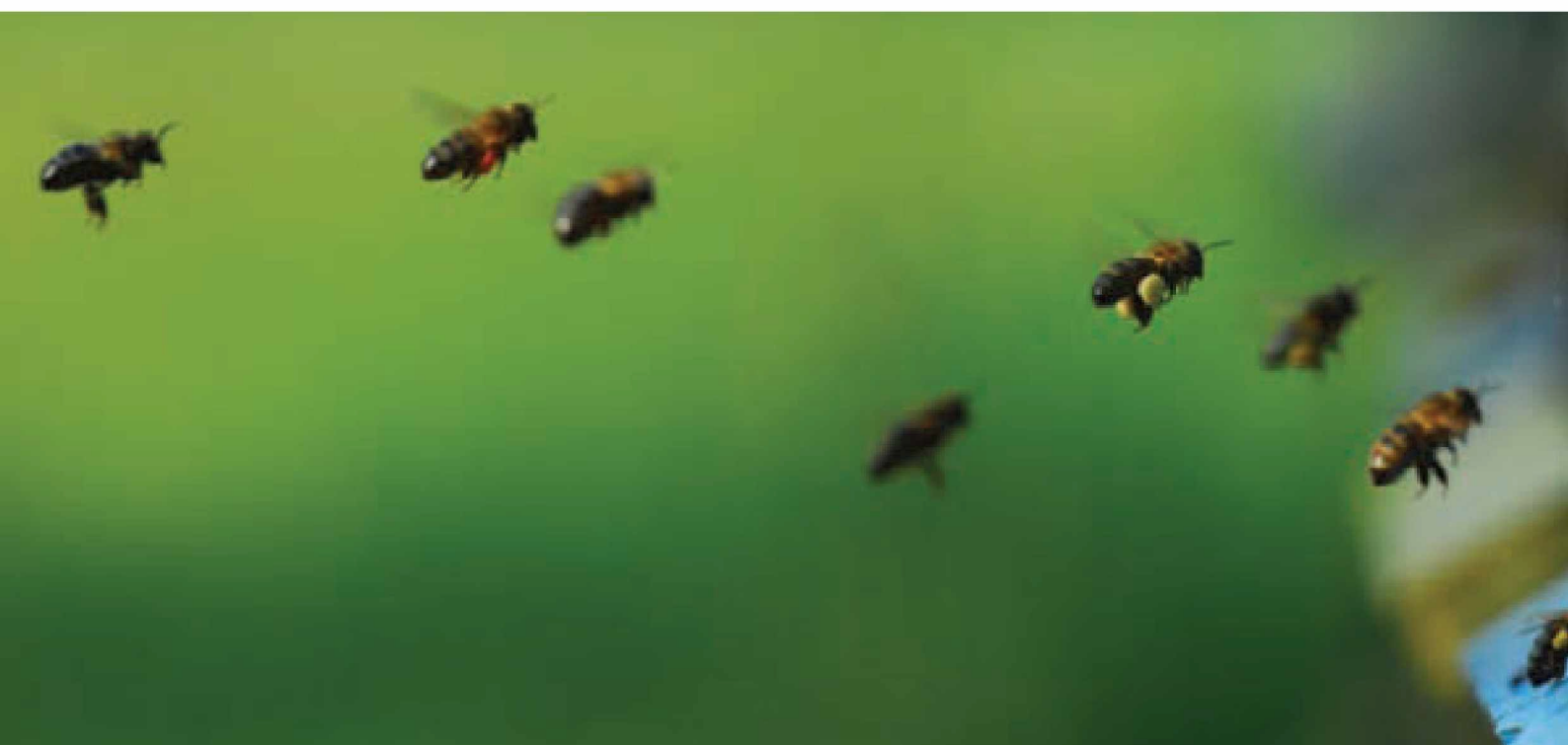




De invloed van imidacloprid en de interactie met gereduceerd stuifmeelaanvoer op de vitaliteit en de overwintering van bijenvolken

5.1.2.e





De invloed van imidacloprid en de interactie met gereduceerd stuifmeelaanvoer op de vitaliteit en de overwintering van bijenvolken

5.1.2e

© 2014 Wageningen, Foundation Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) research institute
Praktijkonderzoek Plant & Omgeving. All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a
retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or
otherwise, without the prior written permission of the DLO, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving (Applied Plant
Research), Business Unit Arable farming, Multifunctional agriculture and Field production of vegetables
The Foundation DLO is not responsible for any damage caused by using the content of this report.

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

Exemplaren van dit rapport kunnen bij de (eerste) auteur worden besteld. Bij toezending wordt een factuur
toegevoegd; de kosten (incl. verzend- en administratiekosten) bedragen € 50 per exemplaar.

Plant Research International, onderdeel van Wageningen UR Business Unit Biointeracties & Plantgezondheid

Adres : Postbus 16, 6700 AA Wageningen
: Wageningen Campus, Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
Tel. : 5.1.2.e
Fax : 5.1.2.e
E-mail : 5.1.2.e @wur.nl
Internet : www.wageningenUR.nl/pri

Inhoudsopgave

	pagina
Samenvatting	1
Abstract	3
Leeswijzer	5
1. Inleiding	7
2. Blootstelling van bijenvolken aan imidacloprid via suikerwater, aangeboden in de bijenkast, aan vrij-vliegende bijenvolken (semi-veldtest)	9
2.1 Het aanbieden van suikeroplossing in de bijenkast	10
2.2 Imidacloprid 5 ppb	11
2.3 Stuifmeeldeficientie, hemolymfeiwit en vitellogenine	11
2.4 Efficiëntie stuifmeelval	11
2.5 Levensverwachting zomerbij	11
3. Materiaal & Methode	13
4. Resultaat en discussie	15
4.1 Blootstelling aan imidacloprid	15
4.1.1 Blootstelling aan imidacloprid in het volk	15
4.1.2 Imidacloprid in bijen, honing en bijenbrood	16
4.2 Imidacloprid en vitaliteit	18
4.2.1 Aantal cellen gesloten broed, aantal bijen, totaal hemolymfeiwit, fractie vitellogenine en aantal bijenbroodcellen	20
4.3 Invloed van imidacloprid op zwermcellen	24
4.4 Imidacloprid en wintersterfte (studie II)	25
4.5 Gereduceerde stuifmeelaanvoer en vitaliteit (studie I)	26
4.5.1 Gereduceerde stuifmeelaanvoer	28
4.6 Interactie imidacloprid / gereduceerde stuifmeelaanvoer (Studie I)	28
4.7 4.7. Imidacloprid en pathogenen	29
<i>Dankwoord</i>	29
Bijlage 1	31
4.8 Materiaal en methode	31
Materiaal	31
Methode	31
<i>Opzet Studie I</i>	31
<i>Opzet studie II</i>	31
Reductie stuifmeelaanvoer studie I	32
Blootstelling aan imidacloprid via suikeroplossing 50%. Studie I en II	32
<i>Aantal bijen (fotoanalyse)</i>	33
<i>Aantal cellen bijenbrood (fotoanalyse)</i>	33
<i>Hemolymfe totaal eiwit en fractie vitellogenine</i>	33

<i>Virussen, Nosema ceranae en N. apis</i>	34
<i>Residu-analyse van imidacloprid en de metabolieten</i>	34
<i>Imidacloprid in de bijen, honing en bijenbrood</i>	34
<i>Hoeveelheid verzameld stuifmeel, studie I</i>	35
<i>Aantal bezette ramen en voorkomen van zwermcellen Studie II</i>	35
<i>Uitwintering</i>	35
<i>Studie I</i>	35
Bijenvolken in de zomerperiode 2012 en wintersterfte 2012-2013	36
Bijlage 2	37
<i>Varroaciden</i>	37
Bijlage 3	41
Referenties	41

Samenvatting

Er is in Nederland sinds enkele jaren sprake van een verhoogde wintersterfte van bijenvolken. De oorzaken hiervan zijn multifactorieel. De bijenparasiet *Varroa destructor*, bijenziekten zoals *Nosema* spp. en virussen, verarming van drachtgebieden, blootstelling aan pesticiden en imkerpraktijk zijn factoren die hierin een rol kunnen spelen. Het relatieve belang van genoemde factoren is niet duidelijk en afhankelijk van de omstandigheden. Deze studie richt zich op het effect van de factoren pesticiden, in deze studie imidacloprid en voedselschaarste, in deze studie stuifmeelaanvoer reductie, op de vitaliteit van honingbij volken en het overwinteringssucces.

Om de impact van imidacloprid op de vitaliteit en de wintersterfte van bijenvolken te testen zijn bijenvolken gedurende 12 weken (juni, juli en augustus) in de kast gevoerd met suikerwater 50% met imidacloprid. De gevoerde suikeroplossing met hierin gemiddeld 5.1 (sd 0.5) ng imidacloprid.g⁻¹ (studie I, 2011) en 6.1 (sd 2.1) ng imidacloprid.g⁻¹ (studie II, 2012) stelt bijenvolken effectief bloot aan imidacloprid. De gevoerde concentraties imidacloprid zijn globaal 2 tot 3 maal de gemeten waarden van imidacloprid in behandelde gewassen. De 12 weken constante blootstelling simuleert een worst case veld scenario; de meeste gewassen bloeien slechts een paar weken. Dit onderzoek is in 2011 en 2012 uitgevoerd in twee onafhankelijke studies. In het 2011-onderzoek is het effect van de blootstelling aan imidacloprid, al of niet gecombineerd met een gereduceerde stuifmeelaanvoer, op een aantal vitaliteitsparameters onderzocht. In de studie van 2012 is het effect van imidacloprid op vitaliteitsparameters en overwintering bepaald.

Het effect van imidacloprid en stuifmeelreductie op de vitaliteitsparameters en overwintering in 2011 en 2012 studies is samengevat in onderstaande tabel.

Vitaliteitsparameters	2011	2011	2012
aantal bijen	stuifmeelreductie	imidacloprid	imidacloprid
aantal cellen gesloten broed	effect	effect	geen effect
aantal cellen bijenbrood	effect	geen effect	geen effect
totaal hemolymfeiwit	effect	geen effect	geen effect
fractie vitellogenine	geen effect	geen effect	geen effect
aantal zwermcellen	niet bepaald	niet bepaald	effect
Overwintering	niet bepaald	niet bepaald	geen effect

De conclusies van dit onderzoek:

- Een gereduceerde stuifmeelaanvoer leidt tot een mindere ontwikkeling van de bijenvolken.
- Er is geen interactie tussen de gereduceerde stuifmeelaanvoer en imidacloprid op de vitaliteitsparameters behalve bij totaal hemolymfeiwit.
- Imidacloprid kan, bij de gekozen hoeveelheid en blootstellings-methode en afhankelijk van de omstandigheden, de hoeveelheid gesloten broed het aantal bijen en aantal zwermcellen verminderen.
- Er is geen effect van imidacloprid op de wintersterfte.

Abstract

In the Netherlands there is an increased winter mortality of honey bee colonies. The causes of winter mortality are multifactorial. The honey bee parasite *Varroa destructor*, bee diseases like *Nosema* spp. and viral infections, poor pollen sources, exposure to pesticides and beekeeping practice are factors involved. The relative impact of these factors is not clear and besides that, also circumstantial. This study focussed on in the factor pesticide, in this study imidacloprid and feed scarcity of feed, in this study pollen scarcity, on the vitality and overwintering of honey bee colonies.

The impact of imidacloprid on the vitality and overwintering of honeybee colonies was studied by in-hive feeding of the colonies during 12 weeks with 400 gram sugar solution 50% containing imidacloprid twice a week. The sugar solution containing on average 5.1 (sd 0.5) ng imidacloprid.g⁻¹ (study I, 2011) and 6.1 (sd 2.1) ng imidacloprid.g⁻¹ (study II, 2012) exposed honeybee colonies effectively to imidacloprid. The concentrations imidacloprid administered are approximately 2 to 3 times the concentrations that can be detected in the nectar of treated crops. The 12-weeks exposure period simulates a worst case scenario; most crops flowers for some weeks. The study consisted of two independent studies, performed in 2011 and 2012. The 2011 study focussed on the impact of imidacloprid and reduced pollen income and the interaction between both factors on the vitality of honey bee colonies from spring till start of hibernation. In the 2012 study the impact of imidacloprid on vitality parameters and overwintering was studied.

The impact of imidacloprid and pollen scarcity on the vitality parameters and hibernation in the 2011 and 2012 studies is summarized in the table below.

Vitality parameters	2011	2011	2012
	Pollen scarcity	imidacloprid	imidacloprid
Number of bees	effect	effect	no effect
Number of capped brood cells	effect	effect	no effect
Number of beebread cells	effect	no effect	no effect
total hemolymph protein	effect	no effect	no effect
fraction vitellogenin	no effect	no effect	no effect
Number of swarm cells	not determined	not determined	effect
Hibernation	not determined	not determined	no effect

The conclusions of this study.

- Pollen scarcity results in a decreased development of honey bee colonies.
- No interaction between pollen scarcity and imidacloprid has been observed except for the parameter total hemolymph protein
- Imidacloprid may, at the chose amount and exposure method, decrease the number of capped brood cells, the number of bees and the number of swarm cells.
- There is no effect of imidacloprid on winter mortality.

Leeswijzer

Dit rapport is een weergave van de twee onderzoeken, uitgevoerd in 2011 en 2012, naar de invloed van imidacloprid en stuifmeel deficiëntie op de vitaliteit van honingbijvolken en op de overwintering.

Om de toegankelijkheid en leesbaarheid van dit rapport te verhogen is gekozen voor een andere opzet dan de gebruikelijke wetenschappelijke lay-out. In dit rapport ligt de focus op de studie-opzet en de resultaten. In aparte bijlagen worden de relevante details en achtergronden gegeven.

Na de *Samenvatting* (Nederlands) en *Abstract* (Engels) met de conclusie van het onderzoek volgt de *Inleiding* (1) waarin de context van het onderzoek geschetst wordt en een verantwoording van de gekozen manier van blootstelling aan imidacloprid van de bijenvolken via het in de kast voeren met een suikeroplossing met imidacloprid (2). Het onderzoek wordt gepresenteerd in een verkort hoofdstuk *Materiaal & Methode* (3) met de opzet van het onderzoek en de gemeten parameters. Vervolgens worden de resultaten, direct gevolgd door de bespreking van de resultaten gegeven in *Resultaat & Discussie*. Bij voorbeeld: 4. Resultaat & discussie; 4.1. Blootstelling aan imidacloprid; 4.1.2. blootstelling aan imidacloprid in het volk, gevolgd door de bespreking van de resultaten (discussie). Elk hoofdstuk begint met een korte samenvatting.

