15 gemarkeerde bijen uit elke testgroep weer verzameld uit het volk. Minder dan 20% van de gemarkeerde bijen van elke testgroep werden teruggevonden op dag 3. De relatieve en absolute abundantie van darmbacteriën werden bepaald.

De auteurs claimen met het blootstellingsniveau in de volkexperimenten (5 en 10 mg glyfosaat/L: G-5 en G-10) de verwachte blootstelling in het veld na te bootsen, *i.e.* 1,4 – 7,6 mg glyfosaat/L (met een bronvermelding naar een ander artikel). Ctgb kon deze waarden echter niet terugvinden in het bronartikel, of het moet zo zijn dat de auteurs de concentraties in het aquatische milieu gebruikt hebben. De relatie tussen de concentratie in (oppervlakte)water en blootstelling van bijen is onduidelijk, zeker kijkend naar blootstelling van individuele bijen.

In het eerste experiment was er op Dag 0 weinig effect te zien van glyfosaat op het darmmicrobioom van de bijen (totaal aantal bacteriën). De auteurs claimen dat de effecten van glyfosaat op het darmmicrobioom meer prominent waren op dag 3, nadat de behandelde bijen teruggebracht waren naar het volk. Hoewel de effecten van de G-5 behandeling op Dag 3 statistisch significant verschilden van de controle, was de abundantie van bacteriën in de controle en G-10 vergelijkbaar. De biologische relevantie op Dag 3 lijkt dus twijfelachtig te zijn. In het tweede experiment werden geen statistisch significante verschillen gevonden tussen de controle en de behandelingen op Dag 0 en Dag 3. De auteurs concluderen dat glyfosaat geen negatief effect had op het darmmicrobioom van de bijen na vijf dagen blootstelling aan 5 en 10 mg glyfosaat/L.

Op Dag 0 was zowel de relatieve als de absolute abundantie van de kernsoort *S. alvi* significant lager in de G-10 groep, maar dit was niet zo op Dag 3. De auteurs geven hier geen uitleg voor. In het tweede volkexperiment werd een significante afname in abundantie van *S. alvi* gezien op Dag 0 en Dag 3 in de G-10 behandeling (hoewel geen duidelijke dosis-responsrelatie aangetoond kon worden). De auteurs concluderen dat van de acht 'kernbacteriesoorten' in de darm van de honingbij, slechts één soort (*S. alvi*) een indicatie liet zien van een mogelijke afname in totale abundantie als gevolg van een vijfdaagse blootstelling aan 10 mg glyfosaat/L.

Deze studie heeft diverse tekortkomingen. De meest kritische zijn: a) de steekproefgrootte van 15 bijen per behandeling (er waren weliswaar 2 steekproefnames, maar deze kunnen niet samengevoegd worden omdat ze in verschillende seizoenen (herfst en lente) uitgevoerd zijn), wat relatief weinig is om de natuurlijke achtergrondvariatie te kunnen scheiden van daadwerkelijke effecten, b) slechts twee volken zijn gebruikt (één in het voorjaar en één in het najaar), c) de omstandigheden waarin de bijen gehouden werden zijn niet gerapporteerd, terwijl deze omstandigheden invloed kunnen hebben op de resultaten en bovendien bekend moeten zijn om iets te kunnen zeggen over de gezondheid van de bijen bij de start van de test, d) alle bijen werden verzameld uit en teruggebracht naar hetzelfde volk; de testgroepen waren derhalve niet van elkaar gescheiden en het is dus niet uitgesloten dat er overdracht heeft plaatsgevonden van glyfosaat en/of bacteriën tussen bijen uit de verschillende groepen, e) variatie in darmbacteriën is normaal tussen volken, maar ook tussen individuele bijen⁴, maar in de studie werd deze variatie niet onderzocht, noch gaven de studieauteurs er enige informatie over, f) de samenstelling van het microbioom

