



Postbus 16 | 6700 AA Wageningen

Ministerie EL&I  
Directeur AKV  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Geachte heer,

Hierbij stuur ik u de aanbiedingsbrief met betrekking tot een voorstel tot uitbreiding van het onderzoeksproject BIJ-1. Het betreft hier een voorgesteld onderzoek aan de mogelijke rol van bepaalde pesticiden, met name neonicotinoiden, bij het optreden van bijensterfte in Nederland.

Het voorstel is begroot op 165 k€ excl. BTW (196 k€ incl. BTW).

Het voorstel bestaat uit twee delen (zie bijlagen). Het eerste deel: Impact van stuifmeel (kwantitatief) en Imidacloprid op de vitaliteit van honingbijvolken van de zomer- en winterpopulatie, wordt uitgevoerd door PRI. Het tweede deel: Regionale verschillen in bijensterfte in relatie tot het voorkomen van neonicotinoiden, fipronil, virussen en Nosema spp. in honingbijen, honing en stuifmeel bij imkers die gedurende 2 jaar de varroamijt tijdig bestreden, wordt uitbesteed aan het NCB.

Met vriendelijke groet,

Dr. ir. J.E. (Ernst) van den Ende  
Algemeen Directeur Plant Sciences Group  
Wageningen UR

DATUM  
26 mei 2011

ONDERWERP  
Uitbreiding onderzoeksproject  
BIJ-1

POSTADRES  
Postbus 16  
6700 AA Wageningen

BEZOEKADRES  
Wageningen Campus  
Gebouw 107  
Droevendaalsesteeg 1  
6708 PB Wageningen

INTERNET  
[www.wur.nl](http://www.wur.nl)

CONTACTPERSOON  
Dr ir J.E. (Ernst) van den  
Ende

TELEFOON  
+31 (0)317 48 21 46

FAX  
+ 31 (0)317 41 80 94

E-MAIL  
[ernst.vandenende@wur.nl](mailto:ernst.vandenende@wur.nl)

**ONDERZOEKSPLAN BIJ-1 (WP3) 2011:**

**Impact van stuifmeel (kwantitatief) en Imidacloprid op de vitaliteit van honingbijvolken van de zomer- en winterpopulatie.**

**J. van der Steen  
PRI bijen@wur  
14 mei 2011**

## Contents

Inleiding .....	3
Materiaal .....	4
Methode .....	4
Locatie .....	4
Voeren imidacloprid .....	4
Parameters .....	5
Monsterfrequentie .....	5
Analysetechnieken .....	5
# bijen (fotoanalyse) .....	6
# gesloten broed (fotoanalyse) .....	6
dm <sup>2</sup> bijenbrood .....	6
PCR virussen en <i>Nosema ceranae</i> .....	6
Varroabesmetting in september .....	6
Residu-analyse van imidacloprid en de metabolieten .....	6
Hoeveelheid verzameld stuifmeel .....	7
Uitwintering .....	7
Behandeling .....	8
Statistiek .....	8
# volken per behandeling: (Genstat, t test, sample size) .....	8
Data analyse .....	8
Locatie .....	8
Extra budget WP3 .....	9
Bijlage .....	10
Werkschema .....	10

## Inleiding

De resultaten van het WP3 onderzoek 2010 en eerder uitgevoerd Varroa-onderzoek geven sterke aanwijzingen dat de vitaliteit van de bijenvolken in september een belangrijke factor is in wintersterfte cq succesvolle uitwintering.

Er zijn duidelijke verbanden aangetoond tussen de vitaliteit van het bijenvolk in september, uitgedrukt als "fractie vitellogenine" en varroa (1 en 2) en stuifmeel (3 en 4) (kwantiteit en diversiteit) en grootte van bijenvolken in november(5).

1. Varroa / fractie vitellogenine: hoe meer varroamijten in september, hoe lager de gemiddelde fractie hemolymfe vitellogenine in de september in het bijenvolk (BIJ1 regio 2010).
2. Winterpopulatie / fractie vitellogenine: een lagere gemiddelde fractie vitellogenine in het bijenvolk in september geeft kleinere volken in november. (ond Varroa 2008).
3. Stuifmeel (continu – niet continu) en fractie vitellogenine: een niet continue stuifmeeldracht in juni en augustus resulteert in lagere gemiddelde fractie vitellogenine in een bijenvolk in september (ond. Varroa 2009).
4. Stuifmeel (diversiteit) en fractie vitellogenine: een lagere stuifmeeldiversiteit resulteert in een gemiddeld lagere fractie vitellogenine in september in een bijenvolk (BIJ-1 WP3 2010).
5. Grootte van bijenvolken en vitellogenine; Grotere volken in september hebben meer vitellogenine in september (WP2, WP3).

