

## Bijen

### ▪ **Overzicht toetsingskader**

Voor bijen geldt momenteel het Sanco Guidance Document on Terrestrial Ecotoxicology<sup>1</sup>. EFSA heeft een nieuw guidance document voor bijen opgesteld<sup>2</sup>. Dit wordt in het huidige document 'de nieuwe EFSA guidance' genoemd. Deze guidance is nog niet geaccepteerd voor gebruik in Europa.

Commented 5.1.2.e 5.1.2.e : NB bijen brengen met formulering in hoofdtekst.

Vanaf 1 januari 2014 voor stoffen en 1 januari 2016 voor middelen gelden de nieuwe dataveren<sup>3</sup>. Onder de nieuwe dataveren moeten voor bijen standaard een chronische (10-d) toxiciteitstest en een larvale toxiciteitstest geleverd worden.

### ▪ **Om welke stoffen gaat het?**

Verreweg de meeste studies zijn uitgevoerd met imidacloprid, clothianidin of thiamethoxam. De andere in Nederland toegelaten neonicotinoiden (acetamiprid en thiacloprid) worden zelden gebruikt in de studies. Acetamiprid en thiacloprid hebben een andere moleculaire structuur dan de andere drie en zijn zowel minder persistent in de bodem als minder toxisch voor honingbijen (alleen data voor acuut). De auteurs van het EASAC-rapport spreken bijna overal over neonicotinoiden in het algemeen, maar het is de vraag of het voor bijen wel gerechtvaardigd is om de resultaten van het onderzoek met imidacloprid, clothianidin en thiamethoxam door te trekken naar acetamiprid en thiacloprid.

Commented 5.1.2.e : NB het argument dat in NL momenteel weinig blootstelling is omdat toepassing in bloeiend gewas niet mag, geldt alleen voor imidacloprid, thiamethoxam en clothianidin. Dat pleit ervoor deze passage toch op te nemen.

### ▪ **Blootstellingsroutes voor bijen**

Het EASAC-rapport gaat in op een aantal routes via welke niet-doelwit arthropoden inclusief bijen blootgesteld kunnen worden. De benoemde blootstellingsroutes via nectar en stuifmeel, directe bespuiting, stofdrift van gecoat zaad, oppervlaktewater en guttatiewater zijn voor bijen reeds (kwantitatief of kwalitatief) betrokken in de toelatingsbeoordeling. De route via honigdauw wordt niet genoemd maar is ook een belangrijke risicovolle blootstellingsroute, die in Nederland meegenomen wordt (overigens staat deze route niet in de nieuwe EFSA guidance).

Commented 5.1.2.e 5.1.2.e : had deze zin niet opgenomen maar ik heb hem er toch weer bijgezet. Incidenten met honingbijen na blootstelling via honigdauw zijn in NL opgetreden en ik denk dat we ook in de toekomst naar deze route moeten blijven kijken. Maar dat moeten we nog afstemmen.

De blootstellingsroutes via contact met residuen op bijvoorbeeld bladeren of stengels, verontreinigd nestmateriaal of nestelplekken, residuen in de bodem die naar naastgelegen bodems of water lekken, en doorgave via trofische niveau's worden momenteel niet in Nederland meegenomen en zijn ook niet uitgewerkt tot risicobeoordelingsmethodieken in de nieuwe EFSA bijenguidance. Het belang van deze blootstellingsroutes ten opzichte van blootstellingsroutes die wel deel uitmaken van het toetsingskader is op dit moment niet goed te kwantificeren. Naar de mening van Ctgb zijn de meeste hiervan van mineur belang vergeleken met de routes die al wél meegenomen zijn. De route via verontreinigd nestmateriaal of nestelplekken, met name via de bodem, is potentieel wel van belang. Er is echter meer onderzoek nodig voordat concentraties in de bodem gekoppeld kunnen worden aan een effect op bijen (zoals de EFSA guidance al aangeeft).

### Directe blootstelling van honingbijen

<sup>1</sup> SANCO/10329/2002, 17 October 2002 rev 2 final. Guidance Document on Terrestrial Ecotoxicology Under Council Directive 91/414/EEC.

<sup>2</sup> European Food Safety Authority, 2013. EFSA Guidance Document on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). EFSA Journal 2013;11(7):3295, 268 pp., doi:10.2903/j.efsa.2013.3295

<sup>3</sup> Commission Regulations 283/2013 (stof) en 284/2013 (middel)

Het EASAC-rapport gaat alleen in op het risico van stofdrift bij behandeld zaad. Hierbij komen tijdens het zaaien stofdeeltjes vrij die de actieve stof bevatten. Deze deeltjes kunnen overwaaien naar een naburig gewas of een akkerrand. Als hier bloeiende planten staan waar honingbijen op vliegen, kunnen deze een dodelijke blootstelling krijgen, wat blijkt uit incidenten met honingbijen in verschillende landen. In Nederland wordt sinds 2010 rekening gehouden met deze blootstellingsroute. Voor alle zaadcoatings met insecticide is geïnventariseerd hoe de coating plaatsvindt, of de zaden in het veld gezaaid worden en met welke machines. Indien er risico bestond voor het ontstaan van stofdrift, zijn aanvullende eisen gesteld aan de manier van coaten en uitzaaien, zodat de mogelijke blootstelling tot een aanvaardbaar niveau wordt teruggedrongen. Deze aanpak wordt nu ook bij nieuwe aanvragen gevolgd. Overigens zijn in Nederland nooit incidenten geweest met stofdrift en honingbijen. Kanttekening hierbij is dat vanwege vrij verkeer van behandeld zaad binnen Europa het niet is uit te sluiten dat behandeld zaad zonder stofdriftrestricties toch in Nederland uitgezaaid wordt.

De situatie in Canada, die door het EASAC-rapport in het bijzonder wordt aangehaald, is erg worst case. In de Canadese gebieden met incidenten wordt soms wel 90% van een gebied min of meer tegelijkertijd ingezaaid met gecoat zaad. Dit is niet representatief voor Nederland.

Directe blootstelling kan ook plaatsvinden via bespuiting van een vloeibaar middel. Het EASAC-rapport gaat hier niet op in. De meeste insecticiden mogen uiteraard niet op bloeiend gewas gespoten worden omdat het risico voor bijen dan veel te groot is (zij kunnen dan overspoten worden), maar in Nederland worden aanvullend ook nog eisen gesteld aan de maximale blootstelling die buiten het veld mag plaatsvinden. Via strenge driftreductietechnieken wordt deze tot een aanvaardbaar niveau teruggedrongen. Deze aanvullende eis zal ook deel uitmaken van de nieuwe EFSA guidance.

#### ▪ Toxicologisch risico voor honingbijen

Het rapport (paragraaf A4.3.4.) gaat in op de daadwerkelijke risicobeoordeling. Hierbij verwijst het EASAC-rapport naar EFSA (2013a, b en c) waarin de op dat moment in Europa toegelaten toepassingen van imidacloprid, clothianidin en thiamethoxam als zaadbehandeling en granulaat beoordeeld werden op risico's voor bijen. Deze beoordelingen waren gebaseerd op een wetenschappelijke opinie van EFSA maar nog niet op een uitgewerkte methodiek. Inmiddels is het nieuwe EFSA guidance document beschikbaar. In 2015 voert de EFSA een beoordeling uit van de risico's voor bijen van dezelfde stoffen maar nu voor alle overige toepassingen (onder andere bespuiting en bevoeiing), en zij doen dit nu volgens hun nieuwe guidance. De resultaten van deze beoordeling worden in 2016 verwacht.

De tabellen A4.4 en A4.5 van het EASAC-rapport presenteren voor imidacloprid residuniveau's in nectar en in dieet van voedsterbijen, de chronische NOEC en de ratio hiertussen. Alle ratio's zijn een factor 2,9 of meer, wat betekent dat de chronische NOEC niet bereikt wordt. De auteurs stellen echter dat er onzekerheden zitten in deze berekeningen, waarbij zij waarschijnlijk doelen op aspecten die zij in de eerste alinea van dit hoofdstuk noemen. Deze worden hieronder beschreven met een oordeel van Ctgb over de onzekerheid van elk aspect:

- welk effect in beschouwing wordt genomen (individueel of volkniveau): de NOEC die hier gebruikt wordt, is een waarde is voor chronische mortaliteit in het laboratorium. Het feit dat subletale effecten niet worden meegenomen leidt mogelijk tot onderschatting van het risico, maar de blootstelling in de studie was worst case ten opzichte van de situatie in het veld en zal naar alle waarschijnlijkheid niet leiden tot onderschatting van het risico.

**Commented 5.1.2.e** Is op zich belangrijke boodschap. Geldt voor alle risico's van zaadbehandelingsmiddelen. Misschien hebben wij uitgebreide restricties op het etiket maar een ander land niet, en dan mag ook het etiket van dat andere land in NL toegepast worden. Toch 5.1.2.e?

- Welke bijensoort getest wordt: aangezien dit hoofdstuk 'risico voor honingbijen' heet, lijkt Ctgb het eindpunt voor honingbijen relevant en zal dit niet leiden tot onderschatting van het risico.
- Hoe het insecticide gebruikt wordt (zaadbehandeling, bespuiting of bevoeiing): de EFSA heeft hier expliciet zaadbehandelingen beoordeeld dus dit is gewoon onderdeel geweest van de risicobeoordeling; dit is geen onderschatting van het risico.
- Oneigenlijk gebruik: Risicobeoordelingen van bestrijdingsmiddelen worden door Ctgb altijd uitgevoerd met de aanname dat gewasbeschermingsmiddelen correct (conform gebruiksvoorschrift) worden toegepast.

Verder wijzen de auteurs op de route via guttatie. Zij stellen terecht dat guttatievloeistof in zaailingen uit behandeld zaad toxisch kan zijn voor een bij, mits deze vloeistof een significant aandeel heeft in de watervoorziening van die bij. Verschillende experimenten suggereren dat honingbijen zelden guttatievloeistof opnemen, waardoor in de praktijk een laag risico verwacht wordt. De auteurs vinden dat het voorkomen van bijzonder hoge concentraties in guttatievloeistof leidt tot significante onzekerheden. Ctgb heeft in beoordelingen tot op heden de blootstellingsroute van honingbijen via guttatie kwalitatief meegenomen. Met de nieuwe EFSA guidance komt kwantitatieve methodiek beschikbaar.

Als laatste noemen de auteurs een aantal artikelen waarin de meerdere oorzaken van achteruitgang van honingbijen worden besproken. Het is algemeen geaccepteerd, ook bij het Ctgb, dat gewasbeschermingsmiddelen hier niet de enige oorzaak van zijn. Ziekten en plagen en intensivering van de landbouw (waardoor de beschikbaarheid van bloemen in het landschap afnam) spelen zeker een grote rol. De rol van bestrijdingsmiddelen (en dus niet alleen neonicotinoïden) is nog altijd niet duidelijk. Momenteel vindt een groot monitoringsonderzoek (alleen gericht op honingbijen) plaats in opdracht van EZ<sup>4</sup> waarin wordt gekeken naar de gezondheid, omgevingsfactoren en belasting met bestrijdingsmiddelen van bijenvolken in Nederland. Het onderzoek wordt uitgevoerd door een consortium dat bestaat uit Naturalis, Bijen@wur, Alterra en het Nederlands Centrum voor Bijenonderzoek (NCB). Het loopt tot eind 2017 en zal hopelijk meer duidelijkheid geven over de rol van bestrijdingsmiddelen.

Commented 5.1.2.e 5.1.2.e had je expres deze verwijzing weggehaald?

#### ▪ Toxische effecten van planten (op honingbijen)

De auteurs geven een overzicht van concentraties in nectar en stuifmeel na zaadcoating en na 'drenching', het doorweken van een bodem of substraat met vloeistof waarin een werkzame stof is opgelost of druppelbehandeling. De gehalten na drenching zijn veel hoger dan bij zaadbehandeling. Dit is niet vreemd, aangezien bij bevoeiing en druppelbehandeling volgroeide en soms al bloeiende planten worden behandeld en de a.s. direct naar de bloem kan worden getransporteerd, terwijl bij zaadbehandeling eerst de plant nog uit het zaad moet opgroeien voor er een bloem kan ontstaan. Er worden geen gehalten gegeven voor toepassing na bespuiting.

Blootstelling aan nectar of stuifmeel uit bloemen die behandeld zijn via drenching of bespuiting, kunnen volgens de auteurs zulke hoge concentraties tot gevolg hebben dat deze tot directe sterfte van bijen kunnen leiden. Bij weten van Ctgb is in Nederland nog nooit een relatie is gevonden tussen een toegelaten toepassing van een neonicotinoïde en sterfte van honingbijen, terwijl onverwachte sterfte van honingbijen door de imker gemeld kan worden aan de NVWA en dan onderzocht wordt of er een relatie is met een bestrijdingsmiddel. Op basis hiervan verwacht Ctgb in Nederland in bloeiende planten geen concentraties die kunnen leiden tot acute sterfte van honingbijen.

<sup>4</sup> <http://www.wageningenur.nl/nl/nieuws/Nieuw-meerjarig-observatieonderzoek-surveillance-studie-bijengezondheid-in-Nederland.htm>

Bij een risicobeoordeling van een middel dat in Nederland in aanvraag is wordt gekeken welke residugehaltes te verwachten zijn bij dat specifieke gewas bij de specifieke teeltomstandigheden. Ook wordt rekening gehouden met alle meetwaarden, inclusief gemiddeldes en ranges. De getallen die genoemd worden in het EASAC-rapport zijn dus niet zomaar door te trekken naar de Nederlandse situatie.

Imidacloprid, thiamethoxam en clothianidin zijn momenteel, conform de Europese restricties, niet toegelaten in bijkantrekkelijke gewassen die in het veld behandeld worden. De belangrijkste blootstellingsroute voor bijen is via nectar en pollen van direct behandeld gewas. Met het verbieden van toepassing in bijkantrekkelijke gewassen is deze route uitgeschakeld. Via driftreducerende maatregelen wordt belasting buiten het veld tot een minimum teruggebracht. Ook de blootstelling via onkruiden in het veld, drinkwater en volggewassen wordt laag geacht. De nog toegelaten toepassingen kunnen volgens Ctgb toegelaten blijven tot de volgende herbeoordeling van deze stoffen.

De andere twee in Nederland toegelaten neonicotinoïden, thiacloprid en acetamiprid, mogen wel in het veld toegepast worden op bijkantrekkelijke gewassen. De risico's van deze twee stoffen voor bijen zijn hoogstwaarschijnlijk lager dan voor imidacloprid, thiamethoxam en clothianidin, gezien de veel lagere acute toxiciteit. Ook uit de openbare literatuur blijkt dat de toxiciteit van deze twee stoffen niet vergelijkbaar is met die van de andere drie neonicotinoïden. Ctgb stelt daarom voor dat voor wat betreft het risico voor bijen het niet nodig is deze toepassing direct te herbeoordelen.

Commented [5.1.2]: (6): 5.1.2 checkt nogmaals

#### ▪ Letale vs. subletale effecten voor honingbijen

In twee in het EASAC-rapport aangehaalde artikelen, Goulson (2013) en Godfray et al (2014) (Ctgb gaat niet in detail in op deze twee reviews), wordt geconcludeerd dat veldrealistische concentraties in nectar en stuifmeel geen schadelijke directe effecten op honingbijen opleveren. Het EASAC-rapport benadrukt echter dat subletale effecten, bijvoorbeeld effecten op navigatiecapaciteit, leergedrag of communicatie, zulke ernstige effecten hebben kunnen op een honingbijvolk dat ze instorting van het volk tot gevolg kunnen hebben, zelfs al zijn er geen direct letale effecten op individuele honingbijen (Desneux et al. 2007, een review waar Ctgb niet in detail in gaat). Het EASAC-rapport haalt 21 studies aan (in Box A4.1) en concludeert daaruit dat het nodig is om de risicobeoordeling voor bijen te baseren op neuro-ontwikkelings- en neurogedragseindpunten. Vanwege het belang van deze studies worden ze vrijwel allemaal apart besproken (elders in dit document).

Volgens de datavereisten kunnen subletale effecten zoals gedrags- en reproductie-effecten op bijen en, indien toepasbaar, op bijenvolken, gevraagd worden. Het is op basis van de huidige kennis echter moeilijk om subletale effecten die in laboratoriumstudies gevonden worden, in een risicobeoordeling te gebruiken. Het moet dan bekend zijn hoe zo'n effect ingrijpt op de populatie. Dit is voor sommige effecten makkelijker in te schatten dan voor andere, maar voor geen enkel effect is de exacte invloed bekend. Ook moet een blootstellingsroute bekend zijn en moeten er triggerwaarden zijn om een effect/blootstellingsverhouding mee te vergelijken. Al deze dingen ontbreken nu, en Ctgb kan dus niet zomaar subletale effecten meenemen in de risicobeoordeling. Ook in de nieuwe EFSA guidance worden subletale effecten niet meegenomen. Op pagina 10 staat hierover: *'sublethal effects observed in individual bees have the potential to affect the development and the survival of the colonies. However, it is not possible with the information available to the working group to make a quantitative link between sublethal effects observed in first tier laboratory studies and effects on colonies. This could underestimate the risk in lower tiers'*

Het beschermdoel voor bijen is volgens de Uniforme Beginselen: geen onaanvaardbare effecten op de larven en het gedrag van de honingbij, de overlevingskans van de kolonie en de ontwikkeling hiervan.

In het huidige toetsingskader is dit beschermdoel niet duidelijk uitgewerkt. In hogere tier effectstudies worden meestal de parameters mortaliteit van volwassen bijen, gedrag inclusief foeragegedrag, en status van het volk inclusief broed meegenomen. Er is expert judgement vereist voor de interpretatie van de studieuitkomsten.

In de nieuwe EFSA guidance ligt meer vast over het beoordelen of het beschermdoel gehaald wordt.

Het specifieke beschermdoel voor honingbijen in de EFSA guidance is (uit hoofdstuk 2): *the magnitude of effects on colonies should not exceed 7% reduction in colony size. Foragers mortality should not be increased compared with controls by a factor of 1.5 for six days or a factor of 2 for three days or a factor of 3 for two days.*

Voor stoffen die alleen effecten hebben op larven, zijn broedeffecten de relevante parameter in semi-veld en veldtesten (GD Appendix O, p. 211).

Voor stoffen die (ook) effecten hebben op volwassen bijen, zijn in hogere tier testen de volgende parameters relevant:

- primaire parameters: mortaliteit van foerageersters, aantal bijen in het volk, overwintersucces.
- Secundaire parameters: gedrageffecten inclusief foeragegedrag

De secundaire parameters hebben geen link met het specifieke beschermdoel en kunnen dus op zichzelf geen aanleiding geven voor een beslissing tot afwijzing of restricties. Ze kunnen wel helpen om effecten op de primaire parameters beter te begrijpen.

#### ▪ Honingbijen vs. andere bijen

Het EASAC-rapport wijst er op dat effectdata voor de honingbij niet per se relevant zijn voor andere bijen.

Het huidige toetsingskader voor bijen gebruikt de honingbij als indicatorsoort voor andere bijen. De intrinsieke gevoeligheid van de honingbij kan verschillen van andere soorten, maar belangrijker nog, de blootstellingsroutes zijn soms heel anders. Sommige solitaire bijen nestelen bijvoorbeeld in de bodem en worden dus mogelijk blootgesteld aan bodemconcentraties van bestrijdingsmiddelen. Deze route is voor de honingbij niet relevant. Verder maakt de sociale levenswijze van de honingbij dat effecten op individuele honingbijen niet per se effect hoeven te hebben op het voortbestaan van het volk. Bij een negatief effect op een solitair levend insect is er een veel grotere kans op een verstoring van de reproductie van dat individu.

Het nieuwe EFSA guidance document is onder andere ontwikkeld om meer aandacht te besteden aan andere bijen dan de honingbij. Er worden in deze guidance ook toxiciteitsdata gevraagd voor andere soorten. Als deze guidance straks gebruikt gaat worden, zal de risicobeoordeling dus beter dekkend zijn voor alle soorten bijen. Ctgb merkt echter op dat het guidance document weinig aandacht besteed aan blootstellingsroutes die niet ook voor de honingbij gelden (op pagina 11 van de guidance staat: *'exposure by residues in the soil is not currently considered in the risk assessment scheme because it was not possible to link the concentration in the soil to the effects on bees'*). Ook wordt blootstelling via was en honingdauw niet meegenomen, routes die voor allerlei soorten bijen van belang kunnen zijn. Er blijven dus ook bij ingebruikname van de nieuwe guidance blootstellingsroutes onderbelicht. Het belang van deze blootstellingsroutes ten opzichte van blootstellingsroutes

die wel deel uit maken van het toetsingskader is op dit moment niet goed te kwantificeren. Naar de mening van Ctgb zijn de meeste hiervan van mineur belang vergeleken met de routes die al wél meegenomen zijn. De route via verontreinigd nestelmateriaal of nestelplekken, met name via de bodem, is potentieel wel van belang. Er is echter meer onderzoek nodig voordat concentraties in de bodem gekoppeld kunnen worden aan een effect op bijen (zoals de EFSA guidance al aangeeft).

Voor hommels en solitaire bijen zijn de eerste tier triggers gebaseerd op dezelfde criteria als voor honingbijen, maar dan met een aanvullende veiligheidsfactor.

In hogere tier studies worden voor hommels en solitaire bijen wél subletale parameters expliciet meegenomen. De volgende beschermdoelen worden gegeven:

- Voor hommels (in Appendix P): *The effects should not be more than 7% on total reproductive output, queen versus male production and queen survival and capacity to nest.*
- Voor solitaire bijen (in Appendix Q): *not more than 7% difference compared to controls in cell production rate, off-spring production and sex ratio, progeny survival and vigour (the vigour can be assessed measuring the adult longevity after emergence) until next spring.*

De meeste studies zijn uitgevoerd met doseringen die relevant zijn voor zaadbehandelingen van gewassen die later gaan bloeien (zoals koolzaad). Op basis van de studies die in dit document worden besproken, blijken op veldniveau over het algemeen geen schadelijke effecten op honingbijen. Het is echter duidelijk dat op hommels en solitaire bijen mogelijk wel schadelijke effecten optreden bij blootstelling aan zaadbehandelde bloeiende gewassen. Op veldniveau is dit gevonden in een recent onderzoek dat in Nature is gepubliceerd (Rundlöf et al. 2015, zie bespreking elders in dit document). Deze toepassingen zijn momenteel in Europa niet toegestaan en Ctgb beveelt aan dit zo te houden tot onderzoek heeft uitgewezen dat er geen schadelijke effecten zijn. Voor spuittoepassing in bloeiende gewassen zijn vrijwel geen residuegegevens aanwezig en het is daarom moeilijk te zeggen of de geteste doseringen hiervoor relevant zouden zijn. Spuittoepassing in bloeiende gewassen is momenteel alleen toegestaan ná de bloei en Ctgb beveelt aan dit zo te houden. In Nederland zijn ook alle andere typen toepassing alleen toegestaan in gewassen die niet in bloei komen.

Commented 5.1.2.e Evt hierinvoegen discussiepunt College appel/peer, en aardappel

#### ▪ Acute vs. chronische effectdata

Suchail et al. 2001 (onderzoek naar de orale toxiciteit van imidacloprid voor de honingbij, acuut en chronisch; dit onderzoek wordt besproken in de DAR van imidacloprid en niet valide geacht voor gebruik in de risicobeoordeling), Charpentier et al. 2014 (onderzoek naar de verhouding tussen acute en chronische toxiciteit van imidacloprid voor fruitvliegjes, zie bespreking elders in dit document) en Rondeau et al. 2014 (vergelijking van gepubliceerde acute en chronische toxiciteitsdata van imidacloprid voor mieren, termieten en honingbijen, dit artikel is niet in detail besproken) vonden dat de toxiciteit van een bepaalde dosering imidacloprid hoger wordt naarmate de geteste organismen langer blootgesteld werden. Op basis hiervan wijzen de auteurs erop dat alleen onderzoek naar acute sterfte niet voldoende is. Dit is een valide punt, zeker voor stoffen die langere tijd in voedselbronnen aanwezig kunnen zijn. De nieuwe dataverenisten voor bijen eisen daarom niet alleen een acute mortaliteitstest (6 uur blootstelling, observatie maximaal 96 u) maar ook een chronische (10 dagen lang blootstelling en observatie). Bovendien vraagt de EFSA guidance om, als er aanwijzingen zijn voor accumulatieve toxiciteit, dit verder te testen in hogere tier studies.