⁴ Hroncova Z, Havlik J, Killer J, Duskocil I, Tyl J, Kamler M, et al. (2015) Variation in Honey Bee Gut Microbial Diversity Affected by Ontogenetic Stage, Age and Geographic Location. PLoS ONE 10(3): e0118707. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118707>

wordt beïnvloed door leeftijd^{5,6}; omdat de leeftijd van de bijen in het experiment niet vermeld werd, en mogelijk bijen van verschillende leeftijden werden gebruikt, is het niet duidelijk of het wel juist is om een vergelijking te maken met informatie over het darmmicrobioom van de honingbij uit andere onderzoeken en informatiebronnen, of tussen de verschillende groepen in het experiment, g) het is niet vermeld hoeveel suikerstroop de bijen exact opgenomen hebben, waardoor de daadwerkelijke doses per bij niet berekend kunnen worden, h) de bijen werden niet gevoerd met stuifmeel (bron van eiwitten en enzymen voor voedsterbijen), en dit heeft de resultaten mogelijk beïnvloed, aangezien veel microbes voor hun overleving afhankelijk zijn van aminozuren, i) hoewel de bron van glyfosaat gerapporteerd werd, is GLP certificering van het testlaboratorium niet aangetoond.

Op basis van de hierboven opgesomde tekortkomingen zijn de resultaten van de volkexperimenten niet betrouwbaar. Er kan dus geen conclusie getrokken worden over het effect van glyfosaat op de grootte van het darmmicrobioom van honingbijen noch op de absolute en relatieve abundantie van de "kernsoorten" van het microbioom.

Kolonisatie-experiment

"Ongeveer 100" nieuw uitgekomen werksters (NEWs), waarvan aangenomen wordt dat ze vrijwel geen darmbacteriën hebben, werden tegelijk blootgesteld aan entmateriaal dat bestond uit hun normale microbiële gemeenschap en aan glyfosaat (5 µl sucrose-oplossing met 1 mM glyfosaat -1,7 µg glyfosaat/bij; bijen werden tweemaal blootgesteld binnen twee dagen). 15 van deze bijen werden verzameld om hun darmmicrobioom te bepalen. In een tweede kolonisatie-experiment verschilde het blootstellingsniveau, *i.e.* de bijen werden blootgesteld aan 0.1 mM glyfosaat gedurende vijf dagen. Aangezien verdere informatie ontbreekt, is het niet mogelijk de totale dosis per bij te bepalen (en zo kwantitatief de effecten van de twee testen te vergelijken) noch om een vergelijking te maken met de mogelijke blootstelling die in veldsituaties zou kunnen optreden. In de tweede test werden slechts acht bijen per testgroep verzameld voor DNA en RNA extractie.

In het eerste experiment was de gemiddelde totale bacteriële abundantie iets lager in aan glyfosaat blootgestelde bijen, maar dit was niet statistisch significant. *S. alvi* was het meest beïnvloede lid van het darmmicrobioom en zijn absolute en relatieve abundantie waren significant lager dan die van de controlebijen, terwijl *Lactobacillus Firm-4* toenam in (alleen) relatieve abundantie. De auteurs concluderen dat blootstelling aan glyfosaat tijdens de vroege ontwikkeling van het darmmicrobioom de normale kolonisatie kan verstoren door de abundantie van nuttige bacteriesoorten te veranderen.

In het tweede experiment analyseerden de auteurs ook veranderingen in abundanties van bacteriën na blootstelling aan glyfosaat door zowel DNA als RNA te extraheren uit de darmen van aan glyfosaat blootgestelde en controlebijen. Er was ook een positieve controlegroep, waarin bijen blootgesteld werden aan tylosin, een antibioticum dat gebruikt wordt in de imkerij. Deze antibioticabehandeling werd verwacht het microbioom te verstoren, maar de afname was alleen significant voor RNA monsters. Glyfosaatblootstelling resulteerde in niet-significante afnames in het totaal aantal bacteriën, zowel voor DNA als RNA analyses. Effecten van glyfosaatbehandeling op absolute abundantie waren specifiek voor *S. alvi*, de enige geteste soort die een significante afname liet zien in absolute abundantie, zowel in DNA als in RNA analyses. De auteurs concluderen dat significante effecten alleen gezien werden op absolute abundantie van *S. alvi* DNA and RNA.