Vitellogenine is een van de belangrijkste aanpassingen van de oorspronkelijk Afrikaans honingbij aan de koude periode. Het opslageiwit vitellogenin wordt gebruikt om de koude broedloze periodes door te komen. Afrikaanse honingbijen hebben geen extra vitellogenine-opbouw voor een winterpopulatie.

De populatie zomerbijen heeft relatief minder vitellogenine dan winterbijen; in de zomerpopulatie is er een snelle turnover van vitellogenine naar o.a. voedersap dan in de winterpopulatie. Het blijkt dat relatief sterke volken in september, relatief gemiddeld meer vitellogenine en minder broed hebben. Meer vitellogenine is hierbij het logisch gevolg zijn van minder broed maar dit roept de vraag op waarom grote volken eerder met broeden stoppen en hierbij de transitie naar de winterpopulatie eerder plaats vindt dan in zwakkere volken?

Het is niet uit te sluiten dat een langdurige blootstelling van bijenvolken aan subletale doses imidacloprid, de te verwachten negatieve effecten van een beperkte stuifmeeldracht, versterkt. Uit lab-studies is bekend dat een blootstelling aan subletale doses een negatief effect heeft op de ontwikkeling van de voedersapklieren. Onderzoek van Faucon (2005) laat zien dat frequente blootstelling van een bijenvolk aan Imidacloprid (5 ppb), gevoerd in suikerwater geen effect heeft op de overwintering. Onderzoek naar de impact van subletale doses van imidacloprid op bijenvolken, in relatie tot voedingstoestand / vitaliteit van de volken is er niet. Door deze factor in het onderzoek mee te nemen als een worst case scenario is kan hier meer duidelijkheid ontstaan, met name de impact op de vitellogenine van de winterpopulatie, de hoeveelheid broed en bijen en *N. ceranae*.

Het BIJ-1 onderzoek van 2011 laat een verband zien tussen de grootte van een bijenvolk en de fractie vitellogenine en *Nosema ceranae*; in grotere volken is meer vitellogenine en worden ook meer sporen van *N. ceranae* gevonden. Het lijkt er op dat in kleinere volken *Nosema ceranae* zich minder goed handhaven / reproduceren.

Gegeven het bovengenoemde zijn 3 hypothesen opgesteld:

1. Door een kwantitatief mindere stuifmeeldracht bijenvolken zijn bijenvolken in september klein en hebben een gemiddeld lagere fractie vitellogenine waardoor ze winterrust gaan cq geen echte winterpopulatie opbouwen. Subletale doses imidacloprid zouden dit fenomeen kunnen versterken.

2. Het tijdstip waarop de winterpopulatie gevormd gaat worden is afhankelijk van de relatie tussen vitellogenine (of totaal eiwit) en temperatuur en/of daglengte. Dit roept de vraag op of er een drempelwaarde is in de verhouding vitellogenine / daglengte en/of temperatuur die ervoor zorgt dat volken wel of niet de transitie maken naar de winterpopulatie.
3. De synergie tussen *Nosema ceranae* en imidacloprid verzwakt bijenvolken. De studie van Alaux et al (2010) suggereert, op basis van laboratorium testen, deze synergie. Is dit ook aantoonbaar in bijenvolken?

## Materiaal

- 4 X 13 bijenvolken, vegers met koninginnen van 2010. In de broedloze fase van de vegers worden ze behandeld met oxaalzuur zodat de volken een praktisch mijtvrije start hebben. In de proefperiode worden de volken niet behandeld tegen varroa.

- imidacloprid (actieve stof): 5 ppb

De concentratie imidacloprid (actieve stof) is 5 ppb. Dit is 2 tot 3 maal meer dan de gemiddelde waarden die in nectar gevonden worden (Rotrais 2005, Maxim & Sluis 2007, Cuttler 2007).

De gerapporteerde 10 ppb in pollen in Cresswell 2010, komt van een studie van Bonmatin 2003 waarin waarden van 1 – 10 ppb gevonden werden met een gemiddelde waarde van 3 ppb.

Het imidacloprid wordt niet in stuifmeel aangeboden, hoewel imidacloprid wel via deze weg in het bijenvolk terecht komt. De reden om deze keus te maken is dat de opname van aangeboden stuifmeel moeilijk te meten is; het stuifmeel dat in de vorm van stuifmeeldeeg aangeboden wordt, wordt niet opgeslagen maar direct geconsumeerd. Dit kan, afhankelijk van het aanbod buiten variëren.