De hoofdfactoren imidacloprid en reductie van de stuifmeelaanvoer worden apart gepresenteerd en behandeld. De interactie tussen de hoofdfactoren staat in een apart paragraaf.

De getallen in de tekst, de tabellen en figuren zijn genoteerd in de wetenschappelijke Engelse notatie; de decimale komma (Nederlandse notatie) is in de Engelse notatie een punt.

De details van *Materiaal & Methode* zijn gegeven in bijlage I.

De gevoerde concentraties imidacloprid en de resultaten van de analyses op residu van niet-imidacloprid insecticiden in bijen, honing en bijenbrood en de varroaciden staan in bijlage II.

In bijlage III zijn de referenties gegeven waarnaar in dit rapport naar verwezen wordt.

1. Inleiding

Het is bekend dat de verhoogde bijensterfte in Nederland van de afgelopen jaren meerdere oorzaken heeft. De bijenparasiet *Varroa destructor* en besmetting met *Nosema apis* en *Nosema ceranae* en virussen, verarming van drachtgebieden, blootstelling aan pesticiden en de imkerpraktijk spelen hierin een rol. De relatieve invloed van bovengenoemde factoren op de ontwikkeling van de bijenvolken en op de overwintering is afhankelijk van de omstandigheden. Om praktisch relevante redenen is ervoor gekozen de factoren pesticide (imidacloprid) en gereduceerd stuifmeelaanvoer op de ontwikkeling en overwintering van bijenvolken te onderzoeken. De praktisch relevante redenen zijn dat imidacloprid het meest gebruikte neonicotinoïde pesticide is en regelmatig genoemd wordt als een relevante factor in de verhoogde bijensterfte. Verminderde stuifmeelaanvoer kan, met name in landbouwgebieden met intensieve grootschalige landbouw en veeteelt, periodiek optreden. De factor *Varroa* is geen onderdeel van deze studie. De studie is zowel in 2011 als in 2012 gestart met praktisch varroavrije volken door behandeling van de broedvrije volken met oxaalzuur enkele weken voor aanvang van de studie.

De invloed van de factoren imidacloprid en verminderde stuifmeelaanvoer zijn in de studies van 2011 en 2012 onderzocht op volksniveau. Het onderzoek in 2011 richtte zich op de invloed van imidacloprid en van een gereduceerde stuifmeelaanvoer en de interactie tussen beide behandelingen op de vitaliteit van de bijenvolken van het voorjaar tot aan de inwintering. In 2012 is de invloed van imidacloprid op de ontwikkeling van voorjaar tot de inwintering en de daaropvolgende overwintering onderzocht. Het effect van elk pesticide op een bijenvolk is het resultaat van giftigheid van het pesticide voor de individuele bij of het bijenbroed en de mate blootstelling. In beide onderzoeken is ervoor gekozen bijenvolken aan imidacloprid bloot te stellen door de volken gedurende 12 weken direct in de kast te voeren met een suikeroplossing met hierin 5 ppb imidacloprid. De concentratie van 5 ppb imidacloprid is globaal een dubbele concentratie die in de praktijk in de nectar aangetroffen kan worden. De verdeling van een suikeroplossing, gevoerd in de kast, is gelijk aan die van inkomende nectar. Vermindering van de stuifmeelaanvoer in de volken is in het onderzoek van 2011 bewerkstelligd door het permanent plaatsen van een stuifmeelval voor de vliegopening van het voorjaar tot in de zomer.

Door de volken te beoordelen op aantal bijen en hoeveelheid broed, concentratie van het hemolymfeiwit, fractie vitellogenine en het voorkomen van *Nosema apis*, *Nosema ceranae* en Deformed Wing Virus en overwintering wordt een beeld gevormd van de vitaliteit van het bijenvolk en de invloed van de behandelingen hierop.

2. Blootstelling van bijenvolken aan imidacloprid via suikerwater, aangeboden in de bijenkast, aan vrij-vliegende bijenvolken (semi-veldtest)

Blootstelling van bijenvolken aan imidacloprid in het veld, direct via voederplaatsen met gecontamineerd suikerwater of via behandeld gewas zal er in resulteren dat de volken verschillende hoeveelheden imidacloprid verzamelen en dus aan verschillende hoeveelheden imidacloprid blootgesteld worden. Dit is dan afhankelijk van het aantal haalbijen dat tussen volken sterk kan variëren en het gegeven dat volken op een bijenstand zich over de drachten in de omgeving verdelen. Daarom is imidacloprid (active ingredient a.i.) direct aangeboden met suikerwater 50% (w/w) in de bijenkast. Met deze semi-natuurlijke blootstelling wordt imidacloprid rechtstreeks verdeeld over de opgeslagen honing, de bijen, het bijenbrood en het broed. Door de nauwkeurig gedoseerde hoeveelheid imidacloprid kan een blootstellings-effect relatie gelegd worden.

Er is voor gekozen het imidacloprid niet via het stuifmeel aan te bieden; de blootstellings-effect relatie is veel minder nauwkeurig te leggen. Net als nectar kan stuifmeel gecontamineerd zijn met imidacloprid. Echter, in tegenstelling tot suikerwater wordt stuifmeel dat rechtstreeks in de kast aangeboden wordt, direct geconsumeerd. Het stuifmeel wordt dan niet, zoals in de normale gang van zaken, in het bijenvolk, eerst opgeslagen, verwerkt / gesileerd tot bijenbrood en dan geconsumeerd. De consumptie van het in de bijenkast aangeboden stuifmeel is in een veld realistische proefopzet niet te reguleren. De consumptie is sterk afhankelijk van de hoeveelheid broed en de hoeveelheid stuifmeel dat door de bijen binnengebracht wordt. Bijenbrood wordt door een beperkte groep bijen geconsumeerd. De voederbijen consumeren het bijenbrood en zetten dit om in eiwit-vetreserves die vervolgens gebruikt worden voor onder andere de aanmaak van voedersap in de hypopharyngeal en mandibulaire klieren. De consumptie van honing is veel hoger dan die van bijenbrood. Een individuele zomerbij consumeert in haar leven gemiddeld 336 mg suiker (400 mg honing) en 65 mg stuifmeel. Bij gelijke contaminatie van honing en bijenbrood is de blootstelling via honing globaal 7 x hoger dan die aan gecontamineerd stuifmeel. Een werksterlarve consumeert 142 mg honing en 1.5 - 2 mg stuifmeel. De directe blootstelling van broed is via stuifmeel/bijenbrood een factor 70 - 100 lager dan via honing. Bij het proces van de omzetting van stuifmeel tot bijenbrood wordt honing aan het stuifmeel toegevoegd. Op deze manier wordt het missen van gecontamineerd stuifmeel deels ondervangen en vindt er ook een blootstelling via deze route plaats.

Voor het buiten aanbieden van vers of gedroogd gecontamineerd stuifmeel geldt hetzelfde als voor het buiten aanbieden van suikerwater.

De onderzoekers zijn er zich van bewust dat door het weglaten van de blootstelling via stuifmeel, een blootstellingsroute buiten beschouwing gelaten is. Gezien de in verhouding geringere blootstelling via stuifmeel/bijenbrood, is met de gekozen opzet, waarbij gedurende 12 weken de bijenvolken blootgesteld worden aan imidacloprid via suikerwater, een worst case semi-realistisch scenario opgezet voor een semi-veldstudie naar de impact van imidacloprid op de vitaliteit en overwintering van het bijenvolk.

2.1 Het aanbieden van suikeroplossing in de bijenkast

De gerefereerde toelichting over blootstelling van bijenvolken aan pesticiden of andere stoffen via suikerwater is hieronder uitgewerkt.

Een suikeroplossing die in de kast aangeboden wordt, wordt opgenomen door bijen van 18 – 28 dagen oud. Deze leeftijdscategorie is, in de leeftijdsgerelateerde taakverdeling in het bijenvolk, de groep die de nectar aanneemt en opslaat (Brodschneider et al., 2007; Sheeley, 1995). De verzamelde nectar wordt deels direct geconsumeerd door werksters en broed maar het grootste deel wordt verwerkt tot honing (Gary, 1975; Maurizio, 1975). DeGrandi-Hofmann & Hagler (2000) toonden aan dat suikerwater, aangeboden in de bijenkast, verdeeld wordt over broed- en opslagraten, het meest in de opslagraten en minder in de broeddraten. Een deel van deze suikeroplossing wordt direct gebruikt voor het voeden van de larven door voedsterbijen; voedsterbijen nemen dus ook direct nieuw binnengebracht voedsel aan van de bijen die het binnenbrengen. Ook in de bijen op de opslagraten wordt deze suiker aangetroffen. De foerageerbijen consumeren ook direct een deel van de binnengebrachte nectar voor ze nieuwe foerageervluchten gaan maken. Het meeste van de aangeboden suiker wordt, gemeten binnen 8 uur, aangetroffen in de werksters op de opslagraten en in de nectar in de opslagraten en het minste in de larven. (Brandstetter et al., 1988). Nixon & Ribbands (1952) voerden zes werksters met gelabelde suiker en onderzochte de verdeling tussen bijen en larven in een volk van 24500 bijen. Binnen 4 uur had 62% van alle foerageerbijen iets van dit voedsel opgenomen en was de gelabelde suiker te vinden in 16 – 21% van alle bijen in het volk. Na 27 uur was de gelabelde suiker in 76% van alle foerageersters en in 43 – 60 % van alle bijen in het volk te detecteren. De voedsterbijen waren significant minder radioactief dan de andere bijen in de kast (huisbijen) en de foerageersters significant meer. Binnen 48 uur waren alle larven in de open cellen radioactief.

Het gegeven dat aangeboden suikerwater, al dan niet met een teststof, aan larven gevoerd wordt is de grondslag van een test naar neveneffecten van Juveniel Hormoon Analoge pesticiden (JHA) op bijenbroed (Oomen et al., 1992). Zowel koninginnenlarven als werksterlarven worden de eerste 2 dagen gevoed met voedersap, geproduceerd door de voedsterbijen in de hypopharyngeale- en mandibulaire klieren, aangevuld met honing. Het larvale voedsel bestaat voor 60 – 80 % uit een heldere vloeistof van de hypopharyngeale klieren, gemengd met honing, spijsverteringsenzymen en water en 20 – 40 % uit een melkachtige component, waarschijnlijk afkomstig uit de mandibulaire klieren. Bij de koninginnenlarve wordt dit voerregime voortgezet. Bij de werksterlarven neemt op de derde dag van de larvale ontwikkeling de hoeveelheid secret uit de mandibulaire klieren af met als gevolg een afname van de diversiteit en kwantiteit van eiwitten. Er wordt, vooral vanaf dag 5 van de larvale ontwikkeling, stuifmeel toegevoegd aan het larvenvoedsel (Winston 1987). Babendreier (2004) stelde vast dat de hoeveelheid stuifmeel in het larvale voedsel beperkt is. Van de totale eiwitbehoefte van een werksterlarve wordt minder dan 5% geleverd door het direct bijvoeren van stuifmeel. De stuifmeelconsumptie van een werksterlarve is 1.52 – 2.04 mg stuifmeel. In het bijenvolk wordt het stuifmeel niet direct geconsumeerd. Het verzamelde stuifmeel wordt gemengd met honing om het omzettingsproces van stuifmeel naar bijenbrood op gang te brengen (Winston, 1987). De hoeveelheid honing, geconsumeerd door een werksterlarve, wordt geschat op 142 mg (Seeley, 1985). Een werksterlarve wordt gedurende de hele larvale ontwikkeling 143 keer gevoed met een totale voederduur van 2 uur (Lindauer, 1952). Een koninginnenlarve wordt 1500 – 1700 keer gevoed met voedersap in een totale voederduur van 17 uur (Jung-Hofmann, 1966; Haydak MH. 1970). Het aanbieden van suikeroplossing in de bijenkast garandeert een zekere blootstelling die niet bereikt wordt bij het aanbieden van imidacloprid buiten de bijenkast.

De bijen van een volk verspreiden zich niet homogeen over een drachtgebied. Per dag bezoeken de bijen van een volk slechts een relatief beperkt aantal redelijk bijeen gelegen plaatsen met dracht. Het volk werkt als een soort informatiecentrum waarbij de zoekbijen (scouts) zich verspreiden over een groot oppervlak (straal van 4 – 6 km) en de drachten zoeken. Deze informatie van de scouts en vervolgens van de rekruten wordt aan het volk doorgegeven en de foerageersters concentreren zich vervolgens op die drachten die profijtelijk zijn op basis van de bijdans en het uitwisselen van het verzamelde voedsel (nectar en stuifmeel). Dit wisselt van dag tot dag of binnen een dag. (Visscher & Seeley 1982; Seeley 1985; Ribbands, 1949). Steffan-Dewenter (2003) stelde vast dat de gemiddelde vliegafstand 1.1815 km was met een range van 60 meter tot 10 kilometer. Het bleek niet uit te maken of de bijen foerageerden in een complex of simpel landschap. In een eenvoudig landschap vliegen de bijen verder voor stuifmeel dan in een complex landschap 1.7 km en 1.5 km resp. De afstanden waren in juni, bij stuifmeel-schaarste

het hoogste. De bijen vliegen voor het verzamelen van nectar tot 13 km, voor stuifmeel 6 km en voor water 2 à 3 km.

Bijenvolken op een stand bezoeken vaak verschillende drachten binnen het gemeenschappelijke drachtgebied. Waddington et al., (1994) onderzochten de spreiding van foerageersters van twee naast elkaar geplaatste volken aan de hand van de bijendans. Het bleek dat de twee volken vooral op verschillende plaatsen foerageerden en soms op dezelfde dracht vlogen. Elk volk verandert van dracht op verschillende dagen. Dit is deels toeval wanneer de verkenners van verschillende volken verschillende drachten vinden. Dit verklaart echter niet het grote verschil. Ook de verschillende stuifmeel – en nectarbehoeften van de volken konden het verschil niet verklaren. Een mogelijke verklaring is dat wanneer een volk een goede dracht gevonden heeft, de efficiëntie toe neemt omdat er meer foerageersters van het volk op gaan vliegen. Verkenners van een ander volk die later komen vinden daardoor een minder aantrekkelijke drachtbron en zoeken verder naar een betere dracht. Het fenomeen dat volken op een stand verschillende drachten bezoeken is bekend. Elke imker weet dat verschillende volken op een stand vaak met een verschillend pallet aan stuifmeelkleuren thuiskomen. Bovengenoemd onderzoek geeft hiervoor een verklaring. De mate waarin de volken zich “verdelen” over een drachtgebied en welke mechanismen hieraan precies ten grondslag liggen is echter nog onbekend.