#### ▪ Veldstudies

Momenteel wordt de risicobeoordeling gericht op effecten op honingbijvolkniveau in het veld. De auteurs van het EASAC-rapport stellen dat het bijzonder moeilijk is om goede veldstudies uit te voeren om verschillende redenen:

- vanwege de aanzienlijke straal van het foerageergebied rond een volk van zowel honingbijen als hommels, waardoor overlap tussen controle en testvelden makkelijk optreedt;
- omdat neonicotinoiden zoveel gebruikt worden dat het moeilijk is een onbesmette controlelocatie te vinden;
- omdat er zoveel variabelen in een veldsituatie zitten dat het twijfelachtig is of één experiment subtiele effecten wel voldoende dekt en extrapolatie naar andere situaties lastig is;
- en vanwege het feit dat er zoveel andere factoren dan bestrijdingsmiddelen meespelen bij de gezondheid van bijen.

Ctgb merkt op dat de EFSA deze problemen met veldstudies heeft onderkend en in haar nieuwe guidance document bijzonder strenge eisen stelt aan veldstudies, maar dat het in EFSA's optiek mogelijk blijft om veldstudies uit te voeren als hoogste tier van de risicobeoordeling. Ctgb sluit zich hierbij aan.

#### ▪ Cumulatieve effecten

Het EASAC-rapport noemt voorts het onderwerp dat bijen niet slechts aan één stof tegelijkertijd worden blootgesteld, maar aan verschillende stoffen. Zoals blijkt uit diverse onderzoeken, worden er veel verschillende stoffen aangetroffen in honingbijvolken, zowel insecticiden en fungiciden als acariciden (tegen Varroa) en andere gewasbeschermingsmiddelen.

De risicobeoordeling van een aangevraagd middel behandelt alleen de risico's van de stof of stoffen die in dat middel zitten, en eventueel additioneel de risico's van bij naam en met dosering genoemde stoffen in een tankmix. In de praktijk worden middelen heel vaak tegelijk of vlak na elkaar toegepast. Bijen (en overigens ook alle andere niet-doelwitorganismen) worden dus tegelijkertijd of vlak na elkaar belast met verschillende stoffen. Dit wordt momenteel niet in de risicobeoordeling meegenomen. Inmiddels zijn op Europees niveau initiatieven (door EFSA) gestart om te onderzoeken op welke wijze dergelijke cumulatieve effecten binnen de risicobeoordeling van gewasbeschermingsmiddelen meegenomen kunnen worden. Mede vanwege de complexiteit van dit onderwerp is het niet te verwachten dat deze effecten op korte termijn deel zullen uitmaken van het vigerende toetsingskader. Er bestaan vele onbekende factoren in een cumulatieve beoordelingsaanpak, en beïnvloedende factoren zijn niet alleen het gebruik van gewasbeschermingsmiddelen, maar bijvoorbeeld ook landbouwmethodieken en lokale biodiversiteit, waarbij het zeer complex is om tot een protocol te komen dat kan worden toegepast in de beoordelingssystematiek voor de toelating. Het is de vraag of, gelet op het feit dat bij de beoordeling van individuele middelen wordt gebruikt met een "worst case" benadering en gebruik wordt gemaakt van veiligheidsfactoren de berekening van cumulatieve effecten zal leiden tot fundamenteel andere uitkomsten.

De risico's van het optreden van synergisme (toxiciteit van een mengsel is hoger dan de optelsom van de toxiciteit van de afzonderlijke componenten) zijn in 2013/4 door Ctgb onderzocht in opdracht van EZ? – (door 5.1.2.e & 5.1.2.e )

5.1.2.e verwijzing naar advies, volgens mij was de uitkomst dat we ons over synergisme (=hogere toxiciteit van de combi dan de optelsom van de toxiciteit van de individuele stoffen) geen zorgen hoeven te maken. Als dat inderdaad zo is, lijkt het me goed om dat hier op te nemen. Temeer daar cumulatief en synergistisch nogal eens door elkaar wordt gehaald.

Commented 5.1.2.e ; 5.1.2.e wat is de bron hiervan? Dit stukje moet nog aangepast worden in lijn met de hoofdtekst.

Commented 5.1.2.e ; Ik heb het inmiddels ook nagevraagd bij 5.1.2.e (12/06 per mail).

#### ▪ **Combinatie-effecten met ziekten en plagen**

Het EASAC-rapport handelt ook over de mogelijke interacties tussen insecticiden en ziekten en plagen. De studies waar naar wordt gerefereerd zijn veelal geheel of gedeeltelijk uitgevoerd in het laboratorium of zelfs op moleculair niveau en over het algemeen met erg hoge doseringen Nosema (een parasiet) en actieve stof.

Het is algemeen bekend dat organismen gevoeliger zijn voor een stressor (zoals een bestrijdingsmiddel) als zij tegelijkertijd aan een andere stressor (zoals een ziekte, of bijvoorbeeld voedselgebrek) blootgesteld worden. Het toetsingskader biedt echter geen ruimte om dit mee te nemen. Geteste organismen moeten vrij zijn van ziekten, of in ieder geval van symptomen van ziekte. Ctgb beveelt aan hier meer aandacht aan te besteden in toekomstige risicobeoordelingsmethodiek.

#### ▪ **Bespreking van individuele studies uit de openbare literatuur**

##### Effecten op bijen van gewasbeschermingsmiddelen

###### ▪ *Effect van thiamethoxam op levensduur van honingbij (Oliveira et al 2013)*

Dit onderzoek toont aan dat de sterfte van geafrikaniseerde honingbijen in het lab toeneemt bij langere blootstellingsduur aan dezelfde concentratie. Dit benadrukt het belang van het meenemen van chronische toxiciteit, wat gaat gebeuren op basis van de nieuwe dataveren en de nieuwe EFSA guidance.

###### Uitgebreide samenvatting:

In dit Braziliaanse onderzoek zijn honingbijen (*Apis mellifera mellifera* x *A.m. scutellata*, de 'geafrikaniseerde honingbij', 0-24 u oud) in het lab blootgesteld aan 0.428 ng thiamethoxam/ $\mu$ L/d of 0.0428 ng a.i./ $\mu$ L/d, 1/10 en 1/100 van de eerder in de studie bepaalde acute LD50. Bijen zaten in kooitjes in groepen van 25, met slechts één groep per dosering. Bij 1/10 van de acute LD50 werd een 41.2% reductie van de levensduur gevonden (overleving was 8.04 d in de controle en bij 1/100 LD50, en 5.22 d bij 1/10 LD50). Bij dissectie werden bij 1/10 LD50 fysiologische verschillen gevonden in de hersenen en darm van de bijen. De gegeven doseringen zijn niet geheel duidelijk aangezien de onderzoekers blijven rapporteren in ng/ $\mu$ L/d. Volgens de onderzoekers konden de bijen elke dag 10  $\mu$ L vloeistof opnemen, wat zou betekenen dat de verkorte levensduur en de fysiologische effecten optraden bij een dagelijkse dosis van 0.428 ng/bee/d. Het onderzoek wijst op het belang van het meenemen van chronische toxiciteit, wat gaat gebeuren op basis van de nieuwe dataveren en EFSA guidance. De bevindingen over de fysiologische verschillen zijn momenteel niet te gebruiken in de risicobeoordeling.

###### ▪ *Effect van imidacloprid op gewicht van hommenvolken (Whitehorn et al. 2012)*

Na twee weken continue blootstelling aan behandeld stuifmeel (6 of 12 ppb) en suikerwater (0.7 of 1.4 ppb) in het lab en daarna zes weken vrij foerageren in het veld waren hommenvolkjes lichter dan de controle en hadden ze veel minder koninginnen geproduceerd. In Nederland heeft imidacloprid als zaadbehandeling momenteel geen toelating in gewassen die aantrekkelijk zijn voor bijen. De geteste blootstellingsconcentraties zijn daarmee niet relevant voor de Nederlandse situatie. Bovendien is het gebruikte blootstellingsregime erg worst case en onrealistisch voor de praktijksituatie.

###### Uitgebreide samenvatting:

In deze test met imidacloprid en hommenvolken (*Bombus terrestris*) werd het effect onderzocht van twee verschillende concentraties imidacloprid in voedsel: een lage (stuifmeel



6 ug/kg, suikerwater 0.7 ug/kg) en een hoge (stuifmeel 12 ug/kg, suikerwater 1.4 ug/kg). Volken werden twee weken blootgesteld in het laboratorium en daarna zes weken in het veld gezet waar zij zelf naar believen konden foerageren. Bij beide doseringen zijn negatieve effecten gevonden op gewicht van het hommelvek (8 en 12% voor de lage en hoge dosering) en op productie van koninginnen (2.0 en 1.4 koninginnen/volk in de lage en hoge dosering, versus 13.72 in de controle).

De gebruikte lage dosering bootst volgens het artikel 'field-realistic' concentraties na in nectar en pollen van gewassen die zaadbehandeling hebben gehad met imidacloprid (met name koolzaad). In Nederland heeft imidacloprid als zaadbehandeling momenteel echter geen toelating in gewassen die aantrekkelijk zijn voor bijen. De geteste blootstellingsconcentraties zijn dus minder relevant voor de Nederlandse situatie. Bovendien is het gebruikte blootstellingsregime, waarbij 100% van het voedsel van het gehele volk imidacloprid bevat gedurende twee weken, erg worst case en onrealistisch voor de praktijksituatie, waarin foerageerders waarschijnlijk verschillende voedselbronnen zullen gebruiken. Controlevolken kregen onbehandeld stuifmeel en nectar (dus geen suikerwater) waardoor de controle niet volledig te vergelijken is met de testgroepen). Het is interessant dat er duidelijke effecten waren van beide testconcentraties, maar geen echte dosis-response relatie.

- *Effect van imidacloprid en clothianidin op overleving van de koningin en werksteractiviteit in hommelveken. (Scholer and Krischik 2014)*  
De auteurs concluderen dat negatieve effecten op hommels te verwachten zijn bij chronische blootstelling aan neonicotinoiden vanaf 20 ppb in het lab. Dit onderzoek is weinig realistisch wat betreft de blootstellingsduur (elf weken onafgebroken verontreinigd voedsel) en ook wat betreft de hoogte van veel van de testconcentraties, aangezien in Nederland toepassingen van imidacloprid en clothianidin in bloeiende gewassen momenteel niet zijn toegestaan.

#### Uitgebreide samenvatting:

In dit onderzoek werden hommelveken (*Bombus impatiens*, 8 volken per testgroep, 9 in de controle) 11 weken blootgesteld in het laboratorium aan suikersiroop dat imidacloprid of clothianidin bevatte in concentraties van ca. 10, 20, 50 of 100 ppb. Sterfte van de koningin was na zes weken verhoogd bij 50 en 100 ppb en na 11 weken bij 20, 50 en 100 ppb. Er werd geen effect gevonden op beweging van de koningin. De meeste hommels werksters echter verzamelden geen voedsel meer, maar zaten uitgeblust wekenlang bij de feeder (het is onduidelijk of dit ook in de controle voorkwam). Er was een statistisch significant effect op werksterbeweging bij 20 en 50 ppb (bij 100 ppb bewogen er zo weinig hommels dat analyse niet mogelijk was). Er was ook een significant effect op de suikersiroopconsumptie van het volk: hoe hoger de dosis, hoe minder siroop opgenomen werd in het nest. Ook werden dan minder potten gemaakt. Gewicht van het nest was significant lager bij 10-100 ppb imidacloprid en bij 20-100 ppb clothianidin. Dit werd gemeten na 11 weken óf wanneer de koningin stierf, dus volken waar de koningin vroeg stierf hadden ook minder tijd om voedsel te verzamelen en te groeien. Volkgewicht en koninginsterfte zijn daarom gelinkte parameters. Er was geen specifiek effect op broed, aangezien er overall evenveel dood broed gevonden werd. De hoeveelheid levend broed was wel duidelijk verlaagd in de testgroepen, wat uiteraard ook gelinkt is aan de overleving van de koningin. De opgeslagen siroop in het nest bevatte veel minder a.s. dan de aangeboden oplossing. De auteurs concluderen dat negatieve effecten op hommels te verwachten zijn bij chronische blootstelling aan neonicotinoiden vanaf 20 ppb. Ook dit onderzoek is worst case wat betreft de blootstellingsduur (elf weken onafgebroken verontreinigd voedsel) en ook wat betreft de hoogte van veel van de testconcentraties, aangezien in Nederland toepassingen in bloeiende gewassen momenteel niet zijn toegestaan. Verder is dit een onderzoek in laboratoriumsetting en zouden deze effecten op veldniveau onderzocht moeten worden.

- *Effect van imidacloprid op vruchtbaarheid van hommelveken (Laycock et al 2012)*

Hier wordt een duidelijke afname van broedproductie van werksters gesignaleerd bij 13 dagen blootstelling aan imidacloprid, met een vermindering van één-derde bij 0.8 ppb, gekoppeld aan een afname in voedselopname. De auteurs concludeerden dat voor het werkelijk begrijpen van de effecten op fertiliteit het nodig is om de dieetinvloeden te onderzoeken op koninginnen in plaats van op werksters. Ook stelden zij dat het nodig is de herstelmogelijkheid te onderzoeken van hommels, na de massale bloei van een neonicotinoïde-zaadbehandeld gewas zoals koolzaad.

#### Uitgebreide samenvatting:

Microcolonies van 4 of 5 hommelmeksters (*Bombus terrestris*) zonder koningin werden in het laboratorium 13 dagen gevoerd met siroop met 125, 50, 20, 8, 3.2, 1.28, 0.51, 0.20, 0.08 en 0 microgram/L imidacloprid, plus onbehandeld pollen. Er trad vrijwel geen sterfte op bij de werksters. Wel werden negatieve effecten op vruchtbaarheid van de werksters gevonden met een duidelijke dosis-respons relatie, waaruit de auteurs afleidden dat een concentratie rond de 1 ppb (0.8 ppb obv erratum) broedproductie met één derde kan verminderen. Zij namen echter ook een significante reductie waar in het foerageren op siroop en pollen. Bij statistische controle van de geconsumeerde dosis werd gevonden dat die kolonies die meer siroop en pollen consumeerden, meer broed produceerden. Zij wierpen vervolgens de hypothese op dat de reden voor de nadelige effecten op broedproductie te maken hadden met voedsellimitatie, veroorzaakt door het onvermogen zich te voeden. Zij concludeerden dat voor het werkelijk begrijpen van de effecten op fertiliteit het nodig is om de dieetinvloeden te onderzoeken op koninginnen in plaats van op werksters. Ook stelden zij dat het nodig is de herstelmogelijkheid te onderzoeken van hommels, na de massale bloei van een neonicotinoïde-zaadbehandeld gewas zoals koolzaad. [Zie Laycock & Cresswell (2013), waarin deze zaken onderzocht zijn]

- *Effect van imidacloprid op vruchtbaarheid van hommels* (Laycock & Cresswell 2013). (deze studie is niet opgenomen in het EASAC-rapport. Er blijkt uit dat hommels herstelcapaciteit hebben)

Voortzetting van het onderzoek van Laycock et al. 2012. Labstudie met pulsdosering ter simulatie van bloei van koolzaad: 14 dagen blootstelling aan siroop met imidacloprid, daarna 14 dagen zonder. Tijdens de 14-d blootstellingsperiode werd een duidelijke dosis-response relatie gevonden: hoe hoger de dosering, hoe minder broed werd geproduceerd. Herstel trad op in de tweede helft van de test, met onbehandelde siroop. De auteurs concluderen dat er mogelijk effecten optreden op de grootte en fitness van hommels bij een gepulseerde blootstelling aan imidacloprid van meer dan 10 ppb.

Blootstelling aan imidacloprid leidt tot een algehele vermindering van eetlust of capaciteit om te eten, aangezien zowel pollen- als siroopconsumptie gereduceerd werd maar alleen de siroop behandeld was. De hypothese van Laycock et al. (2012) dat reductie in broedproductie werd veroorzaakt door een gebrek aan nutriënten, wordt ondersteund door dit onderzoek, aangezien volken die meer siroop en pollen aten, ook meer broed produceerden, reductie in voedselopname dosisgerelateerd was, reductie van broedproductie samenviel met reductie in voedselopname, en herstel van deze twee parameters ook tegelijkertijd optrad toen de imidacloprid blootstelling weggenomen was.

De auteurs zeggen dat andere parameters dan broedproductie mogelijk minder makkelijk herstellen (zoals de productie van koninginnen, de parameter die in Whitehorn et al. (2012) een groot effect liet zien) en zouden graag meer onderzoek naar de herstelcapaciteit van deze andere parameters zien.

Dit onderzoek is zeer interessant aangezien het een gepulseerde blootstelling nabootst, relevant voor een kort bloeiend aantrekkelijk gewas. Aangezien in Nederland toepassingen van imidacloprid in bloeiende gewassen momenteel niet zijn toegestaan, heeft het geen consequenties voor de huidige toelatingen.

#### Uitgebreide samenvatting:

Microkolonies (één koningin en vier werksters) van *Bombus terrestris* L. bumble bees werden in het laboratorium 14 dagen gevoerd met siroop met 125, 0, 20, 8, 3.2, 1.28, 0.51, 0.2, 0.08 en 0 ug/L imidacloprid (ca. 100, 40, 16, 6, 2.5, 1, 0.4, 0.16, 0.06 en 0 ppb), plus onbehandeld pollen. Daarna werden ze 14 dagen gevoerd met onbehandelde siroop om de herstelcapaciteit te testen na zo'n gepulseerde dosering, waarmee de massale bloei van een neonicotinoïde-zaadbehandeld gewas zoals koolzaad wordt nagebootst. Er waren drie volken per behandeling. Het experiment is twee keer uitgevoerd, wat leidt tot in totaal zes volken per dosering.

Er trad geen sterfte op bij de koninginnen en nauwelijks bij de werksters. Tijdens de 14-d blootstellingsperiode werd een duidelijk dosis-response relatie gevonden: hoe hoger de dosering, hoe minder broed werd geproduceerd. Er werden een EC50 en EC10 van 1.44 en 0.15 ppb afgeleid voor broedproductie. Tijdens de 14-d herstelperiode werd dosis-gerelateerd herstel waargenomen. Herstel was niet volledig bij hogere concentraties. Voor de totale 28-d periode worden een EC50 en EC10 van >98 en 2.5 ppb afgeleid. De auteurs berekenen dat 14 dagen blootstelling aan 0.3-10 ppb imidacloprid broedproductie kan verminderen met 18-84%, maar dat de herstelcapaciteit bij deze concentraties zo groot is dat twee weken onbehandeld voedsel na de blootstellingsperiode ervoor zorgt dat de reductie in broed zakt naar 2-19%.

Er werd ook een experiment uitgevoerd waarin volken vier weken lang met 0 (7 volken) of 100 (5 volken) ppb gevoerd werden. Hiermee werd bepaald dat het herstel in broedproductie hoogstwaarschijnlijk veroorzaakt werd door het wegnemen van de imidacloprid en niet door gewenning aan langdurige blootstelling.

Tijdens de blootstellingsperiode was er geen effect op de timing van de eerste eileg, maar in de herstelperiode werd de eileg vertraagd bij volken die een hogere dosering hadden gehad. Tijdens de blootstellingsperiode was er een dosisgerelateerde reductie in de consumptie van siroop en pollen (siroop EC50/EC10 >98 / 23.6 ppb, pollen EC50/EC10 4.4 / 0.2 ppb). Tijdens de 14-d herstelperiode werd dosis-gerelateerd herstel waargenomen. Herstel was niet volledig. Voor de totale 28-d periode worden een EC50 / EC10 van 43.7 / 16.2 ppb afgeleid voor reductie in pollenconsumptie en een EC50 en EC10 van >98 en 32.4 ppb voor reductie in siroopconsumptie.

Aangezien er herstelcapaciteit is voor effecten op broedproductie, maar deze bij hogere dosering niet volledig is, en er bij hogere dosering bovendien een vertraging in de eileg optreedt in de herstelperiode, concluderen de auteurs dat er mogelijk effecten optreden op de grootte en fitness van hommenvolken bij een gepulseerde blootstelling aan imidacloprid bij meer dan 10 ppb.

Blootstelling aan imidacloprid leidt blijkbaar tot een algehele vermindering van eetlust of capaciteit om te eten, aangezien zowel pollen- als siroopconsumptie gereduceerd werd maar alleen de siroop behandeld was. De hypothese van Laycock et al. (2012) dat reductie in broedproductie werd veroorzaakt door een gebrek aan nutriënten, wordt ondersteund door dit onderzoek, aangezien volken die meer siroop en pollen aten, ook meer broed produceerden, reductie in voedselopname dosisgerelateerd was, reductie van broedproductie samenviel met reductie in voedselopname, en herstel van deze twee parameters ook tegelijkertijd optrad toen de imidaclopridblootstelling weggenomen was. De auteurs zeggen dat andere parameters dan broedproductie mogelijk minder makkelijk herstellen (zoals de productie van koninginnen, de parameter die in Whitehorn et al. (2012) een groot effect liet zien) en zouden graag meer onderzoek naar de herstelcapaciteit van deze andere parameters zien.

Het is opvallend dat deze studie niet in het EASAC rapport opgenomen is. Er blijkt uit dat hommels herstelcapaciteit hebben. Het weglaten van juist dit onderzoek werpt enige twijfel op over de neutraliteit van de auteurs van het EASACrapport.

- *Effect van thiamethoxam op vruchtbaarheid van hommenvolken (Laycock et al 2013)*  
Net als in Laycock et al 2012 met imidacloprid wordt een duidelijke afname van broedproductie van werksters gesignaleerd bij 17 dagen blootstelling aan thiamethoxam, maar pas bij hogere concentraties (vanaf 39 ppb). Verminderde

broedproductie is ook hier gekoppeld aan een afname in voedselopname. Ook hier stellen de auteurs dat dit onderzoek herhaald moet worden met koninginnen om werkelijk iets te kunnen zeggen op effect op de broedproductie van hommelveolken. Microcolonies van 4 hommewerksters (*Bombus terrestris subsp. audax*) zonder koningin werden in het laboratorium 17 dagen gevoerd met fructose/glucose/saccharose-oplossing met 98.43, 39.37, 15.75, 6.30, 2.52, 1.01, 0.40, 0.16, 0.06 en 0 microgram/kg thiamethoxam, plus onbehandeld pollen (9 volkjes/concentratie, 9 in de controle). Er was een significante reductie in het foerageren op siroop en pollen en op de hoeveelheid geproduceerd broed bij 39 en 98 ppb. Net als voor imidacloprid in Laycock et al. 2012, werd een relatie gevonden tussen verminderde voedselopname en verminderde broedproductie. De levensduur van werksters was significant lager bij 98 ppb. De gevoeligheid van *Bombus terrestris* voor thiamethoxam lijkt lager dan die voor imidacloprid (vergelijk Laycock et al 2012) maar dit moet volgens de auteurs nog onderzocht worden met hommels van hetzelfde volk. Ook hier stellen de auteurs dat dit onderzoek herhaald moet worden met koninginnen om werkelijk iets te kunnen zeggen op effect op de broedproductie van hommelveolken.