Het buiten verzamelde stuifmeel wordt wel opgeslagen en deels geconserveerd met de, in het volk aanwezige, honing / suikerwater. Het is daarom aannemelijk dat imidacloprid in het bijenbrood terecht komt.

Voor dit onderzoek is voor imidacloprid gekozen omdat deze neonicotine het meest gebruikt wordt, voor zover bekend ook meer dan andere neonicotinen in het milieu voorkomt en het van de toegelaten neonicotinen het meest giftig is voor honingbijen.

- Invert suiker siroop, verdund naar 50% met leidingwater.

- stuifmeelvallen

## Methode

### Behandeling

groep A: 13 bijenvolken ongehinderd stuifmeel laten verzamelen en eventueel bijvoeren in stuifmeelarme periodes.

groep B: 13 bijenvolken ongehinderd stuifmeel laten verzamelen en bijvoeren in arme tijden + in de periode juni t/m half september wekelijks 2 x 350 ml suikerwater 50% met subletale dosis imidacloprid.

groep C: 13 bijenvolken met geactiveerde stuifmeelval

groep D: 13 bijenvolken met geactiveerde stuifmeelval + in de periode juni t/m half september wekelijks 2 x 350 ml suikerwater 50% met subletale dosis imidacloprid.

### Locatie

Bijenstand Droevendaal Wageningen

### Voeren imidacloprid

De volken worden in juni, juli, augustus en de eerste 2 weken van september 2 x per week met een 350 ml suikerwater gevoerd. Zesentwintig volken krijgen suikerwater 50% met 5 ppb imidacloprid en 26 volken krijgen suikerwater 50%. Het voeren gebeurt

bij voorkeur op maandag en donderdag, in de ochtend. Overdag voeren remt het foerageren overdag waardoor te verwachten is dat het aangeboden voedsel snel opgenomen en opgeslagen wordt. Per keer wordt 350 ml verdunde invertsuiker (50%) gevoerd met een glazen pot met een geperforeerde deksel. De potten worden rechtstreeks op de bovenste raten gezet in een lege honingkamer.

## Parameters

1. Gemiddeld honingbijvolk hemolymfe vitellogenine
2. # bijen
3. # gesloten broed
4. dm<sup>2</sup> bijenbrood
5. DWV, ABPV, *Nosema* spp
6. *Varroa destructor*
7. Verzameld stuifmeel
8. Uitwintering

## Monsterfrequentie

Id parameter	parameter	monstername	# monsters / datasets
1	hemolymfe vitellogenine	Bij aanvang van de studie eind mei en in september	2 x 52 monsters = 104
2	# bijen	Bij aanvang van de studie eind mei en in september	2 x 52 datasets = 104
3	# gesloten broed	Bij aanvang van de studie eind mei en in september	2 x 52 datasets = 104
4	bijenbrood	Vanaf eind mei tot half september elke 3 weken	6 x 52 datasets = 312
5	DWV, ABPV en <i>Nosema</i> spp	De bijen worden bemonsterd bij aanvang van de studie en half september	2 x 52 monsters = 104
6	<i>Varroa destructor</i>	Bij aanvang van de studie eind mei en in september	2 x 52 monsters = 104
7	Residu-analyse van imidacloprid en de metabolieten	De bijen, opgeslagen honing / suikerwater en bijenbrood worden bemonsterd bij aanvang van de studie en half september	2 x 52 bijen = 104 2 x 52 honing = 104 2 x 52 bijenbrood = 104
8	verzameld stuifmeel	wekelijks	15 datasets
9	uitwintering	november 2011, januari 2012 en maart 2012	3 datasets

## Analysetechnieken

### 1. hemolymfe vitellogenine

- a. Per volk wordt een monster van minimaal 25 bijen genomen van de buitenste broedraat. Van 25 bijen wordt direct het hemolymfe afgenomen (2 µl) afgenomen, gepooled en ingevroren bij -20 °C. Dit pooled monster wordt beschouwd als representatief voor het bijenvolk. Het totaal eiwit en vitellogenine worden electroforetisch bepaald met SDS/Page (7,5% acrylamide precasted acrylamide-gels (GE Healthcare) according to Laemmli (1970)). Phastsystem protein electrophoresis equipment (Pharmacia) wordt toegepast om de eiwitten in het hemolymfe te scheiden. B-galactosidase (Sigma) wordt toegepast als de interne concentratie marker. De gels worden gekleurd met Commassie Brilliant Blue en imaged met Octopus F (Progress Control) en vervolgens geanalyseerd met Phoretix 1D advanced v5.2 (Nonlinear Dynamics Ltd.).
- b. De totaal eiwit / vitellogenine bepalingen worden uitgevoerd door PRI BU Veredeling, cluster Paddestoelen.