2.2 Imidacloprid 5 ppb

De geteste concentratie imidacloprid van 5 ppb is gebaseerd op de waarden uit de literatuur, o.a. imidacloprid in nectar van zonnebloem en koolzaad (Schmuck et al 2001: 1.9 µg/kg) en Clothianidin 2.24 ppb in koolzaad (Cutler & Scott-Dupree, 2007). De opname van Clothianidin verloopt hetzelfde als bij imidacloprid. In de onderzoeken van Faucon et al. (2005) was 5 µg/l de NOEC voor survival in het veld en bij onderzoek van Schmuck et al. was dat 2-20µg/l.

2.3 Stuifmeeldeficiëntie, hemolymfeiwit en vitellogenine

Honingbijen zijn compleet afhankelijk van stuifmeel voor de eiwit-, vet- en mineralenbehoefte. Werksters consumeren gedurende de eerste twee weken van hun leven bijenbrood en bouwen hiermee de eiwit- vetreserves op. De productie van bijenbrood is sterk afhankelijk van het beschikbare stuifmeel (Brodtschneider, R., Crailsheim, K. 2010). Bij stuifmeelbeperking krijgt de verzorging van de oudere larven de prioriteit (Schmickl, T., Crailsheim, K. 2002). De eiwitstatus van de honingbij bepaalt in sterke mate de levensverwachting en vitellogenine is hierbij hierin een bepalende factor. Vitellogenine is een opslageiwit (glycoproteïne) die voor diverse metabolische processen nodig is, inclusief de productie van voedersap (Amdam & Omholt 2002). Hemolymfeiwit, zowel totaal eiwit als vitellogenine reflecteren de kwaliteit en de bruikbaarheid van een larvendieet (Cremonez et al., 1998).

2.4 Efficiëntie stuifmeelval

Er is niet een vaststaand percentage stuifmeelklompjes dat met de stuifmeelval afgevangen wordt. Dit is afhankelijk van de grootte van het stuifmeelklompje en hoe vast het in de corbicula zit. Free (1967) stelde, bij onderzoek in de zomer waarin de volken diverse drachten konden bezoeken dat er globaal 10% van het stuifmeel dat de bijen verzamelen met de stuifmeelval afgevangen wordt. Bij onderzoek naar de bestuiving door honingbijen van kiwi, werd 54% van het kiwistuiwmeel afgevangen (Vaissière et al., 1996).

2.5 Levensverwachting zomerbij

De levensverwachting van een zomerbij is 25 – 31 dagen (Winston, 1987). Onderzoek van van der Steen (2012) liet zien dat de bijen in augustus gemiddeld iets ouder worden dan 4 weken.

3. Materiaal & Methode

In 2011 is de invloed van imidacloprid en van de interactie tussen imidacloprid en gereduceerd stuifmeel op de vitaliteit van bijenvolken onderzocht (studie I). In de periode 2012 – 2013 is opnieuw de invloed van imidacloprid op de vitaliteit van bijenvolken en op de overwintering bepaald (studie II). Beide studies, uitgevoerd als semi-veldtesten, zijn onafhankelijk van elkaar uitgevoerd. De bepaalde vitaliteits-parameters waren: aantal bijen, aantal cellen gesloten broed, hemolymfeiwit, fractie vitellogenine van hemolymfeiwit, aantal cellen bijenbrood en de prevalentie van de pathogenen *Nosema apis*, *Nosema ceranae*, deformed Wing Virus (DWV) en Acute bee Paralysis Virus (ABPV). Deze bepalingen zijn Methode & Materiaal (bijlage I) aangeduid als detailanalyses. De bepalingen zijn in studie I bij alle volken uitgevoerd. In studie II is dit gedaan met 15 volken per behandelgroep. Deze volken zijn ad random voor aanvang van de behandeling geselecteerd. De wintersterfte, onderdeel van studie II, is bepaald met alle volken van de behandelgroepen.

Het imidacloprid (5 ppb) is aangeboden via het voeren met suikerwater 50% (w/w). De vrijliggende volken werden 2 x per week gevoerd met 330 ml suikerwater(400 gram) gedurende de periode: studie I: van 14 juni 2011 tot 1 september 2011 en studie II van 11 juni 2012 tot 30 augustus 2012. Het effect van een gereduceerde stuifmeelaanvoer is in studie I gesimuleerd door een stuifmeelval voor de volken te plaatsen in de periode 14 juni 2011 tot 4 augustus 2011.

In studie I is de invloed van imidacloprid en van stuifmeelreductie op de vitaliteit tot aan de inwintering bepaald. De studie-opzet en uitwerking zijn gegeven in schema 1. In studie II is de factor stuifmeelreductie niet meegenomen en is de invloed van imidacloprid op de vitaliteit en op de wintersterfte bepaald. De studie-opzet en uitwerking zijn gegeven in schema 2.

imidacloprid	stuifmeelval
imidacloprid + stuifmeelval	controle

*Schema 1. Studie I, uitgevoerd in 2011, is uitgevoerd in een 2x2 opzet met 13 volken per behandelgroep. De metingen van aantal bijen en aantal gesloten broedcellen zijn uitgevoerd bij de aanvang op 30 mei 2011, op 29 juli en op 5 september. Het hemolymfeiwit en fractie vitellogenine zijn gemeten op 31 mei en 6 september 2011. De prevalentie van de bijenziekten *Nosema apis*, *Nosema ceranae* en DWV is gemeten in juni en september 2011. De resultaten van de bijen- en broedmetingen en van de hemolymfeiwit en vitellogenine metingen zijn statistisch geanalyseerd met de 2 x 2 ANOVA.*

Bij de 2x2 opzet worden de effecten van de hoofdfactoren imidacloprid en gereduceerd stuifmeel apart bepaald plus de interactie tussen beide factoren. In dit rapport worden de hoofdfactoren en de interacties apart behandeld.

imidacloprid	controle
--------------	----------

*Schema 2. Studie II, uitgevoerd in 2012 is uitgevoerd in een 1x2 opzet met 60 volken per behandelgroep. De metingen van aantal bijen en aantal gesloten broedcellen zijn uitgevoerd bij de aanvang op 5 juni, op 30 juli, op 5 september 2012 en op 2 april 2013. Het hemolymfeiwit en fractie vitellogenine zijn gemeten op 6 juni en 8 september 2012. De prevalentie van de bijenziekten *Nosema apis*, *Nosema ceranae* en DWV is gemeten in juni en september 2011. Additioneel is in deze studie ook van alle volken vanaf 8 juni tot 17 september elke vier weken het aantal bezette ramen genoteerd en vervolgens in november, december 2012 en april 2013. De resultaten van de bijen- en broedmetingen, van de hemolymfeiwit en vitellogenine metingen en bezette ramen zijn statistisch geanalyseerd met GLM. Het verschil in aantal zwermcellen bij de twee behandelingen is genoteerd op 2 juni, 2 juli en 31 juli 2013 en statistisch geanalyseerd met de Fischer Exact test.*

In de loop van 2011 (studie I) en van 2012 (studie II) zijn er bijenvolken uitgevallen door (stille) moerswisseling, zwermen en algehele verzwakking. Deze volken zijn uit de proef genomen. Dit had tot gevolg dat het aantal bijenvolken per behandelingsgroep lager werd. Uitval van volken was ingecalculereerd bij de berekening van het aantal volken voor bepaalde waarnemingen (bijlage I). De statistische analyses van de vitaliteitsparameters (studie I en II) zijn uitgevoerd met 1) alleen de volken die van aanvang tot inwintering in de studie zaten en 2) met de overgebleven volken per monsterdatum. Omdat dit geen verschil gaf, worden de resultaten van de statistische analyses met de overgebleven volken per monsterdatum gepresenteerd.

De vitaliteit van een bijenvolk wordt beschreven aan de hand van veranderende verhoudingen tussen het aantal bijen, bijenbroed, hemolymfeiwit, vitellogenine en prevalentie van pathogenen in de loop van het bijenseizoen en de transitie naar wintervolk. De parameters worden in hun onderling verband geëvalueerd en bediscussieerd

Wintersterfte is de afname van het aantal volken gedurende de winter in de periode na de inwintering in het najaar en het uitwinteren in het voorjaar.

4. Resultaat en discussie

4.1 Blootstelling aan imidacloprid

Samenvatting

Het voeren van bijenvolken met een suikeroplossing 50% met hierin gemiddeld 5.1 (sd: 0.5) ng imidacloprid (studie I, 2011).g⁻¹suikeroplossing en 6.0 (sd: 2.1) ng imidacloprid (studie II, 2012).g⁻¹ suikeroplossing (sd = 2.1) simuleert een blootstelling aan ongeveer 2 x de hoeveelheid imidacloprid zoals die in gerefereerd onderzoek in het veld gemeten is.

Na de blootstellingsperiode waarin de volken gedurende 12 weken, 2 x per week gevoerd werden met 330 ml (400 g) suikerwater met imidacloprid werd imidacloprid aangetoond in honing, bijenbrood en bijen. Er zijn geen metabolieten van imidacloprid gevonden.

In de honing werd in de meeste volken imidacloprid gedetecteerd. Gemiddeld was dit in de volken met honing waarin imidacloprid gevonden was 2.61 – 2.45 ppb (studie I) en 1.15 ppb (studie II) imidacloprid. In bijenbrood werd in een volk dat blootgesteld was aan imidacloprid 1.21 (studie I) en 0 ppb (studie II) gevonden. In studie I werd in de bijen van een volk imidacloprid 1.34 ppb gedetecteerd. In de bijen van studie II is geen imidacloprid gevonden.

De gemiddelde opname gedurende de blootstellingsperiode per bij was 0.14 ng (= 1.10 x LD₅₀) in studie I en 0.12 ng imidacloprid (= 0.93 x LD₅₀) in studie II.

4.1.1 Blootstelling aan imidacloprid in het volk

In 2011 en in 2012 zijn de volken op dezelfde manier blootgesteld aan imidacloprid. De controlevolken kregen dezelfde hoeveelheid suikerwater zonder imidacloprid.

Per week is per volk globaal 800 gram (2 x 330 ml = 2 x 400 g) suikerwater met imidacloprid aangeboden en opgenomen. Dit komt globaal overeen met

- 4080 ng imidacloprid per week per volk (5.1 ng imidacloprid x 800 gram) (studie I).
- 4800 ng imidacloprid per week per volk (6 ng imidacloprid x 800 gram) (studie II).
- 48960 ng imidacloprid per volk gedurende de blootstellingsperiode (studie I)
- 57600 ng imidacloprid per volk gedurende de blootstellingsperiode (studie II)
- 583 ng imidacloprid per dag per volk (4080 ng / 7) (studie I)
- 685 ng imidacloprid per dag per volk (4800 ng / 7) (studie II)

In de periode juni tot september 2011 (studie I) hadden de volken, gevoerd met imidacloprid en met stuifmeelval gemiddeld 3194 bijen en de volken gevoerd met imidacloprid en zonder stuifmeelval 4869 bijen. Gemiddeld was het aantal bijen niet verschillen (P = 0.4). Het totale gemiddelde van de volken in beide behandelingsgroepen was 4031 bijen. In dezelfde periode in 2012 (studie II) hadden de volken die met imidacloprid gevoerd werden gemiddeld 5559 bijen, bij aanvang minder en bij de laatste blootstelling meer.

De gemiddelde opname per bij per dag in studie I en II is gegeven in tabel 2

Tabel 2. Opname imidacloprid per dag, fractie van de LD₅₀ en blootstelling gedurende de levensverwachting van de zomerbij

Studie	Opname imidacloprid per bij / dag	Opgenomen fractie LD ₅₀	Blootstelling gedurende 28 dagen
I	0.14 ng (583 ng / 4031 bijen)	0.038 (0.14 / 3.7)	1.05 x LD ₅₀ (0.038 * 28)
II	0.12 ng (685 ng / 5550 bijen)	0.033 (0.12 / 3.7)	0.93 x LD ₅₀ (0.033 * 28)

In studie I hebben de kleinere volken (stuifmeelval) gemiddeld meer imidacloprid per bij per dag opgenomen dan de grotere volken (geen stuifmeelval): in de kleinere volken namen de bijen per dag 0.05 maal de waarde van de LD₅₀ (0.18/3.7) op en per bij werd in de grotere volken 0.03 keer de waarde van de LD₅₀ (0.12/3.7) opgenomen.

De aangeboden concentratie van 5 à 6 ppb was ruim twee keer de concentratie imidacloprid die in nectar gemeten kan worden. De wekelijks aangeboden 800 gram suikerwater 50% (400 gram suiker) was minder dan de suikerbehoefte per week in de zomer. Een zomervolk gebruik meer suiker dan een winterfolk door verhoogde broed- en vliegactiviteit. Een normaal zomervolk consumeert 35 kg honing. (Sheeley, 1985). Dit komt overeen met 28 kg suiker. De aangeboden hoeveelheid suiker was 4.8 kg (12 x 400 gram suiker in de suikeroplossing). De proefvolken waren niet groot en de suikerconsumptie per volk zal daarom lager geweest zijn maar wel groter dan de aangeboden hoeveelheid. De aangeboden hoeveelheid suiker is verdund met vers aangevoerde nectar. Uitgaande van verdunning van de aangeboden hoeveelheid suikerwater met ongeveer dezelfde hoeveelheid nectar, benadert de opgenomen hoeveelheid imidacloprid de concentratie zoals die ook in de praktijk gemeten kan worden. Aangezien de extra toevoer van nectar niet gemeten is, kan hierover alleen een aanname gedaan worden. De blootstelling per bij zal daarom ook niet de berekende 1.10 x de LD₅₀ (studie I) en 0.93 (studie II) geweest zijn maar lager. De concentraties imidacloprid in de honing, *2.61 – 2.45 ppb (studie I) en 1.15 ppb (studie II)*, zijn globaal 1.5 maal de concentraties gevonden in nectar van gemiddeld 1.9 µg imidacloprid/kg in veldstudies van Schmuck et al. (2001).