- *Effect van neonicotinoïden op chronische mortaliteit en reproductie van hommels (Mommaerts et al. 2010)*

Dit laboratoriumonderzoek laat zien dat de effecten op hommels groter zijn wanneer foerageeractiviteit van de hommels nodig is dan wanneer ze direct bij hun broed gevoerd worden. Hetzelfde resultaat werd gevonden toen de proef in een semi-veldopstelling (in de kas) werd herhaald. De auteurs pleiten er daarom voor dat een hommelttest in het laboratorium zoals door hen ontwikkeld, opgenomen wordt in de datavereisten. In het EFSA GD is een dergelijke test echter niet opgenomen; foerageeractiviteit zal alleen worden meegenomen in semi-veld en veldtesten. Verder leiden de auteurs op basis van al hun data een NOEC af van 2 ppb imidacloprid voor hommels, en concluderen zij dat thiamethoxam iets minder toxisch is dan imidacloprid en thiacloprid veel minder toxisch dan de andere twee. Dit onderzoek is relevant voor gebruik van neonicotinoïden in bloeiende gewassen, iets wat momenteel van de drie geteste stoffen alleen is toegestaan voor thiacloprid. **Aangezien het onderzoek aantoont dat de risico's van thiacloprid lager zijn dan die van bijvoorbeeld imidacloprid, is acuut ingrijpen in de toelatingen van thiacloprid niet nodig. Ctgb wacht hierin de ontwikkelingen in Europa af.**

#### Uitgebreide samenvatting:

Dit onderzoek is uitgevoerd met kleine nesten hommels (*Bombus terrestris*, 5 werksters, geen koningin). Om de chronische mortaliteit en het effect op reproductie van drie neonicotinoïden te testen werden de volken elf weken gevoerd met behandeld suikerwater in een kunstnest in het laboratorium. In een ander laboratoriumexperiment werd ook foerageergedrag meegenomen. Daar werd elk volk in een kunstmatige neststructuur gezet waarbij twee nesten zijn verbonden met een buis van ca. 20 cm. In één nest wordt het broed opgeslagen, in het andere wordt suikerwater en pollen aangeboden. Ook hier werd elf weken gevoerd. Naast mortaliteit en reproductieeffecten werd ook gedrag en opname van suikerwater geobserveerd. Suikerwater was onbehandeld, of bevatte een neonicotinoïde in verschillende concentraties: 200, 20, 2, 0.2 ppm en 20 en 10 ppb imidacloprid. Per concentratie zijn 4 volken gebruikt. Alle experimenten zijn een keer herhaald. Bij de hoge concentraties imidacloprid werd 100% mortaliteit bereikt, maar wel in relatie met de blootstellingsduur: het duurde een paar uur, 14 d, 28 d of 49 d bij 200, 20, 2 en 0.2 ppm. Bij 20 en 10 ppb werd na elf weken continue blootstelling 15% en 0% mortaliteit gezien ten opzichte van de controle. Negatieve effecten op het aantal geproduceerde darren werden gezien bij de concentraties 200 tot 0.2 ppm, maar niet bij 20 en 10 ppb. In het experiment waar de hommels zich moesten verplaatsen tussen broed en voedsel werd hetzelfde patroon gezien, met het verschil dat het bij de middelste concentraties iets sneller ging voordat 100% mortaliteit bereikt werd (7 en 14 d bij 20 en 2 ppm) en dat bij 20 ppb 50% mortaliteit optrad na 11 weken (bij 10 ppb bleef het 0%). Ook de reproductie-effecten waren uitgesproken.

Effectconcentraties van imidacloprid waren (in ppb):

- Foerageergedrag niet meegenomen: Mortaliteit LC50 59, NOEC 10. Reproductie EC50 67, NOEC 20.
- Foerageergedrag wel meegenomen: Mortaliteit 20, NOEC 10; sublethaal 3.7, NOEC < 2.5.

Om de resultaten van de labexperimenten te bevestigen werd een kasttest uitgevoerd, waar volken met koningin, 25 werksters en broed in met gaas afgesloten gedeeltes van een kas geplaatst werden. Suikerwater en pollen werden op een afstand van 3 m van het nest geplaatst. Suikerwater bevatte 20, 10, 2 of 0 ppb imidacloprid. Drie volken per concentratie, elk experiment éénmaal herhaald. Werkstermortaliteit, volkgewicht, broed en foerageeractiviteit werden twee weken gevolgd. Bij 20 en 10 ppb stierven 62 en 92% van de werksters en alle nog levende werksters waren apatisch. Bij 20 ppb lagen alle dode werksters bij het voer, bij 10 ppb lagen ze in het nest, wat aanduidt dat ze bij 10 ppb nog terug naar het nest konden vliegen. Bij 2 ppb was geen mortaliteit en ook geen subletale effecten op het volk, het broed of het foerageergedrag van werksters.

De labexperimenten zijn ook uitgevoerd met twee andere neonicotinoïden: 100, 10, 1, 0.5, 0.2, 0.1 ppm en 10 ppb thiamethoxam (alleen 0.1 ppm in het foerageerexperiment); en 120, 60, 12, 1.2, 0.12 ppm en 12 ppb thiacloprid (alleen 12 ppm in het foerageerexperiment). Op deze resultaten gaan de auteurs minder diep in, ze concluderen vooral dat thiamethoxam iets minder toxisch is dan imidacloprid en thiacloprid veel minder toxisch dan de andere twee.

Dit onderzoek laat zien dat de effecten op hommels groter zijn wanneer foerageeractiviteit van de hommels nodig is (via de 20 cm lange buis) dan wanneer ze direct bij hun broed gevoerd worden. De auteurs pleiten er daarom voor dat een hommeltest in het laboratorium zoals door hen ontwikkeld, opgenomen wordt in de datavereisten. In het EFSA GD is een dergelijke test echter niet opgenomen; foerageeractiviteit zal alleen worden meegenomen in semi-veld en veldtesten. Verder leiden de auteurs op basis van al hun data een NOEC af van 2 ppb imidacloprid voor hommels.

- *Effect van imidacloprid op voedselopname, bewegingsactiviteit en levensduur van hommels en honingbijen (Cresswell et al. 2012)*  
Binnen deze studie werden effecten gevonden op voedselopnamesnelheid en bewegingsactiviteit van hommels na blootstelling aan imidacloprid gedurende het hele experiment (ca. 35 d voor hommels, ca. 6 d voor honingbijen). De levensduur van hommels werd niet beïnvloed door imidacloprid. Bij honingbijen was er geen effect van de blootstelling op alle drie de parameters, ondanks dat de opgenomen hoeveelheid per dag ongeveer overeenkomt met de acuut orale LD50 van ~4 ng/bij/dag. Dit wordt verklaard met het feit dat de honingbijen in dit onderzoek hun dagelijkse dosis over 24 uur opnemen, in plaats van in zes uur zoals in de acuut orale test. Blijkbaar zorgt metabolisering gedurende de dag ervoor dat er geen toxische dosis in het lichaam wordt bereikt. Bij hommels waren er al effecten bij >1 ng/bij/d. De auteurs verklaren het verschil in gevoeligheid bij orale blootstelling tussen honingbijen en hommels met de hypothese dat honingbijen evolutionair meer gewend zijn aan giftige alkaloiden in tropische nectar en daardoor imidacloprid beter kunnen metaboliseren. Hier is echter meer onderzoek naar nodig.  
De auteurs vonden in hun laboratoriumstudie 10-30% reductie in voedselopnamesnelheid van hommels bij concentraties tussen 1 en 10 µg/L, wat veldrealistische concentraties zijn voor bloeiende gewassen die zaadbehandeling met imidacloprid hebben gehad. Of dit effect ook optreedt in het veld en wat het effect is op volk- en populatieniveau moet verder onderzocht worden.

#### Uitgebreide samenvatting:

Laboratoriumstudie waarin honingbijen (*Apis mellifera*, Buckfast) en hommels (*Bombus terrestris* L.) blootgesteld werden aan imidacloprid in siroop. Hommels werden individueel

blootgesteld, honingbijen in groepjes van tien, voor zo lang als ze in leven bleven. Dosering: 125, 50, 20, 8, 3.2, 1.28, 0.51, 0.20, 0.08 en 0 µg/L imidacloprid. Testen werden twee maal uitgevoerd: met en zonder acetonitrile als oplosmiddel (in concentratie 100 µL/µg imidacloprid). Bovendien werd een controle uitgevoerd met acetonitrile in 'een geschikte dosisgradiënt'. Snelheid van voedselopname, bewegingsactiviteit en levensduur werden gemeten.

Bij hommels is gecorrigeerd voor de grote verschillen in voedselopnamesnelheid tussen individuen, die waarschijnlijk veroorzaakt werden door verschillen in grootte en leeftijd. Ook is gecorrigeerd voor het effect van acetonitrile op bewegingsactiviteit van hommels, het enige effect van het oplosmiddel dat in de controle gevonden werd.

De gemiddelde voedselopnamesnelheid van hommels nam significant af met toenemende imidaclopriddosis. De gemiddelde bewegingssnelheid van hommels nam significant af met toenemende imidaclopriddosis, maar alleen als acetonitrile ook in de oplossing zat. Hommels leefden langer dan honingbijen (ca. 35 d vs. ca. 6 d) maar de levensduur werd niet beïnvloed door imidacloprid. In een apart experiment is onderzocht of het effect op hommels op voedselopnamesnelheid sterker werd in de tijd. Dit bleek inderdaad zo te zijn. In aanwezigheid van acetonitrile trad het effect sneller op dan zonder oplosmiddel.

De auteurs stellen dat imidacloprid een toxisch effect had op hommels en niet alleen een vermijdingseffect. De voedselopnamesnelheid van hommels nam snel af boven doseringen van 1,28 µg/L (1.0 µg/kg), wat overeenkwam met een dagelijkse dosis van >1 ng/bij. Levensduur was niet aangetast, in tegenstelling tot wat Mommaerts et al. (2010) vonden in een kooiexperiment (zie elders in dit document), maar dit kan verklaard worden door het feit dat de hommels in het onderzoek van Cresswell et al. geen afstand hoefden af te leggen van en naar hun voedsel.

De dosis-respons curve van de reductie van voedselopnamesnelheid had twee pieken. De auteurs speculeren dat lage doseringen toxisch zijn omdat ze onder de drempel voor detoxificatie liggen. Als die drempel bereikt wordt, bij hogere dosering, keert de opnamesnelheid terug naar het normale niveau, maar bij nog hogere doseringen kan er niet genoeg afgebroken worden en wordt de stof opnieuw toxisch.

In aanwezigheid van acetonitrile had imidacloprid een extra schadelijk effect, waarschijnlijk omdat deze stof de membraanpermeabiliteit van cellen voor imidacloprid vergroot.

Acetonitrile zit normaal gesproken niet in gewasbeschermingsmiddelen en dit is dus geen veldrelevant effect.

Bij honingbijen was er geen effect van de behandelingen op alle drie de parameters. De dagelijkse dosis was in de hoogste dosering ongeveer 4.9 ng/bij/dag, een dosis die ongeveer gelijk is aan de LD50. In deze studie is waarschijnlijk geen schadelijk effect gevonden omdat de bijen deze dosis gedurende 24 uur per dag konden opnemen in plaats van gedurende zes uur in de acute toxiciteitsstudie, en dus de stof ook 24 uur per dag konden metaboliseren zodat er geen dodelijke dosis in het lichaam bereikt werd. Dit betekent dat honingbijen imidacloprid goed onschadelijk kunnen maken in hun lichaam. Andere studies vonden schadelijke effecten bij doseringen die veel lager lagen dan in deze studie. De auteurs geven drie mogelijke redenen hiervoor: de onderzochte parameters zijn minder gevoelig dan die van andere studies (de PERtest – proboscis extension reflex); de behandeling van de bijen was zachter dan bij een PERtest, waar bijen gekoeld moeten worden en in een harnas vastzitten tijdens de test, waardoor hun detoxificatiesysteem mogelijk minder goed werkt; de bijen kwamen van een ongevoelig volk, maar andere onderzoekers hebben de PERtest uitgevoerd met bijen van hetzelfde volk en vonden een even grote gevoeligheid als in andere studies, dus dit is niet waarschijnlijk.

De auteurs verklaren het verschil in gevoeligheid bij orale blootstelling tussen honingbijen en hommels met de hypothese dat honingbijen evolutionair meer gewend zijn aan giftige alkaloiden in tropische nectar en daardoor imidacloprid beter kunnen metaboliseren. Hier is echter meer onderzoek naar nodig.

De auteurs vonden in hun laboratoriumstudie 10-30% reductie in voedselopnamesnelheid van hommels bij concentraties tussen 1 en 10 µg/L, wat veldrealistische concentraties zijn voor bloeiende gewassen die zaadbehandeling hebben gehad. Of dit effect ook optreedt in

het veld en wat het effect is op volk- en populatieniveau moet verder onderzocht worden (maar zie Rundlöf et al. 2015; op veldniveau lijken er inderdaad schadelijke effecten te zijn).

- *Effect van imidacloprid op voedselopname, bewegingsactiviteit en levensduur van hommels en honingbijen Cresswell et al. 2013 (NB onterecht aangehaald door EASAC als 2014)*

Testgroepen kregen 8 dagen lang behandelde of onbehandelde siroop, of drie dagen behandelde en daarna vijf dagen onbehandelde siroop (pulsdosering).

Bij honingbijen was er geen effect op voedselopname en activiteit. Op basis van residumetingen berekenen de auteurs dat de honingbijen alle dagelijks opgenomen imidacloprid weer gedurende die dag konden afbreken.

Hommels namen ongeveer drie maal zoveel meer imidacloprid op dan honingbijen (waarom is niet bekend). 8 dagen lang behandelde hommels konden het residu vanaf dag vier niet meer volledig afbreken. Bij de pulsdoseringsgroep verdween het residu in de hommel na twee dagen. De behandelde groepen hommels hadden een significant lagere voedselopname en lichaamsactiviteit. In de pulsdoseringsgroep leek zich dit te herstellen nadat de blootstelling gestopt was.

Dit onderzoek bouwt voort op Cresswell et al (2012), waarin dezelfde verschillen in effect op voedselopname en activiteit tussen honingbijen en hommels werden gevonden bij dezelfde dosering, maar residuen in de bijen niet gemeten werden. De verklaring voor de verschillen wordt gezocht in een verschil in vermogen om imidacloprid in het lichaam af te breken of uit te stoten. Hommels namen echter in beide onderzoeken ook ongeveer drie keer zoveel siroop en dus imidacloprid op, waardoor de verklaring ook kan liggen in het feit dat hommels meer imidacloprid in hun lichaam hadden en dat niet allemaal af konden breken.

De auteurs concluderen dat in de risicobeoordeling de volledige dagelijkse dosis niet in één enkele maaltijd gegeven zou moeten worden. Die situatie houdt geen rekening met de metabolisering in het lichaam die op zal treden bij opname van de dagelijkse dosis in vele maaltijden, wat voor bijen een meer realistische situatie is. In de huidige en nieuwe guidance wordt in de hogere tier de realistische blootstellingssituatie meegenomen.

#### Uitgebreide samenvatting:

Volwassen werksterbijen (*Apis mellifera* en *Bombus terrestris*) werden in het lab blootgesteld aan 98 ug/kg = 125 ug/L siroop (zie Cresswell et al 2012 Differential sensitivity voor samenstelling siroop). Honingbijen zaten in kooitjes met tien individuen, hommels zaten alleen. Testgroepen kregen 8 dagen lang behandelde of onbehandelde siroop, of drie dagen behandelde en daarna vijf dagen onbehandelde siroop (pulsdosering) (30 honingbijen en 33 hommels per groep).

Bij honingbijen was er geen effect op voedselopname en activiteit. Hoewel 8-dgn behandelde bijen 2.2 ng/dag imidacloprid opnamen, was het residugehalte in hun lichaam niet te onderscheiden van onbehandelde bijen. De auteurs berekenen daarom een *daily clearance rate* (C) van ~100%. Dit bevestigt een eerder gevonden halfwaardetijd in de honingbij van ~4 uur.

Bij 8-dgn behandelde hommels was het residugehalte in het lichaam vanaf dag vier wel significant hoger dan bij onbehandelde bijen. Zij namen gemiddeld 6.7 ng/d op. C was 88% op de eerste dag en ~68% daarna. Bij de pulsdoseringsgroep verdween het residu in de hommel na 48 uur (met halfwaardetijd 10.3 uur). De behandelde groep had een significant lagere voedselopname en lichaamsactiviteit. In de pulsdoseringsgroep leek zich dit te herstellen nadat de blootstelling gestopt was.

Dit onderzoek bouwt voort op Cresswell et al (2012), waarin dezelfde verschillen in effect op voedselopname en activiteit tussen honingbijen en hommels werden gevonden bij ~100 ppb. De verklaring hiervoor wordt gezocht in een verschil in vermogen om imidacloprid in het lichaam af te breken of uit te stoten. Hommels namen echter in beide onderzoeken ook ongeveer drie keer zoveel (siroop en dus) imidacloprid op, dus de verklaring kan ook liggen in

het feit dat hommels gewoon meer imidacloprid in hun lichaam hadden en dat niet allemaal af konden breken. Waarom hommels zoveel meer aten dan honingbijen is niet bekend en kan in ieder geval niet verklaard worden met lichaamsgewicht alleen. De auteurs speculeren dat de hommels meer siroop opnamen omdat zij meer energie nodig hadden om hun lichaam op temperatuur te houden.

De auteurs concluderen dat in de risicobeoordeling de volledige dagelijkse dosis niet in één enkele maaltijd gegeven zou moeten worden. Die situatie houdt geen rekening met de metabolisering in het lichaam die op zal treden bij opname van de dagelijkse dosis in vele maaltijden, wat een meer realistische situatie is.

De auteurs stellen ook dat hun onderzoek aantoont dat imidacloprid niet irreversibel gebonden wordt in insecten. Het wetenschappelijke debat hierover ging door en de auteurs werd verweten dat ze de mortaliteit van de honingbijen op de lange termijn niet bekeken hebben terwijl daar juist effecten op verwacht worden (bron: [www.boerenlandvogels.nl](http://www.boerenlandvogels.nl)).

Effecten op hommels worden in ander onderzoek gevonden bij veel lagere concentraties dan in dit onderzoek (bij ca. 1 ng/d). De auteurs kunnen dit niet goed verklaren aangezien in het huidige onderzoek hommels wel 5 ng/d kunnen afbreken. Blijkbaar is de afbreekcapaciteit van hommels altijd incompleet, onafhankelijk van de dosering.

- *Effect van imidacloprid op de ontwikkeling van de hypopharyngeale klier (HPG) en ademhalingsfrequentie (Hatjina et al 2013)*  
Deze studie vond een effect op de HPG en ademhalingsfrequentie van honingbijen. De bestudering van deze effecten op de HPG is nieuw (effecten zijn weinig onderzocht) en onduidelijk is hoe dit te gebruiken in de risicobeoordeling.

#### Uitgebreide samenvatting:

Deze studie kijkt naar de effecten op bijen (*Apis mellifera*) van 2-3 ppb imidacloprid (in pollen en suikerwater) op de ontwikkeling van de hypopharyngeale klier (HPG) en ademhalingsfrequentie van honingbijen. De acini zijn max. 16.3% kleiner in behandelde bijen, de ademhaling is vertraagd. De bestudering van effecten op de HPG en ademhaling is relatief nieuw (effecten zijn weinig onderzocht) en onduidelijk is hoe dit te gebruiken in de risicobeoordeling.

- *Effect van thiamethoxam op nestterugvindcapaciteit van honingbijen (Henry et al. 2012)*  
Uit de test blijkt dat honingbijen die aan 67 ppb thiamethoxam blootgesteld waren, hun nest minder goed konden terugvinden dan controlebijen. Na modellering verwachten de auteurs dat er ook effecten op volkniveau zullen zijn. Het artikel leidde tot flinke wetenschappelijke discussie. De auteurs gaven daarin zelf later toe dat 'substantial improvement is needed before one could use honey bee colony modeling in its current form for risk assessment'. Als er inderdaad substantieel versturende effecten optreden op foerageersters, zou dat te zien moet zijn aan parameters op volkniveau (zie ook de beschermdoelen in de nieuwe EFSA guidance). Dit is uit deze test niet af te leiden. De in de test gebruikte dosering is bovendien aanzienlijk hoger dan de veldrealistische concentratie, zeker aangezien toepassing van thiamethoxam in bloeiende gewassen niet is toegestaan.

#### Uitgebreide samenvatting:

Ervaren honingbijfoerageersters werden bij de kast gevangen, getagged met een chip en gevoerd met thiamethoxam in suikeroplossing (1.34 ng/bee, 67 ppb). Daarna werden ze losgelaten op een hen bekende of onbekende plek tot op 1 km van het nest. Uit de test bleek dat honingbijen die aan thiamethoxam blootgesteld waren, hun nest minder goed konden terugvinden dan controlebijen. De bekende terugvliegroute ging na blootstelling aan



thiamethoxam makkelijker dan de onbekende. Na modellering verwachten de auteurs dat er ook effecten op volkniveau zullen zijn. Het artikel leidde tot flinke wetenschappelijke discussie. De auteurs gaven daarin zelf later toe dat 'substantial improvement is needed before one could use honey bee colony modeling in its current form for risk assessment'. Het is de verwachting dat als er inderdaad substantieel versturende effecten optreden op foerageersters, dat dan te zien moet zijn op volkniveau (zie ook de beschermdoelen in de nieuwe EFSA guidance). Dit is uit deze test niet af te leiden. De in de test gebruikte dosering is bovendien aanzienlijk hoger dan de veldrealistische concentratie, zeker aangezien toepassing van thiamethoxam in bloeiende gewassen niet is toegestaan.

- Effect van imidacloprid op tijd tussen voedselvergaarmomenten van honingbijen (Yang et al. 2008)

Bij 40 ppb werd geen effect gezien, maar vanaf 50 ppb imidacloprid was de terugkeertijd bij de voedselbron significant verhoogd en vanaf 1200 ppb kwam een deel van de bijen helemaal niet meer terug. Deze effectconcentraties zijn veel hoger dan schadelijke concentraties uit andere studies (daarin worden vanaf 20 ppb al subletale effecten gezien). De relevantie van dit effect op kolonieniveau dient in semi-veld of veldtesten onderzocht te worden.

#### Uitgebreide samenvatting:

#### Uitgebreide samenvatting:

In deze Taiwanese test zijn met kleur gemarkeerde getrainde foerageersters (*Apis mellifera*) gevolgd op een *feeding station*. Tijd tussen *feeding bouts* is gemarkeerd. Verschillende concentraties imidacloprid in 50% suikeroplossing worden gebruikt (40-6000 µg/L). Oplosmiddel is DMSO omdat van aceton ook al een klein effect gevonden wordt. 'Behavioral abnormality' wordt hier gedefinieerd als 'met tijd tussen bouts > 300 s'. Zonder imidacloprid kwamen alle bijen binnen 300s terug, mét ging die tijd omhoog. Hoe hoger de concentratie, hoe sneller het effect optrad en hoe groter het percentage beïnvloede bijen. De laagste concentratie met effect op terugkeertijd was 50 ppb (50 µg/L, 1.82-4.33 ng/bee, wat ongeveer gelijk is aan de LD50 uit de LoEP van 3.7 ng/bee). Vanaf 1200 µg/L begonnen de problemen met vermiste bijen: ze kwamen niet allemaal meer terug. Sommige nooit, sommige pas de volgende dag, en toen lieten ze ook nog terugkeertijden > 300 s zien. Het is opvallend dat in andere onderzoeken al vanaf 20 ppb subletale effecten aangetoond zijn. Hier is getest van 40 - 6000 µg/L en bij 40 waren geen effecten te zien. De relevantie van dit effect op kolonieniveau dient in semi-veld of veldtesten onderzocht te worden.

#### Easton en Goulson 2013

Dit artikel gaat over bestuivende vliegen en kevers en is daarom niet in dit hoofdstukje over bijen samengevat.

- Effect van imidacloprid met of zonder lambda-cyhalothrin op hommenvolken (Gill et al. 2012)

Hommenvolken werden vier weken blootgesteld in het lab aan behandelde suikersiroop (10 ppb imidacloprid) en/of aan contactblootstelling aan lambda-cyhalothrin en konden buiten foerageren voor stuifmeel. In de lambda-cyhalothrin- en combinatiegroepen zijn meer dode werksters. In de imidacloprid- en combinatiegroepen komen minder werkers uit. De hypothese van de auteurs is dat dit laatste komt door voedselgebrek door minder efficiënt foerageren op stuifmeel. Uiteindelijk zijn in alle behandelde groepen minder werkers, en het minst in de combinatiegroep. Dit onderzoek lijkt enigszins op een voorgesteld testprotocol in de nieuwe EFSA guidance. De gevonden effecten op hommels benadrukken de noodzaak hommels zo snel mogelijk op te nemen in het toetsingskader. Ook zeer relevant is de bevinding dat de effecten sterker zijn bij een combinatie van twee bestrijdingsmiddelen. Zie elders voor de aanbeveling zo snel mogelijk toetsingskader te ontwikkelen voor het beoordelen van combinatietoxiciteit van het gebruik van

meerdere middelen in een seizoen op hetzelfde gewas. De gebruikte dosering van imidacloprid is echter niet relevant voor de huidige toelatingssituatie, waarin toepassing in bloeiende gewassen niet is toegestaan.

Commented [512] (10): In lijn brengen met hoofdstekst.

#### Uitgebreide samenvatting:

Tien hommelveolken (*Bombus terrestris*, een koningin plus maximaal 10 werksters) per groep getest in het laboratorium: controle, 10 ppb imidacloprid in suikeroplossing (nabootsing van zaadbehandeling van bloeiend gewas), lambda-cyhalothrin met 37.5 ppm op filterpapier bij de feeder (nabootsing van spuitbehandeling, wekelijks hernieuwd), en combinatie van de twee a.s. De imidaclopridoplossing werd vlak naast het broed aangeboden, in de kast. De hommels konden buiten foerageren (dit was nodig om stuifmeel te verzamelen). De blootstelling duurde vier weken. In de lambda-cyhalothrin- en mixgroepen zijn meer dode werksters. In de imidacloprid- en mix-groepen komen minder werkers uit. De hypothese van de auteurs is dat dit komt door voedselgebrek. Er zijn meer foerageersters maar die halen minder efficiënt pollen van buiten. Uiteindelijk zijn in alle behandelde groepen minder werksters, en het minst in de mix groep.