### **# bijen (fotoanalyse)**

- c. Per volk worden alle raten met bijen gefotografeerd. De foto's worden geanalyseerd met het computerprogramma Image J. Hierbij wordt het oppervlakte bijen bepaald. Het aantal bijen wordt berekend door de  $dm^2$  bijen te vermenigvuldigen met respectievelijk 125.

### **# gesloten broed (fotoanalyse)**

- d. Per volk worden alle raten met gesloten broedcellen gefotografeerd. De foto's worden geanalyseerd met het computerprogramma Image J. Hierbij wordt het oppervlakte gesloten broed bepaald. Het aantal gesloten broedcellen wordt bepaald door de  $dm^2$  bijen en broed te vermenigvuldigen met respectievelijk 400.

### **$dm^2$ bijenbrood**

- e. Het aantal / oppervlakte bijenbrood visueel geschat door per volk alle raten te checken. Dit levert per volk 6 observaties op.

### **PCR virussen en *Nosema ceranae***

- f. De virussen DWV en ABPV en *Nosema apis* en *Nosema ceranae* worden bepaald in pooled monsters van 30 bijen. De monsters worden genomen zoals beschreven bij "1 hemolymfe vitellogenine" De bijen worden bemonsterd bij aanvang van de studie en half september.

### **Varroabesmetting in september**

- g. Het aantal varroamijten wordt bepaald in pooled monsters van 50 bijen. De monsters worden genomen zoals beschreven bij "1 hemolymfe vitellogenine".

### **Residu-analyse van imidacloprid en de metabolieten**

- h. De residuen van imidacloprid en metabolieten worden bepaald door het RIKILT. De LOQ is 1 ppb. Het RIKILT gaat het bijen-, voedsel- en bijenbroodmateriaal analyseren op onderstaande manier. De analyse wordt uitgevoerd conform de werkwijze zoals beschreven in concept SOP A1129 & SOP A1079. In concept SOP A1129 wordt de opwerking volgens de z.g. Quechers methode (extractie met acetonitril en fasescheiding) beschreven; in SOP A1079 wordt de meting m.b.v. LC-MSMS beschreven. Beide zijn interne werkvoorschriften en komen overeen met methodes beschreven in LEHOTAY ET AL.: JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL VOL. 88, NO. 2, 2005. Deze methode wordt ook getest voor de polaire metabolieten van imidacloprid. Indien de methode niet voldoet wordt de aangepaste Quechers methode conform Kamel (2010), J. Agric. Food Chem. 58, 5926-5931 toegepast. De Quechers methode wordt al jaren toegepast in de analyse van bestrijdingsmiddelen in groente, fruit, grond, vegetatie en bijen. De analyseresultaten moeten voldoen aan eisen zoals gesteld in SANCO/10684/2009: METHOD VALIDATION AND QUALITY CONTROL PROCEDURES FOR PESTICIDE RESIDUES ANALYSIS IN FOOD AND FEED. Dit is een document dat iedere twee jaar gereviewed wordt en Rikilt is hier nauw bij betrokken.

- i. Het onderzoekmateriaal: bijen (gemonsterd zoals beschreven in "1 hemolymfe vitellogenine", bijenbrood en opgeslagen honing / suikerwater wordt bij aanvang van de studie en half september genomen en naar het RIKILT gestuurd. Omdat de enzymatische processen van de afbraak van bestrijdingsmiddelen ook na de dood van bijen nog doorgaan worden de monsters direct na het nemen op de bijenstand op (droog) ijs geplaatst en bewaard bij  $-80^{\circ}$  C tot analyse.

#### **Hoeveelheid verzameld stuifmeel**

- j. Wekelijks wordt het stuifmeel van de volken met een geactiveerde stuifmeelval verzameld, gewogen en opgeslagen in de koelkast bij  $5^{\circ}$  C.

#### **Uitwintering**

- k. In november 2011, januari 2012 en maart 2012 worden de volken gecontroleerd en wordt het aantal ramen bijen geschat. Fotograferen is in november 2011 en januari 2012, gezien de te verwachten weersomstandigheden, niet mogelijk. In maart 2012 kan waarschijnlijk een meer nauwkeurige beschrijving van de volken gemaakt worden.