In tegenstelling tot studie I waarbij de volken vanaf 4 augustus de beschikking hadden over suikerdeeg ad libitum hadden de bijenvolken in studie II gedurende de hele zomerperiode ad libitum toegang tot suikerdeeg.

4.1.2 Imidacloprid in bijen, honing en bijenbrood

In tabel 1 zijn de gedetecteerde hoeveelheden imidacloprid in studie I en studie II gegeven.

Tabel 1. Imidacloprid en metabolieten van imidacloprid (ppb) in honing, bijenbrood en bijen in september na de blootstelling. De gegeven waarden zijn de gemiddelden van de volken waarin imidacloprid gedetecteerd is. In de tabel is tussen haakjes achter het gemiddelde de sd en aantal volken waarin imidacloprid gemeten is gegeven.

STUDIE I				
	imidacloprid gevoerd		Geen imidacloprid gevoerd	
	Met stuifmeelval	zonder stuifmeelval	met stuifmeelval	zonder stuifmeelval
	Honing (sd, n volken)			
Imidacloprid	2.61 (1.09, 5)	2.45 (1.26, 9)	2.52 (1.44,4)	1.20 (0.40, 3)
Metabolieten	nd	nd	nd	nd
	Bijenbrood (sd, n volken)			
Imidacloprid	1.21 (0.1)	nd	nd	3.57 (0,1)
Metabolieten	nd	nd	nd	nd
	Bijen (sd, n volken)			
Imidacloprid	1.34 (0, 1)	nd	0.89 (0, 1)	nd
Metabolieten	nd	nd	nd	nd

STUDIE II				
	imidacloprid gevoerd		geen Imidacloprid gevoerd	
	Honing (sd, n volken)			
Imidacloprid	1.15 (0.6, 8)	nd	nd	nd
Metabolieten	nd	nd	nd	nd
	Bijenbrood (sd, n volken)			
Imidacloprid	nd	nd	nd	nd
Metabolieten	nd	nd	nd	nd
	Bijen (sd, n volken)			
Imidacloprid	nd	nd	nd	nd
Metabolieten	nd	nd	nd	nd

* (detailvolken 2012)

nd = not detected (niet gedetecteerd)

Gedetecteerde imidacloprid voor aanvang van de blootstelling

Bij studie I werd voor aanvang van het voeren met imidacloprid in 5 van de 52 volken imidacloprid gedetecteerd: in de honing van drie volken (0.83, 1.02 en 1.14 ppb). Een volk zat in een behandelgroep die met imidacloprid gevoerd werd, de andere twee volken waren controlevolken. In september is in het volk in de imidaclopridgroep opnieuw imidacloprid aangetroffen. Dit is het resultaat van het voeren omdat in de beide andere volken waarin in de honing voor aanvang imidacloprid gevonden is, dit in september niet aangetoond kon worden.

In het bijenbrood van twee volken is voor aanvang van het voeren imidacloprid gevonden (1.12, en 4.02 ppb). In het volk waarin in het bijenbrood 4.02 ppb imidacloprid werd gevonden werd ook 3.09 ppb imidacloprid-desnitro gedetecteerd. Dit volk zat in de behandelgroep stuifmeelval + imidacloprid. In september is ook in dit volk imidacloprid in het bijenbrood gedetecteerd. Dit is waarschijnlijk het resultaat van het voeren plus mogelijk de verminderde consumptie door een sterke reductie van het broed door de stuifmeelval. Het andere volk zat in de behandelgroep die met imidacloprid gevoerd werd maar geen stuifmeel had. Hier is in september geen imidacloprid in het bijenbrood gevonden. Aangezien de volken zonder stuifmeelval significant meer broed hadden, kan aangenomen worden dat hierin ook de consumptie en omloopsnelheid van het bijenbrood hoger was.

Er is geen effect van het reeds aanwezige imidacloprid op de vitaliteit van de volken vastgesteld. Bij studie II werd voor aanvang van het voeren met imidacloprid in geen van de volken (bijen, honing en bijenbrood) imidacloprid of een van de metabolieten gevonden.

Imidacloprid in honing, bijenbrood en bijen in september na de blootstelling van 12 weken

Honing

In studie I is de laatste imidacloprid gevoerd op 1 september 2011 en 4 dagen later zijn de monsters voor residu-analyse genomen. In studie II is de laatste imidacloprid gevoerd op 30 augustus 2011 zijn de monsters 18 dagen later genomen. In beide studies werd de suikeroplossing steeds binnen enkele dagen opgenomen. In de honing is bij studie I in 14 van de 19 volken die gevoerd waren met imidacloprid, imidacloprid aangetroffen. Bij studie II was dit het geval bij 8 van de 15 volken. De gemeten concentratie in de honing was in studie I, 2 x zo hoog als in studie II, ondanks het gegeven dat de aangeboden concentraties bij studie I en studie II nagenoeg gelijk waren. Dit verschil is waarschijnlijk het resultaat van de latere monsternamen in studie II waardoor een deel van de imidacloprid verdund, geconsumeerd of afgebroken is.

In studie I werd ook imidacloprid gedetecteerd in de honing van volken die niet gevoerd waren met imidacloprid. Er heeft waarschijnlijk uitwisseling van imidacloprid tussen de volken plaatsgevonden als gevolg van vervliegen / roverij. Een stuifmeelval voor de bijenkasten resulteert in meer vervliegen van de bijen (praktijkwaarneming). Het meeste imidacloprid werd gevonden in de opgeslagen honing in de volken die met imidacloprid gevoerd waren. Dit werd ook verwacht, gezien de natuurlijke verdeling van het aangeboden suikerwater. Het is niet waarschijnlijk dat de imidacloprid in de volken bij studie I die niet gevoerd waren met imidacloprid afkomstig was van "buiten". In dat geval was het waarschijnlijker geweest dat dit in meer volken die niet gevoerd waren met imidacloprid, gevonden zou zijn.

Bijenbrood

Verwacht werd, gezien de verdeling van het suikerwater in het bijenvolk, dat er imidacloprid in het bijenbrood terecht zou komen. In het bijenbrood is bij studie I wel imidacloprid aangetroffen in een volk en bij studie II niet. Dit is mogelijk het resultaat van de langere tijd tussen laatste voerdatum en monsternamen voor analyse bij studie II waardoor er meer microbiële afbraak plaats heeft kunnen vinden en/of omdat het gecontamineerde stuifmeel al geconsumeerd was. Bijenbrood blijft in de zomer slechts enkele weken in het volk voordat het geconsumeerd wordt waardoor het mogelijk gecontamineerde stuifmeel in de relatief grotere volken bij studie I al geconsumeerd was voor de monsternamen. Opvallend is dat bij studie I ook imidacloprid gedetecteerd is in het bijenbrood van een volk dat niet gevoerd was met imidacloprid. Hiervoor is niet een duidelijke verklaring. In dit volk was voor aanvang van de studie geen imidacloprid in het bijenbrood gedetecteerd.

Bijen

In tegenstelling tot studie II is bij studie I wel imidacloprid aangetoond in de bijen van een volk gevoerd met imidacloprid en in een volk dat niet gevoerd was met imidacloprid. Ook dit is mogelijk het resultaat van de latere monsternamen. Een mogelijke verklaring is dat er relatief meer imidacloprid in de bijen bij studie I terecht is gekomen omdat de volken in studie I kleiner waren. Omdat er geen direct effect van imidacloprid op het aantal bijen aangetoond is, is het niet aannemelijk dat de bijen die het gecontamineerde voedsel opgenomen hebben dood gegaan zijn. Het is wel aannemelijk dat deze bijen het imidacloprid reeds gedetoxificeerd of op via het spijsverteringskanaal uitgescheiden hebben of niet geconsumeerd hebben.

4.2 Imidacloprid en vitaliteit

Samenvatting

Imidacloprid heeft effect op de vitaliteit van bijenvolken door reductie van broed en zwermcellen in de zomerperiode (studie I). Er is geen effect vastgesteld op de transitie van zomer- naar wintervolken (studie II). Er is geen effect op het aantal bijenbroodcellen vastgesteld wat laat zien dat het stuifmeelhalen niet significant beïnvloed is.

De hoeveelheid broed wordt significant gereduceerd na aanvang van de blootstelling waardoor ook in een later stadium het aantal bijen in de volken lager is. Dit effect is wel in 2011 (studie I) vastgesteld maar niet in 2012 (studie II). Dit is mogelijk een blootstelling – effect relatie waarbij in 2011 (studie I) er een hoger blootstelling per bij was.

Het is echter ook mogelijk dat er wel een reductie van het broed in studie II plaats gevonden heeft maar dat dit door reductie van broed door de verhoogde zwerm drift in de controle volken niet meetbaar was. In 2012 was er geen effect op de volksgrootte uitgedrukt in aantal bijen en ramen bezet met bijen.

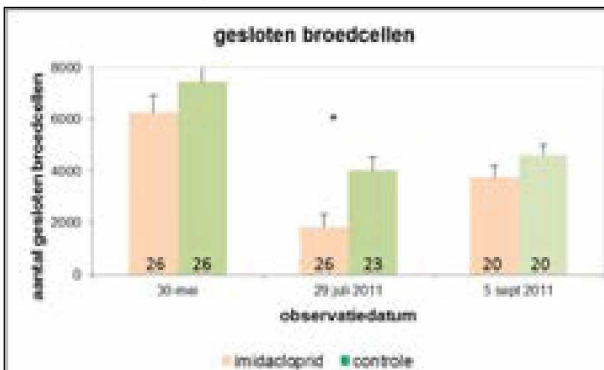
In 2012 (studie II) was er een significant reductie van het aantal zwermcellen in de volken blootgesteld aan imidacloprid. Deze parameter is in 2011 (studie I) niet meegenomen.

De transitie van zomer-naar wintervolk, werd beoordeeld op basis van afname van broed en stijging van vitellogenine. In studie I was dit begin september, bij de laatste beoordeling, nog niet het geval bij zowel de behandelde volken als de controle volken. In studie I kan daarom hierover geen uitspraak gedaan worden. In studie II is geen effect van imidacloprid op de transitie van zomer- naar wintervolk gevonden. Het hemolymfeiwit en fractie vitellogenine vertoonden, onafhankelijk van de blootstelling aan imidacloprid, het normale verloop (afname van broed en toename van fractie vitellogenine in wintervolken).

De prevalentie van *Nosema apis*, *Nosema ceranae*, DWV en ABPV wordt niet beïnvloed door imidacloprid.

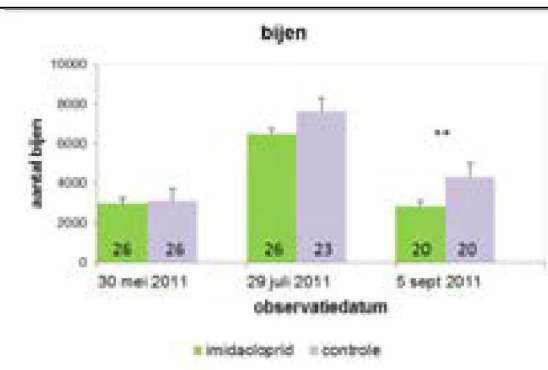
4.2.1 Aantal cellen gesloten broed, aantal bijen, totaal hemolymfeiwit, fractie vitellogenine en aantal bijenbroodcellen

Studie I (2011)



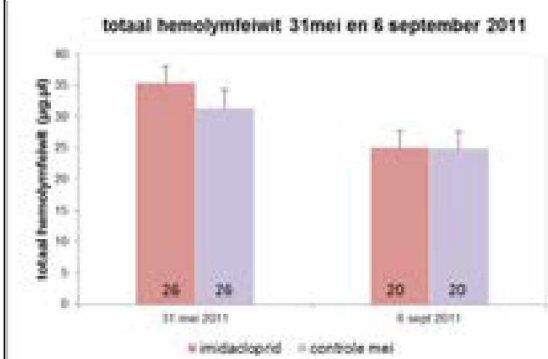
figuur 1. "Predicted" gemiddeld aantal gesloten broedcellen op 30 mei, 29 juli, en 5 september 2011 in de volken blootgesteld aan imidacloprid en de controlevolken. De sterren geven de verschillen tussen de behandelgroepen (* P < 0.0). De staafjes op de kolommen geven de standaardafwijking van het gemiddelde. Het aantal overgebleven volken is per kolom vermeld.

Resultaat statistische analyse
30 mei, P = 0.25; 29 juli, P = 0.014; 5 september, P = 0.17



figuur 2. "Predicted" gemiddeld aantal bijen op 30 mei, 29 juli, en 5 september 2011 in de volken blootgesteld aan imidacloprid en de controlevolken. De sterren geven de verschillen tussen de behandelgroepen (* P < 0.05). De staafjes op de kolommen geven de standaardafwijking van het gemiddelde. Het aantal overgebleven volken is per kolom vermeld.

Resultaat statistische analyse
30 mei, P = 0.75; 29 juli, P = 0.12; 5 september, P = 0.008



figuur 3. "Predicted" gemiddelde hoeveelheid totaal hemolymfeiwit op 30 mei en 5 september 2011 in de volken blootgesteld aan imidacloprid en de controlevolken. De sterren geven de verschillen tussen de behandelgroepen (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001). De staafjes op de kolommen geven de standaardafwijking van het gemiddelde. Het aantal overgebleven volken is per kolom vermeld.

Resultaat statistische analyse
30 mei, P = 0.34; 5 september, P = 0.85

Tabel 3. De gemiddelde "predicted" fracties vitellogenine (se) op 31 mei en 6 september 2011 en de testresultaten van de 2x2 ANOVA

datum	imida-cloprid	gem. fractie vitellogenine (s.e.)	n volken	P
31 mei 2011	ja	0.327 (0.016)	13+13	0.5
	nee	0.312 (0.016)	13+13	1
6 sept 2011	ja	0.227 (0.023)	8+12	0.3
	nee	0.259 (0.023)	7+13	8

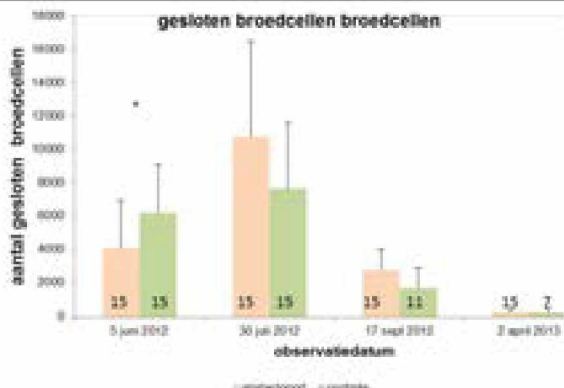
Bijenbrood.