⁵ Hroncova Z, Havlik J, Killer J, Dostkocil I, Tyl J, Kamler M, et al. (2015) Variation in Honey Bee Gut Microbial Diversity Affected by Ontogenetic Stage, Age and Geographic Location. PLoS ONE 10(3): e0118707. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118707>

⁶ Tarpy, D.R.; Matila, H.R. and Newton, I.L.G. (2015) Development of the Honey Bee Gut Microbiome throughout the Queen-Rearing process. *AEM* 81(9): 3182-3191.

De meeste tekortkomingen die genoemd zijn voor de volkexperimenten zijn ook van toepassing op het kolonisatie-experiment, *e.g.* (nog kleinere) steekproefgrootte, onbekende dosering, negeren van natuurlijke variatie in darmmicrobioom tussen individuen, etcetera. De kolonisatie-experimenten worden daarom ook als onvoldoende betrouwbaar en niet eenduidig beschouwd.

Infectie-experimenten

Om te onderzoeken of glyfosaat-geïnduceerde verstoring van microbioom-kolonisatie de gezondheid van de gastheer beïnvloedt, werd de gevoeligheid van met glyfosaat behandelde bijen voor een opportunistische bacteriële pathogeen gemeten in twee experimenten. NEWs werden blootgesteld aan glyfosaat tijdens de periode waarin ze hun normale microbiële gemeenschap verkrijgen. Na vijf dagen blootstelling (eerste experiment: 0.1 mM glyfosaat gedurende 5 dagen; tweede experiment: 0.1 mM glyfosaat gedurende 5 d ~1.7 µg glyfosaat/bij (aangenomen dat bijen ongeveer 20 µl sucrose-oplossing per dag opnemen; dezelfde aanname geldt waarschijnlijk voor het eerste experiment, maar werd niet genoemd), werden bijen blootgesteld aan *Serratia marcescens* kz19, een opportunistische pathogeen die normaal gesproken in zeer lage aantallen voorkomt in de darm van honingbijen. In bijen zonder darmmicrobioom resulteerde blootstelling aan *Serratia* in toegenomen sterfte vergeleken met bijen met een normaal darmmicrobioom, ongeacht glyfosaatblootstelling. In bijen met een normaal darmmicrobioom resulteerde blootstelling aan glyfosaat in toegenomen sterfte na blootstelling aan *Serratia*. In bijen die blootgesteld waren aan glyfosaat, maar niet aan *Serratia*, was de overleving niet significant beïnvloed door glyfosaat en veel hoger (het hoogst van alle testgroepen) dan in de groepen met blootstelling aan *Serratia*, wat aantoont dat een direct effect van glyfosaat op bijen niet de basis is van de hoge sterfte van de bijen die zowel aan glyfosaat als de pathogeen blootgesteld waren.

Gebaseerd op bovenstaande resultaten suggereerden de auteurs dat glyfosaat het beschermende effect van het darmmicrobioom tegen opportunistische pathogenen verkleint en dat *S. alvi* de bacteriesoort is die het meest negatief beïnvloed wordt door glyfosaat. De auteurs wijzen erop dat *S. alvi* wel enige immuniteit schijnt te geven, maar niet zoveel als het hele darmmicrobioom.

De auteurs speculeren verder over de redenen voor de waargenomen variatie in gevoeligheid van bepaalde variëteiten van bacteriesoorten voor glyfosaat. Hun conclusie over dit onderwerp wordt hier slechts summier weergegeven: bijendarmbacteriën variëren in gevoeligheid voor glyfosaat op het niveau van soort en variëteit en variëteiten van *S. alvi* variëren mogelijk *in vivo* in gevoeligheid voor glyfosaat. Variëteitverschillen in glyfosaatgevoeligheid kunnen zo mogelijk bijdragen aan de waargenomen variatie in algemene afname van abundantie van *S. alvi* wanneer bijen met hun aangeboren darmmicrobioom blootgesteld worden aan glyfosaat.