## Behandeling

groep A: bijenvolken ongehinderd stuifmeel verzamelen en bijvoeren in arme tijden

groep B: bijenvolken ongehinderd stuifmeel verzamelen en bijvoeren in arme tijden

+ 2 x per week in juni – ½ sept. 350 ml suikerwater 50% met subletale dosis

imidacloprid

groep C: bijenvolken met geactiveerde stuifmeelval

groep D: bijenvolken met geactiveerde stuifmeelval + 2 x per week in juni – ½ sept 350

ml suikerwater 50% met subletale dosis imidacloprid

## Statistiek

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

Bijen, detecteerbare verschil = 1500 bijen	herhalingen = volken = 8
Bijen, detecteerbare verschil = 2000 bijen	herhalingen = volken = 7
Broed, detecteerbare verschil = 1000 cellen	herhalingen = volken = 14
Broed, detecteerbare verschil = 1500 cellen	herhalingen = volken = 7
Totaal eiwit, detecteerbare verschil = 0.4 µg/µl	herhalingen = volken = 4
Fractie vitellogenine, detecteerbare verschil = 0.04	herhalingen = volken = 7
Fractie vitellogenine, detecteerbare verschil = 0.05	herhalingen = volken = 5
Residu Imidacloprid, detecteerbare verschil 1 ppb (LOQ)	herhalingen = volken = 5
Residu Imidacloprid, detecteerbare verschil 0.6 ppb (sd)	herhalingen = volken = 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. Dit was een dringend advies van de begeleidingscommissie.

## Data analyse

De data worden statistisch geanalyseerd met Generalized Linear model (Genstat 13<sup>e</sup> ed.), zowel voor het aantonen van verschillen (ANOVA) als correlaties.  $P \leq 0.05$  wordt beschouwd als statistisch verschillend,  $P$  waarden tussen 0.05 en 0.10 worden beschouwd als aanwijzingen voor een trend.

**Locatie:** Bijenstand Droevendaal

### **Extra budget WP3**

Het onderzoek wordt, behalve de hieronder gegeven extra kosten voor met name bijenvolken, monsternamen, monstervoorbereiding t.b.v. residu-analyse, residu-analyse en data-analyse, uitgevoerd binnen het budget van het Bij-1 WP3 onderzoek. Deze extra kosten zijn € 80 000.

Het onderzoek wordt, op basis van resultaten 2011, in 2012 herhaald en indien daar aanleiding voor is, uitgebreid met meerdere concentraties cq voedingsregimes, imidacloprid.

## Bijlage

### Werkschema

De monsternamen en schattingen kunnen door onvoorziene omstandigheden een paar dagen eerder of later plaatsvinden.

<b>dag</b>	<b>datum</b>	<b>monsternames en schattingen</b>
maandag	30-mei-11	hemolymfe, # bijen, # broed, # bijenbrood, virus en Nosema spp. , Varroa, monstermateriaal imidacloprid
dinsdag	31-mei-11	hemolymfe, # bijen, # broed, # bijenbrood, virus en Nosema spp. , Varroa, monstermateriaal imidacloprid
woensdag	1-jun-11	hemolymfe, # bijen, # broed, # bijenbrood, virus en Nosema spp. , Varroa, monstermateriaal imidacloprid
donderdag	2-jun-11	hemolymfe, # bijen, # broed, # bijenbrood, virus en Nosema spp. , Varroa, monstermateriaal imidacloprid
vrijdag	3-jun-11	hemolymfe, # bijen, # broed, # bijenbrood, virus en Nosema spp. , Varroa, monstermateriaal imidacloprid
zaterdag	4-jun-11	
zondag	5-jun-11	
maandag	6-jun-11	activering stuifmeelval, start voeren
dinsdag	7-jun-11	
woensdag	8-jun-11	
donderdag	9-jun-11	voeren, stuifmeel verzamelen
vrijdag	10-jun-11	
zaterdag	11-jun-11	
zondag	12-jun-11	
maandag	13-jun-11	voeren
dinsdag	14-jun-11	check bijenbrood
woensdag	15-jun-11	
donderdag	16-jun-11	voeren, stuifmeel verzamelen
vrijdag	17-jun-11	
zaterdag	18-jun-11	
zondag	19-jun-11	
maandag	20-jun-11	voeren
dinsdag	21-jun-11	
woensdag	22-jun-11	
donderdag	23-jun-11	voeren, stuifmeel verzamelen
vrijdag	24-jun-11	
zaterdag	25-jun-11	
zondag	26-jun-11	
maandag	27-jun-11	voeren
dinsdag	28-jun-11	
woensdag	29-jun-11	
donderdag	30-jun-11	voeren, stuifmeel verzamelen
vrijdag	1-jul-11	
zaterdag	2-jul-11	
zondag	3-jul-11	
maandag	4-jul-11	voeren
dinsdag	5-jul-11	check bijenbrood
woensdag	6-jul-11	