Het gemiddeld aantal bijenbroodcellen was in de volken, blootgesteld aan imidacloprid en de controlevolken niet significant verschillend. De aantal varieerden van gemiddeld 2153 cellen in beide groepen begin juli tot 544 eind juli en bij de inwintering was het gemiddeld aantal bijenbroodcellen per volk 1140.

Studie I. Bijen, broed, bijenbrood, totaal hemolymfeiwit en fractie vitellogenine

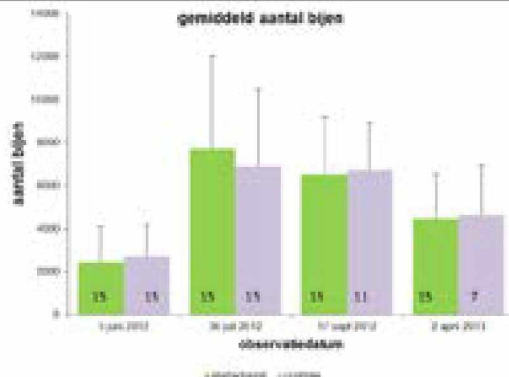
Er is een imidacloprid-effect op het broed. Acht weken na aanvang van de blootstelling is er een significante reductie van het aantal gesloten broedcellen. Dit heeft gevolgen voor het aantal bijen dat vijf weken daarna significant lager is. Het effect op het broed is tijdelijk; bij de inwintering was er geen verschil meer tussen het aantal broedcellen in de behandelde volken en de controle volken. Er is geen direct effect van imidacloprid op het aantal bijen. Of de afname van het broed het resultaat is van afname van de cohort voedsterbijen (10- 20 dagen oude bijen) of een directe mortaliteit van het broed is met de uitgevoerde proefopzet niet vast te stellen. Gezien het herstel van het aantal gesloten broedcellen tot het niveau van de controlevolken zou het mogelijke geweest kunnen zijn dat in eerste instantie het aantal voedsterbijen minder actief is en dat, door de plasticiteit van broedzorg in het bijenvolk, later een evenwicht ontstaat tussen hoeveelheid bijen en broed. Er is geen effect van imidacloprid op de hoeveelheid bijenbrood wat laat zien dat het stuifmeel foerageren niet beïnvloed is door de blootstelling aan imidacloprid. De blootstelling aan imidacloprid had geen gevolgen voor het totaal hemolymfeiwit en de vitellogeninesynthese. De transitie van zomer- naar wintervolk waarbij het broed afneemt en het hemolymfeiwit en fractie vitellogenine toeneemt, is in september 2011 nog niet voltooid; er is in verhouding nog veel broed en het hemolymfeiwit en fractie vitellogenine zijn nog op het zomerniveau. Het is dan ook, op basis van deze gegevens, niet mogelijk een uitspraak te doen over de invloed van imidacloprid op de transitie van zomer- naar wintervolk.

Studie II (2012 – 2013)



figuur 4. Gemiddeld aantal gesloten broedcellen op 5 juni, 30 juli, en 17 september 2012 en 2 april 2013 in de volken blootgesteld aan imidacloprid en de controlevolken. De sterren geven de verschillen tussen de behandelgroepen (* P < 0.05). De staafjes op de kolommen geven de standaardafwijking. Het aantal overgebleven volken is per kolom vermeld.

Resultaat statistische analyse
5 juni, P = 0.05; 30 juli, P = 0.09; 17 september, P = 0.16 (Kruskal-Wallis P = 0.04); 2 april 2013, P = 0.66



figuur 5. Gemiddeld aantal bijen op 5 juni, 30 juli, en 17 september 2012 en 2 april 2013 in de volken blootgesteld aan imidacloprid en de controlevolken. De staafjes op de kolommen geven de standaardafwijking. Het aantal overgebleven volken is per kolom vermeld.

Resultaat statistische analyse
5 juni, P = 0.84; 30 juli, P = 0.58; 17 september, P = 0.80; 2 april 2013, P = 0.85



figuur 6. Gemiddeld hemolymfeiwit op 6 juni, 30 juli, en 18 september 2012 in de volken blootgesteld aan imidacloprid en de controlevolken. De staafjes op de kolommen geven de standaardafwijking. Het aantal overgebleven volken is per kolom vermeld.

Resultaat statistische analyse
6 juni, P = 0.33; 18 september, P = 0.34

tabel 4. Gemiddelde fracties vitellogenine (se) op 6 juni en 18 september 2012 en de resultaten van de GLM

datum	Imidacloprid	gem fractie vitellogenine	n volken	P
6 juni 2012	ja	0.29 (0.07)	14	0.0
	nee	0.25 (0.07)	15	9
18 sept 2012	ja	0.42 (0.06)	15	0.3
	nee	0.44 (0.06)	10	6



figuur 7. Gemiddeld aantal ramen bijen in de volken blootgesteld aan imidacloprid en de controlevolken. De staafjes op de kolommen geven de standaardafwijking. Het aantal overgebleven volken is per kolom vermeld.

Resultaat statistische analyse

8 juni, $P = 0.68$; 2 juli, $P = 0.10$; 31 juli, $P = 0.12$; 28 augustus, $P = 0.74$; 17 september, $P = 0.81$; 17 december, $P = 0.85$; 2 april 2013, $P = 0.84$

Bijenbrood: Het gemiddeld aantal bijenbroodcellen was in de volken, blootgesteld aan imidacloprid en de controlevolken niet significant verschillend. De aantal varieerden van gemiddeld 50 cellen in beide groepen begin juli tot 530 eind september

Zwermcellen

Tabel 5. Het aantal zwermcellen / doppen in de behandelingsvolken en volken die met Imidacloprid gevoerd werden op 6 juni, 2 juli en 31 juli en de resultaten van de statistische analyse (Fisher Exact test $P < 0.05$)

datum	behandeling	Aantal volken met zwermcellen	n volken	P
6 juni 2012	controle	31	60	0.36
	imidacloprid	28	60	
2 juli. 2012	controle	14	60	0.04
	imidacloprid	6	60	
31 juli. 2012	controle	10	58	0.02
	imidacloprid	2	60	

Studie II. Bijen, broed, bijenbrood, totaal hemolymfeiwit en fractie vitellogenine

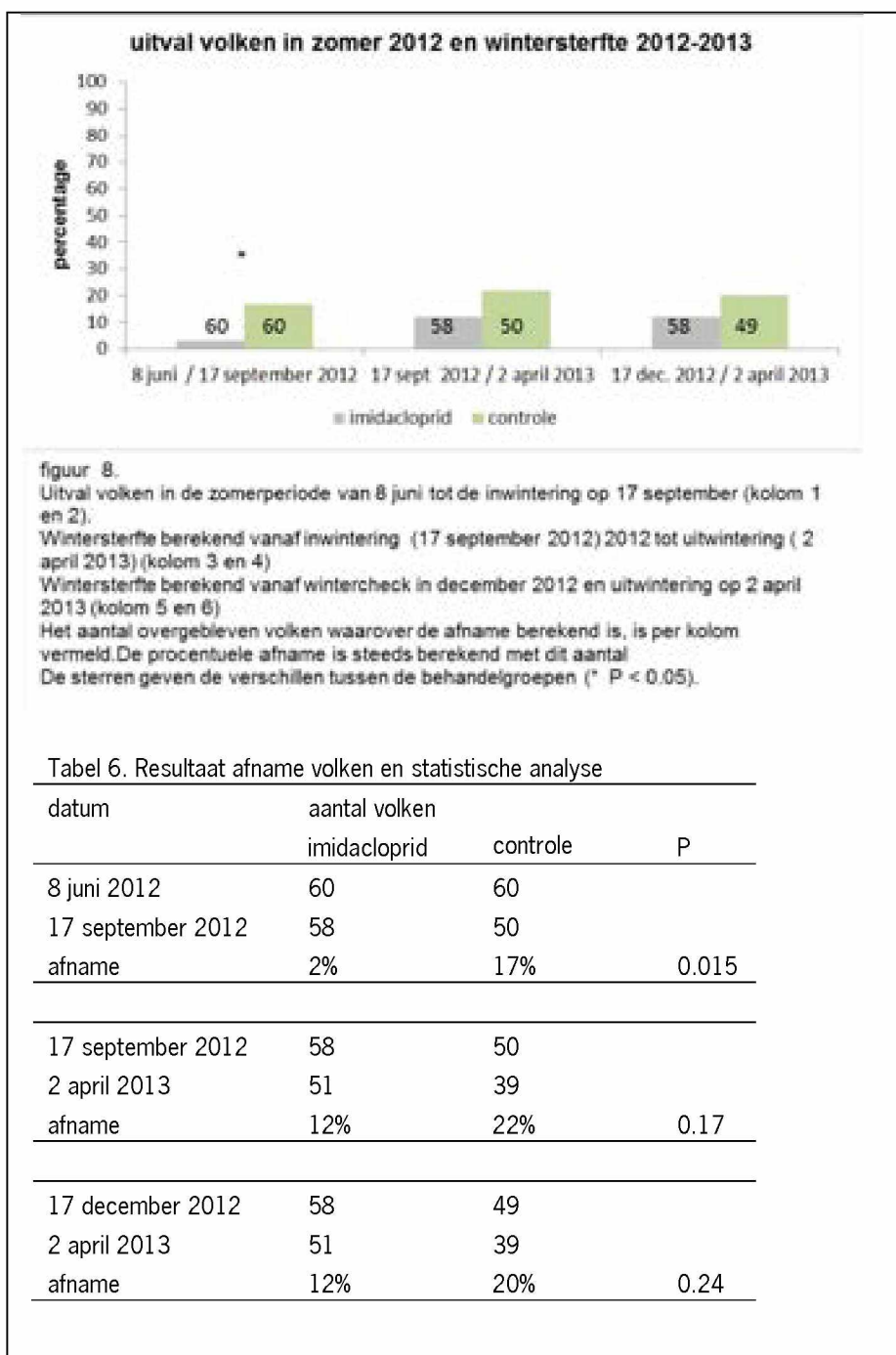
In studie II is, in tegenstelling tot studie I geen imidacloprid-effect op broed vastgesteld. Ook is geen effect van imidacloprid op het aantal bijen. Er is geen effect van imidacloprid op de hoeveelheid bijenbrood wat laat zien dat het stuifmeel foerageren niet beïnvloed is door de blootstelling aan imidacloprid. De blootstelling aan imidacloprid had geen gevolgen voor het totaal hemolymfeiwit en de vitellogeninesynthese. In 2012 waren de volken half september duidelijk in transitie van zomer- naar wintervolk. Het broed was afgenomen en het hemolymfeiwit en fractie vitellogenine waren toegenomen. Dit is het normale beeld en was niet beïnvloed door de blootstelling aan imidacloprid.

4.3 Invloed van imidacloprid op zwermcellen

Deze parameter is bepaald in studie II en niet in studie I. De zwermneiging, gemeten als aantal zwermcellen was in de controlevolken sterker dan in de imidaclopridvolken. Bij aanvang was er nog geen verschil en vertoonden beide groepen een sterke zwermneiging. Op 2 juli en 31 juli 2012 was er een significant verschil en vertoonden de imidacloprid volken veel minder zwermneiging dan de controlevolken. Hierdoor zijn er in de zomerperiode meer volken uitgevallen uit de controlegroep dan uit de groep bijenvolken die blootgesteld waren aan imidacloprid. Dit is het resultaat van de (stille) moerswisseling en zwermneiging die in de controlegroep sterker was dan in de imidacloprid groep. Het 2 x per week aanbieden van een vloeibare suikeroplossing is een vorm van drijfvoeren wat de broedaanzet maar ook de zwermneiging stimuleert. Dit was in de controlegroep sterker dan in de imidaclopridgroep wat laat zien dat er een remmend effect is geweest van imidacloprid op de ontwikkeling van de bijenvolken zoals in 2011 vastgesteld is. Mogelijk hebben twee verschillende effecten tot hetzelfde resultaat geleid, in de controlevolken minder broedaanzet door de sterke zwermneigingen en in de Imidaclopridvolken minder broed door imidacloprid.

4.4 Imidacloprid en wintersterfte (studie II)

Imidacloprid heeft geen effect op de wintersterfte.