Het wordt opgemerkt dat het niet duidelijk is hoe dosering van het geïnjecteerde pathogeen zich verhoudt tot mogelijk realistische doseringen (*i.e.* aan welk niveau van *Serratia* bijen in de natuur blootgesteld worden). De auteurs stellen dat de pathogeen van nature aanwezig is in de darm in kleine hoeveelheden, dus het injecteren van de pathogeen lijkt geen reflectie van de natuurlijke situatie. Het is ook niet duidelijk of de mogelijk waargenomen effecten een gevolg waren van de infectie zelf, of van de combinatie van de infectie en glyfosaatblootstelling samen (aangezien bijen een hogere energiebehoefte hebben wanneer ze aan twee stressoren tegelijk blootgesteld worden), of een gevolg van veranderingen in de immuunrespons van de honingbij door onbekende factoren. Bovendien melden de auteurs dat het darmstelsel van tien bijen uitgetrokken en geprepareerd is en gedurende vijf dagen aan de testbijen gegeven is tot een normaal microbioom gevestigd was. Het is echter de vraag wat een 'normaal' microbioom is, *i.e.* de basiscompositie van het microbioom. Daarnaast werden de bijen niet gevoerd met stuifmeel, wat de resultaten kan beïnvloeden, zoals hierboven reeds besproken. Als laatste werden de doses afgeleid met de aanname dat bijen 20 µl sucrosesiroop per dag opnemen, terwijl in het EFSA Guidance Document on Bees (2013) de hoeveelheid suiker die bijen opnemen (veel) hoger is (respectievelijk 32-128 en 34-50 mg

suiker/bij/dag voor foerageerbijen en voedsterbijen), en de gerapporteerde dosis is daarom onjuist of tenminste twijfelachtig. Net als in het kolonisatie-experiment is het niet mogelijk een vergelijking te maken met de blootstelling die in veldsituaties zou kunnen optreden. In zijn algemeenheid zijn de kolonisatie-experimenten onvoldoende betrouwbaar en de resultaten niet eenduidig.

Conclusie Ctgb

In deze studie werden verschillende experimenten uitgevoerd om aan te tonen dat blootstelling aan glyfosaat van volwassen bijen het darmmicrobioom kan beïnvloeden, leidend tot een grotere gevoeligheid voor infectie door pathogenen.

In geen van de experimenten werd een negatief effect gevonden op het algemene darmmicrobioom. In het eerste experiment was wel indicatie van een mogelijk negatief effect op één bacteriesoort (*S. alvi*) bij 10 mg/L (maar niet bij 5 mg/L). In het tweede experiment werd ook een mogelijk negatief effect gezien op deze zelfde bacteriesoort bij een dosering van ~1,7 µg glyfosaat/bij. In het derde experiment was de sterfte van bijen na blootstelling aan een pathogeen hoger indien die bijen ook blootgesteld waren aan glyfosaat.

Echter, vanwege een aantal tekortkomingen in elk experiment (*e.g.* zeer kleine steekproefgrootte, onbekende omstandigheden van de testbijen en de experimenten, de invloed van het volk, individu en leeftijd op het darmmicrobioom, het ontbreken van verificatie van de daadwerkelijke blootstelling aan glyfosaat per bij, het ontbreken van aminozuren in het dieet, het injecteren van een pathogeen in een gehalte dat niet onderbouwd is), wordt de studie onvoldoende betrouwbaar en niet eenduidig geacht. De studie weerspiegelt bovendien niet de realistische omstandigheden in het milieu, en mogelijke andere variabelen die het darmmicrobioom beïnvloeden zijn niet meegenomen.

Het is opvallend dat, hoewel de auteurs suggereren dat glyfosaat een rol zou kunnen spelen in *colony-collapse disorder* door zijn veronderstelde effect op het microbioom, zij als positieve controle (m.a.w. als stof die zeker een effect zal hebben op het microbioom) een antibioticum kiezen dat algemeen gebruikt wordt in de imkerij.

Dai et al. 2018. The herbicide glyphosate negatively affects midgut bacterial communities and survival of honey bee during larvae reared in vitro

Study abstract (gekopieerd van het artikel en daarom niet vertaald): *Effects of glyphosate on survival, developmental rate, larval weight, and midgut bacterial diversity of Apis mellifera were tested in the laboratory. Larvae were reared in vitro and fed diet containing glyphosate 0.8, 4, and 20 mg/L. The dependent variables were compared with negative control and positive control (dimethoate 45 mg/L). Brood survival decreased in 4 or 20 mg/L glyphosate treatments but not in 0.8 mg/L, and larval weight decreased in 0.8 or 4 mg/L glyphosate treatments. Exposure to three concentrations did not affect the developmental rate. Furthermore, the intestinal bacterial communities were determined using high-throughput sequencing targeting the V3–V4 regions of the 16S rDNA. All core honey bee intestinal bacterial phyla such as Proteobacteria (30.86%), Firmicutes (13.82%), and Actinobacteria (11.88%) were detected, and significant changes were found in the species diversity and richness in 20 mg/L glyphosate group. Our results suggest that high concentrations of glyphosate are deleterious to immature bees.*

Introductie

De studie was gericht op het ontwikkelen van een methode om potentiële effecten van glyfosaat te bepalen op *in vitro* gekweekt bijenbroed. De auteurs keken naar overleving, ontwikkeling, lichaamsgewicht van larven en bacteriële gemeenschappen in de middendarm van *in-vitro* opgegroeide honingbijen die als larvae chronisch blootgesteld waren aan diverse concentraties glyfosaat onder gecontroleerde laboratoriumomstandigheden. Volgens de auteurs waren de gebruikte glyfosaatconcentraties (0,8, 4, en 20 mg glyfosaat/L: G-0.8, G-4 en G20) gebaseerd op concentraties die aanbevolen worden voor de spuittoepassing van glyfosaat en op de concentraties die in het milieu worden aangetroffen, van 1,4 tot 7,6 mg/L. De auteurs stellen dat 20 mg/L glyfosaat niet zal worden aangetroffen in het milieu en dus een realistisch *worst case scenario* voorstelt. Wat betreft de realistische concentraties in het milieu kon Ctgb deze waarden echter niet terugvinden in het bronartikel, of het moet zo zijn dat de auteurs de concentraties in het aquatische milieu gebruikt hebben, wat de relevantie voor honingbijen onzeker maakt.

De studieopzet lijkt op de richtlijn die beschreven wordt in de OECD Series on Testing and Assessment No. 239 "Larval toxicity test with repeated exposure". Bijenlarven werden blootgesteld aan herhaalde doses glyfosaat op dag twee t/m vijf van hun ontwikkeling. Op dag zes werden ze overgebracht naar kamer waar ze konden verpoppen. Na het uitkomen werden de jonge bijen bemonsterd om hun darmmicrobioom te screenen. Er wordt niet gesproken over GLP certificering van het laboratorium.

Resultaten

Op dag 18 werden significante effecten gezien op overleving in de behandelingen G-4 en G-20. Hoewel de daadwerkelijke waarden niet vermeld werden (het artikel geeft alleen een grafische weergave), kan uit de figuur overleving van ~85 and ~75% afgeleid worden voor respectievelijk G-4 en G20. Deze observatie had echter volgens de richtlijn ook al eerder gedaan moeten worden, op ongeveer dag zeven van de test (zodat effecten op de larve gescheiden kunnen worden van effecten die pas tijdens het popstadium tot uiting komen), en op die dag was de overleving ongeveer 90% of hoger in G-4 and G-20. Bovendien kunnen deze resultaten, hoewel ze statistisch significant waren, gezien worden als voortvloeiend uit natuurlijke variatie – één van de validiteitscriteria van de test (OECD Series on Testing and Assessment No. 239) is een minimum van 70% ontpopping (*i.e.* overleving) op dag 22. Aangezien de overleving in alle testgroepen boven de 70% was, kan geen relatie gelegd worden tussen blootstelling aan glyfosaat en effecten.

De auteurs stellen dat er effecten waren op het natgewicht van larven op dag 6 in G-0.8 en G-4, maar niet in G-20. Ctgb is van mening dat de verschillen tussen de groepen zeer klein zijn en dat er geen dosis-responsrelatie is. Deze "effecten" op het gewicht van larven kunnen daarom ook een resultaat zijn van bijvoorbeeld natuurlijke variatie.

Er waren geen effecten op de ontwikkeling van larven en poppen.

Met hiërarchische clusteranalyse werden verschillen in de samenstelling van het microbiom in de middendarm aangetoond in de G-20 groep. Er kwam echter geen significant verschil in Betaproteobacteria (de klasse bacteriën waarin *S. alvi* valt) uit deze analyse, wat opvallend is als je het vergelijkt met de hierboven besproken studie van Motta *et al.* 2018. Hoewel in elke behandelgroep veranderingen te zien waren, ontbraken daarnaast consistente veranderingen van specifieke taxa –de abundantie van Gemmatimonadaceae was bijvoorbeeld significant hoger in G-0.8, maar niet in G-4 en G20. De resultaten zijn bovendien gebaseerd op slechts vijf individuen per behandelgroep. De resultaten worden daarom inconsistent en onvoldoende betrouwbaar geacht.

De auteurs stellen dat hun bevindingen eerdere studies aan glyfosaat, die geen effecten op broedontwikkeling in een realistisch blootstellingsscenario vonden, bevestigen. In een recente studie⁷ waren bij toepassing van 2.88 kg/ha de hoogste glyfosaatresiduen 31,3 mg/kg in nectar en 574 mg/kg in stuifmeel tijdens de eerste drie dagen van blootstelling, en glyfosaat liet een snelle afname zien naar 2,78 mg/kg in nectar en 87,2 mg/kg in stuifmeel op dag 7. De auteurs van Dai *et al.* 2018 stellen dat het onwaarschijnlijk lijkt dat het glyfosaatniveau dat in larvaal voedsel zit het maximale residueniveau benadert dat in stuifmeel of nectar/honing wordt aangetroffen onder normale milieuomstandigheden. Bovendien suggereren zij dat hun studie onder kunstmatige omstandigheden is uitgevoerd, en dat in een meer realistische situatie larven en jonge bijen de kans hebben microbiom uit te wisselen met hun volkgenoten zodat ze hun darmbacteriën kunnen verkrijgen van oudere werksters, de bijenkast of een combinatie van deze twee. Hierdoor wordt elk potentieel effect op de samenstelling van het darmmicrobiom uitgewist.

Conclusie Ctgb

Er werden geen effecten gevonden op overleving, natgewicht en ontwikkeling van larven en poppen, zelfs niet bij voor het milieu onrealistisch hoge concentraties. Er werden geen consistente effecten gevonden op de aantallen bacteriën en de samenstelling van het darmmicrobiom. De bevindingen zijn bovendien niet in overeenstemming met de bevindingen in de studie van Motta *et al.* 2018 wat betreft de bacteriesoort *S. alvi*. Tenslotte is deze studie op het darmmicrobiom uitgevoerd met slechts vijf individuele bijen per testgroep, wat onvoldoende is om natuurlijke variatie te kunnen adresseren. Concluderend wordt de studie gezien als onvoldoende betrouwbaar en niet eenduidig.

⁷ Thompson, H.M., Levine, S.L., Doering, J., Norman, S., Manson, P., Sutton, P., von Mérey, G. Evaluating exposure and potential effects on honeybee brood (*Apis mellifera*) development using glyphosate as an example. *Integr Environ Assess Manag* 2014 10 (3) 463-70.