donderdag	7-jul-11	voeren, stuifmeel verzamelen
vrijdag	8-jul-11	
zaterdag	9-jul-11	
zondag	10-jul-11	
<hr/>		
maandag	11-jul-11	voeren
dinsdag	12-jul-11	
woensdag	13-jul-11	
donderdag	14-jul-11	voeren, stuifmeel verzamelen
vrijdag	15-jul-11	
zaterdag	16-jul-11	
zondag	17-jul-11	
<hr/>		
maandag	18-jul-11	voeren
dinsdag	19-jul-11	
woensdag	20-jul-11	
donderdag	21-jul-11	voeren, stuifmeel verzamelen
vrijdag	22-jul-11	
zaterdag	23-jul-11	
zondag	24-jul-11	
<hr/>		
maandag	25-jul-11	voeren
dinsdag	26-jul-11	check bijenbrood
woensdag	27-jul-11	
donderdag	28-jul-11	voeren, stuifmeel verzamelen
vrijdag	29-jul-11	
zaterdag	30-jul-11	
zondag	31-jul-11	
<hr/>		
maandag	1-aug-11	voeren
dinsdag	2-aug-11	
woensdag	3-aug-11	
donderdag	4-aug-11	voeren, stuifmeel verzamelen
vrijdag	5-aug-11	
zaterdag	6-aug-11	
zondag	7-aug-11	
<hr/>		
maandag	8-aug-11	voeren
dinsdag	9-aug-11	
woensdag	10-aug-11	
donderdag	11-aug-11	voeren, stuifmeel verzamelen
vrijdag	12-aug-11	
zaterdag	13-aug-11	
zondag	14-aug-11	
<hr/>		
maandag	15-aug-11	voeren
dinsdag	16-aug-11	check bijenbrood
woensdag	17-aug-11	
donderdag	18-aug-11	voeren, stuifmeel verzamelen

vrijdag	19-aug-11	
zaterdag	20-aug-11	
zondag	21-aug-11	
maandag	22-aug-11	voeren
dinsdag	23-aug-11	
woensdag	24-aug-11	
donderdag	25-aug-11	voeren, stuifmeel verzamelen
vrijdag	26-aug-11	
zaterdag	27-aug-11	
zondag	28-aug-11	
maandag	29-aug-11	voeren
dinsdag	30-aug-11	
woensdag	31-aug-11	
donderdag	1-sep-11	voeren, stuifmeel verzamelen
vrijdag	2-sep-11	
zaterdag	3-sep-11	
zondag	4-sep-11	
maandag	5-sep-11	voeren
dinsdag	6-sep-11	check bijenbrood
woensdag	7-sep-11	
donderdag	8-sep-11	voeren, stuifmeel verzamelen
vrijdag	9-sep-11	
zaterdag	10-sep-11	
zondag	11-sep-11	
maandag	12-sep-11	hemolymfe, # bijen, # broed, # bijenbrood, virus en Nosema spp. , Varroa, monstermateriaal imidacloprid
dinsdag	13-sep-11	hemolymfe, # bijen, # broed, # bijenbrood, virus en Nosema spp. , Varroa, monstermateriaal imidacloprid
woensdag	14-sep-11	hemolymfe, # bijen, # broed, # bijenbrood, virus en Nosema spp. , Varroa, monstermateriaal imidacloprid
donderdag	15-sep-11	hemolymfe, # bijen, # broed, # bijenbrood, virus en Nosema spp. , Varroa, monstermateriaal imidacloprid
vrijdag	16-sep-11	hemolymfe, # bijen, # broed, # bijenbrood, virus en Nosema spp. , Varroa, monstermateriaal imidacloprid
zaterdag	17-sep-11	
zondag	18-sep-11	
maandag	19-sep-11	
dinsdag	20-sep-11	
woensdag	21-sep-11	
donderdag	22-sep-11	
vrijdag	23-sep-11	
zaterdag	24-sep-11	
zondag	25-sep-11	