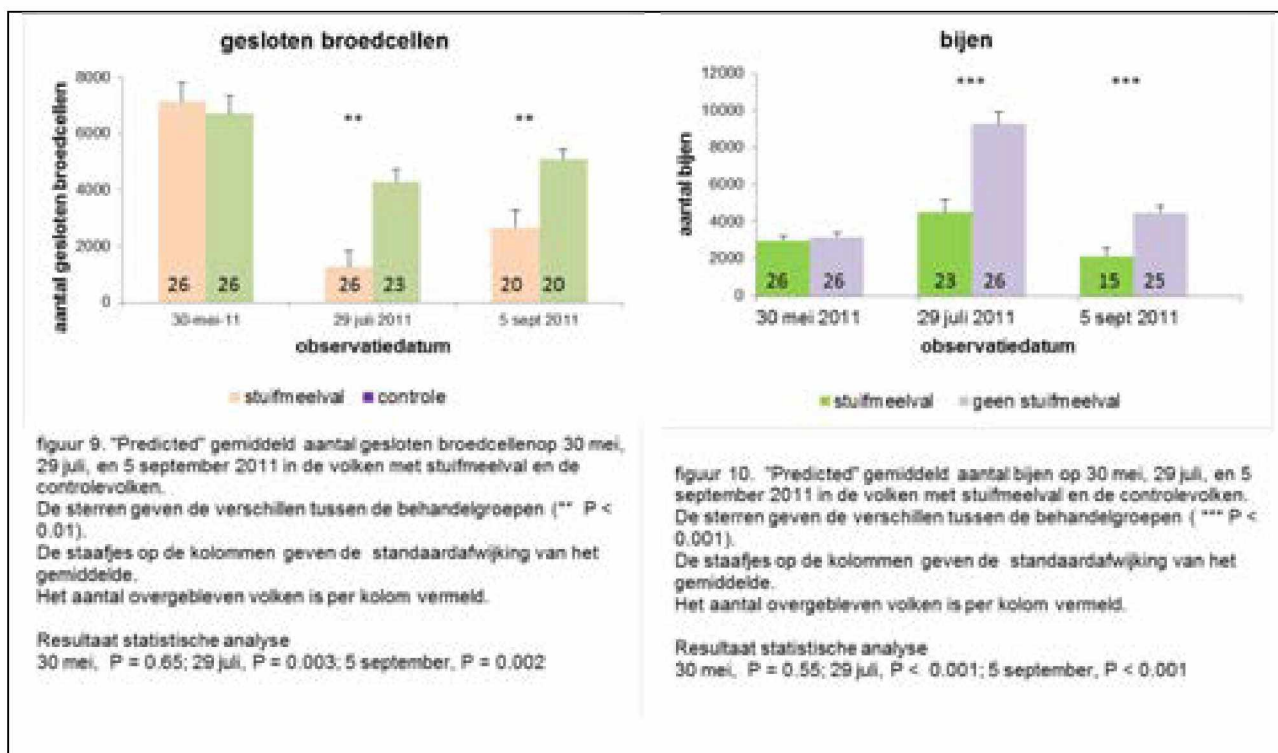


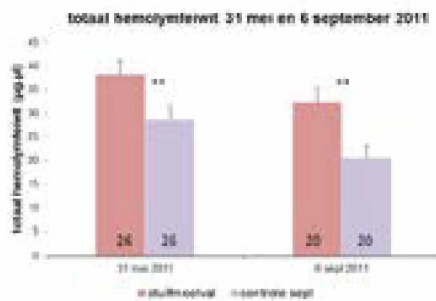
Vanwege de verhoogde uitval van controlevolken is de overleving in de zomerperiode van de imidaclopridvolken significant hoger dan bij de controlevolken. Dit is toe te schrijven aan de verhoogde zwermduft, zwermen en (stille) moerswisselingen in de controlevolken. In de winterperiode is er geen verschil in wintersterfte tussen de controlevolken en de imidaclopridvolken.

4.5 Gereduceerde stuifmeelaanvoer en vitaliteit (studie I)

Samenvatting

Een gereduceerde stuifmeelaanvoer heeft een aantoonbaar negatief effect op de ontwikkeling van de bijenvolken; de hoeveelheid broed, gemeten als gesloten broed, en als gevolg hiervan het aantal bijen worden gereduceerd. Gereduceerd stuifmeelaanvoer heeft geen negatief effect op de hoeveelheid hemolymfeiwit en fractie vitellogenine; de hoeveelheid broed wordt aangepast aan het beschikbare voer.





figuur 11. "Predicted" gemiddelde hoeveelheid totaal hemolymfeiwit op 31 mei en 6 september 2011 in de met stofmeelval en de controlevolken. De sterren geven de verschillen tussen de behandelingsgroepen (** $P < 0.01$). De staafjes op de kolommen geven de standaardafwijking van het gemiddelde. Het aantal overgebleven volken is per kolom vermeld.

Resultaat statistische analyse
31 mei, $P = 0.03$; 6 september, $P = 0.005$

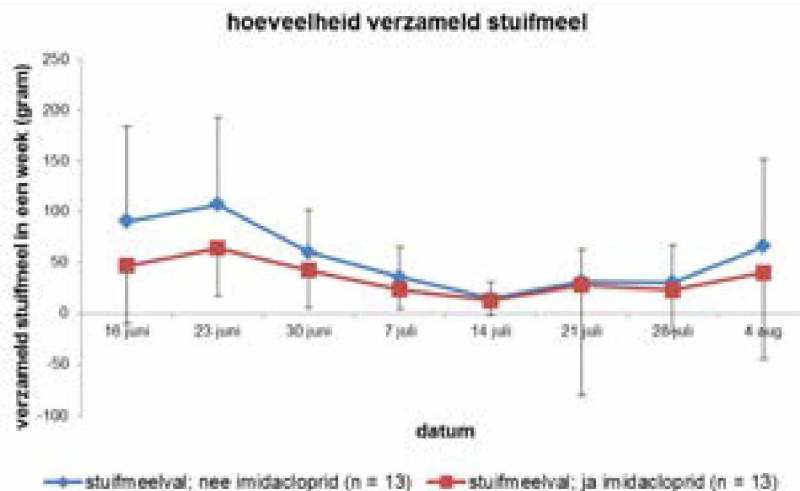
Tabel 7. De gemiddelde "predicted" fracties vitellogenine (se) op 31 mei en 6 september 2011 en de testresultaten van de 2x2 ANOVA

datum	imida- cloprid	gem. fractie vitellogeni ne (s.e.)	n volken	P
31 mei 2011	ja	0.328 (0.016)	13+13	0.4 0
	nee	0.310 (0.016)	13+13	
6 sept 2011	ja	0.268 (0.028)	8+12	0.2 8
	nee	0.228 (0.021)	7+13	

Bijenbrood.

Het gemiddeld aantal bijenbroodcellen was in de volken, met de stofmeelval en de controlevolken begin juli (763 met stofmeelval en 3543 in controlevolken ($P = 0.018$) en half augustus (338 met stofmeelval en 680 in controlevolken, $P = 0.04$) significant verschillend. Op de andere observatiedatums was er geen verschil.

Verzameld stofmeel



figuur 12. Hoeveelheid verzameld stofmeel

Er is geen statistisch verschil als resultaat van imidacloprid op de hoeveelheid verzameld stofmeel. (imidacloprid $F_{1,3} = 0.02$, $P = 0.89$) of in de tijd ($F_{8,132} = 1.15$, $P = 0.30$ G-G Epsilon = 0.148) of in de interactie imidacloprid*tijd (imidacloprid*tijd $F_{8,132} = 1.15$, $P = 0.30$, Epsilon = 0.148).

4.5.1 Gereduceerde stuifmeelaanvoer

Het plaatsen van de stuifmeelval gedurende de periode 14 juni tot 4 augustus 2011 heeft een significant negatief effect op de broedaanzet, en als resultaat hiervan ook op het aantal bijen. Het hemolymfeiwit is in de volken met de stuifmeelval significant hoger. Er is van nature een direct verband tussen hemolymfeiwit en hoeveelheid broed: hoe meer broed, hoe minder hemolymfeiwit. Dit is ook hier het geval. De stuifmeelval heeft geen effect op de fractie vitellogenine, met andere woorden een gereduceerde stuifmeelaanvoer heeft geen effect op de vitellogeninesynthese. Aan de ene kant heeft het afvangen van stuifmeel een stimulerend effect op het halen van stuifmeel door de bijenvolken en aan de andere kant heeft een volk met minder broed, minder behoefte aan stuifmeel (Free, 1967; Brodschneider & Crailsheim, 2010). De combinatie van beide bekende fenomenen kan ertoe geleid hebben dat er half juli en half augustus wel een aantoonbaar verschil was en op andere observatiemomenten niet. Ondanks het feit dat de volken met de stuifmeelval aantoonbaar kleiner waren verzamelden ze evenveel stuifmeel, gemeten als gewicht stuifmeel in de stuifmeelval. Dit is het resultaat van de stimulering van het stuifmeel halen door de stuifmeelval.

De vitaliteitsparameters broed en bijen laten duidelijk zien dat er een significant negatief effect is op de ontwikkeling van de bijenvolk als gevolg van de gereduceerde stuifmeelaanvoer. Gezien de late transitie van zomer- naar wintervolk was het effect hiervan van de stuifmeelval niet meetbaar in september.

4.6 Interactie imidacloprid / gereduceerde stuifmeelaanvoer (Studie I)

Samenvatting

Er is geen interactie effect tussen imidacloprid en gereduceerde stuifmeelaanvoer op het aantal gesloten broedcellen, aantal bijen, aantal cellen bijenbrood en fractie vitellogenine.

datum	interactie	P
30 mei 2011		0.51
29 juli 2011	aantal gesloten broedcellen	0.36
5 september 2011		0.95
30 mei 2011		0.72
29 juli 2011	aantal bijen	0.10
5 september 2011		0.20
30 mei 2011		0.87
14 juni 2011		0.23
5 juli 2011		0.85
29 juli 2011	aantal cellen bijenbrood	0.29
16 augustus 2011		0.59
5 september 2011		0.32
31 mei 2011		0.51
6 september 2011	hemolymfeiwit	0.002
31 mei 2011		0.90
6 september 2011	fractie vitellogenine	0.27

Er is geen interactie tussen imidacloprid en gereduceerde stuifmeelaanvoer. Alleen aan het eind van de blootstellingsperiode aan imidacloprid is er wel een interactie effect vastgesteld voor het hemolymfiewit. Deze kan toegeschreven worden aan de significant verhoogde hoeveelheid hemolymfiewit in de volken met de stuifmeelval (zie vitaliteit en gereduceerd stuifmeelaanvoer).

4.7 4.7. Imidacloprid en pathogenen

Samenvatting

In beide studies is geen effect van imidacloprid op de prevalentie van *Nosema ceranae*, DWV en ABPV gevonden. De pathogenen kwamen steeds in ongeveer even veel volken in de aan imidacloprid blootgestelde volken als controlevolken voor.

De verschillen in pathogeenbelasting zijn, indien er sprake was van verschil in het wel of niet voorkomen van een pathogeen, waren niet significant

In studie I, was er in mei geen verschil in DWV belasting ($P = 0.13$); in september was er geen verschil in *Nosema ceranae* belasting ($P = 0.85$) en DWV ($P = 0.25$).

In studie II, was er in mei geen verschil in DWV belasting ($P = 0.68$); in september was er geen verschil in *Nosema ceranae* belasting ($P = 0.86$) en DWV ($P = 0.16$).

Tabel 13: Resultaat van de prevalentie bepaald met de Taqman PCR moleculair detectie van Nosema ceranae, Nosema apis, DWV en ABPV in mei en september 2011 en juni en september 2012. Per pathogeen is het aantal volken gegeven waarin de pathogeen gedetecteerd is (ja/nee).

Datum (aantal geteste volken)	<i>Nosema ceranae</i>		<i>Nosema apis</i>		DWV		ABPV	
	Ja	nee	ja	nee	ja	nee	ja	nee
2011								
Mei (52)	52	0	0	52	27	25	0	52
Sept (39)	36	3	0	39	9	30	0	39
2012								
Juni (30)	30	0	0	30	25	5		
Sept (26)	25	1	0	26	15	11		

Nosema ceranae komt in praktisch alle volken voor, zowel in het voor- als in het najaar. DWV vertoont een wisselender beeld en komt in ongeveer de helft tot een vijfde van de volken voor. *Nosema apis* is in de volken niet gedetecteerd.

Dankwoord

De auteurs ^{5.1.2.e} en ^{5.1.2.e} (WUR Biometris) voor de hulp bij de statistische analyse van de data.

Bijlage 1

4.8 Materiaal en methode

Materiaal

Studie I en II

- Studie I 4 x 13 bijenvolken (*Apis mellifera*)
- Studie II 2 X 60 bijenvolken (*Apis mellifera*)
- Studie I en II Imidacloprid (Technical 99.4%, NTN 33893), Bayer Crop Science, Batch code: EDFL 011347*20
- Studie I stuifmeelvalen
- Studie I en II Bijenstand Droevendaal Wageningen

Methode

Opzet Studie I

Het onderzoek met de blootstelling aan imidacloprid in combinatie met een gereduceerd stuifmeelaanvoer is uitgevoerd in een 2 x 2 opzet (vier combinatiebehandelingen). Het onderzoek is in mei 2011 gestart met 13 volken met stuifmeelval en geen imidacloprid, 13 volken met stuifmeelval en wel imidacloprid, 13 volken zonder stuifmeelval en geen imidacloprid en 13 volken zonder stuifmeelval en imidacloprid.

Opzet studie II

Deze studie is opgezet met een variabele: blootstelling aan imidacloprid. Voorafgaand aan het onderzoek zijn de 120 volken ad random verdeeld over de twee behandelingen.

Detailanalyses studie I en II

De detailanalyses waren voor de beschrijving van de ontwikkeling van de volken en de transitie naar wintervolk waren aantal bijen, aantal cellen gesloten broed, aantal cellen bijenbrood, totaal hemolymf eiwit, fractie vitellogenine, pathogeen belasting (prevalentie van DWV en *Nosema apis* en *Nosema ceranae*), residubelasting van imidacloprid en de metabolieten, de Varroaciden Coumaphos, tau-Fluvalinaat en Amitraz en andere bestrijdingsmiddelen Acetamiprid, Clothianidin, Fipronil, Piperonyl-butoxide, Propiconazole, Thiacloprid, Thiamethoxam.

In studie I zijn van alle volken detailanalyses uitgevoerd. In studie II zijn voorafgaand aan het onderzoek ad random 15 volken uit de beide behandelingsgroepen geselecteerd voor de detailanalyses.

De monsternames en beschrijvingen van het volk (fotoanalyses en visuele checks voor de detailanalyses) zijn uitgevoerd volgens onderstaand schema.

Schema monstername datums tbv van detailanalyses

Parameter	Studie I. 2011 Monstername / observatie	Studie II. 2012 Monstername / observatie
Hemolymf vitellogenine ¹	31 mei en 6 september 2011	5 juni en 18 september 2012
# Bijen ²	30 mei, 29 juli, 5 september 2011 en 22 maart 2012	5 juni, 30 juli, 17 en 18 september 2012 en 2 april 2013
# Gesloten broed ²	30 mei, 29 juli, 5 september 2011 en 22 maart 2012	5 juni, 30 juli, 17 en 18 september 2012 en 2 april 2013
Bijenbrood ²	30 mei, 14 juni, 5 juli, 29 juli, 16 augustus en 5 september 2011	5 juni, 30 juli en 17 september 2012
DWV, en Nosema spp ³	31 mei en 6 september 2011	5 juni en 18 september 2012
Varroa destructor ³	31 mei en 6 september 2011	5 juni en 18 september 2012
Residu-analyse van imidacloprid en de metaboliëten ⁴	31 mei en 6 september 2011	5 juni en 18 september 2012
Ramen bijen en prevalentie zwermcellen ⁵		8 juni, 2 juli, 30 juli, 18 september, 5 november, 17 december 2012 en 2 april 2013.

1. Monstername hemolymfe van bijen van buitenste broedraam
2. Foto
3. Monster van bijen van buitenste broedraam
4. Monster van bijen (zie 3), opgeslagen honing en opgeslagen bijenbrood
5. Visuele check

De monsters zijn tot analyse bewaard bij -20°C.

Reductie stuifmeelaanvoer studie I

De aanvoer van stuifmeel is gereduceerd door voor de bijenvolken een stuifmeelval te plaatsen. In een stuifmeelval worden de bijen gedwongen door een rooster te kruipen om zo in de kast te komen. Bij de passage van het rooster verliest een bij ongeveer 10 - 50% van het stuifmeel uit de corbicula. Een stuifmeelval is actief wanneer het rooster voor de ingang geschoven wordt en niet actief wanneer er geen rooster in de stuifmeelval geplaatst wordt.

Jaar / studie	Activering stuifmeelval	Verwijdering stuifmeelval
2011 / studie	14 juni 2011	4 augustus 2011

Blootstelling aan imidacloprid via suikeroplossing 50%. Studie I en II

De bijenvolken werden 2 x per week gevoerd met 330 ml suikeroplossing (50% suiker) met 5 ppb imidacloprid. Dit komt overeen met 800 gram suikerwater met 5 ppb imidacloprid per week per volk. De controle volken werden simultaan gevoerd met 3 x 330 ml suikerwater per week.

Jaar / studie	Aanvang blootstelling via suikerwater	Einde blootstelling via suikerwater
2011 / studie I	14 juni 2011	1 september 2011
2012 / studie II	11 juni 2012	30 augustus 2012

Vorbereitung voor de winter en de varroabehandeling studie I

Van 4 augustus tot 13 september 2011 zijn alle volken voorzien van suikerdeeg (75% invertsuiker). Vanaf 13 september zijn alle volken ingewinterd.

De varroabehandeling met Apistanstrips is gestart op 12 oktober en beëindigd op 24 november. De varroabestrijding is uitgesteld van juli (het 'normale' tijdstip voor behandelen) naar oktober om eventuele interferentie met de imidaclopridblootstelling te voorkomen.

Vorbereitung voor de winter en de varroabehandeling Studie II

Alle volken hadden, gedurende de gehele testperiode tot inwintering ad libitum toegang tot invertsuikerdeeg. Vanaf 18 september zijn alle volken ingewinterd.

De varroa behandeling met Thymovar (2 x 3 weken) is gestart op 30 juli en beëindigd op 10 september 2012. Op 17 december zijn de volken behandeld met oxaalzuur 3% (druppelmethode).

Parameters en uitvoering analyses, studie I en II

Aantal bijen (fotoanalyse)

Deze parameter is een maat voor volksgrootte en verloop van de volksgrootte in het seizoen en na de uitwintering.

Uitvoering: Per volk werden alle raten met bijen gefotografeerd. De foto's zijn geanalyseerd met het computerprogramma Image J. Hierbij wordt het oppervlakte bijen bepaald. Het aantal bijen is berekend door de cm² bijen te vermenigvuldigen met 1,25 (Delaplane et al., 2013).

Aantal cellen gesloten broed (fotoanalyse)

Deze parameter geeft informatie over de broedactiviteit.

Uitvoering: Per volk werden alle raten met gesloten broedcellen gefotografeerd. De foto's zijn geanalyseerd met het computerprogramma Image J. Hierbij is het oppervlakte gesloten broed bepaald. Het aantal gesloten broedcellen is bepaald door de cm² broed te vermenigvuldigen met 4 (Delaplane et al., 2013).

Aantal cellen bijenbrood (fotoanalyse)

Deze parameter geeft informatie over de foerageeractiviteit van het bijenvolk.

Uitvoering: Per volk werden alle raten met bijenbrood gefotografeerd. De foto's zijn geanalyseerd met het computerprogramma Image J. Hierbij is het oppervlakte bijenbrood bepaald. Het aantal bijenbroodcellen is bepaald door de cm² bijenbroodcellen te vermenigvuldigen met 4.

Hemolymfe totaal eiwit en fractie vitellogenine

De parameter totaal hemolymfe eiwit geeft informatie over de voedingstoestand (eiwit) van de bijen en een mogelijke impact van de behandelingen op de totale eiwitsynthese. De parameter "fractie vitellogenine" geeft informatie over de impact van de behandelingen op de vitellogeninesynthese en laat het percentage vitellogenine van het totaal hemolymfe zien.

Uitvoering: Per volk werd een monster van minimaal 25 (studie I, 2011), 30 (studie II, 2012) bijen genomen van de buitenste broedraat. Van 30 bijen is direct het hemolymf (2 µl) afgenomen, gepoold en ingevroren bij -20 °C. Dit poolde monster werd beschouwd als representatief voor het bijenvolk. Het totaal eiwit en vitellogenine zijn elektroforetisch bepaald met SDS/Page (7,5% acrylamide precasted acrylamide-gels (GE Healthcare) volgens Laemmli (1970)). Phastsystem protein electrophoresis equipment (Pharmacia) wordt toegepast om de eiwitten in het hemolymf te scheiden. B-galactosidase (Sigma) wordt toegepast als de interne concentratie marker. De gels zijn gekleurd met Commassie Brilliant Blue en imaged met Octopus F(Progress Control) en vervolgens geanalyseerd met Phoretix 1D advanced v5.2 (Nonlinear Dynamics Ltd.).

Virussen, Nosema ceranae en N. apis

Deze parameter geeft informatie over de ziektebelasting en de mogelijke impact van de behandelingen op de pathogenen.

Uitvoering: De prevalentie van de virussen DWV en ABPV (alleen in studie I, 2011), en de Microsporidiae *Nosema apis* en *Nosema ceranae* zijn bepaald met Taqman PCR moleculaire detectie in pooled monsters van 30 bijen van het buitenste broedraam. De gepoolde monsters werden bewaard bij -80°C, waarna ze in een mortier met behulp van vloeibare stikstof werden verpulverd. Een mengmonster van 10 tot 20 mg werd vervolgens gebruikt voor extractie van DNA en RNA (Masterpure complete DNA and RNA purification kit, MC85200 Epicentre, BiozymTC). Een real time PCR protocol werd gebruikt om de aanwezigheid van de doelorganismen aan te tonen. Als positieve controle van de extractie-efficiëntie werd een huishoudgen (β -actin) gebruikt. CT-waarden <35 werden voor de nosema-soorten en DWV als positief beoordeeld. De testen zijn kwalitatief uitgevoerd (prevalent /niet prevalent).

Residu-analyse van imidacloprid en de metabolieten

De residuen van imidacloprid en metabolieten zijn bepaald door het RIKILT. De analyse is uitgevoerd conform de werkwijze zoals beschreven in SOP A1165. Hierin wordt de opwerking volgens de z.g. Quechers methode (extractie met acetonitril en fasescheiding) beschreven en wordt de meting m.b.v. LC-MSMS beschreven. SOP A1165 is een intern werkvoorschrift en komt overeen met de methode zoals beschreven in LEHOTAY ET AL.: JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL VOL. 88, NO. 2, 2005. Deze methode is ook getest voor de polaire metabolieten van imidacloprid. De Quechers methode wordt al jaren met goede resultaten toegepast in de analyse van bestrijdingsmiddelen in groente, fruit, grond, vegetatie en bijen. De kwantitatieve analyses van bijen en honing is uitgevoerd op basis van matrix matched calibration en voldeden aan kwaliteitseisen (zowel m.b.t. identiteit als kwantificering) zoals gesteld in SANCO/12495/2011: METHOD VALIDATION AND QUALITY CONTROL PROCEDURES FOR PESTICIDE RESIDUES ANALYSIS IN FOOD AND FEED. De kwantitatieve analyse van bijenbrood is uitgevoerd volgens een standaard additie protocol en voldeed eveneens aan eisen zoals gesteld in SANCO/12495/2011.

Het onderzoeksmateriaal is bewaard bij -20° C tot analyse om de enzymatische processen die resulteren in afbraak van bestrijdingsmiddelen en die ook na de dood van bijen nog doorgaan te stoppen.

Imidacloprid in de bijen, honing en bijenbrood

Voor de blootstelling aan imidacloprid in mei 2011 en in juni 2012 en na afloop van de blootstelling eind augustus 2011 en begin september 2012 zijn de bijen, de honing en bijenbrood geanalyseerd op imidacloprid (LOQ 0.5 ppb in honing en 1 ppb in bijen en bijenbrood) en de metabolieten, imidacloprid_5-OH (LOQ 5 ppb voor bijen, honing en bijenbrood), imidacloprid-desnitro (LOQ 0.5 ppb honing en 1 ppb bijen en bijenbrood), imidacloprid-desnitro-olefin (LOQ 0.5 ppb honing en 1 ppb bijen en bijenbrood), imidacloprid-olefin (LOQ 5 ppb bijen, honing en bijenbrood) en imidacloprid-urea (LOQ 0.5 ppb*) en 6-chloronicotinic-acid (LOQ 10 ppb bijen, honing en bijenbrood).

Varroaciden en insecticiden (behalve imidacloprid)

Bijen, honing en bijenbrood werden voor en na de blootstelling aan imidacloprid ook geanalyseerd op de varroaciden, (inclusief de metabolieten) Coumaphos (LOQ 2 ppb bijen, honing en bijenbrood), tau-Fluvalinaat (LOQ 10 ppb bijen, honing en bijenbrood) en Amitraz-DMA (LOQ 25 ppb bijen, honing en bijenbrood), Amitraz-DMF (LOQ 5 ppb bijen, honing en bijenbrood), Amitraz-DMPF (LOQ 5 ppb bijen, honing en bijenbrood) en de insecticiden (inclusief de metabolieten) Acetamiprid (LOQ 0.5 PPB honing en 1 ppb bijen en bijenbrood), Clothianidin (LOQ 2 ppb bijen, honing en bijenbrood), Fipronil, Fipronil-carboxamide, Fipronil-desulfinyl, Fipronil-sulfide, Fipronil-sulfone (LOQ Fipronil en metabolieten 0.5 ppb honing en 1 ppb bijen en bijenbrood), Piperonyl-butoxide (LOQ 0.5 ppb honing en 1 ppb bijen en bijenbrood), Propiconazole (LOQ 5 ppb bijen, honing en bijenbrood), Thiacloprid (LOQ 1 ppb bijen, honing en bijenbrood), Thiamethoxam (LOQ 2 ppb bijen, honing en bijenbrood) en Triflumizole (LOQ 1 ppb bijen, honing en bijenbrood).

Hoeveelheid verzameld stuifmeel, studie I

Deze parameter geeft informatie over de continuïteit van de stuifmeel dracht

Uitvoering: Het stuifmeel van de volken met een geactiveerde stuifmeelval werd verzameld uit de stuifmeelvallen en gewogen.

Aantal bezette ramen en voorkomen van zwermcellen Studie II

In de maanden juni, juli, september, december 2012 en april 2013 zijn alle volken gecontroleerd op doppen en aanwezigheid van broed en is het aantal bezette ramen genoteerd. Dit is uitgevoerd door alle ramen bezet met bijen te tellen en het broednest te controleren. Van de volken waarbij de detailanalyses uitgevoerd werden is het aantal bezette ramen bepaald aan de hand van de foto's. In afwijking van het protocol is in augustus het aantal ramen bijen niet genoteerd.

Deze check is in 2011 (Studie I) niet uitgevoerd.

Uitwintering

Deze parameter geeft informatie over de winteroverleving

In september, december 2012 en april 2013 zijn de volken gecontroleerd.

Statistiek

In beide studies zijn de statistische analyses uitgevoerd met de overgebleven volken op de monster- / observatiedatum. De analyses met alleen de overgebleven volken resulteerden niet in afwijkende uitkomsten.

Studie I

De effecten van stuifmeelval (ja/nee), imidacloprid (ja/nee) en de interactie tussen stuifmeelval en imidacloprid zijn bepaald op aantal bijen, gesloten broed, bijenbrood, hemolymfeiwit en vitellogenine van de volken tot uitval. De toetsen zijn gedaan met een 2 x 2 ANOVA (GLM Genstat 14^e ed.). De datareeksen waren normaal verdeeld.

Verschillen in pathogeenbelasting zijn bepaald met de binomiale test.

Effecten van tijd en imidacloprid behandeling op de verzamelde hoeveelheid stuifmeel in de stuifmeelvallen zijn bepaald met de Repeated Measurements Analysis of Variance. (correctie sphericiteit: Greenhouse-Geisser Epsilon)(Genstat 14^e ed.).

Studie II

Het effect van imidacloprid is bepaald op het gemiddeld aantal bijen, aantal cellen gesloten broed, aantal cellen bijenbrood en fractie vitellogenine met de data van de overgebleven volken. De gegevens zijn geanalyseerd van alle volken tot uitval. De toetsen zijn gedaan met GLM. De data waren normaal verdeeld. Het verschil in zwermcellen tussen de behandelingen is getoetst met de Fisher Exact Test. Verschillen in pathogeenbelasting zijn bepaald met de binomiale test.

De afname van het aantal volken over de gehele proefperiode en winterperiode is statistisch geanalyseerd met de Survival analysis, binomial test.

Aantal volken per behandeling: (Genstat, t test, sample size)

Het aantal volken per behandeling (herhalingen) is bepaald aan de hand van de variatie en het te detecteren verschil.

Schema aantal herhalingen / volken

Parameter	Te detecteren verschil	Aantal herhalingen = bijenvolken
bijen	1500	8
bijen	2000	7
broed	1000	14
broed	1500	7
Totaal hemolymfeiwit	0.4 µg/µl	4
Fractie vitellogenine	0.04	7
Fractie vitellogenine	0.05	5
Residu imidacloprid	1 ppb (LOQ)	5
Residu imidacloprid	0.6 ppb (sd)	10

Met een proefopzet met 10 volken per groep kunnen hiermee relevante verschillen gedetecteerd worden tussen de behandeling qua bijen, broed en fractie vitellogenine en residu van imidacloprid. Om het onderscheidend vermogen op basis van de grootte van de onderzoeksgroepen ook nog hoog te houden mocht er onverhoopt een volk uitvallen, bevat elke groep 13 bijenvolken (studie I 2011) of 15 volken (studie II 2012).

Bijenvolken in de zomerperiode 2012 en wintersterfte 2012-2013

De groeps grootte van beide behandelingsgroepen van 2 x 60 volken, bij aanvang van het onderzoek is gebaseerd op een te detecteren verschil in wintersterfte van 10 tot 15%. Op basis van een steekproefgrootte bij vergelijking van 2 (of meer) behandelingen waarbij de waarneming binomiaal verdeeld is resulteert dit in de volgende groeps groottes:

(verschil p_2-p_1) = 0.15, $P = 0.05$, power = 0.80, **n volken 58**

(verschil p_2-p_1) = 0.15, $P = 0.05$, power = 0.70, **n volken 44**

(verschil p_2-p_1) = 0.10, $P = 0.05$, power = 0.60, **n volken 64**

(verschil p_2-p_1) = 0.10, $P = 0.05$, power = 0.50, **n volken 48**

Bijlage 2

Concentraties imidacloprid in de voeroplossingen.

Hoeveelheid gevoerde imidacloprid (ppb). Analyse gevoerde imidacloprid oplossing .

Voeroplossingen 2011	conc. imidacloprid ng/ml (ng/g*)	Voeroplossingen 2012	conc. imidacloprid ng/ml (ng/g*)
week24 - 14- juni	5.5	week24 - 11- juni	4.8
week24 - 16- juni	5.5	week24 - 14 - juni	4.9
week25 - 20- juni	4.8	week25 - 18- juni	7.0
week25 - 23- juni	5.7	week25 - 21- juni	6.9
week26 - 27- juni	5.0	week26 - 25- juni	6.7
week26 - 30- juni	4.5	week26 - 28- juni	5.2
week27 - 04- juli	4.9	week27 - 02- juli	6.8
week27 - 07- juli	4.9	week27 - 05- juli	8.0
week28 - 11- juli	6.1	week28 - 09- juli	4.9
week28 - 14- juli	4.0	week28 - 12- juli	4.8
week29 - 18- juli	4.7	week29 - 16- juli	12.3**
week29 - 21- juli	5.4	week29 - 19- juli	11.5**
Week30 – 25 juli	4.8	week30 - 23- juli	6.2
week30 - 28- juli	nd	week30 - 26- juli	7.2
week31 - 01- aug	6.1	week31 - 30- juli	5.3
week31 - 03- aug	5.9	week31 - 02- aug	5.4
week32 - 08- aug	5.4	week32 - 06- aug	5.4
week32 - 11- aug	4.6	week32 - 09- aug	5.5
week33 - 15- aug	4.6	week33 - 13- aug	3.9
week33 - 18- aug	4.6	week33 - 16- aug	4.2
week34 - 22- aug	5.6	week34 - 20- aug	4.5
week34 - 25- aug	4.9	week34 - 22- aug	4.3
week35 - 29- aug	5.2	week35 - 27- aug	4.6
week35 - 01- sept	5.2	week35 - 30- aug	4.2

Gemiddeld is per blootstelling in 2011 5.1 ng/ml (4.3 ppb*) en in 2012 6.0 ng / g (5 ppb*) imidacloprid aangeboden.

* Berekend op basis s.g. invertsuikeroplossing 50% = 1.2,

** De stockoplossing is per ongeluk 2 x zo sterk gemaakt.

Varroaciden en insecticiden (behalve imidacloprid) in de volken voor en na blootstelling aan imidacloprid

Varroaciden

Studie I. Bij aanvang van de studie werd in 14 volken Coumaphos gedetecteerd. De concentraties in honing varieerden van 2.4 tot 6.8 ppb en in bijenbrood van 2.7 tot 21.4 ppb. Fluvalinate-tau werd in 2 volken gedetecteerd; in één volk in de bijen (10.1 ppb) en in één volk in het bijenbrood (21.2 ppb). DMF (metaboliëet van Amitraz) werd gedetecteerd in 15 volken, in de honing (11 volken, 5.2-28.0 ppb) of in het bijenbrood (8 volken, 5.1-18.0 ppb) of in beide (enige overlap). In 14 volken werd DMPF (metaboliëet van Amitraz) gevonden waarvan 9 in combinatie met DMF. In drie bijenmonsters varieerden de concentraties van 6 tot 13 ppb, in 13 honingmonsters van 5.3 tot 57 ppb en in vijf bijenbroodmonsters van 9.4 tot 30 ppb. De impact van de varroaciden op het aantal bijen op 29 juli 2011 is niet apart geanalyseerd omdat deze middelen een hoge LD₅₀ hebben (niet erg giftig).

Studie II. Bij aanvang van de studie werd in 8 volken Coumaphos gedetecteerd. De concentraties in bijenbrood varieerden van 2.6 tot 30 ppb. In twee volken waarin ook in juni Coumaphos gedetecteerd was, werd in september

nog 4.1 (juni 4.2) en 2.6 (juni 3.0) ppb gevonden. In de andere volken waarin in juni Coumaphos gevonden werd, kon dit in september niet meer aangetoond worden.

Fluvalinate-tau werd in 6 volken gedetecteerd in het bijenbrood. De concentraties varieerden van 11 tot 44 ppb. In september werd in geen van de onderzochte volken (detailanalyse) Fluvalinate-tau aangetoond.

DMF (metabool van Amitraz) werd in juni gedetecteerd in 6 volken in de honing (5.8-132 ppb). In het bijenbrood van vijf volken werd DMF gevonden in juni (5.0-22 ppb). In 4 volken werd DMPF (metabool van Amitraz) gevonden in zowel honing als in bijenbrood (honing 13 – 256 ppb en bijenbrood 14 – 120 ppb). In september werd geen DMF en DMFP meer gevonden. De impact van de varroaciden op het aantal bijen in juni 2012 is niet apart geanalyseerd omdat deze middelen een hoge LD₅₀ hebben (niet erg giftig). Alle volken waarin de varroaciden gevonden werden, zijn ingewinterd.

Insecticiden (niet-imidacloprid)

Studie I. Acetamiprid werd in drie volken in honing gedetecteerd (0.6, 1, 1.3 ppb) en één keer in bijenbrood (0.9 ppb). Thiacloprid werd in 15 volken gevonden waarbij in vier volken residu in zowel honing (1.3 tot 11.0 ppb) als in bijenbrood (1.2 tot 30.5 ppb) werd aangetoond. Triflumizole werd in één bijenbrood monster gevonden (21.3 ppb). Fipronil werd gevonden in vier bijenbrood monsters gevonden (0.6, 0.6, 0.6 en 1 ppb).

In de monsters werd geen DMA, Clothianidin, Fipronil_carboxamide, Fipronil-desulfinyl, Fipronil-sulfide, Fipronil-sulfone, Piperonyl-butoxide en Propiconazole gevonden. In september werden geen van de varroaciden en insecticiden meer gevonden behalve in één honingmonster van het bijenvolk met de op een na hoogste concentraties DMPF in mei (43 ppb), waar in september nog 18 ppb DMPF werd gevonden.

Het mogelijke effect van de overige (niet-imidacloprid) insecticiden, gedetecteerd in de bijen bij aanvang van de studie, is per behandeling bepaald. Per behandeling is de blootstelling aan imidacloprid in de volken gelijk en kan het effect van de insecticiden gemeten worden. Het effect op het bijenvolk is geanalyseerd met GLM ($P \leq 0.05$). Als parameter is het aantal bijen op 29 juli in volken waarin insecticiden waren gedetecteerd, en in volken waarin geen insecticiden waren gedetecteerd, gebruikt. Voor de statistische analyse zijn de volken waarin insecticiden werden aangetroffen, in bijen, in honing en in bijenbrood gepooled. Er werd geen effect van de pesticiden op het aantal bijen vastgesteld (tabel 4).

Het gemiddeld aantal bijen op 29 juli 2011 (sd) / n volken en $P_{(df\text{ behandeling, } df\text{ totaal})}$ in de volken met (niet – imidacloprid) insecticiden en zonder insecticiden in bijen, honing en bijenbrood bij aanvang van de studie op 23 mei 2011.

behandeling	gemiddeld aantal bijen op 29 juli 2011		$P_{(df\text{ behandeling, } df\text{ totaal})}$
	geen insecticiden op 23 mei 2011	wel insecticiden op 23 mei 2011	
stuifmeelval, geen imidacloprid	4410 (3680) / 7	3854 (1695) / 3	0.81 _(1, 9)
stuifmeelval, wel imidacloprid	5066 (4594) / 9	4040 (1401) / 4	0.68 _(1, 12)
geen stuifmeelval, geen imidacloprid	9975 (3221) / 9	12264 (1960) / 4	0.22 _(1, 12)
geen stuifmeelval, wel imidacloprid	8812 (8812) / 7	7225 (4003) / 6	0.35 _(1, 12)

Studie II. In een volk werd bij aanvang van de studie 3.8 ppb Thiacloprid gemeten. Ook werd in juni 2012 in een volk Piperonyl-butoxide gemeten (0.75 ppb) in de honing. In een ander volk werd in september in de honing 1 ppb Piperonyl-butoxide gemeten.

in 2012 is de impact van de residuen van de niet imidacloprid pesticiden op de ontwikkeling en overwintering niet apart gemeten. De volken waarin de genoemde residuen gevonden zijn hebben zich normaal ontwikkeld en zijn ingewinterd.

Bijlage 3

Referenties

- Amdam, G.V., Omholt, S.W. 2002. The regulatory anatomy of honeybee lifespan. *J. Theor. Biol.* 216: 209-228
- Babendreier, D., Kalberer, N., Romeis, J., Fluri, P., Bigler, F. 2004. Pollen consumption in honey bee larvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plants. *Apidologie* 35: 293-300. DOI 10.1051/apido:2004016
- Brandstetter, M., Crailsheim, K., Heran, H. 1988. Provisioning of food in the honeybee before foraging. In BIONA-report 6, Akas. Wiss.u. Lit., Mainz pp 129-148. G. Fischer, Stuttgart.
- Brodschneider, R., Hrassnigg, N., Vollmann, J., Petz, M., Riesberger-Gallé, U, Crailsheim, K. 2007. Liquid nutrition within a honeybee colony, who feeds? Abstracts Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e. V.. Jahrestagung in Veitshöchheim 27 – 29 März , *Apidologie* 38: 482-504
- Brodschneider, R., Crailsheim, K. 2010. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*: 278-297. www.apidologie.org. DOI: 10.1051/apido/2010012
- Cremonese, T.M., Jong, D. de., Bitondi, M.M.G. 1998. Quantification of hemolymph proteins as a fast method for testing protein diets for honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 91: 1284-1289
- Cutler, G.C., Scott-Dupree, C.D. 2007. Exposure to Clothianidin seed-treated canola has no long term impact on honey bees. *Journal of Economic Entomology* 100: 765-772
- Delaplane, K.S., Steen, J. van der, Guzman-Novoa, E. 2013. Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. In V Dietermann; JD Ellis; P Neumann (Eds) *The Coloss Beebook, Volume I: standard methods for Apis mellifera research*. *Journal of Apicultural Research* 52(1): (2013) DOI 10.3896/IBRA.1.52.1.03
- Degrandi-Hoffmann, G., Hagler, J. 2000. The flow of incoming nectar through a honey bee (*Apis mellifera* L.) colony as revealed by a protein marker. *Insectes soc.* 47: 302-306
- Faucon, J.P., Aurères, C., Drajnudel, O., Mathieu, L., Ribière, M., Martel, A-C., Zeggane, S., Chauzat, M-P., Aubert, M.F.A. 2005. Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Pest Manag Sci* 61: 111-125
- Free, J., 1967. Factors determining the collection of pollen by honeybee foragers. *Anim. Behav.* 15: 134-144
- Jung-Hoffmann, I. (1966) Die determination von Königin und Arbeiterin der Honigbiene. *Zeitschrift Bienenforsch* 8: 296-322.
- Haydak MH. 1970. Honey bee nutrition. *Annual Review of Entomology* 15:143-156
- Gary, N.E. 1975. Activities and behavior of honey bees. In *The hive and the honeybee*, ed. C.P. Dadant. Pp 185-264. Hamilton, Ill., Dadant.
- Lindauer M. 1952. Ein Beitrag zur frage der Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie* 34: 299-345.

- Maurizio, A. 1975. How bees make honey. In *Honey, a comprehensive survey*. Ed. E. Crane, pp 77-105. London, Heinemann
- Nixon & Ribbands (1952). Food transmission within the honeybee community Proc Roy Soc vol. 140, no. 898: 43-50.
- Oomen, P.A., Ruijter, A. de., Steen, J. van der. 1992. Method for honeybee brood feeding tests with insect growth regulating insecticides *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 22, 613-616 (1992)
- Ribbands, C.R. 1949. The foraging methods of individual honey bees. *J. Anim. Ecol.* 18: 47-66
- Seeley, T. 1985. *Honey bee ecology; a study of adaption in social life*. Princeton University Press, Princeton ISBN 0-691-08391-6/0-691-08
- Seeley, T. (1995). *The Wisdom of the Hive. The social physiology of honey bee colonies*. Harvard University Press. Cambridge, MA.
- Schmickl, T., Crailsheim, K. 2002. How honeybees (*Apis mellifera* L.) change their broodcare behaviour in response to non-foraging conditions and poor pollen conditions. *Behav. Ecol. Sociobiol* 51: 415-425
- Schmuck, R., Schoning, R., Stork, A., Schramel, O. 2001. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L.) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Manag. Sci* 57: 225-238
- Steen, J.J.M. van der, Cornelissen, B., Donders, J., Blacquièrè, T., Dooremalen C. van, 2012. How honey bees of successive age classes are distributed over a one storey, ten frames hive. *Journal of Apicultural Research* 51(2): 174-178 (2012) © IBRA 2012. DOI 10.3896/IBRA.1.51.2.05
- Steffan-Dewenter, I., Kuhn, A., 2003. Honeybee foraging in differentially structured landscapes. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270 no 1515: 569-575
- Vaissière, B.E., Rodet, G., Cousin, M., Botella, L., Torrè Grossa, J.P. 1996. Pollination effectiveness of honey bees (Hymenoptera: Apidae) in a kiwifruit orchard. *Horticultural EJ. Econ. Entomol* 98(2): 453-461
- Visscher, P.K., Sheeley, T.D. 1982. Foraging Strategy of Honeybee Colonies in a Temperate Deciduous Forest *Ecology* .63 (6): 1790-1801
- Waddington, K.D. 1980. Flight patterns of foraging bees in relation to artificial flower density and distribution of nectar. *Oecologia* 44: 199-204
- Winston, M. 1987. *The biology of the honey bee*. Harvard University Press Cambridge