Dit onderzoek lijkt enigszins op een voorgesteld testprotocol in de nieuwe EFSA guidance. De gevonden effecten op hommels benadrukken de noodzaak hommels zo snel mogelijk op te nemen in het toetsingskader. Ook zeer relevant is de bevinding dat de effecten sterker zijn bij een combinatie van twee bestrijdingsmiddelen. Zie elders voor de aanbeveling zo snel mogelijk toetsingskader te ontwikkelen voor het beoordelen van combinatietoxiciteit van het gebruik van meerdere middelen in een seizoen op hetzelfde gewas. De gebruikte dosering van imidacloprid is echter niet relevant voor de huidige toelatingssituatie, waar toepassing in bloeiende gewassen niet is toegestaan.

- Effect van imidacloprid, clothianidin of coumaphos op hersenactiviteit (Palmer et al. 2013)

De activiteit van 'mushroom body Kenyon Cells' in geïsoleerde honingbijhersen werd in het lab gemeten bij blootstelling aan imidacloprid, clothianidin of het Varroamijtenbestrijdingsmiddel coumaphos in het medium waarin het brein gehouden werd. De auteurs vinden een bij de drie stoffen vergelijkbaar neurofysiologisch effect. Hieruit concluderen zij dat dit mogelijk het mechanisme is dat de in sommige studies gevonden door neonicotinoïden veroorzaakte cognitieve verslechtering bij honingbijen. Verder voorspellen zij dat gelijktijdige blootstelling aan verschillende stoffen die op de cholinergische impulsoverdracht werken, toxiciteit voor bestuivers zal vergroten.

In het artikel worden concentraties gebruikt die volgens de auteurs in behandeld bloeiend gewas en in bijenkasten kunnen worden aangetroffen. Of deze concentraties dan ook relevant zijn voor directe stimulatie van een brein is niet bekend. Het betreft een labstudie naar een neuronaal mechanisme, wat interessant is voor het begrijpen van een effect, maar minder relevant voor gebruik in een risicobeoordeling. Te verwachten effecten op basis van dit soort studies moeten in veldstudies onderzocht worden. Derhalve maakt dit artikel ingrijpen in de huidige Nederlandse toelatingssituatie niet noodzakelijk

#### Uitgebreide samenvatting:

Labonderzoek naar de activiteit van 'mushroom body Kenyon Cells' in geïsoleerde honingbijhersen, bij blootstelling aan imidacloprid, clothianidin of het Varroamijtenbestrijdingsmiddel coumaphos. De 'mushroom bodies' zijn hersenstructuren die zintuiginformatie integreren en een functie hebben bij leergedrag en geheugen. Blootstelling aan de geïsoleerde breinen gaat via de vloeistof waarin de breinen gehouden worden. De auteurs vinden een bij de drie stoffen vergelijkbaar neurofysiologisch effect. Hieruit concluderen zij dat dit mogelijk het mechanisme is dat de in sommige studies gevonden door neonicotinoïden veroorzaakte cognitieve verslechtering bij honingbijen. Verder voorspellen zij dat gelijktijdige blootstelling aan verschillende stoffen die op de cholinergische impulsoverdracht werken, toxiciteit voor bestuivers zal vergroten.

In het artikel worden concentraties gebruikt die volgens de auteurs in behandeld bloeiend gewas en in bijenkasten kunnen worden aangetroffen. Of deze concentraties dan ook relevant zijn voor directe stimulatie van een brein is niet bekend. Het betreft een labstudie naar een neuronale mechanisme, wat interessant is voor het begrijpen van een effect, maar minder relevant voor gebruik in een risicobeoordeling. Te verwachten effecten op basis van dit soort studies moeten in veldstudies onderzocht worden. Derhalve maakt dit artikel ingrijpen in de huidige Nederlandse toelatingssituatie niet noodzakelijk.

▪ Effect van imidacloprid op ontwikkeling, hersenstructuur en loopgedrag van een tropische angelloze bij (Tomé et al. 2012)

Larven van de Braziliaanse angelloze bij *Melipona quadrifasciata anthidiodes* werden gedurende hun hele ontwikkeling via hun voedsel blootgesteld aan imidacloprid, in 18 verschillende concentraties.

Er was geen effect op ontwikkelingstijd en voedselopname van de larven, maar bij de tien hoogste concentraties stierven ze allemaal. Bij de overige doseringen overleefde minder dan 50% van de bijen tot aan het eind van de test, met uitzondering van de laagste concentratie, waar overleving slechts 55% was aan het eind van de test.

De mushroom bodies in de hersenen van adulten waren direct na uitkomen even groot als in de controle en namen daarna bij alle concentraties in volume toe, maar de volumetoename was minder groot in de behandelde bijen en deze groeiremming was dosis-gerelateerd. Ook het loopgedrag van adulten was dosis-gerelateerd aangetast na 4 en 8 dagen, maar niet na 1 dag.

Ctgb heeft de volgende opmerkingen op deze studie:

- De resultaten van deze labtest zouden in het veld onderzocht moeten worden om te zien of ze op volkniveau een rol spelen.
- De concentratierange lijkt te hoog gekozen voor het bestuderen van deze parameters gezien de hoge sterfte in alle concentraties (zelfs in de laagste nog bijna 50%). Idealiter is er in zo'n range minstens één concentratie zonder enig effect.
- Volgens de studie is de hoogste concentratie gekozen omdat deze correspondeert met de dosering op het gebruiksvoorschrift van imidacloprid ter bestrijding van wittevlug in tabak. Hoe deze omrekening gedaan is, is niet duidelijk.
- Deze bijensoort komt (net als alle angelloze bijen) niet voor in Europa en wat dat betreft is dit onderzoek dus minder relevant voor de Europese of Nederlandse toelatingssituatie. Wel blijkt hieruit dat blootstelling tijdens de larvale periode ook nog effecten kan opleveren op adulten die direct na uitkomen nog niet te zien zijn. Effecten van blootstelling op bijenlarven zullen meegenomen worden met ingang van de nieuwe EFSA guidance.

Uitgebreide samenvatting:

Eieren uit nesten van de Braziliaanse angelloze bij *Melipona quadrifasciata anthidiodes* werden in kunstmatige cellen geplaatst in het laboratorium en gevoed met larvaal dieet dat uit hetzelfde volk kwam als het larve. Het dieet bevatte 0, 0.0056, 0.014, 0.028, 0.037, 0.051, 0.056, 0.08, 0.112, 0.28, 0.37, 0.56, 1.12, 1.75, 3.50, 7.00, 14.00, 28.00 of 56 µg/bij imidacloprid. Bij angelloze bijen hoeven larven niet bijgevoerd te worden maar is de voorraad in de broedcel voldoende. Alle larven aten al het aangeboden voedsel op. De totale dosis per larve is dus bekend. De ontwikkelingstijd van de larven is niet expliciet gegeven maar uit een figuur kan opgemaakt worden dat dit ongeveer 23 dagen duurde.

Parameters waren mortaliteit van eieren, larven en adulten (dagelijks gemeten); lichaamsgewicht van de 3 tot 4-d oude pop; ontwikkelingstijd van ei tot adult; loopgedrag van adulten één, vier en acht dagen na uitkomen; morfologie van de *mushroom bodies* van adulten één, vier en acht dagen na uitkomen.

Er was geen effect op ontwikkelingstijd en voedselopname, maar vanaf 0.28 µg/bij stierven alle larven (100% sterfte na ca. 20 dgn behalve bij 56 µg/bij, waarbij al na 6 dagen 100% sterfte optrad). Bij de overige doseringen overleefde minder dan 50% van de bijen tot aan het eind van de test, met uitzondering van de laagste concentratie, waar overleving slechts 55% was aan het eind van de test.

De mushroom bodies waren 1 d na uitkomen even groot als in de controle en namen daarna in volume toe, maar deze groei was minder groot in de behandelde bijen en deze groeiremming was dosis-gerelateerd. Op dezelfde manier liepen 1-d oude behandelde adulten normaal, maar was het loopgedrag dosis-gerelateerd aangetast na 4 en 8 dagen. Ctgb heeft de volgende opmerkingen op deze studie:

- De resultaten van deze labtest zouden in het veld onderzocht moeten worden om te zien of ze op volkniveau (net als honingbijen zijn angelloze bijen eusociaal) een rol spelen.
- De concentratierange lijkt te hoog gekozen voor het bestuderen van deze parameters gezien de hoge sterfte in alle concentraties (zelfs in de laagste nog bijna 50%). Idealiter is er in zo'n range minstens één concentratie zonder enig effect.
- Volgens de studie is de hoogste concentratie gekozen omdat deze correspondeert met de dosering op het gebruiksvoorschrift van imidacloprid ter bestrijding van wittevlug in tabak. Hoe deze omrekening gedaan is, is niet duidelijk.
- Deze bijensoort komt (net als alle angelloze bijen) niet voor in Europa en wat dat betreft is dit onderzoek dus minder relevant voor de Europese of Nederlandse toelatingssituatie. Wel blijkt hieruit dat blootstelling tijdens de larvale periode ook nog effecten kan opleveren op adulten die direct na uitkomen nog niet te zien zijn. Effecten van blootstelling op bijenlarven zullen meegenomen worden met ingang van de nieuwe EFSA guidance.

▪ *Effect van thiamethoxam en clothianidin op reproductieresultaat van solitaire bijen (Sandrock et al. 2013)*

Labstudie met de rosse metselbij waarin negatieve effecten op het reproductieresultaat van deze solitaire bij gevonden werden bij blootstelling aan 2.87 ppb thiamethoxam en 0.45 ppb clothianidin.

De auteurs wijten de effecten op het aantal nesten, het aantal broedcellen en het lagere aantal vrouwtjes aan een verlaagde foerageercapaciteit en voedselopslag-efficiëntie. Zij hebben dit niet zelf aangetoond maar verwijzen naar andere onderzoek waarin een verlaagde voedselopslag-efficiëntie van vrouwtjes tot deze effecten leidde. Dit lijkt Ctgb inderdaad plausibel.

Verder geven zij de hypothese dat de hogere sterfte van de nakomelingen niet van een indirect effect via foerageercapaciteit van de moeders komt, maar van een direct effect van thiamethoxam en clothianidin. Aangezien de larven aan een zeer lage hoeveelheid werkzame stoffen moeten zijn blootgesteld (omdat zij vooral met stuifmeel gevoed zijn, waar geen werkzame stof in zat, en omdat in het in de broedcellen achtergebleven stuifmeel geen werkzame stof aangetroffen is), verwachten zij dat larvale stadia gevoeliger zijn dan adulten. Deze hypothese is echter niet te bewijzen met gegevens uit dit of ander beschikbaar onderzoek.

Er is (vergeleken met honingbijen en hommels) nog niet veel onderzoek gedaan aan de effecten van bestrijdingsmiddelen op solitaire bijen. Deze studie is daarom belangrijk maar het onderzoek zou herhaald moeten worden in een veldsetting.

Ctgb merkt verder op dat de gebruikte concentraties realistisch worst case zijn voor zaadbehandeling van thiamethoxam op een bij-aantrekkelijk gewas zoals koolzaad. Toepassingen van thiamethoxam en clothianidin op bij-aantrekkelijke gewassen zijn echter sinds januari 2014 verboden in Europa (toepassing als spuitbehandeling is alleen nog toegestaan na de bloei). Blootstelling zal dus momenteel alleen kunnen plaatsvinden via andere routes, zoals onkruiden, planten buiten het veld, volggewassen etc.

De auteurs pleiten voor een aanpassing van het toetsingskader voor bijen. Effecten op andere bestuivers dan de honingbij en in het bijzonder effecten op de gehele levenscyclus/het reproductiesucces van niet-Apis bestuivers zouden meegenomen moeten worden. Ctgb sluit zich hierbij aan. In de hogere tier van het nieuwe EFSA

guidancedocument zullen dit soort effecten op de levenscyclus van niet-Apis bijen meegenomen worden.

#### Uitgebreide samenvatting:

In dit onderzoek werden twee groepen *Osmia bicornis* (Rosse metselbij) gehouden in kooien waar ze gevoed werden met een nectarsubstituut en pollen. In elke kooi zaten 125 vrouwtjes en 75 mannetjes. Alle bijen kwamen uit een kweeklab in Duitsland en kwamen van dezelfde nestlocatie van een *single source population*. De nectar bevatte in de testgroep 2.87 ug/kg thiamethoxam en 0.45 ug/kg clothianidin, en in de controlegroep geen van deze stoffen (LOD 0.1 ppb). De pollen was niet behandeld. De bijen konden paren en nestelen in de kooien. Er was geen verschil in lichaamsgewicht van de vrouwtjes in beide groepen. De nesten werden vier weken na het vliegseizoen van de adulten (dat is in april/juni) opengebroken. Succesvol ontwikkelde cocons werden onder gesimuleerde winteromstandigheden gebracht en daarna weer onder warme condities om het uitkomen van de cocons te stimuleren.

Vrouwtjes leefden even lang in beide groepen. In de testgroep werden echter minder nesten afgemaakt en zaten minder broedcellen per compleet nest. Ook was de relatieve sterfte van de nakomelingen hoger. Er was een significante reductie in het aantal nakomelingen per nest. Ook was de sexeratio anders: in de testgroep was 47.1% van de uitgekomen nakomelingen vrouw, in de controlegroep was dat 55.6%. Lichaamsgewicht van de uitgekomen nakomelingen verschilde niet tussen de groepen. In totaal zijn er duidelijke negatieve effecten op het reproductieresultaat van deze solitaire bij.

De auteurs wijten de effecten op het aantal nesten, het aantal broedcellen en het lagere aantal vrouwtjes aan een verlaagde foerageercapaciteit en voedselopslageefficiëntie. Zij hebben dit niet zelf aangetoond maar verwijzen naar andere onderzoek waarin een verlaagde voedselopslageefficiëntie van vrouwtjes tot deze effecten leidde. Dit lijkt Ctgb inderdaad plausibel.

Verder geven zij de hypothese dat de hogere sterfte van de nakomelingen niet van een indirect effect via foerageercapaciteit van de moeders komt, maar van een direct effect van thiamethoxam en clothianidin. Aangezien de larven aan een zeer lage hoeveelheid werkzame stoffen moeten zijn blootgesteld (omdat zij vooral met stuifmeel gevoed zijn, waar geen werkzame stof in zat, en omdat in het in de broedcellen achtergebleven stuifmeel geen werkzame stof aangetroffen is), verwachten zij dat larvale stadia gevoeliger zijn dan adulten. Deze hypothese is echter niet te bewijzen met gegevens uit dit of ander onderzoek.

De auteurs geven toe dat dit onderzoek een laboratoriumkarakter heeft en in veldsetting herhaald zou moeten worden. Dit is inderdaad nodig voor definitieve conclusies getrokken kunnen worden. Bijvoorbeeld omdat in deze studie de bijen alleen met besmette nectar gevoed zijn, terwijl ze in een veldsetting waarschijnlijk ook andere voedselbronnen zullen gebruiken.

Ctgb merkt verder op dat de gebruikte concentraties realistisch *worst case* zijn voor zaadbehandeling van thiamethoxam op een bij-aantrekkelijk gewas zoals koolzaad.

Toepassingen van thiamethoxam, clothianidin en imidacloprid op bij-aantrekkelijke gewassen zijn echter sinds januari 2014 verboden in Europa (toepassing als spuitbehandeling is alleen nog toegestaan na de bloei). Blootstelling zal dus momenteel alleen kunnen plaatsvinden via andere routes, zoals onkruiden, planten buiten het veld, volggewassen etc. Metingen van residuniveau's via deze routes zijn niet gedaan, maar het is aannemelijk dat de gehalten lager zullen zijn dan bij directe behandeling van een gewas.

De auteurs pleiten voor een aanpassing van het toetsingskader voor bijen. Effecten op andere bestuivers dan de honingbij en in het bijzonder effecten op de gehele levenscyclus/het reproductiesucces van niet-Apis bestuivers zouden meegenomen moeten worden. Ctgb sluit zich hierbij aan. In de hogere tier van het nieuwe EFSA guidancedocument zullen dit soort effecten op de levenscyclus van niet-Apis bijen meegenomen worden.

- *Effect van chronische blootstelling aan thiamethoxam en clothianidin op honingbijvolken. Sandrock et al. 2014*

In dit veldonderzoek met kunstmatige blootstelling kregen honingbijvolken 45 dagen lang stuifmeel met thiamethoxam plus clothianidin en werden ze daarna nog een jaar gevolgd.

Er was geen verschil in overwintersucces (dood vs. levend), maar de controlevolken hadden significant meer volwassen bijen, eieren en larven direct na blootstelling en na overwintering (en dus niet bij het tussengelegen meetpunt vlak vóór overwintering) dan de behandelde volken. Het aantal poppen verschilde alleen na overwintering significant met de controle. Honingproductie was significant lager in de behandelde groepen. Stuifmeelopslag- en opname tijdens de blootstellingsperiode werd niet beïnvloed door de a.s., maar stuifmeelverzameling (van buiten de kast) wel – vanaf drie weken in de blootstellingsperiode verzamelden behandelde volken significant minder stuifmeel.

Er werd een negatief effect gevonden op verschillende parameters direct na blootstelling, dat vlak voor overwintering niet meer te zien was en dat ook geen effect had op overwintersucces, maar na overwintering waren behandelde volken duidelijk kleiner en hadden ze minder broed. Verder was er een significant effect van de a.s. op het vervangen van de koningin. In de twee jaar dat dit experiment liep, gebeurde dit nooit in de controlevolken, maar wel bij zes van de tien behandelde volken in het jaar na blootstelling. Zwermen (waarbij een deel van het volk bij de oude koningin in de kast blijft en een ander deel met een nieuwe koningin wegvliegt) trad juist vaker op in de controle dan in de behandeling. De auteurs verklaren de lagere aantallen bijen en broed in de behandelde volken met het grotere aantal vervangingen van de koningin.

De blootstellingsduur (1,5 maand) en het blootstellingsregime (al het pollen bevatte thiamethoxam en clothianidin) zijn beide worst case voor een landbouwkundige setting. De gebruikte concentraties zijn relevant voor zaadbehandeling van bloeiend gewas maar niet voor de huidige toelatings situatie in Nederland.

#### Uitgebreide samenvatting:

Onderzoek naar de effecten op honingbijvolken van chronische blootstelling aan thiamethoxam en clothianidin in stuifmeel, in de tijd en met bijen van twee verschillende genetische achtergronden.

24 volken met elk ca. 20.000 volwassen bijen werden gebruikt. Veertien volken met koninginnen uit een Duitse regio met intensieve landbouw (*Apis mellifera carnica*), en tien volken met koninginnen uit een alpiene regio in Zwitserland (vooral *A.m. mellifera*). De volken werden in twee rijen geplaatst in een bijenstand bij Zürich. De rijen werden zo geplaatst dat foerageersters zo min mogelijk naar een volk in de andere rij zouden vliegen. Na ongeveer een jaar in deze bijenstand om te zorgen dat de volken zo gelijk mogelijk waren voor wat betreft de aanwezigheid van ziekten en plagen, werden de volken van half mei tot eind juni 2011 (45 dagen) in de kast gevoerd met *pollen patties*, een mix van stuifmeel, sucrose en gist. Eén rij kreeg onbehandeld pollen, de andere rij kreeg pollen met daarin 5.31 ± 0.75 ppb thiamethoxam en 2.05 ± 1.8 ppb clothianidin.

Tijdens de blootstellingsfase zaten er pollenvallen voor de kastingangen om de bijen te stimuleren de pollen patties uit de kast op te nemen, en dit gebeurde ook over het algemeen binnen 48 uur. Na de blootstellingsfase werden de pollenvallen verwijderd en mochten de volken vrij foerageren. Ze werden nog tot juni 2012 gevolgd.

Er werd in beide groepen geen residu van de a.s. aangetroffen in pollen uit de pollenvallen, bijen, poppen, bijenbrood, honing en bijenwas. Het is verrassend dat ook na drie weken blootstelling in de behandelde groepen niets werd gevonden. Ctgb merkt op dat de LODs vrij hoog waren vergeleken met de dosering, namelijk 4.0 ppb thiamethoxam en 1.0 ppb clothianidin (het artikel is hierover overigens niet geheel duidelijk), en dat lage residuen dus mogelijk gemist zijn. De LOQ is niet gegeven.

Volken werden uitgebreid beoordeeld op vier tijdstippen: drie dagen vóór blootstelling, twee dagen na blootstelling, 3,5 mnd na blootstelling en één jaar na blootstelling. Door verlies van de koningin in twee controle- en twee behandelde volken bleven er 3,5 maand na blootstelling elf volken per groep over en na één jaar tien volken per groep.

Er was geen verschil in overwintersucces (dood vs. levend), maar de controlevolken hadden significant meer volwassen bijen, eieren en larven direct na blootstelling en na overwintering (en dus niet bij het tussengelegen meetpunt vlak vóór overwintering) dan de behandelde volken. Bovendien was er een verschil tussen de twee genetisch verschillende groepen bijen : de Zwitserse alpiene bijen waren gevoeliger dan de Duitse 'landbouwbijen'. Het aantal poppen verschilde alleen na overwintering significant met de controle, en hier was geen verschil tussen de genetisch verschillende groepen.

Honingproductie was significant lager in de behandelde groepen, en wederom was het effect sterker in de alpiene bijen. Stuifmeelopslag- en opname tijdens de blootstellingsperiode werd niet beïnvloed door de a.s., maar stuifmeelverzameling (van buiten de kast) wel – vanaf drie weken in de blootstellingsperiode verzamelden behandelde volken significant minder stuifmeel. Als laatste was er een significant effect van de a.s. op het vervangen van de koningin (zonder dat een deel van het volk gaat zwermen). In de twee jaar dat dit experiment liep, gebeurde dit nooit in de controlevolken, maar wel bij zes van de tien behandelde volken in het jaar na blootstelling. Zwermen (waarbij een deel van het volk bij de oude koningin in de kast blijft en een ander deel met een nieuwe koningin wegvliegt) trad juist vaker op in de controle (bij negen van de tien volken) dan in de behandeling (bij twee van de tien volken). Er werd dus een negatief effect gevonden direct na blootstelling, dat vlak voor overwintering niet meer te zien was en dat ook geen effect had op overwintersucces, maar na overwintering waren behandelde volken duidelijk kleiner en hadden ze minder broed. Dit wordt geassocieerd met een toename in 'troonopvolging'. De auteurs denken dat de koningin, door haar langere levensduur en haar grote aantal tropholactische interacties, mogelijk veel meer a.s. binnengekregen heeft dan andere bijen uit het volk, dat zij daarom minder goed ging presteren en het daarom nodig werd de koningin in zoveel van de behandelde volken te vervangen. De nieuwe koninginnen hadden waarschijnlijk een minder goed paarsucces en dit zou de verlaging in volkgroei kunnen verklaren. Een toename in troonopvolging is ook gebleken voor het pyrethroid cypermethrin acariciden die in de kast gebruiken worden tegen Varroa kunnen een negatief effect hebben op de ontwikkeling en prestaties van koninginnen (referenties genoemd in artikel).

Het korte-termijn effect op de volwassen bijen is onverwacht, aangezien pollen vooral wordt geconsumeerd door voedslerbijen en larven en veel minder door foerageersters. De auteurs verklaren het effect met subletale effecten op larven die later in hun leven zorgen voor een verminderde capaciteit om hun nest terug te vinden. In een ander artikel (Dively et al. 2015) echter wijst men op het verschil in gebruik tussen zelf verzameld stuifmeel en pollen patties. Het verschil tussen de twee genetisch verschillende groepen bijen is interessant, maar de oorzaken hiervoor zijn niet te verklaren met deze studie.

De blootstellingsduur (1,5 maand) en het blootstellingsregime (al het pollen bevatte thiamethoxam en clothianidin) zijn beide worst case voor een landbouwkundige setting. De gebruikte concentraties zijn relevant voor zaadbehandeling van bloeiend gewas maar niet voor de huidige toelatingssituatie in Nederland.

- *Effect van imidacloprid op honingbijvolken. [Lu et al 2012](#)*

Veldonderzoek met kunstmatige blootstelling aan behandelde high-fructose corn sirop (HFCS), een suikersiroop waar honingbijen in Amerika mee bijgevoerd worden. Testvolken kregen eerst vier weken 0,1, 1, 5 of 10 ppb en daarna 9 weken 20, 40, 200 of 400 ppb imidacloprid in siroop, in de kast. 15 van de 16 testvolken gingen dood tussen 14 weken na blootstelling (eind december 2010) en maart 2011. De volken vertoonden tekenen van Colony collapse disorder (CCD) en het tijdstip van sterven was min of meer dosis gerelateerd (hoe meer imidacloprid, hoe eerder sterfte optrad). In dezelfde periode stierf slechts één van de vier controlevolken. Auteurs hebben de hypothese dat 1) subletale blootstelling in larvale stadia er voor zorgt dat volwassen bijen later minder goed kunnen overleven en 2) dat er door zaadbehandeling van maïs met imidacloprid in HFCS imidaclopridresiduen hebben gezeten sinds 2005/6, de tijd dat CCD opeens toenam. Ze hebben echter geen residumetingen uitgevoerd in oude HFCS en het is onduidelijk of het een realistische

verwachting is dat er zulke hoge concentraties zitten in HFCS uit behandeld maiszaad. In alle volken, ook de controlevolken, was de broedontwikkeling sterk verschillend van de normale broedontwikkeling bij honingbijvolken in die regio in die periode, en er zijn maar weinig volken per dosering getest. Ook is het de vraag of het niet sowieso bijzonder verstoring is voor bijenvolken om tijdens de winterrust wekelijks te monitoren. Dit alles werpt twijfels op over de betrouwbaarheid van de studie. Maar hoe dan ook zijn de doseringen en de blootstellingsduur in deze studie onrealistisch hoog voor de Nederlandse (en Europese) landbouwkundige situatie.

#### Uitgebreide samenvatting:

Onderzoek uit Central Massachusetts, VS. Bijenvolken (*Apis mellifera* L.) zijn gevoerd met *high-fructose corn sirop* (HFCS), een suikersiroop waar honingbijen in Amerika mee bijgevoerd worden. Er waren 16 testvolken en 4 controlevolken. Testvolken kregen van 1 juli tot en met 30 september 2010 eerst vier weken 0,1, 1, 5 of 10 ppb en daarna 9 weken 20, 40, 200 of 400 ppb imidacloprid in siroop, in de kast. 15 van de 16 testvolken gingen dood tussen 14 weken na blootstelling (eind december 2010) en maart 2011. De volken vertoonden tekenen van Colony collapse disorder (CCD) en het tijdstip van sterven was min of meer dosis gerelateerd (hoe meer imidacloprid, hoe eerder sterfte optrad). In dezelfde periode stierf slechts één van de vier controlevolken. Auteurs hebben de hypothese dat 1) subletale blootstelling in larvale stadia er voor zorgt dat volwassenen bijen later minder goed kunnen overleven en 2) dat er door zaadbehandeling van maïs met imidacloprid in HFCS imidaclopridresiduen hebben gezeten sinds 2005/6, de tijd dat CCD op eens toenam. Ze hebben echter geen residumetingen uitgevoerd in oude HFCS en het is onduidelijk of het een realistische verwachting is dat er zulke hoge concentraties zitten in HFCS uit behandeld maiszaad. In alle volken, ook de controlevolken, was de broedontwikkeling sterk verschillend van de normale broedontwikkeling bij honingbijvolken in die regio in die periode, en er zijn maar weinig volken per dosering getest. Ook is het de vraag of het niet sowieso bijzonder verstoring is voor bijenvolken om tijdens de winterrust wekelijks te monitoren. Dit alles werpt twijfels op over de betrouwbaarheid van de studie. Maar hoe dan ook zijn de doseringen en de blootstellingsduur in deze studie onrealistisch hoog voor de Nederlandse (en Europese) landbouwkundige situatie.

#### ▪ *Effect van imidacloprid op honingbijvolken. Pilling et al. 2013*

Deze publicatie beschrijft de resultaten van een groots opgezet, vierjarig monitoringsprogramma in verschillende regio's in Frankrijk naar de effecten van zaadbehandeling met thiamethoxam van maïs of koolzaad. Volken zijn vier jaar lang blootgesteld aan de bloeiende maïs of koolzaad en tussentijds op een onbehandelde monitoringssite geplaatst. Residumetingen in stuifmeel en nectar zaten in dezelfde range als bij vergelijkbare onderzoeken. In de bijenvolken werden geen residuen aangetroffen. Er werd geen verschil gevonden tussen behandelde en controlevolken op verschillende parameters, inclusief overwintering. Soortgelijke monitoringstudies (waarschijnlijk dezelfde, maar dit is niet op te maken uit het artikel) zijn ook meegenomen bij de herbeoordeling van thiamethoxam op EU niveau (EFSA 2013c in het EASACrapport). De lidstaten en EFSA concludeerden dat dit zeer goed uitgevoerde studies zijn en dat ze geen indicatie geven dat er negatieve effecten te verwachten zijn van vierjarige blootstelling aan met thiamethoxam behandelde maïs of koolzaad, maar dat dit niet met zekerheid te stellen valt door allerlei onzekerheden die zulke langjarige onderzoeken met zich meebrengen, en dat verdere analyse van de data nodig was.

#### Uitgebreide samenvatting:

Deze publicatie beschrijft de resultaten van een groots opgezet, vierjarig monitoringsprogramma in verschillende regio's in Frankrijk met maïsplanten of koolzaadplanten die gegroeid waren uit met thiamethoxam behandelde zaden (88.2 g a.s./ha / 0.85 mg a.s./zaadje in maïs; 12.6 g a.s./ha / 0.02 mg a.s./zaadje in koolzaad; 77 g a.s./ha / 0.03 mg a.s./zaadje in gerst). De studies bestaan uit twee delen: residumetingen en effecten op bijenvolken. Residumetingen gaven de volgende waarden: maïsstuifmeel van bijen 1-7 ug



thiamethoxam/kg en 1-4 ug/kg clothianidin/kg; koolzaadstuifmeel van bijen <1-3,5 ug thiamethoxam/kg en <1 ug clothianidin/kg; koolzaadnectar van bijen 0.65-2,4 ug thiamethoxam/kg en <1 ug clothianidin/kg. In de bijenvolken waren residuen altijd op of onder de LOD (in bijenbrood en nectar 1 ug/kg, honing en honing en koninginengelei 0.5 ug/kg). In de effectenstudie zijn dezelfde volken vier jaar lang blootgesteld aan de bloeiende maïs of koolzaad en tussentijds op een onbehandelde monitoringssite geplaatst. Er wordt geen verschil gevonden tussen behandelde en controlevolken op verschillende parameters, inclusief overwintering. Soortgelijke monitoringstudies (waarschijnlijk dezelfde, maar dit is niet op te maken uit het artikel) zijn ook meegenomen bij de herbeoordeling van thiamethoxam op EU niveau (EFSA 2013c in het EASACrapport). De lidstaten en EFSA concludeerden dat dit zeer goed uitgevoerde studies zijn en dat ze geen indicatie geven dat er negatieve effecten te verwachten zijn van vierjarige blootstelling aan met thiamethoxam behandelde maïs of koolzaad, maar dat dit niet met zekerheid te stellen valt door allerlei onzekerheden die zulke langjarige onderzoeken met zich meebrengen, en dat verdere analyse van de data nodig was.

- *Thompson et al 2013*  
Veldstudie met hommelveolken in een landschap met met neonicotinoïde behandeld koolzaad. Er werden geen negatieve effecten gevonden. EFSA heeft deze studie beoordeeld<sup>5</sup> en vanwege fouten in de studieopzet en methodiek geoordeeld dat de conclusies niet betrouwbaar zijn. Hij wordt hier daarom niet verder besproken.
- *Effect van clothianidin en imidacloprid op nestterugvindcapaciteit van honingbijen Fischer et al 2014*  
Honingbijen werden gevangen, gevoerd met al dan niet behandelde sucroseoplossing en op een onbekende plek weer losgelaten. Testdoseringen waren: 2.5 ng/bee / 25 ppb clothianidin; 7.5 ng/bee / 75 ppb imidacloprid; 11.25 ng/bee / 112.5 ppb imidacloprid; 1.25 microgram/bee/12.5 ppm thiacloprid. Volgens auteurs zijn dit niet-dodelijke doseringen, maar Ctgb merkt op dat ze dichtbij of boven de letale dosis zitten (LD50 oral uit EFSA conclusie 3.8 ng/bee clothianidin, 3.7 ng/bee imidacloprid, 17.32 microgram/bee thiacloprid). Algemeen gezien werd de nestterugvindcapaciteit aangetast. Volgens de auteurs is deze studieopzet relevant om een idee te krijgen over het effect op herinnering aan en orientatie in het landschap. Maar bijen in het wild komen meestal niet zomaar op een onbekende plek terecht waar ze niet zelf naartoe zijn gevlogen. Bovendien zijn de concentraties veel hoger dan in Nederland te verwachten veldconcentraties, waar toepassing in bloeiende gewassen niet is toegestaan (de concentraties liggen bovendien hoger dan de relevante concentraties voor zaadbehandeling in bloeiende gewassen).

#### Uitgebreide samenvatting:

Op een feeder getrainde honingbijen (*Apis mellifera carnica*) werden gevangen, gevoerd met al dan niet behandelde sucroseoplossing en elders weer losgelaten zodat de bijen op basis van hun herinnering van 1) richting feeder naar hive ('vector', recent opgeslagen, want o.b.v. heenweg) en 2) algemene omgeving ('homing', als ze via de vector flight op een bekend punt in het landschap aangekomen zijn) hun weg moeten zoeken. Testdoseringen waren: 2.5 ng/bee / 25 ppb clothianidin; 7.5 ng/bee / 75 ppb imidacloprid; 11.25 ng/bee / 112.5 ppb imidacloprid; 1.25 microgram/bee/12.5 ppm thiacloprid. Volgens auteurs zijn dit niet-dodelijke doseringen, maar Ctgb merkt op dat ze dichtbij of boven de letale dosis zitten (LD50 oral uit EFSA conclusie 3.8 ng/bee clothianidin, 3.7 ng/bee imidacloprid, 17.32 microgram/bee thiacloprid). Over het algemeen was de vector flight niet erg aangetast maar de homing flight wel duidelijk (er waren wel verschillen tussen de stoffen op verschillende

<sup>5</sup> European Food Safety Authority, 2013. Evaluation of the FERA study on bumble bees and consideration of its potential impact on the EFSA conclusions on neonicotinoids. EFSA Journal 2013;11(6):3242, 20 pp., doi:10.2903/j.efsa.2013.3242

onderdelen/parameters). Volgens de auteurs is deze studieopzet relevant om een idee te krijgen over het effect op herinnering aan en oriëntatie in het landschap. Maar bijen in het wild komen niet zomaar op een onbekende plek terecht waar ze niet zelf naartoe zijn gevlogen. Bovendien zijn de concentraties veel hoger dan in Nederland te verwachten veldconcentraties, waar toepassing in bloeiende gewassen niet is toegestaan (de concentraties liggen bovendien hoger dan de relevante concentraties voor zaadbehandeling in bloeiende gewassen).

- *Effect op honingbijen van blootstelling aan met clothianidin behandeld koolzaad Cutler et al. 2014*

Volken werden middenin bloeiende koolzaadvelden geplaatst en na 14 dagen overgebracht naar eerst een geïsoleerde bijenstand waar ze op wilde bloemen konden vliegen, en daarna naar een overwinteringslocatie. Ze werden gevolgd tot na de winter.

Er was geen effect van clothianidin op volkgewicht, honingopbrengst, hoeveelheid verzameld stuifmeel, ziektes/plagen, aantallen dode en levende bijen of broed. Er was hoge wintersterfte: 37% in de controle en 26% in de behandeling (niet statistisch significant verschillend). In Nederland wordt wintersterfte van ca. 10% als normaal gezien. De wintersterfte in de studie kwam echter overeen met de gemiddelde sterfte dat jaar in de regio. De auteurs denken dat er mogelijk een correlatie is tussen de infectiegraad met *Nosema* en wintersterfte, maar dit is niet uit de studie op te maken.

Deze veldstudie is realistisch voor een deel van Canada, waar op miljoenen hectares behandeld koolzaad geteeld wordt. De blootstelling aan het behandelde gewas (gemeten met percentage koolzaadstuifmeel) in deze studie was erg hoog, wat positief is. Een nadeel is dat de controlevolken besmet bleken met clothianidin, zij het in significant lagere gehalten dan in de behandeling. De studie voldeed aan de aanbeveling van EFSA om velden tenminste vier kilometer uit elkaar te hebben en gezien de afstand van ten minste tien kilometer is het zeer onwaarschijnlijk dat controlebijen op behandelde velden geïmagineerd hebben. Het is ook onwaarschijnlijk dat er residuen uit voorgaande jaren via de bodem in de planten terecht is gekomen, aangezien dan op dag 7 al clothianidin gevonden zou moeten zijn en niet alleen later in de studie; of dat de zaaimachines besmet waren, want alle controlevelden zijn eerder ingezaaid dan de behandelde velden. De auteurs denken dat de meest waarschijnlijke bron van besmetting spuittoepassing van thiamethoxam is geweest, met besmetting van wilde planten via drift, en omzetting van thiamethoxam in de metaboliet clothianidin. De besmetting van de controle maakt deze studie minder betrouwbaar, maar hij is zeker in de landbouwkundige situatie van Canada realistisch voor de veldsituatie, en wijst uit dat daar geen negatieve effecten op honingbijen te verwachten zijn van blootstelling aan met clothianidin behandeld koolzaad tot en met overwinteringssucces.

#### Uitgebreide samenvatting:

Clothianidin wordt in een deel van Canada op miljoenen hectares koolzaad gebruikt. Deze veldstudie keek naar de effecten op honingbijen van blootstelling aan behandeld koolzaad. De studie is uitgevoerd in 2012-2013.

Het koolzaad werd behandeld met ongeveer 2,9 mg clothianidin/kg zaad, en ingezaaid met een dosering van ongeveer 16 g clothianidin/ha. Het zaadbehandelingsmiddel bevatte verder drie fungiciden, die ook in controlevelden toegepast werden. De velden lagen tenminste 10 km uit elkaar en buiten 'foerageerafstand' (niet toegelicht) van andere koolzaadvelden. De vorige behandeling met neonicotinoïden van deze velden was ten minste anderhalf jaar geleden. Er waren 5 testvelden en 5 controlevelden, elk ongeveer 2 ha. Middenin elk veld werden vier honingbijvolken (*Apis mellifera*) geplaatst, met ongeveer 11.500 bijen/volk, toen ongeveer 25% van het koolzaad bloeide (eind juni/begin juli). Na 14 dagen in het koolzaadveld werden de volken overgebracht naar een geïsoleerde bijenstand waar ze op wilde bloemen konden vliegen, en vóór de winter werden ze naar een overwinteringslocatie

gebracht. De volgende parameters werden gemeten vanaf blootstelling tot oktober (overwintering) op verschillende momenten: volkgewicht vóór en na blootstelling aan het koolzaad, honingopbrengst, sterfte van volwassen bijen (inclusief residumeting), broed, aantal bijen per volk, residuen in nectar (uit raat, vers), honing, pollen (van bijen via pollenvallen) en bijenwas. Na overwintering is gekeken naar overleving van het volk, hoeveelheid gesloten broed, aantal bijen, aanwezigheid van koninging, eieren en larven, residuen in bijenwas, en aanwezigheid van Varroamijt, Acarapis miltziekte en Nosema. Pollenanalyse wees uit dat de bijen veel foerageerden op het koolzaad, met 88% van al het stuifmeel van koolzaad tijdens de eerste week in het veld. Tijdens de tweede week daalde dit sterk, en op dag 14 was nog maar 46% van het stuifmeel van koolzaad. De rest kwam vooral van wilde bloemen of siergewassen en voor een klein deel van maïs. Na verplaatsing naar de bijenstand werd geen stuifmeel van gewassen meer gevonden. Er was geen verschil tussen controle en behandelde volken.

Er was geen effect van clothianidin op volkgewicht, honingopbrengst, hoeveelheid verzameld stuifmeel, ziektes/plagen, aantallen dode en levende bijen of broed. Er was hoge wintersterfte: 37% in de controle en 26% in de behandeling (niet statistisch significant verschillend). Deze wintersterfte kwam overeen met de gemiddelde sterfte dat jaar in de regio.

In nectar, honing en bijenwas werd geen clothianidin aangetroffen boven de LOD van 0.35 ppb. In pollen van de behandelde velden vond men op dag 7 0.6-1.1 ppb (gemiddeld 0.9 ppb) en op dag 14 <LOQ – 1.9 ppb (gemiddeld 0.8 ppb). In volken uit controlevelden werd ook clothianidin aangetroffen, alleen op dag 14:  $2x < LOQ$ , 0.35, 0.5 en 1.3 ppb. De auteurs onderwierpen de gemiddelde residuniveaus in de 14 dagen blootstellingsperiode aan statistische analyse en vonden significant hogere clothianidinresiduen in de volken uit de behandelde velden (meer dan driemaal zo hoog).

Andere bestrijdingsmiddelen werden ook aangetroffen in beide testgroepen, zowel acariciden (diergeneesmiddel) als gewasbeschermingsmiddelen (met name chloorthalonil). Wintersterfte was bijzonder hoog (in Nederland wordt wintersterfte van ca. 10% als normaal gezien). De auteurs denken dat er mogelijk een correlatie is tussen de infectiegraad met Nosema en wintersterfte. Zij hebben Nosema echter in dode volken gemeten in dode bijen en in levende volken in levende bijen, en deze conclusie is daarom moeilijk uit de studie op te maken. Een andere verklaring is echter niet te geven.

De blootstelling aan het behandelde gewas in deze studie was erg hoog, wat positief is. Een nadeel is dat de controlevolken besmet bleken met clothianidin, zij het in significant lagere gehalten dan in de behandeling. De studie voldeed aan de aanbeveling van EFSA om velden tenminste vier kilometer uit elkaar te hebben en gezien de afstand van ten minste tien kilometer is het zeer onwaarschijnlijk dat controlebijen op behandelde velden gefoerageerd hebben. Het is ook onwaarschijnlijk dat er residuen uit voorgaande jaren via de bodem in de planten terecht is gekomen, aangezien dan op dag 7 al clothianidin gevonden zou moeten zijn, of dat de zaaimachines besmet waren, want alle controlevelden zijn eerder ingezaaid dan de behandelde velden. De auteurs denken dat de meest waarschijnlijke bron van besmetting spuittoepassing van thiamethoxam is geweest, met besmetting van wilde planten via drift, en omzetting van thiamethoxam in de metaboliet clothianidin. De besmetting van de controle maakt deze studie minder betrouwbaar, maar hij is zeker in de landbouwkundige situatie van Canada realistisch voor de veldsituatie, en wijst uit dat daar geen negatieve effecten op honingbijen te verwachten zijn van blootstelling aan met clothianidin behandeld koolzaad tot en met overwinteringssucces.

In de Zwitserse veldstudie van Sandrock et al. 2014 werd wél effect gevonden op honingbijen. Het daar gevonden meetpunt later in de zomer is niet meegenomen in de huidige studie. In de herfst is echter in beide studies gemeten en werd alleen in de Zwitserse studie effect gevonden. Een verschil tussen beide studies is het veelvuldig optreden van vervanging van de koningin in de Zwitserse studie terwijl daarvan geen melding wordt gedaan in de huidige studie. Verder werd er in Zwitserse studie gevoerd met pollen patties in het volk, en was dit een volledig realistische veldstudie met blootstelling alleen via foerageren van de bijen op het behandelde gewas.

- *Effecten op honingbijen tijdens het zaaien van maïs. Girolami et al. (2012) en Tapparo et al. (2012)*

Bij Girolami et al. lijkt een fout geslopen te zijn in de referentie in het EASAC-rapport. De titel van het artikel verwijst naar een publicatie van dezelfde auteurs uit 2011. Een vergelijkbare publicatie uit 2012 draagt een andere titel. Alledrie de artikelen gaan over de effecten op honingbijen die door stofwolken vliegen die ontstaan tijdens het zaaien van maïs. Hieruit blijkt dat bijen bij gebruik van zaaimachines die de lucht omhoog blazen een dodelijke blootstelling kunnen oplopen in het veld, mits ze daarna in hoge luchtvochtigheid worden gehouden. Bij zaaimachines met deflectoren is de sterfte veel minder. Deze artikelen gebruiken een worst case blootstellingsmethode. De blootstellingsroute via stofdrift dat op bloeiende planten buiten een ingezaaid veld terecht komt, lijkt relevanter voor populatieeffecten op bijen. Om stofdrift buiten het veld zoveel mogelijk te voorkomen zijn in Nederland sinds 2010 maatregelen ingesteld die deflectoren op maiszaaimachines verplicht stellen (dit leidt bovendien tot een reductie van de stofwolken in het veld). Deze artikelen zijn dus niet relevant voor de huidige Nederlandse situatie. Zij benadrukken hooguit de noodzaak om in de risicobeoordeling rekening te houden met stofdrift bij uitzaaien van behandeld zaad, wat dus al gebeurt in Nederland.

- *Rundlöf et al. 2015<sup>6</sup> (niet in EASAC-rapport want later gepubliceerd in Nature)*

De auteurs concluderen dat clothianidin als zaadcoating in koolzaad negatieve effecten heeft op wilde bijen, met potentieel negatieve effecten op populatieniveau. Hoewel vanwege verontreiniging met andere stoffen en een mogelijk effect van niet volledig blind uitgevoerde monitoring de controle niet volledig vergelijkbaar is met de behandelde velden, vindt Ctgb de resultaten toch zorgwekkend. Het gebrek aan nestelactiviteit van de *Osmia*'s en het minder voorkomen van wilde bijen in en rond behandelde velden verdient meer onderzoek voordat hierover definitieve conclusies kunnen worden getrokken. Het effect op de hommels is echter ook al gezien in ander onderzoek. Het lijkt erop dat hommels minder foerageren op stuifmeel en nectar met neonicotinoïden en daardoor minder broed produceren en het volk minder hard groeit. Dit wordt nu ook in een veldsituatie gezien.

De auteurs concluderen ook dat de honingbij niet geschikt is als indicatorsoort voor alle bijen, zeker niet in de hogere tier. Dit onderschrijft Ctgb en onderstreept het belang van opname van deze bestuivers in de nieuwe EFSA guidance. De waarnemingen laten verder zien dat via stofdrift van behandeld zaad blootstelling van akkerranden kan plaatsvinden. Dit is bekend en opgenomen in toekomstige guidance, en in Nederland worden sinds 2010 maatregelen genomen om stofdrift zoveel mogelijk tegen te gaan. Echter, vanwege vrij verkeer van behandeld zaad binnen Europa is het mogelijk dat behandeld zaad zonder stofdriftrestricties toch in Nederland uitgezaaid wordt.

#### Uitgebreide samenvatting

Dit onderzoek gaat over de vraag hoe neonicotinoïden bijen beïnvloeden op veldrealistische landbouwschaal. In Zuid-Zweden zijn acht behandelde en acht onbehandelde velden, gepaard op basis van vergelijkbaarheid in omgeving. De velden zijn ingezaaid met koolzaad dat behandeld was met het fungicide thiram, of met thiram plus clothianidin plus beta-cyfluthrin. De dosering thiram is niet vermeld. De dosering van de insecticiden was 25 mL Elado/kg seed (400 g/L clothianidin en 80 g/L beta-cyfluthrin), met 7.7 kg zaad/ha. Dit leidt tot 77 g clothianidin/ha en 15.4 g beta-cyfluthrin/ha.

<sup>6</sup> Rundlöf, Andersson, Bommarco, Fries, Hederström, Herbertsson, Jonsson, Klatt, Pedersen, Yourstone, Smith. Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature*, 520, 416 (23 April 2015); DOI: 10.1038/nature14420.

Commented 5.1.2.e In lijn brengen met eerdere opmerking hierover

Tijdens de bloei is gekeken hoeveel en welke solitaire bijen en hommels (hierna 'wilde bijen' genoemd) voorkwamen, zowel in de velden als in en vlak naast de randen, en wat de dekkingsgraad van de koolzaadbloemen was in het veld. De bloemdichtheid was positief gecorreleerd met het aantal wilde bijen, en de bloemdichtheid was hoger in behandelde velden. Desondanks was het aantal wilde bijen significant lager in en langs behandelde velden. De grootte van het veld was positief gecorreleerd met het aantal wilde bijen, maar het gehalte landbouwgebied in de omgeving had geen invloed.

De aantallen wilde bijen staan vermeld in extended data table 7. Hierin is te zien dat er vooral veel hommels waargenomen zijn. De aantallen zijn voor de solitaire bijen erg laag per soort. In totaal zijn in de testvelden ongeveer twee keer zoveel wilde bijen waargenomen als in de controlevelden (dit geldt zowel met als zonder *Bombus terrestris*, die zowel wild als gekweekt kan zijn). De monitoring in het veld is 'blind' uitgevoerd, maar de waarnemers in de randen wisten of hun veld behandeld was of niet. Het is helaas niet te bepalen of hierdoor de resultaten mogelijk zijn beïnvloed, aangezien niet is vermeld hoeveel bijen in het veld en hoeveel in de randen zijn gezien.

Drie nesten met elk 27 cocons van de rosse metselbij (*Osmia bicomis*) zijn vlak voor de bloei naast elk veld geplaatst en er is gevolgd hoeveel nestactiviteit er was van de uitgekomen bijen. Osmiavrouwtjes bouwen hun broedcellen het liefst bovenop het nest waar ze zelf uitgekomen zijn, dus er werd verwacht dat ze zouden nestelen in hun oude nest. In zes van de acht controlevelden deden ze dit ook, maar in geen van de acht testvelden. Dit is een duidelijk effect van de behandeling, hoewel het werkingsmechanisme onbekend is. De auteurs speculeren dat het komt door een reductie in navigatiecapaciteit.

Bij het begin van de bloei zijn zes hommelsvolken (*Bombus terrestris*, ca. 10 weken oud, met één koningin, ongeveer 50 werksters en broed in alle stadia) naast elk veld geplaatst. De volken werden gedurende de tijd op het veld drie tot vijf keer gewogen. Zodra in één van de twaalf volken van een veldpaar nieuwe koninginnen werden gevormd, werden alle volken ingevroren. Dit gebeurde 22-38 d na introductie op het veld. In vier van de zes volken werd het aantal koningin en werkster/darcellen, het gewicht van de cocons, larven en neststructuur, en het aantal opslagcellen voor nectar en pollen bepaald. Een negatief effect van de behandeling werd gevonden op nestgroei (lagere toename in gewicht en lagere groeijsnelheid) en reproductie (minder cocons van koninginnen en werksters/darren) van de hommels.

Bij het begin van de bloei zijn ook zes honingbijvolken (*Apis mellifera*) bij elk veld geplaatst. De volken bevatten elk ongeveer 3418 volwassen bijen. Na anderhalve maand zijn de volken verplaatst naar een overwinterlocatie en is het aantal volwassen bijen opnieuw bepaald, met de Liebefeldmethode. Volgens een *power* analyse kan een verschil van 20% in volkgrootte bepaald worden met een *power* van 0.8. Er werd geen effect gevonden.

Het gehalte koolzaadpollen dat door de verschillende soorten verzameld werd, is bepaald met stuifmeelvalven aan de honingbijkasten (53% in controle, 63% in test), van hommels in het veld (88% in controle, 75% in test), en uit broedcellen van de metselbijen (35%, alleen in controle, want geen broedcellen in test).

Residuen van clothianidin, beta-cyfluthrin en vier andere neonicotinoïden die in Zweden gebruikt mogen worden (acetamiprid, imidacloprid, thiamethoxam en thiacloprid) zijn tijdens de bloei gemeten in stuifmeel en nectar verzameld van foerageersters op het veld. Vijf honingbijen met pollen en tenminste vijf met nectar werden verzameld per veld (op twee controlevelden na, waar geen pollenfoerageersters gevonden werden). Ook werd van drie tot vijf hommels per veld de nectar verzameld (op één controleveld na, waar slechts één hommel met nectar gevonden werd). Beta-cyfluthrin werd niet gevonden boven de LOD van 1 ng/g, wat in overeenstemming is met de verwachtingen voor deze niet-systemische stof.

Van honingbijen werd clothianidin in alle acht behandelde velden aangetroffen in nectar (6.7-16, mean 10.3 ng/g) en pollen (6.6-23, mean 13.9 ng/g), maar ook in nectar van twee controlevelden (wel in veel lagere concentratie, 0 en 0.61, mean 0.1 ng/g). Het is niet bekend of de controlevelden waar clothianidin in de nectar zat, dezelfde waren als de velden waar geen pollenfoerageersters gevonden werden, dus het is niet uit te sluiten dat in totaal vier controlevelden verontreinigd waren met clothianidin.

De hommelnectar bevatte geen clothianidin in de controlevelden en 1.4-14, mean 5.4 ng/g, clothianidin in de testvelden.

Verder valt op dat in de testvelden ook thiacloprid aangetroffen werd (pollen in vier velden, max. 0.29 ppb; nectar in twee velden, max. 0.044 ppb, dit is een waarde onder de LOQ). In de controlevelden werden ook verschillende andere stoffen aangetroffen in zowel nectar als pollen: acetamiprid, imidacloprid, thiacloprid en thiamethoxam (in één tot drie velden, met maximumgehalten van 0.19 tot 1.4 ppb). Op thiacloprid na werden deze stoffen niet gevonden in de testvelden. Volgens de gegevens van de boeren is slechts op één controleveld thiacloprid gespoten (ondanks het verzoek van de onderzoekers dit in geen enkel veld te doen).

Deze veldstudie reflecteert de normale landbouwsituatie en verontreiniging van de controles was waarschijnlijk onvermijdelijk. Het feit dat de controlevelden wat betreft gehalte andere stoffen niet vergelijkbaar zijn met de testvelden maakt de resultaten wel minder betrouwbaar. Bovendien zijn de gemiddelde concentraties en ranges niet vermeld, waardoor het lastig is een beeld te krijgen van de werkelijke blootstelling in de verschillende velden.

In alle controle- als testvelden, met uitzondering van één controleveld, zijn bovendien één of twee behandelingen geweest met indoxacarbmiddelen, tot vlak voor de bloei. Het gehalte indoxacarb in de bloemen is niet gemeten zodat het niet duidelijk is of hier verschillen waren tussen controle en testvelden.

Bloemen en bladeren werden verzameld in de akkerranden die gebruikt werden voor wilde bij-monitoring, binnen twee dagen na zaaien (controle en test) en twee weken na zaaien (alleen testvelden). Clothianidin werd niet aangetroffen in de controlevelden, wel in de testvelden in 0-5.9, mean 1.2 ng/g vlak na zaaien en 0-6.5, mean 1.0 ng/g, na twee weken. Dit zijn residugehalten in hele planten, niet in nectar en stuifmeel, en als zodanig dus minder relevant voor een risicobeoordeling via voedsel. De waarnemingen laten zien dat via stofdrift blootstelling van akkerranden kan plaatsvinden. Dit is bekend en opgenomen in toekomstige guidance, en in Nederland worden sinds 2010 maatregelen genomen om stofdrift zoveel mogelijk tegen te gaan. Echter, vanwege vrij verkeer van behandeld zaad binnen Europa is het mogelijk dat behandeld zaad zonder stofdriftrestricties toch in Nederland uitgezaaid wordt.

De auteurs concluderen dat clothianidin als zaadcoating in koolzaad negatieve effecten heeft op wilde bijen, met potentieel negatieve effecten op populatieniveau. Hoewel vanwege verontreiniging met andere stoffen en een mogelijk effect van niet volledig blind uitgevoerde monitoring de controle niet volledig vergelijkbaar is met de behandelde velden, vindt Ctgb de resultaten toch zorgwekkend. Het gebrek aan nestelactiviteit van de *Osmia*'s en het minder voorkomen van wilde bijen in en rond behandelde velden verdient meer onderzoek voor hierover een definitieve conclusie kan worden getrokken. Het effect op de hommels is echter ook al gezien in ander onderzoek. Het lijkt erop dat hommels minder foerageren op stuifmeel en nectar met neonicotinoïden en daardoor minder broed produceren en het volk minder hard groeit. Dit wordt nu ook in een veldsituatie gezien.

De auteurs concluderen ook dat de honingbij niet geschikt is als indicatorsoort voor alle bijen, zeker niet in de hogere tier. Dit onderschrijft Ctgb (zie elders in dit stuk).

- Kessler et al. 2015<sup>7</sup> (niet in EASAC-rapport want later gepubliceerd in Nature)

Onderzoek naar de mogelijkheid van honingbijen (*Apis mellifera*) en hommels (*Bombus terrestris*) onderscheid te maken tussen suikerwater met en zonder imidacloprid, clothianidin of thiamethoxam.

De auteurs trekken de conclusie dat hommels en honingbijen neonicotinoïden niet kunnen proeven. Zij verklaren de gevonden voorkeur voor sucrose met neonicotinoïden uit de invloed die deze stoffen hebben op de nACh-receptoren in de hersenen – zo zouden zij de neurale mechanismen beïnvloeden die betrokken zijn bij het leren over de locatie van voedsel.

Andere studies laten juist zien dat het leervermogen en geheugen van honingbijen worden aangetast door neonicotinoïden (waardoor je zou verwachten dat ze juist niet naar een voedselbron terugkeren met neonicotinoïde). De auteurs zoeken een verklaring voor deze tegenstelling in de kortere blootstellingsduur bij dit experiment of in verschillende gevoeligheid van nACh-receptoren in de hersendelen die voor deze taken verantwoordelijk zijn. Dit laatste zou volgens hen ook het verschil in vermijding van imidacloprid tussen ervaren foerageersters en net uitgekomen werksters kunnen verklaren.

Naar de mening van het Ctgb is dit een interessante en goed uitgevoerde studie. De bevinding dat zowel hommels als honingbijen in het lab concentraties die kunnen voorkomen bij zaadbehandeling van een aantrekkelijk gewas niet vermijden, soms zelfs prefereren, maar daardoor in totaal minder voedsel opnemen, is vergelijkbaar met het effect van nicotine op mensen. Bij honingbijen worden echter geen schadelijke effecten gevonden op volkniveau in het veld en dus speelt dit effect op veldrealistische schaal blijkbaar geen belangrijke rol (zie bijvoorbeeld Rundlöf et al, 2015). Voor hommels is dit anders (zie bijvoorbeeld hetzelfde onderzoek). Deze studie onderbouwt daarom het belang van het opnemen van hommels in het toetsingskader.

#### Uitgebreide samenvatting

Onderzoek naar de mogelijkheid van honingbijen (*Apis mellifera*) en hommels (*Bombus terrestris*) onderscheid te maken tussen suikerwater met en zonder imidacloprid, clothianidin of thiamethoxam.

Hommelwerksters werden individueel in bakjes gezet (tussen de 36 en 66 hommels per testconcentratie). Honingbijwerksters zaten met 25 bij elkaar in een bak (40 groepen van 25 per testconcentratie). Elke bak bevatte drie (voor hommels) of vijf (voor honingbijen) buisjes: één met water, één (of twee) met sucroseoplossing (0.5 M), en één (of twee) met sucroseoplossing (0.5 M) plus een neonicotinoïde. Na 24 u werd gekeken of de bijen dood of levend waren en hoeveel van de suikeroplossingen gegeten was. Concentraties van de neonicotinoïden waren 1 nM (ca. 0.26 ppb), 10 nM (ca. 2.6 ppb), 100 nM (ca. 26 ppb) en 1 µM (ca. 260 ppb).

Bij 1 en 10 nM (realistische concentraties bij zaadbehandeling van een bloeiend gewas) hadden de hommels een significante voorkeur voor de neonicotinoïdenoplossing, bij hogere concentraties hadden zij voorkeur noch afkeur. De honingbijen hadden juist bij de drie hoogste concentraties een significante voorkeur voor de neonicotinoïden. Alleen 1 µM thiamethoxam en clothianidin zorgde voor significante sterfte na 24 uur bij beide soorten (ca. 80% bij hommels en 20% bij honingbijen), alle andere concentraties niet. Deze sterfte is niet verrassend aangezien de dosering per bij bij 1 µM in de range zit van de LD50 voor honingbijen.

De leeftijd van de bijen lijkt een rol te spelen. Bovenstaand resultaat komt uit proeven met foerageersters die gevangen werden terwijl ze terugkwamen van het veld. Net uitgekomen bijen, die nog geen foerageerervaring hadden, vermeden concentraties van 1 (hommels en honingbijen) en 10 nM (alleen hommels) imidacloprid wél.

<sup>7</sup> Rundlöf, Andersson, Bommarco, Fries, Hederström, Herbertsson, Jonsson, Klatt, Pedersen, Yourstone, Smith. Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. Nature, 520, 416 (23 April 2015); DOI: 10.1038/nature14420.

Hoewel ervaren bijen dus sucroseoplossing met neonicotinoïden niet vermijden, of zelfs prefereren boven onbehandelde sucroseoplossing, nemen ze er in totaal wel statistisch significant minder van op. Dit was zo bij thiamethoxam (bij de hoogste dosering), clothianidin (bij hommels bij de twee hoogste doseringen en bij honingbijen bij de hoogste) en imidacloprid (bij hommels bij alle doseringen, bij honingbijen bij de twee hoogste).

Met honingbijen zijn twee testen gedaan: eerst de Proboscis Extension Reflex (PER) test (druppel 1 M sucroseoplossing op de antenne, als een bij voedsel herkent steekt zij haar proboscis uit; 40 bijen per concentratie) en direct daarop een druppel 1 M sucroseoplossing op de proboscis om te zien of de bij het opeet (10 bijen per concentratie). Concentraties van de drie neonicotinoïden waren 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM en 10 µM. Er werd geen effect gevonden op proboscis extension of retraction (dus: de bijen staken bij elke concentratie hun tong uit, en namen het voedsel vrijwel altijd op).

Electrofysiologische opnames zijn gemaakt van de smaakneuronen in zintuighaartjes (sensilla chaetica) op een monddeel (de galea) van levende honingbijen en hommels (vastgezet in een harnas). Met deze sensilla herkent een bij voedings- en giftige stoffen. Giftige stoffen geven een reactie in bepaalde neuronen of juist een onderdrukking van andere. De sensilla werden gestimuleerd met een electrode met verschillende oplossingen. Sucrose, zout en *nicotine hydrogen tartrate* gaven een duidelijke reactie in neuronactiviteit. De neonicotinoïden gaven geen grotere respons dan water bij 1 nM en 1 µM. Ook was er geen verschil in reactie op suikerwater zonder, of met 1, 100 nM of 1 µM neonicotinoïden. Deze resultaten werden gezien zowel bij ervaren foerageersters als net uitgekomen honingbijen. De auteurs trekken hierop de conclusie dat hommels en honingbijen neonicotinoïden niet kunnen proeven. Zij verklaren de voorkeur voor sucrose met neonicotinoïden met de invloed die deze stoffen hebben op de nACh-receptoren in de hersenen – zo zouden zij de neurale mechanismen beïnvloeden die betrokken zijn bij het leren over de locatie van voedsel. Andere studies laten juist zien dat het leervermogen en geheugen van honingbijen juist worden aangetast door neonicotinoïden (waardoor je zou verwachten dat ze juist niet naar een voedselbron terugkeren met neonicotinoïde). De auteurs zoeken een verklaring voor deze tegenstelling in de kortere blootstellingsduur in dit experiment of in verschillende gevoeligheid van nACh-receptoren in de hersendelen die voor deze taken verantwoordelijk zijn. Dit laatste zou volgens hen ook het verschil in vermijding van imidacloprid tussen ervaren foerageersters en net uitgekomen werksters kunnen verklaren.

Naar de mening van het Ctgb is dit een interessante en goed uitgevoerde studie. De bevinding dat zowel hommels als honingbijen in het lab concentraties die kunnen voorkomen bij zaadbehandeling van een aantrekkelijk gewas niet vermijden, soms zelfs prefereren, maar daardoor in totaal minder voedsel opnemen, is vergelijkbaar met het effect van nicotine op mensen. Bij honingbijen worden echter geen schadelijke effecten gevonden op volkniveau in het veld en dus speelt dit effect op veldrealistische schaal blijkbaar geen belangrijke rol (zie bijvoorbeeld Rundlöf et al, 2015). Voor hommels is dit anders (zie bijvoorbeeld hetzelfde onderzoek). Deze studie onderbouwt daarom het belang van het opnemen van hommels in het toetsingskader.

- *Effect van imidacloprid op honingbijen Dively et al. 2015 (Niet in EASAC want te laat gepubliceerd)*

Op basis van hun resultaten en dosis-responsrelaties voor verschillende volkparameters vóór de winter concluderen de auteurs dat blootstelling aan 20 en 100 µg/kg imidacloprid via pollensubstituuut gedurende 12 weken in de vroege zomer, negatieve effecten heeft op de gezondheid van de honingbijvolken, maar blootstelling aan 5 µg/kg niet. Waarschijnlijk doelen de auteurs met de 'dosis-responsrelaties' op de volgende effecten, waarvan de meeste alleen gezien werden in één van beide jaren: meer 'queen events' (vervanging van de koningin, merk op dat dit ook in Sandrock et al. 2014 werd gezien) en daaropvolgende



verstoring van broedzorg in 2009 bij 20 en 100 µg/kg, hogere Varroabesmetting bij hogere dosering in beide jaren (significant bij 100 µg/kg in 2009), meer honingcellen bij 100 µg/kg in 2009 (wat volgens hen wijst op mogelijke vermijding van besmet voedsel), en minder bijenbroed met toenemende dosering in 2010.

Ctgb wijst erop dat de effecten over het algemeen erg verschillen tussen de twee jaren. De analyses zijn niet altijd helder gepresenteerd. Sommige effecten lieten een duidelijke dosis-repons zien zonder significantie bij enkele doseringen en het is daarom niet helemaal duidelijk waarom de auteurs concluderen dat er geen effect was bij 5 maar wel bij 20 en 100 µg/kg. Dit is mogelijk vooral gebaseerd op de voor beide jaren samengevoegde volkoverlevingsdata, waar zij bij 5 geen maar bij 20 en 100 µg/kg wel significante effecten vinden.

De auteurs betwijfelen zelf of een 12-weeken blootstellingsregime realistisch is voor de veldsituatie en Ctgb sluit zich daarbij aan. Ook wijzen zij op het belang van het meenemen van overwintering in honingbijveldstudies. Vóór de winter werden in 2009 geen significante effecten gevonden, maar ná de winter wel. Subletale effecten kunnen dus zo subtiel zijn dat ze gemist worden in statistische analyse, maar ze kunnen dan toch de overleving in de winter significant beïnvloeden. Meenemen van overwintering is een onderdeel van de aanbevelingen voor veldstudies in de nieuwe EFSA guidance. De grote verschillen tussen de twee jaren in deze studie pleit er zelfs voor om meerdere jaren achter elkaar te testen, omdat anders effecten mogelijk gemist worden. Hoeveel jaar gemeten zou moeten worden, is echter niet bekend.

#### Uitgebreide samenvatting

Honingbijvolken (*Apis mellifera*) zijn gedurende twaalf weken (twee á drie broedcycli, mei tot begin augustus) continu blootgesteld aan 0, 5, 20 of 100 µg/kg imidacloprid (via pollensubstituut in de kast) en daarna gevolgd tot na de overwintering. Alle volken stonden in bijenstanden in Maryland, USA. Binnen 3 km werd geen imidacloprid gebruikt (wel andere neonicotinoïden in een deel van de maïs in de buurt; deze zijn niet verder benoemd noch meegenomen in de residumetingen). In 2009 zijn 10 volken/behandeling gebruikt met ca. 15.000 bijen/volk aan het begin van de test, in 2010 7 volken met ca. 16.000 bijen/volk aan het begin van de test. De bijen mochten vrij foerageren, maar werden gestimuleerd het pollensubstituut te eten door middel van pollenvallen bij de ingang van de kast. Parameters: status van het volk (aantal cellen, bijen, gesloten broed, open cellen met larven, honingcellen en bijenbrood); ongebruikelijke aanwezigheid van cellen met darren, dode larven, abnormaal gedrag van werkers, abnormaal broedpatroon, tekenen van ziekte, aanwezigheid van plagen; foerageeractiviteit; aanwezigheid van ziektes.

In 2009 was de frequentie van 'queen events' (het vervangen van de koningin, door de bijen zelf of door de imker, omdat de oude koningin zwak of dood was) positief gecorreleerd met de dosis (1 in de controle, 2 bij 5 ppb, 4 bij 20 ppb, 4 bij 100 µg/kg). In de herfst was er een positieve correlatie tussen dosis en Varroa en bij 100 ppb hadden de volken significant meer Varroamijten. Na overwintering was deze correlatie er niet meer (alleen gemeten in de overlevende volken). Er was nooit een significante relatie met Nosema. Foerageeractiviteit (was in augustus en september (dus in de twee maanden na blootstelling) significant lager in de behandelde volken dan in de controle, maar het enige effect op de status van het volk was een positief effect op de honingvoorraad bij 100 µg/kg (significant meer honingcellen) direct na blootstelling. Dit effect was later in de herfst (2 maanden na blootstelling) en na overwintering niet meer te zien. Hoewel de volken dus geen effect lieten zien in sterkte, was er wel een statistisch significant effect op lager overwintersucces bij 100 µg/kg, en een trend bij lagere doses. De auteurs wijten dit aan de hogere frequentie van 'queen events' en daaruit volgende verstoringen in broedzorg bij de hogere doseringen.

In 2010 de proef werd herhaald met vrijwel dezelfde opzet, behalve dat er zeven in plaats van tien volken per behandeling waren en dat de proef iets later in mei begon en dus ook

later in augustus eindigde. Dit jaar was er geen relatie tussen 'queen events' en dosis (er waren zelfs meer 'queen events' bij 0 en 5 µg/kg dan bij 20 en 100 µg/kg). Er waren geen significante verschillen in Varroabesmetting tussen doseringen, maar regressieresultaten wezen wel uit dat er een significante toenemende trend was met dosering. Nosema kwam vrijwel niet voor en had geen relatie met dosering. Foerageeractiviteit werd niet negatief beïnvloed door imidacloprid. Controlevolken foerageerden significant minder, wat volgens de auteurs kwam door verstoringen in broedzorg door meer 'queen events'. Er waren geen significante effecten op volkparameters, maar er was wel een significant verschil tussen broedproductie in de controle en alle behandelingen samen. Bij 100 µg/kg werd wederom meer honing verzameld maar dit effect was dit jaar niet significant. Overwintersucces was veel lager dan in 2009, vanwege de milde winter en daarom uitputting van voedselvoorraden (4 van 7 in de controle, 3 van 7 in de testgroepen). Er was geen relatie met de dosering.

Residuen van imidacloprid en metabolieten werden gemeten in bijen uit de kast en in bijenbrood, tot in oktober. In 2009 werd in een zeer klein deel (<5%) van de controlesamples imidacloprid aangetroffen. In deze controlesamples zat ongeveer evenveel a.s. als in de samples uit de behandelde groepen. In de behandelde volken nam het residugehalte direct na blootstelling toe met toenemende dosis; in oktober was deze relatie er niet meer. In 2010 waren alle controleresiduen onder de LOD (0.2 µg/kg voor imidacloprid). In de testvolken waren de residuen in bijen en bijenbrood lager dan in 2009 en er was geen relatie tussen residugehalte en blootstellingsdosis.

In 2011 werd met 8 volken (grootte niet vermeld) per behandeling onderzoek gedaan naar het gedrag en de lotgevallen van imidacloprid in bijenvolken. Concentraties waren 0, 20 (in suikersiroop) of 100 µg/kg (in pollensubstituut) imidacloprid. De auteurs berekenden dat bij beide doseringen er ongeveer 40 µg imidacloprid/kg/volk/week opgenomen werd.

Blootstelling duurde zes weken, vanaf mei. In acht van de 87 controlesamples werden lage gehalten aangetroffen, volgens de auteurs het resultaat van drift, besmetting tijdens monsternamen of roof uit een ander volk. Bovendien bevatte één sample een hoog gehalte; dit werd beschouwd als outlier.

Residuen bij 100 µg/kg waren significant hoger en werden significant vaker gevonden dan bij 20 µg/kg. De hoogste gehalten werden gevonden bij 100 µg/kg in honing (range 2.8-13.4, gemiddeld 6.5-7.2 µg/kg), gevolgd door lagere maar consistente gehalten in bijenbroed (range 0.5-1.7, gemiddeld 0.9-1.0 µg/kg) en bijen (range 0.2-1.9, gemiddeld 0.3-0.7 µg/kg). In larven werd vrijwel nooit imidacloprid gevonden. Zes weken na blootstelling aan 100 µg/kg waren de gehalten iets lager maar samples waren even vaak positief. Bij 20 µg/kg waren de gehalten lager en namen ze sneller af.

Direct na zes weken blootstelling werd ook koninginnegelei bemonsterd (de koningin was tijdelijk gescheiden van haar volk om de productie ervan op gang te brengen). Dit bevat geen gehalten >LOD bij 20 µg/kg, maar wel bij 100 µg/kg (range 0.3-1.0 µg/kg, gemiddeld 0.6 µg/kg).

De metabolieten werden nooit gevonden boven hun LOD.

De bijenvolken gebruikt in dit residuexperiment werden ook onderzocht op volkparameters. Volksgrootte werd niet beïnvloed, maar in augustus hadden volken met 100 µg/kg significant minder raten met bijen dan in de andere twee groepen. Verder waren er geen effecten. Overwintering is niet meegenomen bij deze groep.

De hoge gehalten in honing bij 100 µg/kg in pollensubstituut zijn verrassend. Hogere gehalten werden verwacht bij 20 µg/kg via suikersiroop. Dit komt misschien omdat bijen pollensubstituut sneller verwerken in voedsel dan pollen van bloemen, dat langer opgeslagen wordt. Ook worden gehalten hoger doordat vocht verdampt uit de nectar. Verder zijn de gehalten in koninginnegelei verrassend, aangezien dit geproduceerd wordt via verwerking van voedsel in bijen, en het metabolisme van imidacloprid in bijen snel is (DT50 4-5 uur). De auteurs concluderen dat de residugehalten die bij 100 µg/kg gevonden werden, een worst-

case scenario vormen voor veldblootstelling aan imidacloprid op volkniveau. Aangezien de gehalten in deze volken min of meer gelijk zijn aan de gehalten die gevonden worden in stuifmeel en nectar van met imidacloprid zaadbehandeld bloeiend gewas, kan Ctgb hiermee instemmen. Bij 20 µg/kg waren de gehalten lager. Gemiddelde gehalten worden niet gegeven, maar de auteurs zeggen zelf dat de chronische dosis ook bij 20 µg/kg de veldrealistische doses bij zaadbehandeling ver overschreedt. Bij 5 µg/kg zijn alleen metingen gedaan in de toxiciteitsexperimenten van 2009 en 2010 en deze zijn nauwelijks gerapporteerd (de enige specifiek voor deze dosering gerapporteerde waarde is een gemiddeld residuniveau van 1.2µg/kg in bijenbrood in 2009). Er is dus niets te zeggen over het realisme van de gehalten in het volk voor de praktijk van de 5 µg/kg dosering. Ctgb merkt nog op dat de residumetingen gebaseerd zijn op zes weken blootstelling en de effectdata op twaalf weken blootstelling.

Foerageeractiviteit liet geen effect zien. Varroabesmetting wel, in beide jaren. Er was geen effect te zien op de status van het volk tijdens en na blootstelling vóór de winter, behalve een hoger aantal 'queen events' in 2009. Als data van beide jaren samengevoegd worden, vinden de auteurs dat 100, 94.1, 82.4 en 82.4% van de volken tot in oktober overleefde bij respectievelijk 0, 5, 20 en 100 µg/kg imidacloprid. Dit is niet statistisch significant, maar de auteurs vinden dat de dosis-respons erop wijst dat er uitgestelde subletale effecten optraden in de twee hogere doseringen. De auteurs hebben verder de volkoverlevingsdata van beide jaren samengevoegd voor oktober, februari en maart, en vinden dan een overall significant doseringseffect en bovendien significante effecten bij 20 en 100 µg/kg imidacloprid (maar niet bij 5 µg/kg). Na de winter, in maart, overleefde 82.4, 58.8, 47.1 en 52.9% bij respectievelijk 0, 5, 20 en 100 µg/kg imidacloprid (data van beide jaren samengevoegd).

Op basis van deze resultaten en dosis-responsrelaties voor verschillende volkparameters vóór de winter concluderen de auteurs dat blootstelling aan 20 en 100 µg/kg imidacloprid via pollensubstituut gedurende 12 weken in de vroege zomer, negatieve effecten heeft op de gezondheid van de honingbijvolken, maar blootstelling aan 5 µg/kg niet. Waarschijnlijk doelen de auteurs met de 'dosis-responsrelaties' op de volgende effecten, waarvan de meeste alleen gezien werden in één van beide jaren: meer 'queen events' en daaropvolgende verstoring van broedzorg in 2009 bij 20 en 100 µg/kg, hogere Varroabesmetting bij hogere dosering in beide jaren (significant bij 100 µg/kg in 2009), meer honingcellen bij 100 µg/kg in 2009 (wat volgens hen wijst op mogelijke vermijding van besmet voedsel), en minder bijenbroed met toenemende dosering in 2010. Ctgb wijst erop dat de effecten over het algemeen erg verschillen tussen de twee jaren. De analyses zijn niet altijd helder gepresenteerd. Sommige effecten lieten een duidelijke dosis-respons zien zonder significantie bij enkele doseringen en het is daarom niet helemaal duidelijk waarom de auteurs concluderen dat er geen effect was bij 5 maar wel bij 20 en 100 µg/kg. Dit is mogelijk vooral gebaseerd op de voor beide jaren samengevoegde volkoverlevingsdata, waar zij bij 5 geen maar bij 20 en 100 µg/kg wel significante effecten vinden.

De auteurs betwijfelen zelf of een 12-weeken blootstellingsregime realistisch is voor de veldsituatie en Ctgb sluit zich daarbij aan. Ook wijzen zij op het belang van het meenemen van overwintering in honingbijveldstudies. Vóór de winter werden in 2009 geen significante effecten gevonden, maar ná de winter wel. Subletale effecten kunnen dus zo subtiel zijn dat ze gemist worden in statistische analyse, maar ze kunnen dan toch de overleving in de winter significant beïnvloeden. Meenemen van overwintering is een onderdeel van de aanbevelingen voor veldstudies in de nieuwe EFSA guidance. De grote verschillen tussen de twee jaren in deze studie pleit er zelfs voor om meerdere jaren achter elkaar te testen, omdat anders effecten mogelijk gemist worden. Hoeveel jaar gemeten zou moeten worden, is echter niet bekend.

- *Charpentier et al. 2014*

Adulte en larvale fruitvliegjes werden blootgesteld aan 3.1 mM (800 mg/L) imidacloprid in een sucroseoplossing. Ondanks deze hoge dosering was er slechts 31% mortaliteit na een acute blootstelling van 18 uur. Er was voldoende mortaliteit om een LC50 van ca. 1.4 mM (ca. 400 mg/L) te berekenen. De chronische LC50 werd berekend op basis van 8 dagen continue blootstelling aan dezelfde blootstellingsniveau's en bleek aanzienlijk lager te liggen maar nog steeds in de mg/L range (ca. 19 µM of 5 mg/L). De auteurs keken ook naar paring en vruchtbaarheid en vonden een verhoging van de paringsfrequentie bij 0.391 nM (het Ctgb vraagt zich af of dit als een nadelig effect moeten worden gezien). Met betrekking tot de vruchtbaarheid werd geen dosis-reponse relatie gevonden. De auteurs bediscussieerden de weerstand van verschillende fruitvliegstammen tegen acute en chronische blootstelling om de verschillen te verklaren tussen hun studie en een vergelijkbare studie met een verschillende stam. Zij wierpen de hypothese op dat bij lagere blootstelling aan imidacloprid de ontgiftingsprocessen minder efficiënt worden geïnitieerd, waardoor een grotere fractie beschikbaar is voor interactie met de nicotine acetylcholinesterase receptor, of dat imidacloprid aan verschillende receptoren bindt met verschillende affiniteiten (hoog en laag), of dat synergisme tussen het oplosmiddel DMSO, gebruikt om hoge concentraties imidacloprid in oplossing te krijgen, en imidacloprid zou kunnen optreden (ofschoon dit ook weer werd weerlegd gezien de lage niveau's van DMSO en het feit dat dit niet de oorzaak zou kunnen zijn voor de gevonden sexe verschillen). De studie levert geen echte nieuwe bruikbare informatie op inzake het werkingsmechanisme of de relatie met effecten op kolonie-niveau.

#### Studies over combinatie-effecten van bestrijdingsmiddelen met ziekten en plagen

- *Effecten van de combinatie van imidacloprid en Nosema-infectie op honingbijen (Alaux et al. 2010)*

Volgens de auteurs is aangetoond dat de interactie tussen microsporide parasieten en pesticiden niet alleen een hogere sterfte veroorzaakte maar ook mogelijk volken kan verzwakken. Alle testen zijn echter gedaan met kleine groepen bijen (30 of 120) en niet met hele volken, dus het effect op volkniveau moet nog onderzocht worden voor deze conclusie getrokken kan worden.

#### Uitgebreide samenvatting

In dit artikel zijn de effecten van de combinatie van imidacloprid (10 dagen blootstelling aan 0.7, 7 of 70 µg/kg in 50% suikersiroop) en Nosema-infectie (200.000 sporen/bij, een mix van *N.apis* en *N.ceranae*) getest op drie dingen: individuele gezondheid, individuele weerstand en kolonieweerstand. De geteste bijen waren een mix van *Apis mellifera ligustica* x *A.m.mellifera*, de typische bij in die regio in Zuid-Frankrijk. Mortaliteit is duidelijk verhoogd bij de combinatie vergeleken met de controle of de afzonderlijke behandelingen. Er is ook meer suikeropname, dus hogere energiebehoefte. Voor de weerstandeffecten op individuniveau zijn stoffen gemeten die een rol spelen bij de afweer (THC, total haemocyte count; en phenoloxidase activiteit, speelt een rol bij *encapsulating foreign objects*). Hier waren geen effecten van de behandeling, wel van leeftijd van de bijen (hoe ouder, hoe meer PO en hoe minder THC). Voor social immunity is glucose oxidase (GOX) activiteit gemeten, zit in de *hypopharyngeal glands* (HPG), speelt een rol bij *antiseptic product* productie voor in larvevoedsel en honing, daarmee in voedselsterilisatie en daarmee in ziektepreventie. Bij de combinatiebehandeling was er significant minder GOX. De HPG was kleiner bij Nosema alleen en bij de combinatie dan in de controle en bij imidacloprid alleen. Volgens de auteurs is hiermee aangetoond dat de interactie tussen microsporide parasieten en pesticiden niet alleen een hogere sterfte veroorzaakte maar ook mogelijk volken kan verzwakken. Alle testen zijn echter gedaan met kleine groepen bijen (30 of 120) en niet met hele volken, dus

het effect op volkniveau moet nog onderzocht worden voor deze conclusie getrokken kan worden.

- *Effecten van bestrijdingsmiddelen in broedraten op de ontwikkeling van honingbijen (Wu et al. 2011)*

De onderzoekers keken naar de ontwikkeling van bijen in, met oa neonicotinoiden, besmette raten in een kooitest en vonden een vertraging in de ontwikkeling en vroegere sterfte van volwassen bijen. Na meerdere broedcycli in deze raten traden meer effecten op. Het is niet mogelijk om de effecten aan één stof of zelfs een groep van stoffen te wijten gezien de cocktail aan stoffen die in de raten zat. Het is bovendien niet uit te sluiten dat de besmette raten meer pathogenen bevatten dan de controleraten. De studie keek niet naar effecten op hele volken op de langere termijn. Dit onderstreept het belang van een brede benadering van de problematiek. Een goede hygiëne in de bijenhouderij is een belangrijk middel om het broedsucces en overleving van bijenvolken te bevorderen.

#### Uitgebreide samenvatting

In dit artikel mat men residuen van bestrijdingsmiddelen in broedraten uit Noord-Amerikaanse bijenvolken. Imidacloprid, thiamethoxam en clothianidin werden elk gevonden in één van de 13 monsters, in respectievelijk 45, 38 en 35 ppb. Er zaten veel andere stoffen in de raten. Acariciden (gebruikt door imkers) werden het vaakst aangetroffen. De onderzoekers keken naar de ontwikkeling van bijen in de besmette raten in een kooitest en vonden een vertraging in de ontwikkeling en vroegere sterfte van volwassen bijen. Na meerdere broedcycli in deze raten traden meer effecten op. Het is niet mogelijk om de effecten aan één stof of zelfs een groep van stoffen te wijten gezien de cocktail aan stoffen die in de raten zat. Het is bovendien niet uit te sluiten dat de besmette raten meer pathogenen bevatten dan de controleraten. De studie keek niet naar effecten op hele volken op de langere termijn. De belangrijkste boodschap van deze studie zou moeten zijn dat bijenhouders bij de vervanging van raten moeten zorgen dat deze schoon zijn.

- *Effecten van imidacloprid op Nosema-infectie van honingbijen (Pettis et al. 2012)*

In individuele bijen die als larve opgegroeid waren in een volk waar imidacloprid gevoerd werd, was de Nosema-infectie na kunstmatige besmetting in het laboratorium hoger. Er was echter geen dosis-responsrelatie (de infectiegraad in de hogere dosering was niet hoger dan in de lagere dosering). Ook werd in de behandelde volken geen hogere Nosemainfectiegraad gevonden. Dit effect zou in een meer realistische blootstellingssetting onderzocht moeten worden voordat conclusies getrokken kunnen worden voor de risicobeoordeling. De gebruikte imidaclopriddoseringen en –blootstellingsduur zijn bovendien hoger dan de residuen die we van de momenteel toegelaten imidaclopridtoepassingen in het veld verwachten.

#### Uitgebreide samenvatting

In deze test zijn honingbijvolken (*Apis mellifera*, volken van 30-40.000 volwassen bijen) gevoerd met 0, 5 of 20 ppb imidacloprid in *proteïn supplement patties*. Na 5 en 8 weken blootstelling werden raten met uitkomend broed naar het lab gebracht. Net uitgekomen volwassen bijen werden in groepen van 30 in een kooitje gezet en gevoerd met een Nosemaoplossing tot een dosis van 333.333 sporen in twee dagen. In individuele bijen die als larve opgegroeid waren in een volk waar imidacloprid gevoerd werd, was de Nosema-infectie hoger. Er was echter geen dosis-responsrelatie (de infectiegraad in de hogere dosering was niet hoger dan in de lagere dosering). Ook werd in de behandelde volken geen hogere Nosemainfectiegraad gevonden. Dit effect zou in een meer realistische blootstellingssetting onderzocht moeten worden voordat conclusies getrokken kunnen worden voor de risicobeoordeling. De gebruikte imidaclopriddoseringen zijn bovendien hoger dan de residuen die we van de imidaclopridtoepassingen in het veld verwachten (maximaal gehalte in nectar/pollen opgegroeid uit behandeld zaad van 5 ppb (een conservatieve

schatting) en een maximaal gehalte in volggewassen van 2 ppb). En de gebruikte Nosemadosering is erg hoog en op zichzelf uiteindelijk al dodelijk voor een bij.

- *Effect van fipronil en thiacloprid op Nosema-infectie in en sterfte van honingbijen. Vidau et al. 2011*

Na kunstmatige infectie met *Nosema ceranae* werden honingbijen in laboratoriumkooitjes twintig dagen lang blootgesteld aan fipronil of thiacloprid in een dagelijkse dosis van ongeveer 1/100 van de LD50. Infectie met *Nosema* verhoogde de mortaliteit significant. Fipronil en thiacloprid alleen hadden geen effect op mortaliteit, maar in combinatie met *Nosema* versnelden zij het intreden van de dood en de hoogte van de mortaliteit zowel vergeleken met de controle als met *Nosema* alleen. Gedragseffecten (agressiviteit en tremoren, en later ataxia) traden alleen op bij de combinatiegroepen. Hoewel de effecten op bijen van de combinatiegroepen hetzelfde waren, verlaagde fipronil de sporenontwikkeling van *Nosema* terwijl thiacloprid deze juist verhoogde. De auteurs verklaren dit niet. Dit kunstmatige infectie-experiment in het laboratorium zou herhaald moeten worden onder veldrealistische omstandigheden voor conclusies getrokken kunnen worden die in de risicobeoordeling gebruikt kunnen worden.

#### Uitgebreide samenvatting

Net uitgekomen volwassen *Apis mellifera mellifera* bijen (vrij van *Nosema*) werden blootgesteld aan *Nosema ceranae*, fipronil, thiacloprid, *Nosema*+fipronil of *Nosema*+thiacloprid. Doseringen waren 1 µg/L fipronil of 5.1 mg/L thiacloprid (gemeten blootstelling per dag: ~0.025-0.027 ng fipronil/bij/d en ~112-153 ng thiacloprid/bij/d, beide gedurende 20 dagen). A.s. blootstelling duurde 20 dagen en begon 10 dagen na kunstmatige infectie met 125.000 sporen/bij.

Bepaalde indicatoren van het detoxificatiesysteem werden gemeten (ECOD (7-ethoxycoumarin-O-deethylase) en GST (Glutathione-S-Transferase)). ECOD was niet beïnvloed door *Nosema*, maar GST activiteit was significant verhoogd in de *Nosema*groep. Infectie met *Nosema* verhoogde de mortaliteit significant. Fipronil en thiacloprid alleen hadden geen effect op mortaliteit (dit is te verwachten aangezien de dosering ongeveer 1/100 van de acute orale LD50 is), maar in combinatie met *Nosema* versnelden zij het intreden van de dood en de hoogte van de mortaliteit zowel vergeleken met de controle als met *Nosema* alleen. Met *Nosema* behandelde bijen namen vóór insecticideblootstelling significant meer sucrose op dan onbehandelde bijen. Toch was er later in de test zichtbaar geen verschil meer, aangezien er geen statistisch verschil was in insecticide-opname tussen de twee groepen. Gedragseffecten (agressiviteit en tremoren, en later ataxia) traden alleen op bij de combinatiegroepen. Hoewel de effecten op bijen van de combinatiegroepen hetzelfde waren, verlaagde fipronil de sporenontwikkeling van *Nosema* terwijl thiacloprid deze juist verhoogde. De auteurs verklaren dit niet.

Dit kunstmatige infectie-experiment in het laboratorium zou herhaald moeten worden onder veldrealistische omstandigheden voor conclusies getrokken kunnen worden die in de risicobeoordeling gebruikt kunnen worden.

- *Effect van thiacloprid op Nosema-infectie in en sterfte van honingbijen. Retschnig et al. (2014)*

Al dan niet na kunstmatige infectie met *Nosema ceranae* werden honingbijen in laboratoriumkooitjes veertien dagen lang blootgesteld aan een hoge of lage dosering thiacloprid. De dagelijkse dosis thiacloprid per bij is niet berekend, maar het gehalte in de testvloeistof was twaalf of zes keer hoger dan in Vidau et al. 2011. Sterfte was significant hoger in de groep met de hoge thiaclopriddosering + *Nosema*, en de sterfte in deze groep was hoger dan die in de hoge thiacloprid- en de *Nosema*groep opgeteld, een significant synergistisch effect. Bij de lage thiaclopridgroep werd geen synergistisch effect gevonden. Er werd een vermindering van het aantal *Nosema*sporen gevonden in thiaclopridbehandelde volken (geen

relatie met de dosering) ten opzichte van onbehandelde volken. Deze resultaten zijn in tegenspraak met de bevindingen van Vidau et al. (2011).

Ctgb merkt op dat de testomstandigheden mogelijk niet ideaal waren, aangezien zelfs in de controle slechts 20 van de 80 bijen de volle veertien dagen overleefde.

Voor conclusies over mogelijk synergistische effecten van thiacloprid en Nosema getrokken kunnen worden, moet daar onderzoek in het veld naar plaatsvinden, aangezien de omstandigheden op volkniveau heel anders kunnen uitpakken voor een infectie dan bij individuele honingbijen in het lab, en ook gezien de tegenstrijdige resultaten van vergelijkbare onderzoeken in het lab.

Verder lijken de gebruikte testconcentraties erg hoog. Het EASACrapport noemt een waarde van 0-199 ppb in koolzaadstuifmeel na zaadbehandeling, i.e. maximaal 0,199 ppm. Hogere waarden dan deze zijn Ctgb niet bekend. Er zijn echter waarschijnlijk geen metingen gedaan na spuitbehandeling. In Nederland is toepassing van thiacloprid op bloeiende gewassen momenteel toegestaan.

#### Uitgebreide samenvatting

Net uitgekomen *Apis mellifera camic*a werksters werden met 20 bij elkaar in kooitjes gezet en 14 dagen lang blootgesteld aan een lage of een hoge dosis thiacloprid in suikerwater, al dan niet in combinatie met een initiële blootstelling aan de parasiet *Nosema ceranae*.

100,000 Nosemasporen per bij, 60 ppm = 70 mg/L of 30 ppm = 35 mg/L thiacloprid in 50% w/v sucroseoplossing. Per behandeling 4 kooitjes = 80 bijen. Er was geen effect op voedselopname. Op sterfte werd wel een significant effect gevonden: lager in de controle en hoger in de groep met 60 ppm thiacloprid + Nosema. De sterfte in deze groep was hoger dan die in de 60 ppm thiacloprid en in de Nosema groep opgeteld, een significant synergistisch effect. Bij 30 ppm werd geen synergistisch effect gevonden, wat in tegenspraak is met bevindingen van Vidau et al. (2011) die bij 5.1 ppm thiacloprid (en 125.000 sporen per bij, een enorm hoge dosering) dat al wél vond. Ook in contrast met Vidau et al. werd geen stimulatie, maar juist een vermindering van het aantal Nosemasporen gevonden in thiaclopridbehandelde volken (geen relatie met de dosering) ten opzichte van onbehandelde volken. Ctgb merkt op dat de testomstandigheden mogelijk niet ideaal waren, aangezien zelfs in de controle slechts 20 van de 80 bijen de volle veertien dagen overleefde. Verder lijken de gebruikte testconcentraties erg hoog. Het EASACrapport noemt een waarde van 0-199 ppb in koolzaadstuifmeel na zaadbehandeling, i.e. maximaal 0,199 ppm. Hogere waarden dan deze zijn Ctgb niet bekend. Er zijn echter waarschijnlijk geen metingen gedaan na spuitbehandeling. In Nederland is toepassing van thiacloprid op bloeiende gewassen momenteel toegestaan.

Voor conclusies over mogelijk synergistische effecten van thiacloprid en Nosema getrokken kunnen worden, moet daar onderzoek in het veld naar plaatsvinden, aangezien de omstandigheden op volkniveau heel anders kunnen uitpakken voor een infectie dan bij individuele honingbijen in het lab.

- *Effect op hommelveolken van thiamethoxam + clothianidin alleen of in combinatie met een darmparasiet. Fauser-Mislin et al (2014) .*  
Labonderzoek met kunstmatige infectie met de parasiet *Crithidia bombi* en negen weken lang blootstelling zowel in suikerwater als stuifmeel. De auteurs concluderen dat neonicotinoïden een duidelijk negatief effect hebben op de groei en fitness van hommelveolken, en dat andere parameters alleen effect laten zien bij de combinatie van de neonicotinoïden en de parasiet. Zij pleiten voor het opnemen in het toetsingskader van andere bijensoorten dan de honingbij, chronische tests op de hele levenscyclus en voor het opnemen van combinatie-effecten van gewasbeschermingsmiddelen en andere stressoren zoals parasieten. Ctgb kan hiermee instemmen. Met de nieuwe EFSA guidance voor bijen en met de ontwikkelingen op het gebied van combinatie-effecten zijn stappen hiernaartoe reeds gezet. Dit onderzoek geeft geen directe aanleiding tot ingrijpen in de huidige toelatingssituatie in Nederland, aangezien toepassing op in het veld bloeiende

planten niet is toegestaan en zowel de gehalten als de blootstellingsduur in deze studie dus onrealistisch hoog zijn. Bovendien betreft het labonderzoek en zouden deze effecten ook in het veld onderzocht moeten worden.

#### Uitgebreide samenvatting

*Bombus terrestris* volkjes (1 koningin en 10 werksters) werden in het lab blootgesteld aan één van vier behandelingen: P = infectie met de darmparasiet *Crithidia bombi*, N=blootstelling aan thiamethoxam en clothianidin, PN = combinatie van de voorgaande twee, en C=controle. In P en PN, de parasiet werd toegebracht bij de helft van de werksters. N en PN kregen negen weken lang zowel in suikerwater (35%, met gelijke aandelen glucose, fructose en saccharose) als in *pollen patties* (met twee-derde vers stuifmeel) met concentraties van 4 ug/kg (4ppb) thiamethoxam en 1.5 ug/kg (1.5 ppb) clothianidin. Tien volken per behandeling, alle veertig koninginnen waren zusters.

Volken die neonicotinoïden kregen, minderden eerder met werksterproductie en produceerden ook minder werksters dan C en P volken. Dit werd zichtbaar vanaf week 4. Ook leefden de werksters van deze volken minder lang, werd minder sexueel actief broed (koninginnen + darren) geproduceerd en minder darren (voor koninginnen alleen was het effect niet statistisch significant), en werd minder suikerwater (direct vanaf het begin van het experiment) en pollen (vanaf week 4) verzameld. Er was geen effect van de parasiet alleen op al deze parameters.

Koninginnen leefden significant korter in de NP volken dan in C.

P en NP volken waren voor vrijwel 100% geïnfecteerd met de parasiet. Er was hierbij geen effect van de neonicotinoïden te zien.

De auteurs concluderen dat neonicotinoïden een duidelijk negatief effect hebben op de groei en fitness van hommenvolken, en dat andere parameters pas effect laten zien bij de combinatie van neonicotinoïden en de parasiet. Zij pleiten voor het opnemen in het toetsingskader van andere bijensoorten dan de honingbij, chronische tests op de hele levenscyclus en voor het opnemen van combinatie-effecten van gewasbeschermingsmiddelen en andere stressoren zoals parasieten. Ctgb kan hiermee instemmen. Met de nieuwe EFSA guidance voor bijen en met de ontwikkelingen op het gebied van combinatie-effecten zijn stappen hiernaartoe reeds gezet. Dit onderzoek geeft geen directe aanleiding tot ingrijpen in de huidige toelatingssituatie in Nederland, aangezien toepassing op in het veld bloeiende planten niet is toegestaan en zowel de gehalten als de blootstellingsduur in deze studie dus onrealistisch hoog zijn.

- *Effect van clothianidin en imidacloprid op immuunsysteem van honingbijen (Di Prisco et al. (2013))*

De auteurs vinden voor de twee neonicotinoïden een negatieve werking op de immunrespons en een verhoogde vermeerdering van het deformed wing virus. Volgens de auteurs gebeurt dit al bij veldrelevante, subletale doseringen. De gebruikte doseringen zitten echter veelal dicht bij de LD50 die voor de twee stoffen op EU-niveau zijn vastgesteld. Clothianidin en imidacloprid zijn bovendien momenteel niet toegelaten in Europa in bij-aantrekkelijke gewassen, waardoor deze gehalten nu niet veld-relevant zijn. Verder zijn de onderzoeken gedaan in het laboratorium. De effecten zouden ook in een veldsituatie (met hele bijenvolken) onderzocht moeten worden.

#### Uitgebreide samenvatting

Deze publicatie beschrijft een onderzoek naar de werking van een bepaald onderdeel van het immuunsysteem van honingbijen (*Apis mellifera ligustica*) na blootstelling aan clothianidin of imidacloprid. De testvloeistof werd met een micropipet op de thorax aangebracht. Concentraties waren 10, 20, 30, 40 en 50 ng/bij clothianidin; 2,5, 5, 10, 20, 30, 40 en 50 ng/bij imidacloprid; 15, 30, 60, 125, 250, 350, en 500 ng/bij chloorpyrifos. De auteurs vinden voor de twee neonicotinoïden, maar niet voor chloorpyrifos, een negatieve werking op de immunrespons en een verhoogde vermeerdering van het deformed wing virus. Volgens de auteurs gebeurt dit al bij veldrelevante, subletale doseringen. De gebruikte doseringen zitten echter veelal dicht bij de LD50 die voor de twee stoffen op EU-niveau zijn



vastgesteld. Clothianidin en imidacloprid zijn bovendien momenteel niet toegelaten in Europa in bij-aantrekkelijke gewassen, waardoor deze gehalten nu niet veld-relevant zijn. Verder zijn de onderzoeken gedaan in het laboratorium. De effecten zouden ook in een veldsituatie (met hele bijenvolken) onderzocht moeten worden. Hoewel de relevantie voor de huidige toelatingssituatie in Nederland laag is (geen direct ingrijpen nodig in lopende toelatingen), geeft dit artikel nuttige informatie over de mogelijke manieren waarop een bestrijdingsmiddel invloed kan hebben op het vermogen van een organisme zich te wapenen tegen ziektes en plagen. Dit soort indirecte effecten is mogelijk ook voor veel andere stoffen en organismen relevant, maar is momenteel helaas geen onderdeel van het toetsingskader. Het verdient aanbeveling hier methodiek voor te ontwikkelen zodat dit in de toekomst wel meegenomen kan worden in de risicobeoordeling van gewasbeschermingsmiddelen, in een breder kader (en niet specifiek gericht op honingbijen en neonicotinoiden).

- *Nazzi & Pennacchio (2014).*

De auteurs beschrijven een functioneel kader om het mogelijke samenwerken van verschillende stressoren (ziekten en plagen, voedselgebrek, bestrijdingsmiddelen etc) op de gezondheid van de honingbij te interpreteren. Het artikel bevat geen nieuw onderzoek en levert als zodanig geen nieuwe eindpunten voor een risicobeoordeling. Het is nuttig bij het ontwikkelen van toetsingskader dat combinaties van stressoren meeneemt. EFSA is hier inmiddels mee begonnen.

- *Effect van imidacloprid of clothianidin op honingbijvolken. Lu et al. 2014*

Veldonderzoek met kunstmatige blootstelling. Imidacloprid of clothianidin in suikeroplossing werd dertien weken lang aangeboden in honingbijvolken. De onderzoekers vonden geen effecten in het jaar van blootstelling, maar wel in de eerste maanden van het volgende jaar, toen de controlevolken weer in grootte toenamen maar de behandelde volken steeds kleiner werden. De helft van de behandelde volken stierf uiteindelijk (met symptomen van Colony Collapse Disorder), en één van de zes controlevolken (met symptomen van Nosema). De gebruikte dosering is veel hoger dan te verwachten is van een realistische veldblootstelling op zo'n lange termijn. Bovendien is een zeer klein aantal volken gebruikt. Dit onderzoek zou met realistische blootstellingsduur- en dosering herhaald moeten worden om conclusies te kunnen trekken die voor een risicobeoordeling relevant zouden kunnen zijn.

#### Uitgebreide samenvatting

Imidacloprid in suikeroplossing werd dertien weken (juli-september 2012) lang aangeboden in honingbijvolken (*Apis mellifera*, aannahme van ca. 50.000 volwassen bijen/volk) in centraal Massachusetts, VS. De gebruikte dosering (grof berekend, want de dichtheid van de suikeroplossingen is niet gerapporteerd) was ongeveer 136 ppb (258 µg a.s./1,9 L ~ 136 µg a.s./kg). De onderzoekers vonden geen effecten in het jaar van blootstelling, maar wel van januari tot april 2013, toen de controlevolken weer in grootte toenamen maar de behandelde volken steeds kleiner werden. De helft van de behandelde volken stierf uiteindelijk (met symptomen van Colony Collapse Disorder), en één van de zes controlevolken (met symptomen van *Nosema*). De gebruikte dosering is veel hoger dan te verwachten is van een realistische veldblootstelling op zo'n lange termijn. Realistische veldconcentraties van imidacloprid zijn veel lager (Blacquièrre et al., 2012). Vergeleken met de door EFSA en Ctgb gebruikte NOEC van 20 ppb en ook met lagere NOECs uit de openbare literatuur is dit een zeer hoge dosering en zou het dus niet verwonderlijk zijn dat er effecten optreden. Bovendien is een zeer klein aantal volken gebruikt: 6 voor imidacloprid, 6 voor clothianidin en 6 controlevolken. Bij al deze groepen is ook nog een splitsing gemaakt tussen suikersiroop (3/groep) en maissiroop (3/groep). Dit onderzoek zou met realistische blootstellingsduur- en dosering herhaald moeten worden om conclusies te kunnen trekken die voor een risicobeoordeling relevant zouden kunnen zijn.

- *Mason et al. 2013*

Dit betreft een review, dus zonder nieuw onderzoek. De auteurs stellen de hypothese dat de achteruitgang van allerlei groepen organismen (bijen, waterleven, amfibieën, vleermuizen en vogels) te wijten is aan de weerstandsverlaging die veroorzaakt wordt door neonicotinoïden en fipronil. Het onderbouwend onderzoek dat zij aanhalen betreft vooral labstudies en is voornamelijk gedaan aan bijen en vissen. Voor de andere groepen is er geen experimenteel bewijs. De informatie in deze review kan meegenomen worden bij het ontwikkelen van toetsingskader voor een risicobeoordeling met meerdere stressoren.

- *Szczepaniec et al. 2013*  
Dit artikel gaat niet over bijen en wordt daarom niet in dit hoofdstuk behandeld.

Retschnig et al. 2015<sup>8</sup> (niet in EASACrapport want later gepubliceerd)

Korte samenvatting:

XXX

#### Uitgebreide samenvatting

De studie is uitgevoerd op twee locaties, in Zwitserland en Duitsland. Vier volken die buiten stonden en vrij konden foerageren werden zes weken lang blootgesteld aan thiacloprid (1 kg sucroseoplossing per week in het volk met 611,5 ppb thiacloprid (gemeten)) en tau-fluvalinate (via Apistan strips in het volk, volgens de normale manier van Varroamijtbestrijding: 0,8 g a.s./strip, 2 strips/volk). Vier andere volken alleen aan onbehandelde sucroseoplossing. Na deze zes weken werden werksters van dezelfde leeftijd verzameld en gebruikt voor experimenten. Deze vonden deels plaats op een andere locatie, 300 km verderop. De helft van de werksters werden geënt met *Nosema ceranae* via opname van een sucroseoplossing: ~ 100 000 sporen per bij, de andere helft kreeg onbehandeld voedsel.

Zo ontstonden vier testgroepen: controle, bestrijdingsmiddel, parasiet, en bestrijdingsmiddel+parasiet, met 198 individuele bijen per testgroep. Deze bijen werden gemerkt en in kleine 'observatievolken' geplaatst, onbehandelde volken die dienden als omgeving om de behandelde bijen te kunnen observeren op sterfte en gedrag (gedurende twee weken), *Nosema* infectiegraad (na twee weken, bij 16-28 overlevende werksters per testgroep), vliegactiviteit (dag 7 t/m 13 na introductie in de observatievolken, gemeten als aantal vluchten per minuut).

Op locatie A was mortaliteit bij bijen behandeld met bestrijdingsmiddelen significant hoger dan de controle. De sterfte na 14 dagen was hier tussen de ~60 en ~45% (alle groepen). Op locatie B was mortaliteit niet significant beïnvloed, met sterfte na 14 dagen ~35%. In alle groepen hadden bijen van locatie B significant hogere sterfte dan van locatie A. Bijen behandeld met *Nosema* waren significant vaker inactief dan controlebijen, onafhankelijk van bestrijdingsmiddel. Er was geen verschil op vliegactiviteit, behalve dat met *Nosema* behandelde bijen een hogere vliegactiviteit hadden dan met bestrijdingsmiddel behandelde bijen.

Residuen van thiacloprid en tau-fluvalinaat, gemeten in de sucroseoplossing en in honing, was en stuifmeel, bevestigden de blootstelling. In de controlevolken werd ook wat thiacloprid aangetroffen, in lagere concentraties (4% vergeleken met de behandelde groep in honing, 5% in stuifmeel, 23% in was). De controlebesmetting wordt verklaard met drift van bijen tussen volken of omgevingsbesmetting.

Het aantal *Nosema*sporen in met *Nosema* behandelde bijen was niet verschillend tussen de met bestrijdingsmiddel behandelde en onbehandelde groep. Wel hadden met *Nosema* behandelde bijen significant meer sporen dan niet met *Nosema* geënte bijen, hoewel een

<sup>8</sup> Retschnig, G., Williams, G.R., Odemer, R., Boltin, J., Di Poto, C., Mehmman, M.M., Retschnig, P., Winiger, P., Rosenkranz, P., Neumann, P. (2015) Effects, but no interactions, of ubiquitous pesticide and parasite stressors on honey bee (*Apis mellifera*) lifespan and behaviour in a colony environment. *Environmental Microbiology*, in press

Commented 5.1.2.e 5.1.2.e maakt nog

deel van deze niet geënte bijen toch een hoog sporenaantal droeg. Dit wordt verklaard met besmetting via materiaal in het volk.

Het feit dat de effecten van de stressoren op mortaliteit niet consistent waren tussen de locaties, wijst er volgens de auteurs op dat deze effecten zwak zijn; sterke effecten zijn over het algemeen goed reproduceerbaar. Desalniettemin was het op één van de twee locaties zo dat de blootstelling aan de bestrijdingsmiddelen in het larvale stadium zorgde voor verhoogde sterfte van uitgekomen werksters. De auteurs pleiten voor meer onderzoek naar de invloed van de locatie op stressor-bijen-onderzoek.

Omdat de twee bestrijdingsmiddelen niet apart getest zijn, is er niets te zeggen over de mogelijke combinatie-effecten van de twee stoffen. In deze studie werd geen effect gevonden van *Nosema* op werkstersterfte of vliegactiviteit. *Nosema* had alleen tot gevolg dat iets meer werksters inactief gedrag vertoonden. In sommige andere studies is wel verhoogde sterfte gevonden, wat de auteurs verklaren door een mogelijk verschil in virulentie tussen *Nosema ceranae* stammen, of in gevoeligheid van bijen tussen geografische regio's. In tegenstelling tot andere onderzoeken vond deze studie geen synergistische effecten tussen *Nosema* en neonicotinoïden. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat blootstelling aan de ene stressor (de bestrijdingsmiddelen) en de observaties aan de bijen op volkniveau gebeurden, terwijl de meeste onderzoeken naar (interacties tussen) stressoren in het lab plaatsvinden.

#### Hopwood et al. (2012)

Review, hier alleen aangehaald om de bron van de residugehaltes die in het EASAC-rapport worden genoemd, te duiden. Hopwood et al. wordt verder niet in detail door Ctgb besproken. De hoogste concentraties in nectar en pollen die in het EASAC-rapport worden genoemd, werden gevonden bij toepassing van imidacloprid in pompoen als de helft van de dosering (5.25 oz/acre) via het *transplant water* werd toegediend en de andere helft (ook 5.25 oz/acre) als drip irrigatie tijdens de bloei (Dively & Hooks 2010<sup>9</sup>, de volledige referentie wordt hier gegeven omdat deze ontbreekt in het EASAC-rapport); deze gepliste toediening leidde dus tot hogere concentraties dan een enkele toediening van 10.5 oz/acre).

In siergewassen werden na *drenching* ook hoge concentraties gevonden van imidacloprid, zes maanden (bij *Rhododendron*), achttien maanden (bij de struik *Amelanchier*) of zeventien maanden (in *Cornus mas*) na soil *drenching*; en imidacloprid werd 3-6 jaar na toepassing nog in 19 ppb gevonden in *Rhododendron* (Doering et al. 2004, 2004b<sup>10</sup>, 2004c<sup>11</sup>, 2005a<sup>12</sup>, 2005b<sup>13</sup>). Gehaltes zijn soms een jaar na toepassing hoger dan twee weken na toepassing. Residuen in de bloemen worden gepresenteerd, niet in stuifmeel of nectar, wat mogelijk een vertekend beeld geeft. Het feit dat zo lang na toepassing er nog steeds hoge residuen in de bloemen van deze struiken gevonden worden is wel zorgwekkend en geeft aan dat er mogelijk een verschil is tussen de opname en persistentie van imidacloprid (en mogelijk ook andere stoffen) in houtige gewassen en kruiden. De specifieke toepassingen die in de studies onderzocht zijn, zijn niet relevant voor de huidige Nederlandse toelatingssituatie.

Commented 5.1.2.e : Doering et al. 2004 niet op Ctgb aanwezig en niet online te vinden, evt opvragen bij Bayer in later stadium

Commented [ 5.1.2.e (14) : 5.1.2.e checkt nog

<sup>9</sup> Dively & Hooks, 2010. Use patterns of neonicotinoid insecticides on cucurbit crops and their potential exposure to honey bees. Progress Report, Strategic Agricultural Initiative Grants Program, EPA Region III.

<sup>10</sup> Doering, Maus & Schoening. 2004b. Residues of Imidacloprid WG 5 in blossom samples of *Rhododendron* sp. after soil treatment in the field. Application: Autumn 2003, Sampling: 2004." Bayer CropScience AG. Report No. G201820.

<sup>11</sup> Doering, Maus & Schoening. 2004c. Residues of Imidacloprid WG 5 in blossom samples of *Rhododendron* sp. (variety Nova Zembla) after soil treatment in the field. Application: 2003, Sampling: 2003 and 2004." Bayer CropScience AG. Report No. G201806.

<sup>12</sup> Doering, Maus & Schoening. 2005a. Residues of Imidacloprid WG 5 in blossom and leaf samples of *Amelanchier* sp. after soil treatment in the field. Application: 2003, Sampling: 2004 and 2005." Bayer CropScience AG. Report No. G201799.

<sup>13</sup> Doering, Maus & Schoening. 2005b. Residues of Imidacloprid WG 5 in blossom samples of *Cornus mas* after soil treatment in the field. Application: 2003, Sampling: 2005." Bayer CropScience AG. Report No. G201801.

#### A4.6 Biodiversiteitseffecten

##### *Mineau & Palmer 2013*

De referentie Mineau en Palmer (2013) gaat in op de risico's van zaadbehandeling. Zij bespreken de risicobeoordeling zoals die in de VS wordt uitgevoerd. In Europa gebruiken we grotere veiligheidsfactoren en is het toetsingskader daarom beter in lijn met wat Mineau en Palmer voorstellen. Hoewel de gehalten per zaadje soms dicht bij de (met een veiligheidsfactor voor verschil in gevoeligheid tussen soorten gecorrigeerde) letale dosis liggen, zijn in Nederland nooit dode vogels gemeld die waren gestorven door het eten van behandeld zaad. De risicobeoordeling voor zaadbehandeling is uiterst zorgvuldig en bevat meestal verschillende onderdelen. Onderwerking en voorkoming van morsen is zeer belangrijk en wordt gehandhaafd.

##### *Gibbons et al. 2015*

Review van 150 studies naar directe en indirecte effecten op wilde vertebraten (zoogdieren, vogels, vissen, amfibieën en reptielen) van neonicotinoïden. Vanwege de sterkere binding van neonicotinoïden aan de nicotine acetylcholine receptoren in insecten in vergelijking met vertebraten, treedt toxiciteit bij vertebraten op bij veel hogere doseringen dan bij insecten en andere invertebraten. De auteurs deden een systematisch literatuuronderzoek. Het overgrote deel van de studies die zij vonden was uitgevoerd in het laboratorium, betrof directe toxische effecten, is gedaan met de stoffen imidacloprid, clothianidin of fipronil en uitgevoerd met zoogdieren, vogels of vissen.

De auteurs behandelen de volgende punten, waarop Ctgb reageert:

- Er is te weinig aandacht voor verschil in gevoeligheid tussen soorten in de Noord-Amerikaanse risicobeoordeling: in de Europese methodiek wordt hier veel meer rekening gehouden.
- Reproductiestudies met vogels onderzoeken effecten op broed- en kuikenzorg niet en kunnen lage power hebben om effecten aan te tonen, maar zijn dan wel weer worst case in blootstellingsduur: Zoals de auteurs zelf ook zeggen is dit de enige test die beschikbaar is om reproductie-effecten te onderzoeken. Gezien de continue blootstelling gedurende maanden verwacht Ctgb dat deze test inderdaad worst case eindpunten zal opleveren.
- Subletale effecten kunnen optreden ver (tot 1000x lager) onder de letale dosis maar worden niet meegenomen in de acute risicobeoordeling. Dit is correct, maar in de chronische risicobeoordeling, die ook altijd wordt uitgevoerd, worden subletale effecten wel meegenomen.
- Veldconcentraties in water zitten ver onder de letale niveau's voor imidacloprid en clothianidin, wel dicht bij die van fipronil; subletale effecten zijn soms wel te verwachten op vissen. Respons 5.1.2.e wordt gedekt in de risicobeoordeling?
- Behandelde zaden bevatten een dosis die dicht bij de letale dosis ligt. Dit klopt voor veel van de zaadbehandelingen, daar wordt in de risicobeoordeling rekening mee gehouden en er zijn vaak uitgebreide verfijningen nodig. Merk op dat hierbij met een veiligheidsfactor rekening wordt gehouden met het mogelijke verschil in gevoeligheid tussen soorten. Er zijn in Nederland nooit incidenten gemeld met dode vertebraten door het eten van behandeld zaad.
- Indirecte effecten (het wegnemen van voedsel door bestrijden van insecten en planten) worden niet meegenomen maar zijn potentieel belangrijk. Indirecte effecten maken momenteel inderdaad geen onderdeel van het toetsingskader ook niet in nieuwe aquatische guidance toch 5.1.2.e ? (gekopieerd uit een eerdere brief aan de staatssecretaris (briefnummer 201405260206 dd. 11/09/2014 nav Hallman studie): Het is de vraag welke indirecte effecten al bij middeltoelating zouden kunnen worden meegenomen en welke effecten middels een gebiedsgerichte aanpak moeten worden beheerst. U wordt geadviseerd de Europese Commissie te verzoeken dit te agenderen in de relevante EU werkgroepen.

Hallman et al. 2014

In een eerdere brief aan de staatssecretaris (briefnummer 201405260206 dd. 11/09/2014) heeft Ctgb deze studie al samengevat en enige kanttekeningen gemaakt. De conclusie geldt nog steeds:

Het Ctgb is alert op signalen uit de wetenschappelijke literatuur over effecten van gewasbeschermingsmiddelen. Het Nature-artikel is één van die signalen. In de afgelopen jaren zijn maatregelen genomen om de effecten van imidacloprid op de bijenstand en op het waterleven binnen aanvaardbare normen te houden.

Het effect van deze maatregelen zal de komende tijd zichtbaar (moeten) worden in verlaging van de gehalten imidacloprid in oppervlaktewater.

Het Ctgb is van mening dat de uitwerking van deze maatregelen moet worden afgewacht alvorens eventuele nieuwe maatregelen aan de orde kunnen zijn.

Zie brief Ctgb aan Stas en dan met name bijlage III voor de samenvatting van het artikel.

5.1.2.e ik hoop dat jij wordversies hebt, ik heb die niet.



2014 10 27



2014 10 27

kamerbrief-imidac...kamerbrief-imidac...

Lopez-Antia et al. 2013

Patrijzen (*Alectoris rufa*), per paar in een buitenkooitje, werden 25 of 10 dagen lang gevoerd met graan, waarbij het graan behandeld was met 0, 0,14 of 0,7 mg imidacloprid/g zaad (dit zou overeenstemmen met 0%, 20% en 100% van de toegelaten dosering in Spanje). Bij de hoge dosering stierven alle dieren binnen 21 dagen, de vrouwtjes eerder dan de mannetjes. Bij de lage dosering werden effecten gevonden op een aantal biochemische parameters en kleur van de snavel en oogring, was er een lager aantal eieren per nest, was de eerste eilegdatum uitgesteld, waren er effecten op het gehalte vitamininen en carotenoiden in de dooier, en was een bepaalde immuunreactie in de kuikens verlaagd. Tijdens de blootstellingsperiode werd imidacloprid aangetroffen in de lever en krop van de behandelde vogels.

De gevonden sterfte is hoger dan in een eerdere studie van dezelfde auteurs, wat geweten wordt aan de lagere temperatuur tijdens de huidige studie waardoor vogels meer of sneller aten.

De auteurs concluderen dat vermijding van zaad hier niet zo'n grote rol speelde dat het sterfte kon voorkomen. Zij wijzen op de risico's voor vogels via het eten van behandeld zaad.

In de toelatingsbeoordeling wordt rekening gehouden met deze risico's. Als een theoretisch dieet, volledig bestaand uit behandeld zaad, leidt tot potentiële risico's, kan volgens de EFSA guidance voor vogels en zoogdieren gekeken worden naar meer realistische situaties, met bijvoorbeeld met gemengde dieten en onderwerking van zaden. In Nederland zijn geen toelatingen afgegeven voor imidacloprid als zaadbehandeling van granen, maar gebruik is Nederland is theoretisch wel mogelijk gezien het vrije verkeer van zaad binnen de EU indien er een toelating is in één van de lidstaten. 5.1.2.e werkelijk gebruik bekend? Hierbij wordt erop vertrouwd dat deze andere lidstaat de risicobeoordeling juist heeft uitgevoerd en de restrictiezinnen heeft voorgeschreven die nodig zijn voor een veilig gebruik. In Nederland zijn Ctgb geen incidenten bekend van vogels die gestorven zijn door het eten van behandeld zaad.

Main et al. 2014, Van Dijk et al. 2013, Beketov & Liess 2008 en 2011, Nyman et al. 2013, Roessink et al. 2013. Gaat over gehalten in en effecten op aquatische systemen. PETER!