maandag	26-sep-11	
dinsdag	27-sep-11	
woensdag	28-sep-11	
donderdag	29-sep-11	
vrijdag	30-sep-11	
zaterdag	1-okt-11	
zondag	2-okt-11	
maandag	3-okt-11	data analyse en rapportage
dinsdag	4-okt-11	data analyse en rapportage
woensdag	5-okt-11	data analyse en rapportage
donderdag	6-okt-11	data analyse en rapportage
vrijdag	7-okt-11	data analyse en rapportage
zaterdag	8-okt-11	
zondag	9-okt-11	
maandag	10-okt-11	data analyse en rapportage
dinsdag	11-okt-11	data analyse en rapportage
woensdag	12-okt-11	data analyse en rapportage
donderdag	13-okt-11	data analyse en rapportage
vrijdag	14-okt-11	data analyse en rapportage
zaterdag	15-okt-11	
zondag	16-okt-11	
maandag	17-okt-11	data analyse en rapportage
dinsdag	18-okt-11	data analyse en rapportage
woensdag	19-okt-11	data analyse en rapportage
donderdag	20-okt-11	data analyse en rapportage
vrijdag	21-okt-11	data analyse en rapportage
zaterdag	22-okt-11	
zondag	23-okt-11	
maandag	24-okt-11	uitloop onvoorzien
dinsdag	25-okt-11	uitloop onvoorzien
woensdag	26-okt-11	uitloop onvoorzien
donderdag	27-okt-11	uitloop onvoorzien
vrijdag	28-okt-11	uitloop onvoorzien
zaterdag	29-okt-11	
zondag	30-okt-11	
maandag	31-okt-11	
dinsdag	1-nov-11	
woensdag	2-nov-11	
donderdag	3-nov-11	
vrijdag	4-nov-11	
zaterdag	5-nov-11	
zondag	6-nov-11	
maandag	7-nov-11	

dinsdag	8-nov-11	
woensdag	9-nov-11	
donderdag	10-nov-11	
vrijdag	11-nov-11	
zaterdag	12-nov-11	
zondag	13-nov-11	
<hr/>		
maandag	14-nov-11	
dinsdag	15-nov-11	check wintervolken

In januari en maart worden de winter volken gecheckt cq beschreven op overleving, volksgrootte en uitwintering.

## Onderzoeksvoorstel Regionale verschillen in Bijensterfte in relatie tot het voorkomen van neonicotinoïden, fipronil, virussen en *Nosema* spp. in honingbijen, honing en stuifmeel bij imkers die gedurende 2 jaar de varroamijt tijdig bestreden.

Wintersterfte ligt in Nederland vanaf 2006 op een hoog niveau. De afgelopen 4 jaar op gemiddeld 23 %, sterfte ten gevolge van toxisch bijenvoer in de winter 2009-2010 niet meegerekend. Uit de analyse van de bijensterfte per imker over de periode 2006-2010 blijkt een significante relatie tussen geografische positie, omvang van de imkerij en de mate van bijensterfte. (van der Zee en Pisa, 2011, Monitor Uitwintering Bijenvolken 2010). Mogelijk verklarende factoren die met wintersterfte geassocieerd worden, zijn de chronische aanwezigheid van *Varroa destructor* (en de daarmee geassocieerde virussen) en de wijze waarop de imker deze bestrijdt, het voorkomen van *Nosema ceranae* en diverse omgevingsfactoren (voedselaanbod, wellicht ook insecticiden). Rekening moet worden gehouden met de gevolgen van interacties tussen deze factoren voor de levensduur van winterbijen. Uit experimenteel onderzoek (Frazier, 2008) blijkt de vermeerdering van het aantal *Nosema ceranae* sporen in individuele bijen sterk toe te nemen bij blootstelling aan zeer lage doses imidacloprid.

Veldstudies naar mogelijke lange termijn effecten van neonicotinoïden zijn nog nauwelijks beschikbaar. Het vaststellen van associaties tussen geobserveerde wintersterfte van bijenvolken en neonicotinoïden wordt bemoeilijkt door de aanwezigheid van andere verklarende determinanten met name de *V. destructor*. Met ingang van de Monitor Uitwintering Bijenvolken 2008 is gevraagd naar de bestrijding van *V. destructor* per maand en het daarbij gebruikte middel. Een significante relatie werd gevonden tussen een lagere wintersterfte en het gedurende 2 jaar op tijd d.w.z. in augustus en eventueel nogmaals in september, bestrijden van de *V. destructor* (van der Zee en Pisa, 2011, Monitor Uitwintering Bijenvolken 2010). Dit effect wordt als volgt verklaard. Tijdige bestrijding in jaar 1 leidt tot een lage startpopulatie van mijten in het voorjaar van jaar 2. Tijdige bestrijding in jaar 2 elimineert de vanaf het voorjaar van jaar 2 toegenomen varroapopulatie en verkleint daardoor het sterfterisico van de wintergeneratie die vanaf augustus wordt opgezet. Er is maar een beperkte groep imkers die ieder jaar op tijd bestrijdt. De voorspellende waarde van het effect van een bestrijding op de bijensterfte in de erop volgende winter is gering. Er kan immers geen onderscheid gemaakt worden tussen imkers, die al dan niet adequate maatregelen genomen hebben in jaar 1. Binnen de groep imkers, die op tijd bestreed, bestaat echter nog steeds een variabele wintersterfte van bijenvolken die regionaal bepaald is. Het voorliggend onderzoeksvoorstel heeft tot doel binnen deze groep dit verschil in bijensterfte nader te onderzoeken. Zijn er aanwijzingen dat er gemiddeld meer, al dan niet varroa gerelateerde virussen, *Nosema* spp., dan wel residuen van neonicotinoïden voorkomen in gebieden met gemiddeld hogere bijensterfte in vergelijking met gebieden met gemiddeld lagere sterfte? En bestaan er voor de bijenvolken in de totale studiepopulatie verschillen in het voorkomen van deze factoren, gerelateerd aan de mate van bijensterfte in de winter van 2010-2011?

### Methodiek

De data van de Monitoren Uitwintering Bijenvolken 2008-2011 worden geanalyseerd op regionale effecten van wintersterfte van bijenvolken bij imkers die gedurende 2 opeenvolgende jaren de varroamijt tijdig bestreden. De wintersterfte van het oktober cohort bijenvolken per imkerij wordt berekend met een Generalized Linear Model (GzLM). Voor de totale studiepopulatie wordt de bijensterfte vervolgens onderzocht in relatie tot omvang en



geografische positie van de imkerij met een zero-inflated negative binomial model en vervolgens nader geanalyseerd met een expliciet ruimtelijke (Bayesiaanse) benadering.

In de gebieden met hogere sterfte worden 20 imkers at random geselecteerd en uit gebieden met lage sterfte eveneens 20 imkers. Van iedere imker worden 2 bijenvolken at random geselecteerd, waarbij volken worden uitgesloten, die gedurende de afgelopen 2 jaar werden toegevoegd van elders. Van alle volken wordt door de imker in de eerste week van juli en in de eerste week van oktober een monster van minimaal 200 bijen afgenomen voor de bepaling van het aantal mijten per 100 bijen volgens OIE protocol. In de eerste 2 weken van augustus worden alle volken bemonsterd door het NCB. Per volk worden 50 bijen, 10 gram honing en 10 gram bijenbrood (opgeslagen pollen) voor analyse op neonicotinoïden afgenomen. Bovendien 30 vliegbijen voor bepaling van *Nosema* spp., 30 jonge bijen voor virusbepaling (DWV, BQCV en SBV). Het stuifmeel wordt gedetermineerd op belangrijke soorten. Het RIKILT- Institute of Food Safety te Wageningen onderzoekt de monsters op imidacloprid, clothianidin, thiamétoxam, acetamiprid, thiacloprid, 6-chloronicotine zuur en fipronil. De analyse wordt uitgevoerd conform Kamel (2010). Referentiemateriaal voor het valideren van de extractiemethode is niet beschikbaar. De analyse wordt uitgevoerd volgens voorschrift EC document No. SANCO/10684/2009. Bij de totstandkoming van dit document was het RIKILT betrokken.

Het RIKILT heeft geen ervaring met de vaststelling van neonicotinoïden in bijenbrood. Voorafgaand aan de bemonstering in augustus zal door het RIKILT een testanalyse op neonicotinoïden worden uitgevoerd op enkele test monsters die worden verzameld door het NCB.

De kosten van het onderzoek worden begroot op €85.000 ex. Btw.

## Output

Een rapport en eventueel een wetenschappelijk artikel/note over het voorkomen van neonicotinoïden en onderzochte pathogenen in honingbijen uit gebieden met hoge en lage sterfte in Nederland. Rapportage zal naar verwachting in het eerste kwartaal 2012 plaatsvinden.

## Literatuur

Alaux, e.a. (2010), J. Environmental Microbiology, Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*)

CHAUZAT (2011) e a , J. Environmental Toxicology, An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. Environmental Toxicology and Chemistry, 30, 103-111

Creswell (2011), J. Ecotoxicology 20, A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees

Frazier M, Mullin C, Frazier J, Ashcraft S. What have pesticides got to do with it? *Am Bee J.* 2008;148:521–523

Kamel (2010), J. Agric. Food Chem 58, 5926-5931

Monitor Uitwintering Bijenvolken 2010 (2011) van der Zee en Pisa, Rapport NCB

Monitor Bijenvolken 2008 en 2009, van der Zee, Data verzameling NCB.

Pihlström e.a. SANCO/10684/2009, Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed.