

# Een observationele studie naar wintersterfte bij honingbijvolken en de associaties met *Varroa destructor*, neonicotinoïden en andere risicofactoren

Romée van der Zee<sup>1\*</sup>, Alison Gray<sup>2</sup>, Lennard Pisa<sup>1</sup>, Theo de Rijk<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Nederlands Centrum Bijenonderzoek, Tersoal, Nederland, <sup>2</sup>Department of Mathematics and Statistics, University of Strathclyde, Glasgow, UK, <sup>3</sup>RIKILT Wageningen UR, Instituut voor Voedselveiligheid, Wageningen, Nederland

\*Contact : R. van der Zee, [romee.van.der.zee@beemonitoring.org](mailto:romee.van.der.zee@beemonitoring.org)

N.B. Dit rapport is een Nederlandse vertaling van het in PLoS ONE verschenen artikel 'An observational study of honey bee colony winter losses and their association with *Varroa destructor*, neonicotinoids and other risk factors'.

<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0131611>

## Samenvatting

In dit rapport wordt de analyse gepresenteerd van factoren, die betrokken zijn bij de sterfte in een steekproef van 86 bijenvolken tijdens de winter 2011–2012. De volken bevonden zich op 43 standen en werden geselecteerd met behulp van een ruimtelijk gestratificeerde, gerandomiseerde steekproef. De wintersterfte data werden gerelateerd aan data van een laboratoriumanalyse van monsters, die werden afgenomen van 2 geselecteerde volken op ieder van 43 deelnemende imkerijen, en aan kenmerken van die volken in de zomer van 2011. Het logistisch regressiemodel, dat de wintersterfte het best verklaarde, bevatte in volgorde van statistische betekenis (1) de mate waarin de *Varroa destructor* mijt in de volken aanwezig was in oktober 2011, (2) de aanwezigheid van de cyano-gesubstitueerde neonicotinoïden acetamiprid of thiacloprid in bijen, honing of bijenbrood (stuifmeelopslag) tijdens de eerste 2 weken van Augustus 2011, (3) de aanwezigheid van *Brassica napus* (koolzaad) of *Sinapis arvensis* (herik, wilde mosterd) in bijenbrood eveneens in begin augustus en (4) een maat voor onverklaarde bijensterfte voor het postcodegebied waarin de volken zich bevonden, verkregen uit een andere dataset. Wij overwegen in de discussie dat verminderde mogelijkheden voor de bijenvolken om te foerageren in juli en augustus als gevolg van slecht weer substantieel kan hebben bijgedragen aan de negatieve effecten van acetamiprid en thiacloprid. Nieuw is het gebruik in deze studie van postcode random effecten uit twee andere onafhankelijke datasets, die werden verzameld in de jaarlijkse landelijke Monitor Uitwintering Bijenvolken met behulp van vragenlijsten over wintersterfte van honingbijen in Nederland. Deze werden gebruikt om de steekproef te trekken voor de huidige studie en ook voor de modellering van de data. Bij het interpreteren van de resultaten van deze studie moet bedacht worden dat het een pilotstudie betreft met een beperkt aantal volken met als consequentie dat sterke effecten gevonden kunnen worden, maar mogelijke interactie effecten wellicht niet.

## Introductie

In Nederland lag de wintersterfte voor bijenvolken in de periode 2006–2013 boven de 20% [1–5]. Dit is hoger dan gerapporteerd door de meeste andere Europese landen [6]. De Nederlandse data zijn afkomstig van de jaarlijkse Monitor Uitwintering Bijenvolken, uitgevoerd door het Nederlands Centrum Bijenonderzoek (NCB). In deze monitors worden gegevens van bijenhouders verzameld over wintersterfte van hun bijenvolken en over de gevoerde imkerpraktijk met behulp van de internationaal gestandaardiseerde COLOSS vragenlijst [2–5]. Analyse van de jaarlijkse monitors laat o.a. zien dat imkers, die de ectoparasiet *Varroa destructor* (in deze studie aangeduid als “varroamijt”) in de winter én in de zomer bestrijden, een significant lager wintersterfterisico voor hun volken ondervonden dan imkers die alleen in de zomer bestreden. De wijze van varroabestrijding is daarom een belangrijke risicofactor voor de kans op bijensterfte en een belangrijke maatregel om de wintersterfte te beperken. Andere belangrijke factoren die regelmatig significant waren in de monitors waren het optreden van koninginnenproblemen, de mate waarin volken ingewinterd werden met een jonge koningin en de mogelijkheid van volken om bepaalde drachtbronnen te benutten (wilg, koolzaad, mais en heide). Het verklarend model in de jaarlijkse monitorrapporten [2–5] laat ook aanzienlijke variatie zien in het risico op wintersterfte tussen administratieve (postcode) gebieden. Daarbij werd rekening gehouden met effecten van significante voorspellende factoren voor bijensterfte, die werden berekend met

gegeneraliseerde lineaire mixed modellen (GLMMs; [7]). De verklarende modellen bevatten zowel bijenhouder als postcodegebied random effecten met specifieke (fixed) modelfactoren als b.v. varroabestrijding. Het in de monitors berekende postcode randomeffect kan worden opgevat als een maat voor onverklaarde ruimtelijke variatie in het risico op bijensterfte. Op dezelfde wijze is het imker random effect een maat voor onverklaarde variatie in het risico op bijensterfte samenhangend met factoren op imkerniveau. Specifieke ruimtelijke informatie, die potentieel van belang zou kunnen zijn, zoals landgebruik en het gebruik van agrarische gewasbeschermingsmiddelen, was in deze landelijke monitorstudies nog niet voorhanden. Deze ruimtelijke factoren kunnen echter wel medebepalend zijn voor de gevonden variatie in postcode effecten. Nader onderzoek in bijenvolken is nodig, om de grote onverklaarde variatie tussen postcode gebieden, die in de monitors gevonden wordt, verder te verkennen. Het huidige onderzoek, waarin gebruik gemaakt wordt van de postcode effecten uit de landelijke monitors, is zo'n observationele studie.

Vanwege de beperkt beschikbare financiële middelen moest een studieopzet ontwikkeld worden, waarmee tenminste de bijdrage van enige belangrijke mogelijke oorzaken verkend konden worden, als voorbereiding voor de opzet van een meer omvangrijke en kostbaarder longitudinale vervolgstudie. Daarbij overwogen wij de volgende mogelijke risicofactoren en de periode waarin mogelijke effecten op wintersterfte geobserveerd konden worden:

- (1) Tijdens de zomer moeten bijenvolken een populatie werksters opbouwen met voldoende levensduur om de soms lange Nederlandse winter met substantiële variaties in temperatuur te kunnen overleven. Ernstige belasting van parasieten in de zomer, of slecht weer met als gevolg verminderde foerageermogelijkheden, zijn bekende factoren die bemoeilijken dat een winterpopulatie met voldoende levensduur wordt opgebouwd, waardoor het risico op wintersterfte toeneemt [8, 9].
- (2) Een ander risico voor bijengezondheid, dat onderzocht en besproken wordt in een toenemend aantal publicaties, is de rol van agrarische gewasbeschermingsmiddelen en in het bijzonder de neonicotinoïden (zie [10] voor een overzicht). De rol van deze middelen is in veel media naar voren gebracht en bereikte daardoor een groot publiek. Dit heeft geleid tot discussies in het Nederlands parlement, (zie hiervoor [11]), die de aanleiding vormden tot de huidige pilotstudie om de effecten van deze middelen op wintersterfte onder bijenvolken te onderzoeken. Het gebruik van gewasbeschermingsmiddelen ligt in Nederland, met zijn belangrijke agrarische sector, op een hoog niveau. In 2008 werd bijvoorbeeld 5.605 ton actieve pesticiden ingrediënten gebruikt [12]. In het beperkt aantal beschikbare observationele studies, dat bij aanvang de huidige studie voor handen was en waarin o.m. neonicotinoïden werden onderzocht [13, 14,15], wordt gerapporteerd, dat verschillende in bijenvolken aanwezige matrices (was, honing, bijen en stuifmeel) sterk gecontamineerd kunnen zijn met pesticiden, waaronder neonicotinoïden als thiacloprid, imidacloprid en (het minder vaak gebruikte) acetamiprid. Deze monitorstudies richten zich vooral op pesticiden blootstelling van specifieke gewassen als koolzaad, zonnebloemen en mais. Het identificeren en specifiek onderzoeken van een bepaalde bron van contaminatie kan van belang zijn als een pesticide alleen op een specifiek gewas gebruikt wordt en honingbijen worden blootgesteld door het foerageren op dat gewas. In dat geval kunnen specifieke maatregelen overwogen worden om het risico op blootstelling te beperken. De belangrijkste middelen in de huidige studie worden echter breed gebruikt in de agrarische sector. Bijvoorbeeld het minst toxische neonicotinoïde, thiacloprid, beschouwd als veilig voor bijen, wordt gebruikt voor agrarische gewasbescherming van o.a. laatbloeiende gewassen als aardbei, framboos en

blauwe bes soorten. De producent adviseert toepassing van thiacloprid bevattende commerciële producten ook in het voorjaar, tijdens de bloei van fruit in open teelt [16]. Neonicotinoïden zijn ook aangetroffen in oppervlakte water [17] en kunnen zo andere drachtbronnen voor bijen contamineren, waardoor deze mogelijk een belangrijk risico vormen, een risico dat niet eenvoudig vermeden kan worden.

Op basis van deze overwegingen kozen wij blootstelling aan parasieten, pathogenen of pesticiden, tijdens de zomerperiode als basis voor onze studieopzet. Wij onderzoeken de aanwezigheid van agrarische gewasbeschermingsmiddelen in drie honingbijmatrices (honing, pollen en bijen), de mate van aanwezigheid van de varroamijt, *Nosema* spp. en een reeks virussen in de zomer, alsmede omvang van de imkerij, leeftijd van koninginnen en enige kenmerken van de volken als omvang en voedselvoorraad van het bijenvolk in deze periode. Wij onderzoeken tevens of de mate van varroamijt-belasting in oktober een goede voorspeller is van wintersterfte, zoals gevonden werd in een Duitse observationele studie [15].

Wij verzamelden gegevens over *Nosema* spp. in juli omdat wij in een longitudinale studie vonden dat een *Nosema ceranae* infectie meestal in hoge mate aanwezig was in deze maand (ongepubliceerde NCB data). De andere data werden verzameld gedurende stand bezoek in de eerste twee weken van augustus, om de effecten te bepalen van bovengenoemde factoren op de opbouw van de winterpopulatie. Deze planning was ook gekozen om rekening te houden met de wens van de deelnemende imkers om tijdig de zomerbestrijding van de varroamijt uit te voeren.

Tenslotte onderzoeken wij of het postcodegebiedseffect, zoals berekend in de Monitor Bijenvolken 2012 [4] voor de overwintering van bijenvolken in de winter van 2011–2012, behulpzaam kan zijn in het verklaren van de variatie in het risico op wintersterfte tussen postcodegebieden in de huidige studie. De berekende postcode effecten uit de Monitor 2011 [3] werden gebruikt om een ruimtelijk gestratificeerde steekproef te trekken voor de huidige studie. Het gebruik van postcodegebiedseffecten op deze manier heeft het voordeel dat een steekproef wordt genomen met een afgewogen representatie van gebieden met een hoog en laag risico op bijensterfte. De methode wordt hieronder beschreven. Voor zover ons bekend is dit de eerste observationele studie op volksniveau, met een studieontwerp gebaseerd op random effecten, zoals berekend met behulp van onderzoeksgegevens verkregen van imkers. Het gebruik van random effect termen in het modelleren van de onderzoeksdata is eveneens op een nieuwe manier uitgevoerd en levert een beter passend model op.

## Materiaal en Methoden

### Ethische verklaring

Varroamijten, bijen, bijenbrood en honing werden verzameld van bijenvolken met toestemming van de bijenhouders.

### Mogelijk concurrerende belangen

T. de Rijk verklaarde dat de noodzakelijke imidacloprid metabolieten (die bij aanvang van het onderzoek niet commercieel te verkrijgen waren) geschonken werden aan het RIKILT door Bayer Crop Science. Bayer Crop Science heeft noch invloed gehad op het ontwerp van de analytische procedure noch op het vaststellen van het pesticiden gehalte van de monsters. De auteurs verklaren dat er geen conflicterende belangen bestaan.

## Financiering

Dit onderzoek werd gefinancierd door een bijdrage van het Nederlandse Ministerie van Economische Zaken (<http://www.government.nl/ministries/ez>). De financier had geen rol bij het studieontwerp, de dataverzameling of analyse, beslissing te publiceren of de voorbereiding van het manuscript.

## Gebruik van gegevens uit de landelijke Monitors

### Uitwintering Bijenvolken 2010–2011 en 2011–2012 in de huidige studie

Uitkomsten van de analyse van eerder verzamelde sterfte data van honingbij volken van respectievelijk 1541 en 1673 imkers, die deelnamen aan de landelijke Monitors Uitwintering Bijenvolken 2011 [3] en 2012 [4] werden gebruikt voor de bemonsteringsopzet voor deze nieuwe studie en het onderzoek naar het meest passend model voor de verzamelde onderzoeksgegevens van de volken in de huidige studie.

Data over imkerpraktijk, wintersterfte van bijenvolken en locatie van volken werden verzameld met de internationaal gestandaardiseerde COLOSS vragenlijsten 2011 en 2012. De analyse werd uitgevoerd met een gegeneraliseerd lineair mixed model (GLMM; [7]) met een binomiale verdeling voor het aantal in de winter verloren volken van het aantal ingewinterde volken (zie ook [18]). Deze GLMMs maken gecorreleerde observaties mogelijk, d.w.z. het management van bijenvolken door imkers in postcodegebieden, hier aangegeven als “PC2 gebieden”. Nederland kan worden ingedeeld in 90 van zulke administratieve gebieden. Het is weinig waarschijnlijk dat bijenvolken onafhankelijk van elkaar verloren gaan, of niet verloren gaan, aangezien ze onderworpen zijn aan een gelijksoortige imkerpraktijken. Net zo is het waarschijnlijk dat er gemeenschappelijke factoren zijn, die van invloed zijn op de bijenvolken van imkers binnen een PC2 gebied, en dat die factoren ook verschillend kunnen zijn tussen die gebieden. Deze imker en gebied gerelateerde effecten zijn beide onderdeel van het onderzoek naar een passend model, waardoor de uitkomsten statistisch meer valide zijn dan bij een onafhankelijke behandeling van deze observaties. Imker- en gebiedseffecten werden beide als random intercepts in de modellen opgenomen [7], om de effecten van imkerpraktijk en PC gebied van elkaar te onderscheiden. Effecten van imkerpraktijk werden in het model gespecificeerd als ‘fixed effects’ (specifieke effecten van belang). De volgende factoren waren significant in de analyse van de data van de Monitor Uitwintering Bijenvolken 2012: het foerageren op heide (lagere kans op wintersterfte,  $p < 0,0001$ ), varroabestrijding (bestrijding in de zomer én winter, of alleen in de winter (lagere kans op wintersterfte vergeleken met alleen bestrijding in de zomer,  $p = 0,0034$ ), foerageren op mais (ja/nee, hogere kans op wintersterfte indien foerageren ja,  $p = 0,0046$ ), raatvernieuwing (meer raatvernieuwing

vertoonde een lager risico op sterfte,  $p=0,0228$ ) en foerageren op wilg in het voorjaar (ja/nee, lagere kans op sterfte bij ja,  $p=0,0484$ ).

Een volledige analyse van de Monitor 2011 data was nog niet beschikbaar op het moment dat de steekproef voor de huidige studie werd voorbereid en uitgevoerd. De random effectwaarden voor de PC2 gebieden ("PC 2011 effecten") werden daarom berekend voor een model met alleen een intercept i.p.v. een model met ook verklarende factoren. Bij het modelleren van de data werd gebruik gemaakt van de gegevens van 1412 imkers, allen lid van een van de drie nationale imkerorganisaties, met in totaal 12.924 volken bij inwintering in 2010. Zij stuurden hun gegevens voor 15 juni 2011 en leverden valide informatie over wintersterfte en postcodegebied.

Wij gebruikten de waarden van de postcode random effecten (PC 2011), hier in het algemeen aangeduid als "postcode effecten" zoals verkregen uit de Monitor 2011, om de imkerijen te selecteren voor de huidige studie. Wij gebruikten ook de corresponderende postcode random intercepts (PC12 effecten) uit de analyse van de Monitor 2012 als fixed effect (een covariaat) in gegeneraliseerde lineaire regressie modellen (GzLMs [7]). Zie het bemonsteringsschema en de statistiekparagraaf beneden voor verdere details. In een andere context bediscussiëren de auteurs van [19] de voordelen van het gebruik van random intercepts verkregen uit het een bepaald model als waarden voor een voorspellende variabele in een ander model. Fig. 1 toont deze PC12 effecten afkomstig van de datamodellering uit de Monitor 2012 analyse. Daaruit blijkt dat er een aanzienlijke ruimtelijke variatie is tussen PC gebieden wat betreft deze effecten die de onverklaarde wintersterfte representeren. (Een soortgelijke map is beschikbaar in [4], maar omdat dat rapport in het Nederlands is, en daarom nog niet toegankelijk voor een internationale lezerskring, is Fig. 4 hier beschikbaar).

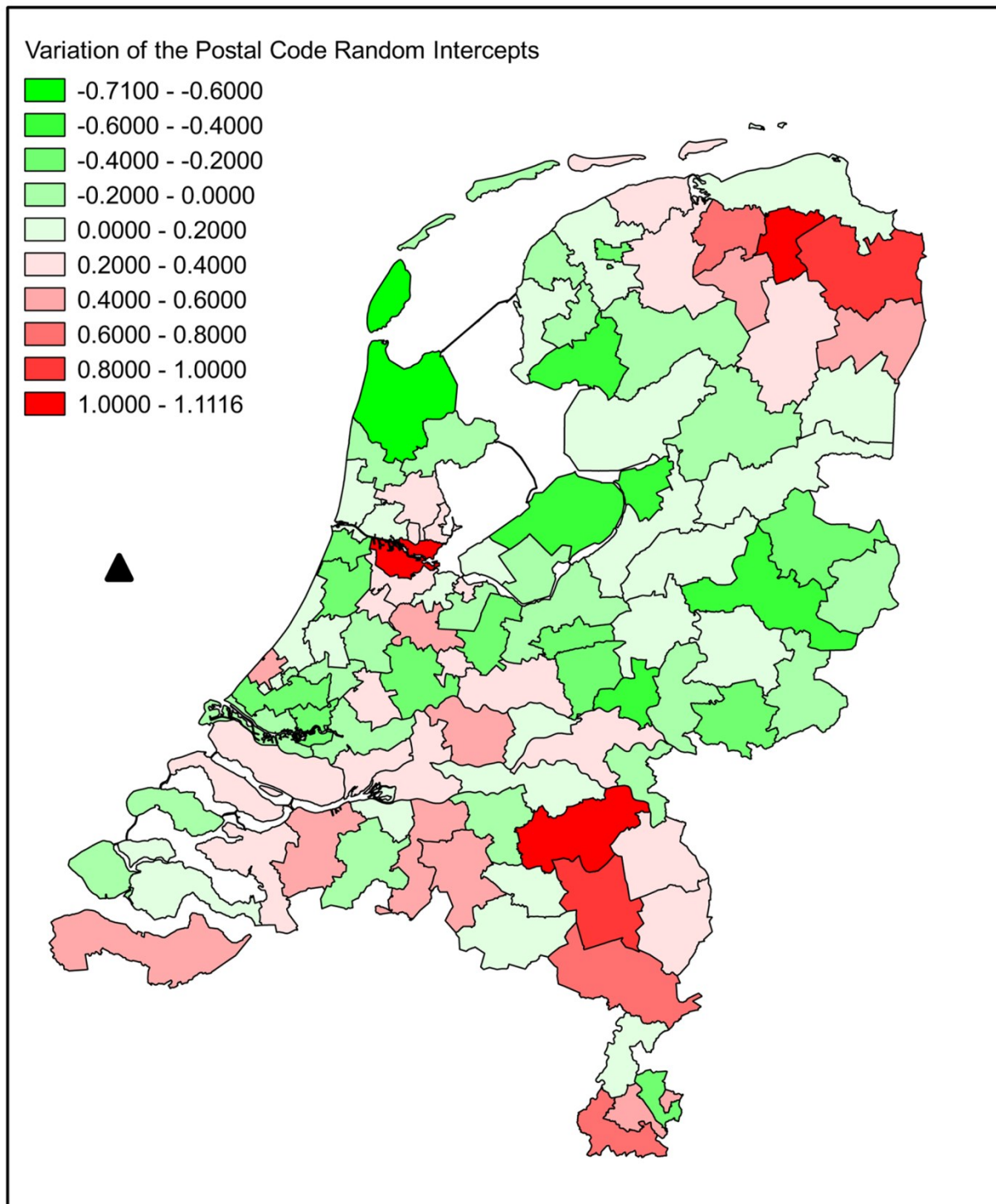


Fig1. Choroplethische kaart van de ruimtelijke variatie in postcode random effecten. Deze effecten werden berekend met een binomiale GLMM met daarin **significante fixed factoren voor bijenhouders-risico op wintersterfte van hun bijenvolken en met een postcode random effect**, voor de imkerijen met 1–50 tot volken, die gebruikt werden in de model fitting. De data zijn afkomstig van de Nederlandse Monitor Uitwintering Bijenvolken 2012. De legenda in de figuur vertoont de sleutel tot de kleurcodering. Donkergroen wijst op gebieden met een lager risico en donkerder rode gebieden op een

hoger risico op sterfte. De waarde van de postcode effecten werd gebruikt als voorspeller in het eindmodel van de data in de huidige studie.

## Bemonsteringsschema

De waarden van de PC11 postcode effecten die berekend werden met het mixed model uit de Monitor 2011 gegevens voor de winter 2010–2011 [3] werden gebruikt om de imkers in 2 groepen te splitsen. Alleen imkers met minimaal 5 uitgewinterde volken in het voorjaar van 2011 kwamen in aanmerking voor de steekproef, om zekerheid te hebben over de beschikbaarheid van tenminste 2 volken tijdens de bemonstering. Om een afgewogen verhouding te verkrijgen tussen imkerijen uit gebieden met hoge en lagere kans op sterfte werden de imkers eerst gesplitst in imkers uit gebieden met een negatief (lagere kans op wintersterfte), en imkers uit gebieden met een positief (hogere kans op wintersterfte) postcode effect. Vervolgens werd een gerandomiseerde steekproef van 43 imkers genomen, met 21 imkers uit postcodegebieden met een lagere (negatieve) kans op wintersterfte en 22 uit postcodegebieden met een hogere (positieve) kans. De mate van risico kon niet geheel verklaard worden uit eerdere modellering van data. Omdat deze gebieden met een verschillende mate van risico verondersteld worden te variëren in een andere, tot nu toe onbegrepen wijze, overwogen wij dat het van belang was dat zowel hoog als laag risicogebieden goed in de steekproef vertegenwoordigd waren. De gevolgde strategie was een eenvoudige manier om dit te bereiken. Eén imker bleek 3 volken te hebben i.p.v. 5 of meer. Van iedere imker werden 2 volken geselecteerd en opgenomen in de studiesteekproef (omvang N=86). De deelnemers werd gevraagd de volken niet te verplaatsen naar andere standen tijdens de studieperiode, die begon op 1 juli 2011.

Het bemonsteren van de volken werd uitgevoerd volgens het volgende schema:

1. **Gedurende de laatste week van juli** werden tussen 11.00 en 14.00 uur 35 bijen verzameld van voor de gesloten vliegopening. De monsters werden in situ geconserveerd op ethanol 70% en voor analyse verstuurd naar Warsaw University of Life Sciences, faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology and Veterinary Diagnostics Laboratory of Bee Diseases, Polen voor analyse op *Nosema* spp., percentage geïnfecteerde bijen per monster en bandsterkte van zowel *Nosema ceranae* als *Nosema apis*.
2. **Gedurende de eerste 2 weken van augustus 2011** werd een monster van 50 bijen afgenomen – 25 van ramen met broed en 25 van ramen zonder broed – voor residu analyse van pesticiden. De monsters werden in situ opgeslagen op droog ijs (–80° C) en geconserveerd op deze temperatuur voor een periode van maximaal 2 dagen tot aflevering bij het RIKILT laboratorium in Wageningen, waar alle monsters geconserveerd werden op –20° C tot de analyse. Minimaal 30 bijen werden op eendere wijze genomen voor virusanalyse. Deze bijenmonsters werden eveneens in situ op droog ijs (–80° C) opgeslagen en verstuurd naar het Food and Environment Research Agency (FERA) in York, Engeland, voor analyse. Vervolgens werden tenminste 50 cellen bijenbrood (opgeslagen stuifmeel) verzameld. De helft van het monster werd gebruikt voor analyse op gewasbeschermingsmiddelen door het RIKILT, de andere helft voor palynologische determinering door het Animal Ecology team van ALTERRA in Wageningen. Rijpe en halfrijpe honing werd verzameld uit ieder volk voor analyse op pesticiden, in situ



opgeslagen op droog ijs ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) en verstuurd naar RIKILT en ALTERRA, waar alle monsters geconserveerd werden op  $-20^{\circ}\text{C}$  tot de analyse.

3. **Gedurende de laatste week van juli en de laatste week van oktober** werden per volk 200–250 bijen verzameld door de imker en verstuurd naar het Nederlands Centrum Bijenonderzoek (NCB) voor de bepaling van de varroamijt belasting.

## Statistische analyse

De statistische analyse werd uitgevoerd met het softwarepakket R [20] en SPSS 20. Beschrijvende statistiek, statistische tests en generaliseerde lineaire modellering werden gebruikt. De staafdiagrammen werden vervaardigd met Excel. De kaart werd geproduceerd met QGIS versie 2.0.1–Dufour (beschikbaar op <http://www.qgis.org/en/site/index.html>). Correlaties tussen omvang imkerij (het totaal aantal ingewinterde volken van de deelnemende imkers per 1 oktober 2011) en aantal mijten per 100 bijen (varroamijt ratio), werden met Pearson correlatie (geschikt voor data die bij benadering (bivariaat) normaal verdeeld zijn) berekend.

Spearman's rank correlatie (geschikt voor niet-normaal verdeelde continu data) werd gebruikt om de correlatie te berekenen tussen postcodegebied random effect en de varroamijt ratio. Hierbij werden p-waarden lager dan 0,05 beschouwd als significant. Met een two-sample Mann-Whitney U-test werden verschillen in waarde van het postcode random effect getest tussen 2 groepen, gedefinieerd door een binair voorspellende variabele (aanwezigheid van een pesticide in pollen).

Wij gebruikten een logistische GzLM om associaties te bepalen tussen voorspellende variabelen – zoals omvang van de imkerij, grootte van het volk en aantal ramen met broed, de varroa mijt ratio, aanwezigheid van de verschillende pesticiden in honingbij matrices de aanwezigheid van planten families in pollen en de postcode gebiedseffecten uit de Nederlandse Monitor 2012 – en het risico op wintersterfte in de steekproef. In dit GzLM model werd het aantal dode volken in het voorjaar 2012 als afhankelijke variabele genomen en werd een binomiale distributie verondersteld. Omdat het aantal bemonsterde volken (2) per imker gelijk was, hoefde geen rekening te worden gehouden met mogelijke extra-binomiale variatie in de data. Eerst werden modellen met maar één factor (de verschillende onderzoeksvariabelen als voorspellende factor of covariaat) getest, om factoren te identificeren, die geassocieerd waren met wintersterfte. De PC2–2012 gebiedseffecten werden gebruikt als een van die voorspellende variabelen. De variabelen die verder in aanmerking kwamen waren varroamijt bestrijding, percentage raatvernieuwing, gerapporteerd foerageren op mais (wijd en zijd gebruikt in Nederland) en heide (beperkt tot specifieke gebieden in Nederland). Zowel de dataset uit de huidige studie als de Monitor 2012 hebben betrekking op de winter 2011–2012.

Vervolgens werd het best passende model bepaald door het toevoegen van alle variabelen, die significant waren in de enkele factor analyse en die significant bleven in het multifactor model. Wij beoordeelden het AIC (Akaike's Informatie Criterium) voor het model als iedere term uit het model werd verwijderd, een voor een, en ook de corresponderende likelihood ratio test (LRT) statistiek met daarbij horende p-waarde. Een stijging in de AIC als de term verwijderd werd, samen met een significante LRT p-waarde, geeft aan dat de term niet verwijderd behoort te worden uit het model, omdat deze significant bijdraagt aan het verklaren van het risico op wintersterfte van de bijenvolken.

# Chemische analyse

## Referentie Standaarden

De meeste referentie standaardstoffen werden aangekocht van commerciële leveranciers. De imidacloprid metabolieten werden geschonken door Bayer Crop Science (tabel S1). Een combinatie oplossing werd bereid door het mengen van verschillende stockoplossingen van de individuele gewasbeschermingsmiddelen (tabel S1). Acetonitril, methanol, (alle van HPLC kwaliteit of beter) en HPLC kwaliteit water werden verkregen van Biosolve (Valkenswaard, Nederland). Azijnzuur, natrium sulfaat en magnesium sulfaat werden verkregen van Merck (Darmstadt, Duitsland) en mierenzuur en ammonium fosfaat werden verkregen van Sigma-Aldrich (Zwijndrecht, Nederland).

## Extractie

### Bijen

1,0 ( $\pm$  0,05) g van bevroren monstermateriaal werd afgewogen in een 50 ml Greiner tube. Extractie werd uitgevoerd door 3,0 ml water toe te voegen, direct gevolgd door 4,0 ml extractie vloeistof (azijnzuur/acetonitril = 1/99 (v/v)). Het monster werd gehomogeniseerd gedurende 1 minuut met behulp van een ultra-turrax, gevolgd door toevoeging van 1,6 g  $\text{MgSO}_4$  en 0,40 g natrium acetaat. Na homogenisering (vortex gedurende 30 s) en centrifugering (5 minuten op 2000 tpm) werd 250  $\mu\text{L}$  van het extract verdund met 250 ml water en gefilterd met behulp van een 0,45  $\mu\text{m}$  filter (Mini-UniPrep, Whatman, Forham Park, NJ), resulterend in een matrix equivalent in het extract van 0.125 g/ml.

### Honing en Bijenbrood

De extractieprocedure voor honing en bijenbrood was identiek aan de procedure zoals hierboven beschreven voor bijen met één uitzondering: de ultra-turrax homogeniseringstap werd vervangen door intensief schudden gedurende 30 minuten. De monsters werden eerst gehomogeniseerd met water voordat de extractievloeistof werd toegevoegd.

## Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) analyse

Voor de LC-MS/MS analyse werd een Shimadzu high performance liquid chromatography (HPLC) systeem (Shimadzu 's-Hertogenbosch, Nederland) en een Applied Biosystems 5500 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems Bleiswijk, Nederland) toegerust met een electrospray (ESI) bron gebruikt voor de bepaling van de gewasbeschermingsmiddelen. Scheiding werd uitgevoerd op een 100 mm  $\times$  3,0 mm i.d., 3,0  $\mu\text{m}$  Atlantis T3 C-18 kolom (Waters, Etten-Leur, Nederland) met een debiet van 0,40 ml/minuut. De kolomtemperatuur werd op 35°C gehouden. Eluent A was water met 5 mM ammonium formaat en 0,1% (v/v) mierenzuur. Eluent B was water/methanol 5/95 (v/v) met 5 mM ammonium formaat en 0,1% (v/v) mierenzuur. De HPLC gradiënt startte met 100% A gedurende 0,5 minuten, werd lineair opgevoerd tot 100% B gedurende 4,0 minuten, en gehouden op dit percentage gedurende 4,5 minuten. Tenslotte werd de gradiënt weer gewisseld naar 100% A gedurende 0,5 minuten en geëquilibreerd gedurende 4,0 minuten voor de volgende injectie plaatsvond. Het injectievolume was 10  $\mu\text{L}$ .

## MS/MS Conditities

ESI-MS/MS werd uitgevoerd met een scheduled multiple reaction monitoring (sMRM) in positive modus en multiple reaction monitoring (MRM) in negative modus. In sMRM modus was het detection window ingesteld op 90 s en de target scan tijd was ingesteld op 0,5 s. In MRM modus werd de acquisitie uitgevoerd met 10 ms dwell time. Voor beide scan typen was de settling time en pause time ingesteld op 5 ms. Het aantal datapunten in de breedte van de pieken was tenminste acht. De instellingen van de ESI-bron waren als volgt: bron temperatuur 300 °C, curtain gas 20 psi, bron gas 1 60 psi, bron gas 2 60 psi, ion spray voltage –2000 V (neg. mModus) en + 5500 V (pos. Modus) en collision gas (stikstof): medium. De analiet-afhankelijke parameters (declustering potential (DP), collision energy (CE) en cell exit potential (CXP) zijn weergegeven in tabel S2.

## Verificatie van recovery en matrix effecten

Voor de bevestiging van de terugvinding van de verschillende extractie methoden, werd iedere matrix versterkt tot niveaus als weergegeven in de S3 tabel. Ook werd een geaddede monster aan de test set toegevoegd. Het extract van het niet geaddede monster werd ook gebruikt voor de bereiding van een matrix-matched kalibratie curve. In de LC- MS/MS sequentie, voor iedere matrix werden de vijf monsterextracten bewerkt met bracketing door de matrix-matched kalibratie standaard (en een oplosmiddelstandaard met dezelfde concentratie). Gemiddelde terugvindingen en relatieve standaard deviaties (RSDs) werden berekend voor de geaddede monsters tegen matrix-matched standaards. De verkregen terugvindingen reflecteren daarom de terugvinding van de extractieve procedure (S3-S5 Tabellen).

## Validering

Aan alle drie de matrices werden in 5-voud op drie niveaus bekende hoeveelheden van de te onderzoeken gewasbeschermingsmiddelen toegevoegd (1x, 2x and 10x spiking niveau (SL), tabellen S3-S5). Bepaalbaarheidsgrenzen (Limits Of Quantification, LOQ) werden ingesteld op het laagste toevoegingsniveau, met uitzondering van imidacloprid urea en thiacloprid in bijenbrood, waarvoor hogere LOQ's van 1,0 en respectievelijk 2,0 µg/kg werden ingesteld. Voor sommige gewasbeschermingsmiddelen was het uitvoerbaar om een detectiegrens (Limit Of Determination, LOD) te bepalen, die lager lag dan de LOQ en voldeed aan voorwaarden gesteld aan de analytische parameters ion-ratio en retentietijd [21]. Gewasbeschermingsmiddelen die aanwezig waren op een  $LOD < x < LOQ$  niveau werden gerapporteerd als "spoor". Matrix-matched kalibratie ijklijnen werden geconstrueerd door de gecombineerde stock-oplossingen 500, 2000, 5000, 20000, en 40000 keer te verdunnen (tabel S1) met extracten van blanco honing, bijen en bijenbrood. Deze standaarden werden getoetst op lineariteit van respons versus concentratie. In de LC-MS/MS sequentie werd de 2000 keer verdunde matrix-matched standaard bij herhaling geanalyseerd na iedere 5-8 injecties. De terugvinding ("recovery") werd berekend gebaseerd op een one-point matrix-matched kalibratie, waarbij het gemiddelde van de 2000 keer verdunde matrix-matched standard werd gebruikt voorafgaand en volgend op het monster ("bracketing calibration").

## Analyse op aanwezigheid van pathogenen

### Varroamijt belasting

De proportie van phoretische mijten per 100 bijen (varroamijt ratio) werd bepaald volgens OIE protocol [22].

### Virus analyse

Een real-time PCR werd uitgevoerd met een suite van TaqMan tests als beschreven in Chantawannakul et al. (2006) [23] die detectie mogelijk maakt van: *chronic bee paralysis virus* (CBPV), *acute bee paralysis virus* (ABPV), *Apis iridescent virus* (AIV), *Kashmir bee virus* (KBV), *sacbrood virus* (SBV), *deformed wing virus* (DWV), *black queen cell virus* (BQCV) en *Israeli acute paralysis virus* (IAPV).

### *Nosema* spp. analyse

De abdomens van de verzamelde honingbijen werden geplet in Eppendorf tubes met gebruik van vloeibaar stikstof en sealed pipette tips. 0,5 ml gedistilleerd water werd aan iedere tube toegevoegd. 0,5 ml en gemixt met de abdomens. Een combinatie monster werd gemaakt door 0,1 ml oplossing af te nemen van iedere tube. Dit combinatiemonster werd gedurende 6 minuten gecentrifugeerd op 800 tpm. Uit het pellet werd DNA geëxtraheerd met Dneasy Plant Mini Kit (Quiagen) volgens protocol van de producent. De geëxtraheerde monsters werden bewaard op  $-20^{\circ}\text{C}$  tot verdere verwerking. De thermale opzet en alle andere PCR condities werden geïmplementeerd volgens [24]. Elektroforese van het PCR product werd uitgevoerd in 1,5 agarose gel gekleurd met ethidium bromide. Daarna werd het product gevisualiseerd onder UV licht. Als het resultaat positief was werden de individuele bijen van de resterende monsters beoordeeld met behulp van lichtmicroscopie. Een hoeveelheid van 2 ml van de sporenoplossing werd geplaatst op een IFI slide en de aanwezigheid van sporen werd onderzocht.

## Palynologische bepalingen

Bijenbrood afkomstig uit ongeveer 25 bijenraatcellen werd gebruikt om de pollensamenstelling van ieder monster vast te stellen. De gecombineerde inhoud van deze cellen werd intensief gemengd en opgeslagen in containers met 70% ethanol. Monsters voor microscopische inspectie werden bereid door een klein deel van het opgeslagen bijenbroodmengsel op te lossen in 2 ml water. Twee druppels van deze pollenoplossing werden op een observatieglas geplaatst en bedekt met een glycerinegel met basic fuchsin om de pollenkorrels te kleuren. Identificatie vond plaats onder een lichtmicroscop met 400 keer vergroting en met behulp van een collectie referentiepollen van ongeveer 130 species en referentiedocumenten (zie [25]). Voor ieder monster schatten we de bijdrage (%) voor ieder pollen taxon van het totaal aantal pollenkorrels. Pollen taxa werden geïdentificeerd tot het laagst mogelijke taxonomische niveau.

## Kenmerken van de volken

Tijdens de bemonstering in augustus 2011 werden verschillende gegevens geschat over de toestand van de 86 studievolkten. Het betrof (1) omvang van het volk (aantal ramen met bijen), (2) omvang

broednest (aantal ramen met broed), (3) aanwezigheid en hoeveelheid van pollen boven het broednest (gecategoriseerd als goed, redelijk, matig en slecht), (4) aanwezigheid van pollen naast het broednest als af/aanwezig en (5) leeftijd koningin. De volken werden verder onderzocht op zichtbare kenmerken van bijenziekten.

Aan de deelnemende imkers werd in januari en april 2012 gevraagd naar de verloren volken uit de studiepopulatie gedurende respectievelijk de perioden 1 september 2011 – 31 december 2011 en 1 januari 2012 – 31 maart 2012. Voor het bepalen of een volk als verloren moest worden beschouwd werd gebruik gemaakt van de zaakdefinities in het COLOSS BEEBOOK [26].

## Resultaten

### Verloren volken

Van de 86 volken in de studiesteekproef gingen er in totaal 25 (29,1%) verloren tussen 1 september 2011 en 1 april 2012. 9 (10,5%) volken gingen verloren in de periode 1 september 2011 – 31 december 2011 en in de periode Januari–maart 2012 gingen nog eens 16 (18,6%) volken verloren. **Met de het onderzoek naar een passend model werden geen associaties gevonden tussen het risico op sterfte in de steekproef en omvang van de imkerij.**

Geen associatie werd gevonden tussen het risico op bijensterfte in de studiesteekproef en de omvang van de imkerij van de deelnemende imkers ( $p=0,681$ , alhoewel het resultaat van de gerandomiseerde steekproef samenstelling was, dat maar 1 imker in de steekproef meer dan 50 volken had. Een sterke relatie werd gevonden tussen het risico op wintersterfte (0, 1 of 2 volken verloren) voor de 2 volken van iedere imker uit het steekproef en het risico op wintersterfte voor hun hele imkerij, zoals berekend met de data van de Monitor Uitwintering Bijenvolken 2012 ( $p<0,0001$ ). Deze analyse werd uitgevoerd om bevestiging te verkrijgen of de steekproef van imkers die geselecteerd werden voor deze studie consistent was met de veel grotere steekproef gebruikt in de Monitor 2012. Er werden geen associaties gevonden ( $p=0,806$ ) tussen het aantal ramen met broed in augustus en de wintersterfte in de volken uit de steekproef, noch voor het aantal ramen bezet met bijen (afnemend risico voor een toenemend aantal ramen met bijen,  $p=0,155$ ), alhoewel dit laatste effect zou kunnen wijzen op een betere overwintering.

### Kenmerken van de volken

In totaal 68 van 86 volken ontvingen aanvullende suikeroplossingen voor of tijdens de bemonstering in de eerste 2 weken van augustus 2011. De variatie tussen imkers wat betreft het precieze ogenblik waarop het tekort aan voedsel werd geconstateerd, en daarmee de start van het bijvoeren, verhinderde een goede vergelijking van de voedselvoorraad tussen de volken uit dit onderzoek. In 5 volken was geen honing en geen stuifmeel aanwezig. In 5 volken werd de stuifmeelkrans om het broednest als goed beoordeeld, redelijk in 14, matig in 27, bijna afwezig in 33 en geheel afwezig in 7 volken. Er werden geen significante associaties gevonden tussen de mate waarin een pollenkrans aanwezig was om het broednest ( $p=0,385$ ) of de mate van pollenaanwezigheid in het raam aansluitend op het broednest ( $p=0,887$ ) in de eerste 2 weken van augustus 2011 en het risico op wintersterfte. Evenmin als in de landelijke monitor 2012 werd een effect gevonden voor een kans op wintersterfte ( $p=0,921$ ) gerelateerd aan de leeftijd van de koningin.

### Varroamijt gerelateerde effecten

Geen associaties werden gevonden tussen het risico op bijensterfte ( $p=0,554$ ) en de varroamijt ratio in de laatste week van juli. De varroamijt ratio voor de afgenomen monsters in de laatste week van oktober kon worden berekend voor 81 van de 86 volken in de steekproef. Voor de missende 5 volken waren geen gegevens beschikbaar omdat 3 volken verloren gingen voordat de bemonstering in de laatste week van oktober plaatsvond en de overige 2 volken omdat met de bijenhouder in deze periode geen contact gelegd kon worden. **Een sterke positieve associatie ( $p<0,001$ ) werd gevonden tussen een**

toenemende varroamijt belasting in oktober en een toenemend risico op bijensterfte. Dit bevestigt de uitkomst van andere studies [15, 27]. Er was geen significante correlatie tussen de varroamijt ratio en omvang van de imkerij ( $p=0,597$ ).

## Associaties tussen de aanwezigheid van pesticiden en wintersterfte

In 15 volken waren sporen van neonicotinoïden aanwezig op een niveau boven het detectie niveau (Limit Of Detection; LOD), maar beneden kwantificeringsniveau (Limit Of Quantification; LOQ). Deze observaties werden als positief beschouwd en kregen een waarde toegekend van 0,05 bij het uitvoeren van de analyse.

Imidacloprid (inclusief zijn metaboliet imidacloprid desnitro), acetamiprid en thiacloprid werden gevonden in pollen, honing of bijen van 37 volken in de steekproef ( $n=86$ ). Geen andere neonicotinoïden werden gevonden (zie S6 tabel).

De chemische synergist piperonyl-butoxide werd gevonden in de pollen van 6 volken. Fipronil, fipronil-sulfide, fluvalinate-tau en propiconazole werden alleen in een beperkt aantal matrices gevonden. Een opmerkelijk hoge waarde ( $371 \mu\text{g/kg}$ ) voor propiconazole contaminatie werd gevonden in 1 van de monsters (zie tabel S6 voor meer gedetailleerd beschrijvende informatie).

De statistische analyse werd beperkt tot de groep van neonicotinoïden in plaats van alle pesticiden, omdat alleen voor deze groep een voldoende aantal monsters aanwezig was (S6 tabel).

Eerst onderzochten we het effect van de aanwezigheid van tenminste 1 van de neonicotinoïden (acetamiprid, imidacloprid (of imidacloprid desnitro) of thiacloprid) in volken, vergeleken met volken waarin geen neonicotinoïden gevonden werden. De kans op wintersterfte in de groep volken ( $n=37$ ), waarin de neonicotinoïden (acetamiprid, imidacloprid (of imidacloprid desnitro) of thiacloprid) aanwezig waren in 1 of meer matrices (bijen, honing of pollen), was hoger ( $p=0,014$ ) vergeleken met volken ( $n=49$ ) waarin geen neonicotinoïden aanwezig waren.

Wij testten vervolgens het risico op wintersterfte voor de aanwezigheid van tenminste 1 van deze neonicotinoïden voor iedere matrix apart. Aanwezigheid van deze neonicotinoïden in pollen ( $n=24$ ) was niet geassocieerd ( $p=0,209$ ) met hoger risico op bijensterfte vergeleken met volken zonder neonicotinoïden in pollen ( $n=55$ ). Maar een sterke associatie werd gevonden tussen een hogere kans op wintersterfte en aanwezigheid ( $n=23$ ) van een van deze neonicotinoïden in honing ( $p=0,002$ ) vergeleken met afwezigheid ( $n=57$ ) van neonicotinoïden. Dit vonden wij ook voor neonicotinoïden in bijen ( $n=14$ ) ( $p=0,014$ ) vergeleken met volken ( $n=70$ ) zonder neonicotinoïden in bijen.

We onderzochten vervolgens de aanwezigheid in tenminste één van de matrices van de stoffen thiacloprid, acetamiprid en imidacloprid apart, en bepaalden opnieuw het effect op het risico op

wintersterfte vergeleken met de 49 volken zonder aanwezigheid van neonicotinoïden in de matrices.

Volken met thiacloprid in tenminste één van de matrices ( $n=30$ ) ondervonden een significant hogere kans op sterfte ( $p=0,009$ ) dan volken zonder neonicotinoïden. De hogere kans op sterfte als acetamiprid aanwezig was in tenminste 1 van de matrices ( $n=11$ ), vergeleken met volken zonder neonicotinoïden, was niet significant ( $p=0,065$ ). Het effect voor de 10 volken met imidacloprid (of imidacloprid desnitro) in tenminste één van de matrices was ver van significantie ( $p=0,0461$ ). Ook het risico voor vroege wintersterfte (voor 1 januari 2012) was significant ( $p=0,461$ ) hoger als thiacloprid in de volken aanwezig was (in bijen, honing of pollen) vergeleken met volken zonder neonicotinoïden.

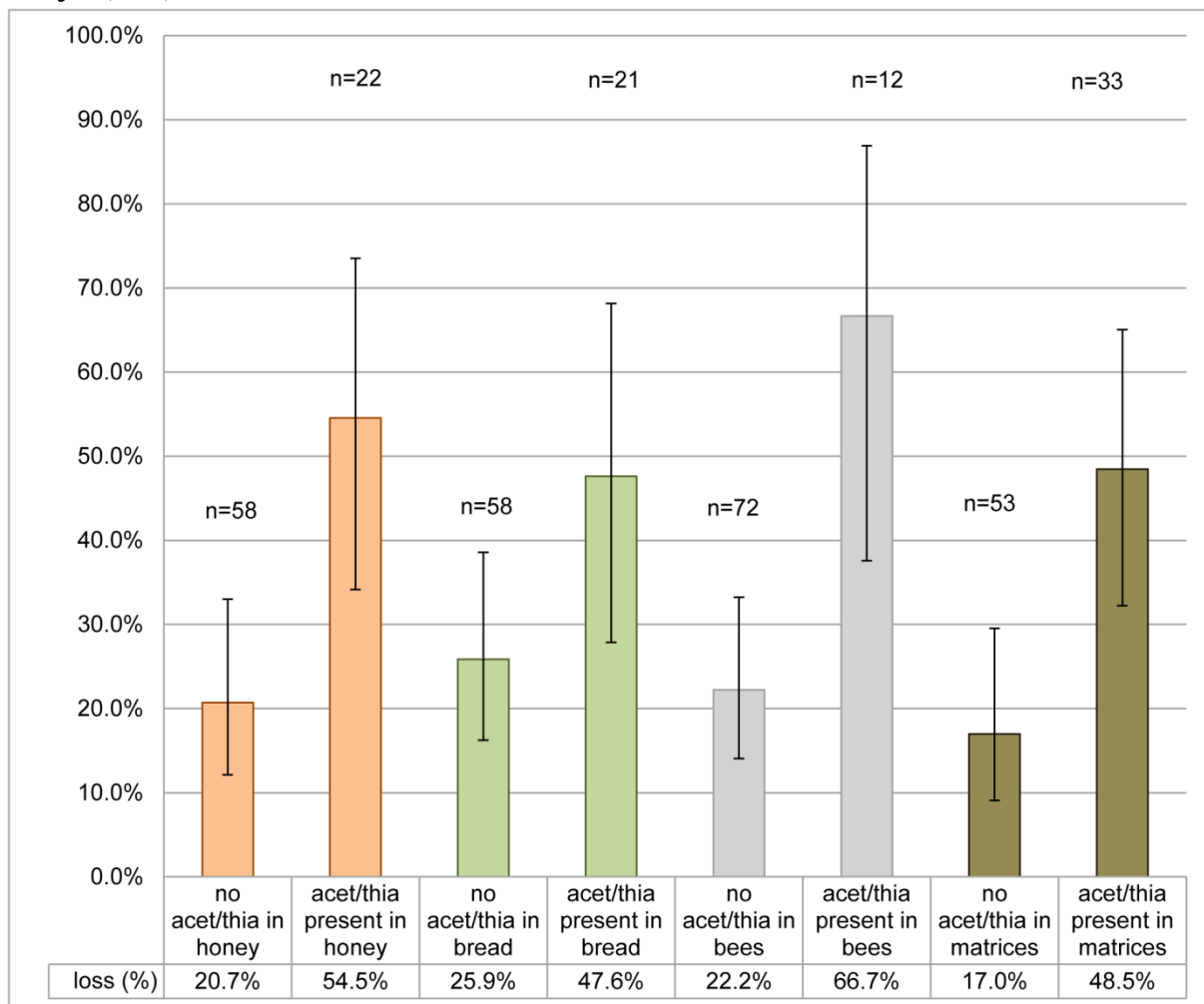
Aanwezigheid van thiacloprid in honing ( $n=21$ ) was geassocieerd ( $p=0,007$ ) met hogere kans op wintersterfte vergeleken met de volken zonder neonicotinoïden. Zulke effecten werden ook gevonden voor de aanwezigheid van thiacloprid in bijen ( $n=10$ ,  $p=0,003$ ) en in pollen ( $n=19$ ,  $p=0,039$ ) vergeleken met volken zonder neonicotinoïden.

Wij vonden dat wanneer acetamiprid aanwezig was, meestal (in 8 van de 11 gevallen) ook thiacloprid aanwezig was in de monsters. Deze twee cyano-gesubstitueerde neonicotinoïden hebben een vergelijkbare chemische structuur, verschillend van het N-nitroguanidine imidacloprid [28, 29]. Daarom creëerden we een nieuwe combinatiefactor 'acetamiprid of thiacloprid aanwezig ja/nee', waarmee wordt aangegeven dat wel of niet tenminste één van de matrices honing, bijen of pollen gecontamineerd was met thiacloprid of acetamiprid. Met het op deze wijze combineren nam bovendien de statistische validiteit van de geschatte modeleffecten toe omdat acetamiprid in maar weinig volken aanwezig was (en dit zou kunnen verklaren waarom het effect van acetamiprid op zichzelf net niet significant geassocieerd was met de kans op sterfte).

Als thiacloprid of acetamiprid aanwezig waren in tenminste één van de matrices ( $n=33$ ), was de kans op wintersterfte significant hoger ( $p=0,0025$ ) vergeleken met alle overige volken ( $n=53$ , nu dus inclusief volken waarin imidacloprid aanwezig was), waarin thiacloprid of acetamiprid niet gevonden werd in tenminste één van de drie matrices. Fig. 2 toont dit wintersterftepercentage met 95% betrouwbaarheidsintervallen voor volken met en zonder acetamiprid of thiacloprid. Er is duidelijk hogere sterfte wanneer een of beide aanwezig zijn in bijen, in honing, of in enige van de drie matrices.



**Figuur 2, Percentage verloren volken, met 95% betrouwbaarheidsinterval, voor volken met/zonder acetamiprid of thiacloprid (afgekort als acet/thia) aanwezigheid in honing (honey), bijenbrood (bread) of bijen (bees).**

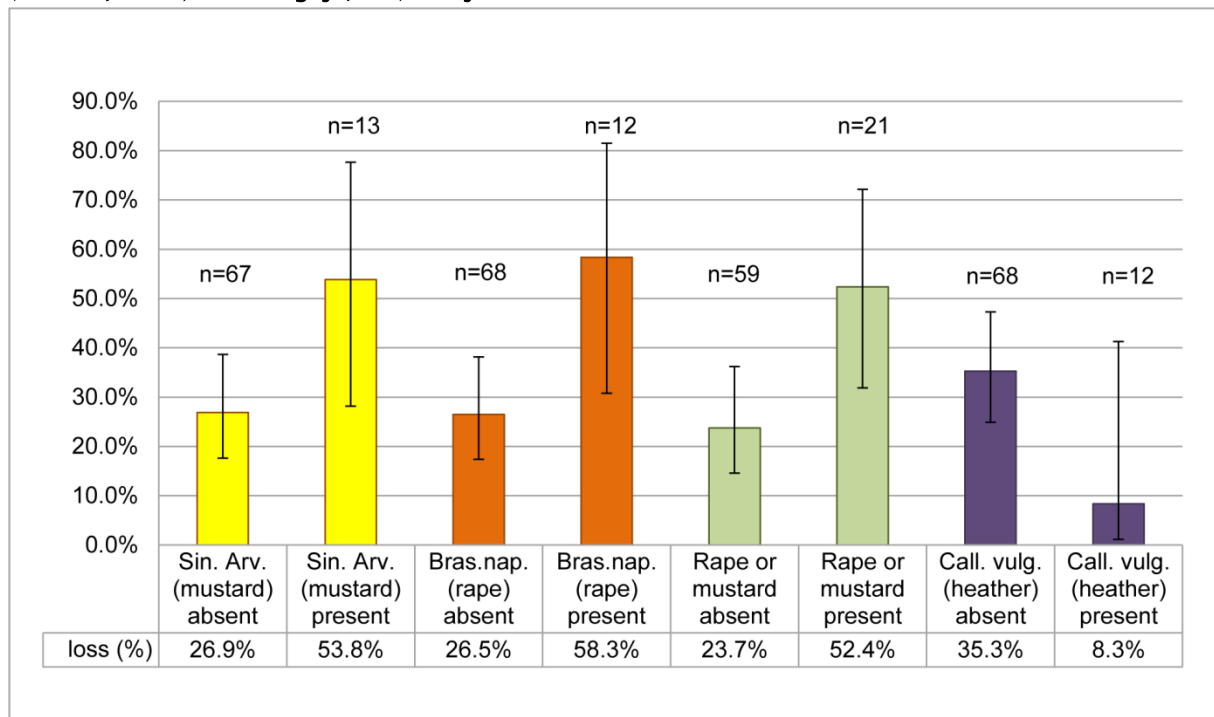


## Sterfte gerelateerd aan plant species

De aanwezigheid van *Brassica napus* (koolzaad) in pollen (n=12) was geassocieerd met een hogere kans ( $p=0,0358$ ) op wintersterfte vergeleken met volken (n=68) waarin het niet gevonden werd. Aanwezigheid van *Sinapis arvensis* (herik/veldmosterd) in pollen (n=13) was ook geassocieerd met een hogere kans op wintersterfte, maar niet significant ( $p=0,0672$ ) vergeleken met volken (n=67) waarin het niet gevonden werd. **Alhoewel wij zowel *Brassica napus* en *Sinapis arvensis* in pollen waarnamen, was het moeilijk om steeds een onderscheid te maken tussen deze twee in pollen. Daarom besloten we om de aanwezigheid (ja/nee) van *Brassica napus* of *Sinapis arvensis* te gebruiken als één modelfactor, aangeduid als koolzaad/herik. Koolzaad/herik in bijenbrood (n=21) was ook geassocieerd met een hogere kans op wintersterfte ( $p=0,0179$ ) vergeleken met de volken (n=59) waarin het niet gevonden werd.** Er werd geen associatie gevonden tussen de aanwezigheid van mais in bijenbrood (n=8) en risico op wintersterfte ( $p=0,9903$ ) vergeleken met de 72 volken waarin het niet gevonden werd. Aanwezigheid van *Calluna vulgaris* in pollen (n=12) vergeleken met de 68 volken waarin het niet gevonden werd, was niet significant geassocieerd met een lagere sterftkans (0,0954). Fig. 3 toont het

sterftepercentage, met 95% betrouwbaarheidsinterval, voor volken met en zonder deze plant species in pollen.

**Figuur 3, Percentage verloren volken, met 95% betrouwbaarheidsinterval, voor volken met/zonder pollen van *Sinapis arvensis* (mustard, herik), *Brassica napus* (rape, koolzaad) of *Calluna vulgaris* (heather, heide) aanwezig (ja/nee) in bijenbrood.**



## Virus en *Nosema* spp. gerelateerde wintersterfte

Aleen de virussen Acute Bee Paralysis Virus (ABPV), Black Queen Cell Virus (BQCV), Deformed Wing Virus (DWV) en Sacbrood virus (SBV) werden aangetroffen in de julimonsters. Het was mogelijk om een analyse uit te voeren voor alle 86 volken. Wij onderzochten associaties tussen de virusbelasting en wintersterfte. Geen significante associaties werden gevonden; BQCV ( $p=0,907$ ), ABPV ( $p=0,876$ ), DWV ( $p=0,353$ ), SBV ( $p=0,719$ ). Interacties tussen deze virussen en andere factoren in het model bleken niet significant te zijn gerelateerd met het risico op sterfte.

We vonden geen significante associaties met een GzLM waarbij de aan-/afwezigheid van *Nosema ceranae* en/of *Nosema apis* in 86 volken in juli gebruikt werd als een categorale factor en deze gerelateerd werden aan het risico op volkssterfte (*N. apis*,  $n=1$ ,  $p=1$ ; *N. ceranae*,  $n=40$ ,  $p=0,464$ ; *N. apis* en *N. ceranae*,  $n=29$ ,  $p=0,493$ ), waarbij *Nosema* spp. ( $n=16$ ) gebruikt werd als baseline categorie. Significante factoren werden evenmin gevonden, als wij de pcr bandsterkte van het meest voorkomende *Nosema* species, *N. ceranae* in juli, als a categorale factor in een GzLM onderzochten en deze relateerde aan het risico op sterfte (afwezig ( $n=17$ ,  $p=0,704$ ), lage bandsterkte ( $n=11$ ,  $p=0,704$ ), medium bandsterkte ( $n=15$ ,  $p=0,449$ ), hoge bandsterkte ( $n=43$ , baseline categorie)), in the volken in juli. Er werden geen Interacties gevonden tussen *Nosema* spp. en andere factoren in het model die significant gerelateerd waren met de kans op sterfte.

Gedetailleerde informatie over de virus en *Nosema* spp. is beschikbaar in de S8 dataset.

## Postcodegebied (PC) gerelateerde wintersterfte

Met een GzLM werd een sterke relatie gevonden ( $p=0,002$ ) tussen de PC effecten (van de Nederlandse Monitor Uitwintering Bijenvolken 2012) toegekend aan volken uit die PC gebieden en de kans op wintersterfte. Hogere kans op sterfte correspondeerde met hogere, meer positieve, PC effect waarden. Natuurlijk hebben individuele imker effecten een impact op het sterfterisico en zullen deze variëren binnen ieder PC gebied met zijn eigen overall PC effect. De variatie tussen imkers is gekwantificeerd als het imker random effect in de analyse van de Nederlandse Nationale Monitor Onderzoeken. De random steekproef uit de huidige studie omvat 29 imkerijen met een imkereffect waarvan het teken overeenkomt met het teken (positief of negatief) van het PC effect. Beide effecten werden berekend in de Monitor 2011 analyse, en bleek dat 7 imkerijen met een negatief imker effect waren gelegen in PC gebieden met een positief PC effect en 7 imkerijen in PC gebieden met een negatief effect. Slechts 1 van de 25 verloren volken was aanwezig in een gebied met een negatief postcode effect ( waar het sterfterisico lager zou moeten zijn).

## Associaties tussen postcodegebied (PC) effecten en andere variabelen

We onderzochten ook associaties tussen de PC effecten en andere variabelen, die beschouwd worden als mogelijke voorspellers van wintersterfte. Een significante, maar zwak positieve Spearman correlatie van 0,30 werd gevonden tussen de varroamijt ratio in oktober en het toegekende PC random effect ( $p=0,0069$ ). Een Mann-Whitney test voor de verschillen in PC effect liet zien dat de aanwezigheid van thiacloprid of acetamiprid in tenminste één van de matrices correspondeerde met een hogere, meer positieve waarde van het PC random effect ( $p=0,0265$ ). Met dezelfde test kon worden aangetoond dat de aanwezigheid van heidepollen (*Calluna vulgaris*) in pollen significant geassocieerd was ( $p=0,0087$ ) met hogere aanwezigheid in gebieden met lagere (meer negatieve) random PC effecten. Ook mais in pollen was significant geassocieerd ( $p=0,0131$ ) met hogere aanwezigheid in gebieden met lagere (meer negatieve) random effecten. Koolzaad/herik in pollen, gebruikt als voorspellende variabele voor wintersterfte hieronder, was echter niet significant geassocieerd met het PC random effect.

## Meest verklarende model

Wij hebben voor verschillende multivariabele modellen (GzLMs) onderzocht in welke mate ze passend waren voor de volken met tenminste informatie van alle relevante variabelen. Voor de 86 volken uit de studie waren voldoende data beschikbaar voor 75 volken (zie S2 dataset). Eerst construeerden wij een vol model voor deze 75 volken met als variabelen (1) varroamijt ratio, (2) contaminatie met de cyano-gesubstitueerde neonicotinoïden acetamiprid of thiacloprid (ja/nee) in honing, pollen of bijenmatrices, (3) koolzaad/herik aanwezig in pollen (ja/nee) en (4) het toegekende PC2-2012 random effect uit de landelijke Monitor 2012, weergegeven in volgorde van hun belang in het uiteindelijke model. Van de 4 modellen met maar 1 variabele (Tabel 1) verbetert de varroamijt ratio het model het meest vergeleken met het nul model en verklaart dus meer de variatie in sterfte dan enige andere variabele in een enkelvoudig model. Wij merken op dat het PC effect net niet significant is op het 5% niveau in Tabel 2,

maar toch opgenomen wordt in het meest passende model omdat het weglaten van deze factor resulteert in een significant minder passend model (Tabel 3).

**Tabel 1**, Resultaten passend maken model.

Model	AIC <sup>(1)</sup>	DF <sup>(2)</sup>	<sup>(3)</sup> Residual Deviance
Nul (alleen intercept) model	92,766	74	90,766
Model met alleen acetamiprid/thiacloprid als factor	90,090	73	86,090
Model met alleen koolzaad/herik in pollen als factor	89,432	73	85,432
Model met alleen PC 2012 effecten als covariaat	83,916	73	79,916
Model met alleen varroa mijt ratio (oktober) als a covariaat	80,237	73	76,237
Vol model M1 met alle 4 significant factoren	71,789	70	61,789
Vol model M2 met vervanging van acetamiprid/thiacloprid in M1 door welk neonicotinoïde dan ook	72,904	70	62,904
Vol model M3 met vervanging van acetamiprid/thiacloprid in M1 door thiacloprid	74,322	70	64,322
Vol model M4 met vervanging van acetamiprid/thiacloprid in M1 door acetamiprid	76,426	70	66,426
Vol model M5 met vervanging van acetamiprid/thiacloprid in M1 door imidacloprid	75,456	70	65,456

<sup>(1)</sup> AIC = Akaike's Information Criterion, <sup>(2)</sup>DF = Degrees of Freedom, <sup>(3)</sup>Residual Deviance =  $-2 \log \text{Lik}$ ; een lage AIC, en lage Residual Deviance wijzen op een beter model.

**Tabel 2. Risico factoren voor wintersterfte: resultaten van het best verklarende model voor de 75 gebruikte volken.**

Voorspellende variabelen	N. pos. <sup>(1)</sup>	OR (BI) <sup>(2)</sup>	Slope <sup>(3)</sup>	SE <sup>(4)</sup>	Z-test <sup>(5)</sup>	p-value
Varroa mijt ratio Okt. 2011		1,17 (1,04–1,31)	0,155	0,060	2,588	0,010
Aanwezigheid acetamiprid of thiacloprid	30	4,82 (1,25–18,59)	1,573	0,688	2,285	0,022
Koolzaad/herik in pollen	20	5,38 (1,24–23,30)	1,683	0,748	2,251	0,024
PC 2012 effect		6,01 (0,98–36,96)	1,794	0,926	1,937	0,053

<sup>(1)</sup> aantal positieve gevallen, <sup>(2)</sup> Odds Ratio met 95% betrouwbaarheids interval, <sup>(3)</sup> Slope parameter, <sup>(4)</sup> Standard Error, <sup>(5)</sup> Z-test statistics

**Tabel 3. Analyse van het best verklarend model M1.**

Onttrokken Term	DF <sup>(1)</sup>	<sup>(2)</sup> AIC	<sup>(3)</sup> LRT	p-value
Geen		71,789		
Varroa mijt ratio	1	77,673	7,8835	0,004989**
Aanwezigheid van acetamiprid of	1	75,661	5,8710	0,015392*

thiacloprid

Koolzaad/herik in pollen	1	75,300	5,5105	0,018903*
PC 2012 effect	1	74,197	4,4072	0,035787*

<sup>(1)</sup>DF = Degrees of Freedom de onttrokken term, <sup>(2)</sup>AIC = Akaike's Information Criterion,

<sup>(3)</sup>LRT=Likelihood Ratio Test statistiek voor de verandering in het passend maken van het model en de p-value van de test.

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1

Tabel 1 toont in welke mate de modellen passend zijn. De AIC nam af van 92,766 in het nulmodel zonder verklarende variabelen naar 71,789 in model M1 met alle 4 variabelen. De residual deviance nam af van 90,766 tot 61,789.

Deze 4 variabelen waren alle significant geassocieerd met het risico op wintersterfte (Tabel 2 en Tabel 3). Tabel 3 toont de AIC wanneer iedere term, een voor een, onttrokken wordt uit het 4 factormodel om tot een 3 factormodel te komen, ook de corresponderende likelihood ratio test (LRT) statistiek en de corresponderende p-waarde. Het resultaat laat zien dat alle termen in model 1 behouden moeten blijven.

Aanvullend onderzochten we voor twee andere modellen of deze meer passend zouden zijn dan model M1. In model 2 (M2) testten we de effecten van neonicotinoïden als specifieke groep door het vervangen van de combinatiefactor acetamiprid/thiacloprid (2) hierboven met de factor tenminste één (van de drie) neonicotinoïden (ja/nee) aanwezig in een van de drie matrices. In model 3 (M3) testten we het effect van alleen thiacloprid, door het vervangen van factor (2) met de factor thiacloprid (ja/nee) in tenminste één van de drie matrices.

Het best passend model voor de dataset is het eerste model (M1) met een AIC van 71,789 (Tabel 1). In dit model was de term voor acetamiprid/thiacloprid sterk significant ( $p=0,02229$ ). Model M2 met de factor 'tenminste één van de neonicotinoïden' was bijna even goed passend met een AIC van 72,904. De term voor tenminste één van de neonicotinoïden is ook significant ( $p=0,03981$ ). Model M3 met daarin de term thiacloprid volgt daarop in betekenis, maar thiacloprid zelf is niet significant ( $p=0,07667$ ).

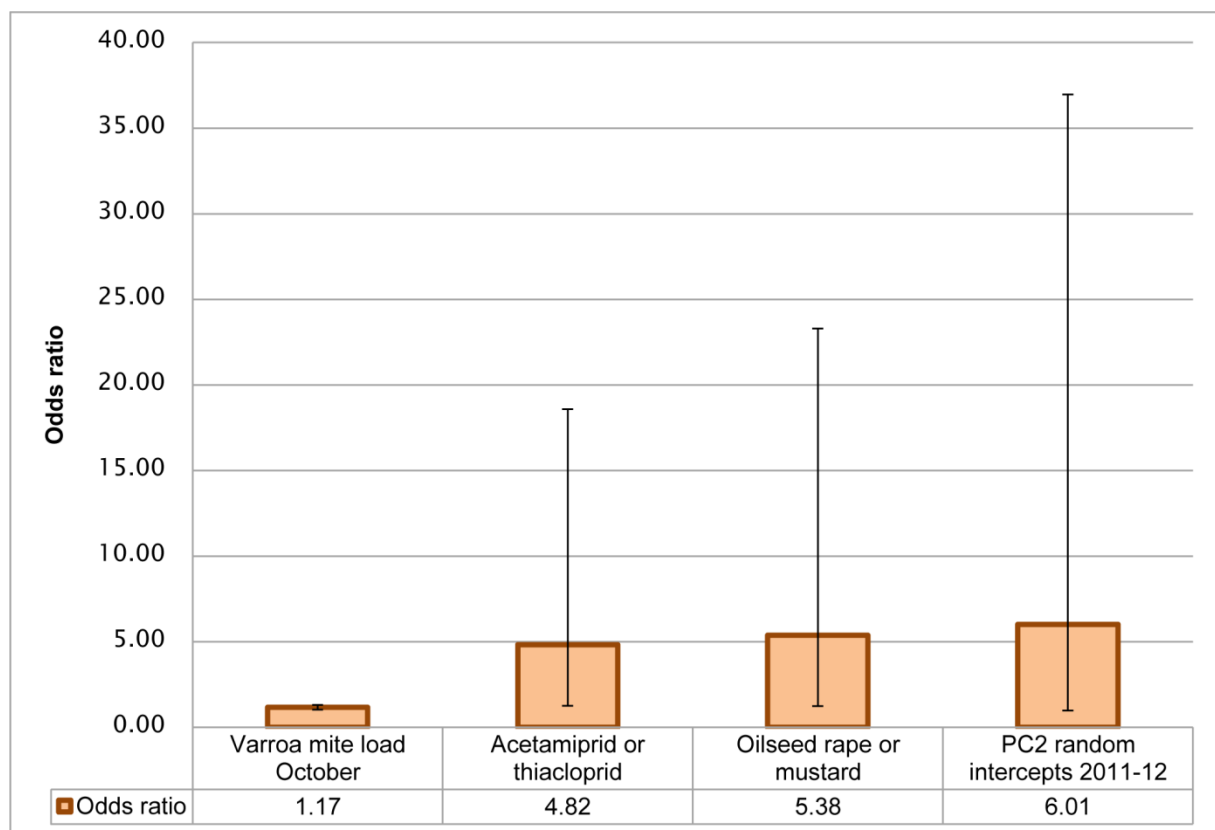
Om te vergelijken onderzochten we tenslotte nog 2 andere modellen. Daarbij vervingen wij factor (2) in model M1 met de aanwezigheid van acetamiprid (ja/nee) in model M4 en aanwezigheid van imidacloprid (ja/nee) in model M5. Deze beide modellen verklaren minder de variatie in de data (Tabel 1) dan de modellen M1, M2 en M3. Ook is de aanwezigheid van ieder van beide pesticiden alleen, in het geheel niet significant ( $p=0,1389$  voor imidacloprid en  $p=0,2554$  voor acetamiprid) gegeven de andere termen in het model. Dit bevestigt de eerdere resultaten.

Net als voor model M1, testten we het effect van het onttrekken van iedere term in de modellen M2–M5, voor steeds een term per keer, waardoor wij in het bijzonder het PC gebiedseffect konden beoordelen. In alle gevallen bleek het toevoegen van het PC gebiedseffect aan het model een significante verbetering op te leveren. Onttrekking van het PC effect uit model M3 had als gevolg dat thiacloprid meer significant werd ( $p=0,04465$ ) vanwege de kleinere standard errors van de geschatte effecten in het eenvoudiger model. Op delfde wijze was het gevolg van het onttrekken van het PC effect

uit het model M1, dat acetamiprid/thiacloprid meer significant werd ( $p=0,01725$  vergeleken met  $0,02229$  in M1).

Daarom nemen wij model M1 als het uiteindelijke model. Dit model met 4 variabelen bleek het best passende en verklarende model dat beschikbaar was om het risico op bijensterfte te beschrijven, verkregen uit de talrijke variabelen, die in deze studie verzameld en beschreven zijn. Interactie effecten tussen de 4 modelfactoren/covariaten werden niet gevonden.

Figuur 4 toont duidelijker de relatieve omvang van de odds ratio's uit Tabel 2 voor de 4 termen in het eindmodel met hun 95% betrouwbaarheidsintervallen. De p-waarden in Tabel 2 en Tabel 3 geven het belang aan van de individuele variabelen in het 4 variabelen model (waar Tabel 1 een vergelijking geeft van het nul model, modellen voor iedere variabele apart en modellen met 4 variabelen). De statistisch meest significante term in het eindmodel is de varroamijt ratio in oktober, gevolgd door contaminatie met de cyano-gesubstitueerde neonicotinoïden acetamiprid of thiacloprid (ja/nee) in honing, pollen of bij matrices, daarna koolzaad/herik (ja/nee) in pollen, met het PC 2012 effect als minst significante voorspellende variabele. De geschatte odds ratio's zijn ongeveer 5 keer zo groot voor de laatste 3 variabelen vergeleken met de odds ratio van een toename van 1 (mijt) in de varroamijt belasting, alhoewel de slope parameters niet met diezelfde precisie berekend kunnen worden vanuit de beschikbare data. Dus de standaard errors van deze effecten zijn groter dan voor het varroamijt effect en de betrouwbaarheidsintervallen voor deze odds ratio's zijn daarom breder dan voor het varroamijt effect (Tabel 2 en Fig. 4). Alhoewel dit met elkaar in tegenspraak lijkt, is het de statistische consequentie van de beschikbare steekproefomvang voor de schatting van ieder effect en van de variatie in de waarden van de covariaten. Een grotere steekproefomvang in verdere studie kan dit tot op zekere hoogte oplossen, omdat dan het voordeel ontstaat van kleinere standaard errors voor alle geschatte effecten in het model.



**Fig. 4. Odds Ratio's voor de fixed effecten van het meest verklarend model, met 95% betrouwbaarheidsintervallen.** Fixed model termen zijn acetamiprid of thiacloprid aanwezig in bijen, honing of bijenbrood tijdens de zomer 2011, koolzaad/herik (Oilseed rape or mustard) aanwezig in pollen tijdens de zomer 2011, toegekende postcode random intercepts 2011–2012 (PC 2012 effecten) en de varroamijt belasting in oktober 2011. Voor de categorale factoren is de odds ratio de odds van

de sterfte voor de volken met acetamiprid of thiacloprid gedeeld door de odds voor volken waarin deze afwezig waren, en op dezelfde wijze de proportionele toename of afname in odds voor koolzaad/herik. Voor de continu termen is de odds ratio de proportionele toename in de odds van sterfte voor een toename van 1 unit in de waarde van de continu variabele.

## Discussie

In het onderzoek naar het meest passende model hebben we gebruik gemaakt van de PC 2012 random effecten als fixed effect in een GzLM. Een alternatieve benadering zou kunnen zijn om met een GLMM te modelleren en een PC op te nemen als random effect berekend uit de gegevens van de huidige studie. Maar het gebruik van de GzLM stelde ons in staat om de relatie te onderzoeken tussen het risico op wintersterfte en voorheen onverklaarde gebiedseffecten berekend met de data van een grotere dataset en ook konden wij zo meer inzicht krijgen in de relatieve betekenis van de verschillende termen in het model, omdat het allemaal fixed effecten waren.

Wij onderzochten eerst een aantal modellen met maar één variabele om te verduidelijken hoe het uiteindelijke model tot stand kwam. In deze discussie ligt de focus meer op de variabelen die significant geassocieerd bleken met het risico op wintersterfte in het uiteindelijke model, dan op het bespreken van alle variabelen die wij overwogen tijdens het onderzoek naar een passend model. Analyse van de jaarlijkse Nederlandse vragenlijstdata [2–5] laat zien dat de wijze van varroamijtbestrijding de sterkste factor was in het verklaren van de gerapporteerde wintersterfte. De uitkomst van de huidige observationele studie naar risicofactoren op volksniveau bevestigt de belangrijke bijdrage van deze ectoparasiet aan honingbijwintersterfte. Een hoge varroamijt belasting in oktober, wijzend op een falende varroabestrijding, was de sterkste factor in het best passende model. Dit is in overeenstemming met de uitkomsten van vele studies, zoals de Duitse longitudinale surveillance studie [15] en een pan-Europese studie [18], Becher e.a. in [30] en een studie over varroamijt belasting [27]. Er werd geen associatie gevonden tussen de varroamijt belasting in juli en wintersterfte, maar slechts 1 imker was in juli al begonnen met een serieuze varroabestrijding. De landelijke Nederlandse Monitor verslagen laten ook zien dat het zwaartepunt van de varroabestrijding voor de meeste imkers in augustus en september [2–5] ligt, na het verwerken van de honingoogst van de voorafgaande maanden..

Noch de aanwezigheid van verschillende honingbij virussen die werd vastgesteld in de afgenomen monsters in juli, noch de aanwezigheid van *Nosema* spp. in de volken in juli, bleken geassocieerd te zijn met risico op wintersterfte. Ook werd geen interactie gevonden tussen de aanwezigheid van virussen en/of *Nosema* spp. in de volken en andere factoren. Onderzoeken naar de aanwezigheid van deze virussen in oktober zou wellicht tot een ander resultaat geleid hebben. In de Duitse Monitorstudie werd een sterk positieve relatie gevonden tussen de aanwezigheid van de virussen DWV en ABPV (beide geëxtraheerd uit de kopjes van bijen) in oktober en wintersterfte [15]. Dit is echter niet overwogen voor de huidige studie om de kosten te beperken.



De auteurs van een Duitse studie [15] vonden geen associatie tussen contaminatie van gewasbeschermingsmiddelen in de pollen van koolzaad en wintersterfte (persoonlijke communicatie met de eerste auteur van [15]). Wij vonden in de huidige studie evenmin zo'n associatie, alhoewel de aanwezigheid van koolzaad/herik in pollen op zichzelf een significante modelfactor was, die geassocieerd was met hogere sterfte. Wij vonden bijvoorbeeld geen significante associatie met hogere sterfte bij het onderzoek naar interactie effecten op sterfte van koolzaad/herik in pollen en de aanwezigheid van thiacloprid of acetamiprid in honing, bijen of pollen. Dit was naar verwachting, omdat thiacloprid of acetamiprid in die tijd nog niet waren toegestaan voor gebruik op koolzaad. Een verklaring voor de significante associatie tussen de aanwezigheid van koolzaad/herik in bijenvolk-matrices en wintersterfte als gevolg van het gebruik van andere pesticiden kon niet worden onderzocht, omdat alleen neonicotinoïden in augustus in voldoende mate gevonden werden voor een statistische analyse. Het is daarom mogelijk dat zulke associaties bestaan en wel gevonden zouden zijn bij een grotere steekproef dan in onze studie.

Slechts enkele studies hadden neonicotinoïden in maar één van de matrices. Wij vonden geen effect op het risico van bijensterfte als neonicotinoïden uitsluitend aanwezig waren in honing of pollen vergeleken met volken zonder aanwezigheid van neonicotinoïden. Wij vonden echter een sterk effect op het risico van bijensterfte als wij de aanwezigheid van neonicotinoïden in honing vergeleken met afwezigheid van neonicotinoïden in honing, terwijl zo'n effect niet gevonden werd voor aanwezigheid versus afwezigheid van neonicotinoïden in pollen. Een significant effect voor het risico op bijensterfte werd wel gevonden voor volken met gecontamineerde pollen met acetamiprid/thiacloprid vergeleken met alle volken waarin deze cyano-gesubstitueerde neonicotinoïden niet aanwezig waren, alhoewel het effect voor honing veel sterker was in een vergelijkbare analyse. Wij beschouwen dit als een mogelijke aanwijzing dat aanwezigheid van cyano-gesubstitueerde neonicotinoïden in honing een betere indicator van het risico op sterfte zou kunnen zijn dan aanwezigheid in pollen, maar meer onderzoek is nodig om hierover tot heldere conclusies te komen. De opname van honing per individuele bij is veel hoger dan voor pollen [31] wat bovenstaande vinding verder ondersteunt. Bedacht moet echter worden dat in een aanzienlijk aantal volken neonicotinoïden gelijktijdig in meer dan één matrix aanwezig waren. Deze mogelijk beïnvloedende effecten maken het moeilijk om sterke conclusies te trekken over effecten van iedere factor op zichzelf, anders dan dat het kandidaten zijn voor verder testen in een multifactorieel model.

De aanwezigheid van thiacloprid of acetamiprid (ja/nee) in de bijenvolk-matrices begin augustus was een andere sterke factor in het meest verklarende model en geassocieerd met hogere kans op wintersterfte. Van een vergelijkbare betekenis was de aanwezigheid van enig neonicotinoïde in een van de matrices begin augustus. In vergelijking met acetamiprid en imidacloprid bleek thiacloprid het meest van belang in het verklaren van de kans op sterfte. Het was ook het meest voorkomende neonicotinoïde in de data set.

In de eerste periode van de winter (vóór januari 2012) hadden volken met thiacloprid in een van de matrices een significant hogere kans op sterfte vergeleken met volken zonder neonicotinoïden, wat duidt op een verminderde levensduur van de gecontamineerde volken. Naar ons weten is zo'n uitkomst in andere observationele studies niet gevonden, wat begrijpelijk is vanwege de lager geachte toxiciteit

van de cyano-gesubstitueerde neonicotinoïden. Iwasa e.a. [32] vonden in laboratoriumstudies dat de cyano-gesubstitueerde neonicotinoïden minder toxisch waren vergeleken met de nitro-gesubstitueerde neonicotinoïden en suggereerde dat tenminste acetamiprid veilig zou kunnen zijn voor bijen. Een mogelijke verklaring voor onze contrasterende uitkomst zou kunnen zijn als gesuggereerd door Laurino e.a. [33], die in een experimentele studie vond dat;

*'acetamiprid and thiacloprid, as also evidenced in other acute toxicity trials [32, 34], were apparently not dangerous to the honey bees unless they were starved. This result suggests that there is a repellent effect of both a.i. as also reported for imidacloprid [35] and a food preference test would prove such an effect. If so, and disregarding sub-lethal effects, some hazards can arise when colonies are severely short of stores or after prolonged seclusion'.*

Zo'n aanzienlijke voedselgebrek werd begin augustus in veel van de volken uit de huidige studie gevonden. Dat kan het gevolg zijn geweest van de slechte weersomstandigheden. Het Koninklijk Meteorologisch Instituut [36] rapporteerde dat juli 2011 als zesde gerangschikt was in de reeks van natste julimaanden sinds 1901. De temperatuur was 2 graden onder het langjarig gemiddelde, de hoeveelheid zonneschijn was 158 uur, vergeleken met 212 uur normaal. Er viel een totale maandelijkse neerslag van 179 mm in 96 uur, vergeleken met een lange termijn gemiddelde van 81 mm in 40 uur. Augustus vertoonde een gelijksoortig patroon met 153 uur zonneschijn tegen 195 uur lange termijn gemiddelde en er viel 110 mm neerslag, waar 78 mm neerslag het lange termijn gemiddelde voor augustus was. Deze weersomstandigheden resulteerden in verminderde foerageermogelijkheden voor bijenvolken gedurende de hoogzomerperiode. De slechte foerageermogelijkheden werden zichtbaar in de grotendeels lage honing- en pollenreserves in de studievolken tijdens de bemonstering in de eerste 2 weken van augustus 2011. Het was aanleiding voor de meeste imkers om te starten met aanvullende voeding. Een gevolg van deze ongunstige foerageermogelijkheden in een belangrijke drachtperiode kan zijn geweest dat voedselgebrek een rol gespeeld heeft. Ook kan de blootstelling aan gecontamineerde honing en pollen relatief hoog geweest zijn vanwege gereduceerde mogelijkheden voor volken om de beperkte opgeslagen voedselvoorraad te detoxificeren door de opname van niet gecontamineerd voedsel met als mogelijk gevolg een verdunning van de concentratie aanwezige acetamiprid of thiacloprid [37]. Wij beschouwen echter voedselgebrek en verminderde detoxificatie als het slechtst denkbare scenario en kunnen de mogelijkheid niet uitsluiten dat de cyano-gesubstitueerde neonicotinoïden een effect hadden onafhankelijk van de voedselsituatie, zoals recent gevonden werd door Retschnig e.a. [38]. Zij vonden hogere sterfte van individuele bijen in volken die gevoerd werden met thiacloprid (en het pyrethroïde tao-fluvalinaat) vergeleken met volken uit een controlegroep op één van de twee locaties. Het is ook mogelijk dat in de toekomst factoren (zoals andere pesticiden of zware metalen) gevonden worden, die eveneens of een betere verklaring geven van de effecten op sterfte die nu worden toegeschreven aan thiacloprid.

Sommige volken waren in de gelegenheid om te compenseren voor de slechte weersomstandigheden in de hoge zomer. September, oktober en november waren warmer dan normaal. De analyse van de Monitor Uitwintering Bijenvolken 2012 [4] laat zien, dat volken die een *Calluna vulgaris* (heide) dracht konden benutten, een lager risico op wintersterfte ondervonden, vergeleken met volken zonder deze mogelijkheid ( $p < 0,0001$ ). Het relatief warme weer in september, oktober en november gaf de bijenvolken de mogelijkheid alsnog een winterpopulatie te produceren. Een indicatie van zo'n effect in de huidige studie was de lagere sterftekans (een trend,  $p = 0,0954$ ) voor het beperkt aantal volken

(N=12 ingewinterde volken, 1 verloren), met *Calluna vulgaris* pollen in het bijenbrood. Ook was de aanwezigheid van *Calluna vulgaris* pollen in het bijenbrood sterk significant ( $p=0,0087$ ) geassocieerd met aanwezigheid van volken in PC gebieden met lagere, meer negatieve PC random effecten. In Nederland is *Calluna* alleen in bepaalde gebieden aanwezig en het bloeit tot laat in de zomer. Er is daarom een aanwijzing voor een positief effect van *Calluna* op bijensterfte en bovendien draagt de aanwezigheid van *Calluna* bij aan het verklaren van lagere kans op bijensterfte in sommige gebieden.

In de Monitor Uitwintering bijenvolken 2011 [3] vonden van der Zee en Pisa een hogere kans op wintersterfte voor imkers, die aangaven dat hun volken de mogelijkheid hadden om op mais te foerageren. Mais was aanwezig binnen een afstand van 3 km voor 94% van de deelnemende 1571 imkers, die deelnamen aan de Monitor Uitwintering Bijenvolken 2014 (ongepubliceerde data, van der Zee). Wille en Wille [39] en Wille e.a. [40] vonden dat mais een van de hoofdbronnen van pollen voor bijen was in sommige Zwitserse regio's. Mogelijke effecten van gecoat maiszaad waren nog niet duidelijk, zoals werd opgemerkt in het Monitor 2012 rapport [4]. Zo'n effect werd in de Monitor 2011 [3] niet gevonden. In de huidige studie vonden wij dat de aanwezigheid van mais in pollen niet geassocieerd was met een hogere kans op bijensterfte, maar significant ( $p=0,0131$ ) geassocieerd was met aanwezigheid in PC gebieden met lagere, meer negatieve PC random effecten. Het gebruik van gecoat maiszaad was laag (ongeveer 8%) in 2011 volgens informatie van de Land en Tuinbouw Organisatie Noord (de Nederlandse boeren en tuinders organisatie LTO Noord) gebaseerd op informatie van Agrodiss, de organisatie die de producenten van landbouwkundige pesticiden in Nederland vertegenwoordigt. In 2012 was 9–10% van het totale maisareaal gecoat met voornamelijk thiamethoxam en clotianidin en een beperkte hoeveelheid met imidacloprid, in 2013 was 13% van het maisareaal gecoat. Het wordt het meest gebruikt in Noord Nederland, waar grasland wordt afgewisseld met mais en dan neonicotinoiden worden gebruikt als bestrijding van de *Coleoptera* larve (hoofdzakelijk voorkomend in grasland). Zulke informatie was echter niet precies genoeg om associaties te onderzoeken tussen de aanwezigheid van gecoat mais in specifieke postcodegebieden en de kans op bijensterfte in de huidige studie.

De aanwezigheid van koolzaad/herik in pollen was geassocieerd met hogere kans op sterfte, maar het was niet geassocieerd met het PC random effect. Dit kan het gevolg zijn van het reizen van imkers uit andere gebieden naar de specifieke gebieden waar koolzaad verbouwd wordt.

Het PC gebiedseffect, dat berekend werd in de Monitor Uitwintering Bijenvolken 2012, en toegekend aan de volken in de huidige studie als fixed model covariaat, was de minst significante term in het meest verklarend model. Dit mocht verwacht worden, omdat de postcodegebieden zijn ingedeeld als administratieve eenheden, en geen optimale weergave vormen van ecologische verschillen. Maar, variatie in sterfterisico tussen postcodegebieden mag weer wel verwacht worden, omdat de grondsoort hoofdzakelijk het grondgebruik bepaalt en zich over grotere gebieden dan postcodegebieden uitstrekt.

Ruimtelijke variatie tussen de volken in de huidige studie zou voor een deel verklaard kunnen worden door verschillen in de mate waarin de varroamijt in de volken aanwezig was tussen PC gebieden. De varroamijt ratio in oktober was gecorreleerd ( $p=0,0069$ ) met hogere, meer positieve waarden van het toegekende PC effect. Hetzelfde geldt voor volken met acetamiprid of thiacloprid. Deze waren ook

geassocieerd met PC gebieden met hogere, meer positieve waarden van het toegekende PC effect ( $p=0,0265$ ). Dit werd ook verwacht, want akkers zijn vooral aanwezig in postcodegebieden met een hoger risico, terwijl het landgebruik in postcodegebieden met een lager risico meer gekenmerkt wordt door grasland en ongecultiveerde grond (zie fig. 2.2 over dominant grondgebruik in [41]). Wij trekken de conclusie dat de regionale variatie in toegekende postcode effecten tot op zekere hoogte verklaard kan worden door verschillen in mijtbelasting en de aanwezigheid van acetamiprid/thiacloprid in de volken en dat een hogere mijtbelasting in oktober en aanwezigheid van deze pesticiden geassocieerd is met een hogere kans op wintersterfte.

Aan de deelnemende imkers werd gevraagd niet met hun volken te reizen gedurende studieperiode, maar sommigen zullen voor die tijd met hun bijenvolken naar andere gebieden gereisd hebben. Zulke verplaatsingen kunnen het gebiedseffect verzwakt hebben. Die volken kunnen zijn blootgesteld aan invloeden die de gezondheid positief of negatief beïnvloed hebben. Daarom kan het gebiedseffect deels beïnvloed zijn door effecten uit andere gebieden dan die waar de volken later in het seizoen stonden. Een studie gedurende meerdere jaren kan behulpzaam zijn om op dit punt verheldering te bieden. Wij vonden dat het gebiedseffect significant was in al de verschillende multivariabele modellen die wij onderzochten. Niet opnemen van het gebiedseffect in de modellen met thiacloprid als aparte factor had als gevolg dat aanwezigheid van thiacloprid meer significant werd. Dit wijst verder op een link tussen aanwezigheid van thiacloprid in de volken en gebied, en wel dat aanwezigheid van thiacloprid deels verklaard wordt door het gebied. Dit was ook zo voor de combinatiefactor acetamiprid/thiacloprid, maar niet voor acetamiprid alleen, noch voor imidacloprid, noch voor de “aanwezigheid van enig neonicotinoïde” factor.

Geredeneerd zou kunnen worden dat het gebruik van de PC 2012 effecten als maat voor de variatie van onverklaarde sterfte tussen gebieden niet gebruikt zou moeten worden als voorspeller voor de wintersterfte 2011–2012 in de huidige studie omdat deze PC 2012 effecten zelf ook gerelateerd zijn aan de winter 2011–2012. Ze werden verkregen uit een andere, grootschaliger dataset, waar ook de imkers in deze studie aan deelnamen. De PC 2012 effecten uit de landelijke Monitor 2012 verstrekken echter een betrouwbare maat voor het risico op wintersterfte in ieder PC gebied, dat niet verklaard kon worden door de variabelen ontleend aan de gebruikte vragenlijst. De analyse van de landelijke Nederlandse Monitor data [2–5] bevestigt dat deze effecten consistent zijn in het van jaar tot jaar identificeren van gebieden, waar belangrijke oorzaken van sterfte nog verder verklaard moeten worden. De PC 2012 effecten waren de meest recente schattingen van deze effecten, die beschikbaar waren voor de modellering in onze studie. De PC random effecten van de landelijke Monitor 2011, die voor onze steekproef gebruikt werden bij het indelen van de imkerijen, die gelegen waren in hoog- of laagrisico gebieden, hadden ook gebruikt kunnen worden in onze modellering in plaats van de PC 2012 effecten. Niet verrassend, zijn deze PC 2011 en de PC 2012 effecten significant positief gecorreleerd (voor de 75 volken in de uiteindelijke modellering bleek de Spearman correlatie 0,631, met een bijna 0  $p$ -waarde). Beide hadden als covariaat gebruikt kunnen worden in het uiteindelijke model. Wij hebben het effect van PC 2011 effecten in het verkrijgen van een passend model in plaats van het PC 2012 effect ook onderzocht. Het maakte nauwelijks uit in de het uiteindelijke model en de conclusies. De relatieve betekenis van de variabelen in het model waren hetzelfde als bij gebruik van de 2012 effecten. Echter, de 2011 effecten werden berekend voor een model met alleen een intercept,

een imker random effect en een postcode random effect, maar zonder verklarende variabelen omdat die informatie nog niet beschikbaar was. Daarom zijn de PC 2011 effecten een algemene maat voor alleen de variatie in sterfterisico tussen PC gebieden, gerelateerd aan de wintersterfte 2010–2011, en niet zozeer een variatie in onverklaarde sterfte. Daarom beschouwen wij het gebruik van de PC 2012 effecten als maat voor onverklaarde sterfte als meer op zijn plaats. De overeenkomst tussen locatie (de postcode-effecten) en het risico op sterfte in zowel 2011 als 2012 is een aanwijzing dat ruimtelijke factoren een rol kunnen spelen. Deze factoren zijn nog niet geïdentificeerd in de landelijke Nederlandse Monitor studies, maar kunnen gerelateerd zijn aan landgebruik, zoals de huidige studie suggereert.

Toevoegen van landgebruik aan de modelvorming zou goed kunnen leiden tot vervanging van postcodegebieden door een beter verklarende ruimtelijk effect, dat van groot belang kan zijn voor de verdere verkenning van plaatselijke effecten. Het gebruik van database informatie over landgebruik en het pesticiden gebruik op agrarische gewassen kan eveneens behulpzaam zijn in het modelleren van de data uit de jaarlijkse landelijke Monitor (met vragenlijsten voor imkers). Deze benadering zou ook kunnen leiden tot een beter begrip van de toe- en afname van andere bestuivers die mogelijk ook beïnvloed wordt door landgebruik en agrarische pesticiden.

In een recente publicatie [42] werden gezonde/niet gezonde volken, en niet dode/verloren volken, met elkaar vergeleken in een kleinschalige observationele Belgische studie. Deze studie vond plaats in dezelfde periode als onze studie, n.l. zomer 2011, met een evaluatie van bijengezondheid in het voorjaar van 2012. De auteurs vonden een significante associatie tussen toename van het risico op “colony disorder” (verder aangeduid als “bijenvolk stoornis”) en toenemende mate van akkerland om de imkerijen, zoals wij een hogere kans op wintersterfte vonden in postcodegebieden met meer positieve postcode random effecten. Deze Belgische uitkomst is interessant en versterkt de noodzaak om landgebruik informatie te betrekken bij het verder modelleren. Wij zijn het oneens met de opmerking in deze Belgische studie dat deze bijenvolk stoornissen plaatsvonden ondanks normale klimatologische omstandigheden. Zij beschouwen alleen het weer in de periode oktober–november 2011, dat even zonnig en droog was als in Nederland. Het weer in de zomer [43] was ook vergelijkbaar met Nederland en bood zeer slechte foerageermogelijkheden. Dit kan een rol gespeeld hebben bij de wintersterfte zoals besproken in huidige studie, maar kan ook van betekenis geweest zijn op de uitkomst van de Belgische studie.

In een andere, veel grotere, Belgische studie door Ravoet e.a. [44] werden monsters uit een eerdere studie opnieuw geanalyseerd op de prevalentie van de nieuw gevonden trypanosomide parasiet *C. mellificae* samen met 16 bekende honingbij pathogenen. De monsters, die afkomstig waren van 363 volken, werden in juli 2011 verzameld (vergelijkbaar met het tijdstip van monsternamen in de onze studie). In hun studie ging 46,5 % van de volken verloren in de winter van 2011–2012. Ravoet e.a. gebruikten eveneens een generaliseerde lineaire model benadering om de aanwezigheid van deze pathogenen in de zomer te relateren aan wintersterfte. In hun uiteindelijke model werden data van 299 volken gebruikt. Aanwezigheid van *C. mellificae* en *N. ceranae* waren beide significante factoren voor het verklaren van wintersterfte. *V. destructor* had een p-waarde van 0,07 in het model, en werd ook als significant gerapporteerd. Zij vonden ook een interactie effect van *C. mellificae* en *N. ceranae*, dat significant bijdroeg aan het verklarend model voor bijensterfte. *C. mellificae* zou in onze studie

eveneens een rol gespeeld kunnen hebben, maar behoorde niet tot de pathogenen die door ons werd overwogen. *Nosema ceranae* was geen verklarende factor in onze studie noch in de meeste Noord Europese landen [38, 44]. Deze soms contrasterende uitkomsten demonstreren dat bijensterfte alleen begrepen kan worden door het in aanmerking nemen van een groot aantal pathogenen en pesticiden die mogelijk bijdragen aan sterfte onder specifieke condities.

Onze studie was een relatief kleinschalige studie die werd uitgevoerd als eerste verkenning van de aanwezigheid van verschillende agrarische pesticiden in Nederlandse honingbij matrices en hun effect op wintersterfte van bijenvolken. Daarvoor werden monsters verzameld in de zomer van 2011. Als gevolg hiervan zijn de conclusies beperkt tot Nederland. Een longitudinale studie gedurende meerdere jaren, met meer volken, en bij voorkeur met een analyse van een meer uitgebreide reeks pesticiden, zijn noodzakelijk om de uitkomsten van deze studie verder te verklaren.

## Conclusies

Deze studie illustreert de kwetsbaarheid voor wintersterfte van bijenvolken als deze in de hoogzomerperiode een gezonde winterpopulatie moeten opbouwen, terwijl factoren die de gezondheid kunnen aantasten de kans daarop reduceren. In het meest verklarend model was de varroamijt ratio in oktober de meest significante term, gevolgd door de aan/afwezigheid van acetamiprid of thiacloprid in honing, pollen of bijen, daarna de aan/afwezigheid van koolzaad/herik in pollen, en met het postcodegebied als minst significante term in het model. De geschatte odds ratio's waren ongeveer 5 keer zo groot voor de neonicotinoïden, koolzaad/herik en het postcodegebied effect dan de odds ratio voor toenemende varroamijt belasting met 1 unit. Maar in het uiteindelijke model waren de standard errors van de slope parameters voor deze eerste drie effecten veel groter dan het varroamijt-effect. Dit betekent dat alhoewel de mate van de effecten van met name acetamiprid/thiacloprid en koolzaad/herik veel groter bleken dan het varroamijt-effect, ze toch niet in dezelfde mate statistisch significant zijn en niet in dezelfde mate de variatie in sterfte verklaren. Een grotere steekproef in een toekomstige studie zou als voordeel hebben dat de standard errors van alle geschatte effecten in het verklarend model zouden afnemen. Dit zou een beter inzicht geven in de relatieve betekenis van de effecten op het risico van bijensterfte in de winter en wellicht ook interacties aan het licht brengen, die in de huidige studie niet gevonden werden.

Slecht weer kan een belangrijke rol gespeeld hebben bij de waargenomen wintersterfte, omdat beperkte foerageermogelijkheden in juli en augustus een negatieve impact gehad kunnen hebben op de opbouw van een gezonde winterpopulatie. Niet alleen door een tekort in de noodzakelijke voedselvoorziening, maar ook omdat verhongering zou kunnen leiden tot verhoogde toxische effecten van thiacloprid en acetamiprid. Deze effecten spelen mogelijk ook een rol onder minder extreme omstandigheden in gebieden met beperkte voedselbronnen in de zomer.

## Bijdragen van anderen aan deze studie

Wij danken de bijenhouders, die aan deze studie deelnamen. Ook Jan Enne Dees, Wim van Oord, Theo de Ronde, Sigis Sparenberg, Harmen Veenhuis en Hayo Velthuis voor de bemonstering en inspectie van de volken. Ruud van Dam wordt bedankt voor zijn bijdrage aan de analyse van de gewasbeschermingsmiddelen. Verder David Kleijne, Ruud van Kats en Jaap Kerkvliet voor hun rol in de palynologische bepalingen en Grazyna Topolska voor haar rol in de *Nosema* spp. analyse. Hayo Velthuis ook voor zijn kritische lezing van het manuscript.

## Referenties

1. Van Der Zee, R (2010) Colony losses in the Netherlands. *Journal of Apicultural Research* 49(1): 121–123. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.25>
2. Van Der Zee R, Pisa L (2011) NCB Reports: Monitor Uitwintering Bijenvolken 2010. <http://www.beemonitoring.org/Downloads/MonitorUitwinteringBijenvolken2010.pdf>
3. Van Der Zee R, Pisa L (2012) NCB Reports: Monitor Uitwintering Bijenvolken 2011. <http://www.beemonitoring.org/Downloads/MonitorUitwinteringBijenvolken2011.pdf>
4. Van Der Zee R, Pisa L (2013) NCB Reports: Monitor Uitwintering Bijenvolken 2012. <http://www.beemonitoring.org/Downloads/Monitor-Uitwintering-Bijenvolken-2012.pdf>
5. Van Der Zee R (2013) NCB Reports: Monitor Uitwintering Bijenvolken 2013. <http://www.beemonitoring.org/Downloads/Monitor-Uitwintering-Bijenvolken-2013.pdf>
6. Van Der Zee R, Pisa L, Andonov S, Brodschneider R, Charrière JD, Chlebo R, et al. (2012) Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008–2009 and 2009–2010. *Journal of Apicultural Research* 51(1): 100–114. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.51.1.12>
7. Zuur A, Ieno EN, Walker N, Saveliev AA, Smith GM (2009) *Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R*. DOI: 10.1007/978-0-387-87458-6 1, New York: Springer, Statistics for Biology and Health.
8. Fluri P, Lüscher M, Wille H, Gerig L (1982) Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. *Journal of Insect Physiology* 28: 61–68.
9. Van Dooremalen C, Gerritsen L, Cornelissen B, Van Der Steen JJM, Van Langevelde F, Blacquière T (2012) Winter survival of individual honey bees and honey bee colonies depends on level of *Varroa destructor* infestation. *PLoS ONE* 7(4): e36285 DOI: 10.1371/journal.pone.0036285
10. Blacquière T, Smagghe G, van Gestel CAM, Mommaerts V (2012) Neonicotinoids in bees: A review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21(4): 973–992.
11. Bleker H (2011) Beantwoording vragen n.a.v. schriftelijk overleg VC EL&I inzake gewasbeschermingsmiddelen en bijensterfte. Ministerie van Economische Zaken, Landbouw en Innovatie, Agroketens en Visserij, referentie 219450.
12. CBS, PBL, Wageningen UR (2011). Gebruik van gewasbeschermingsmiddelen in de landbouw per gewas, 1995–2008 (indicator 0006, versie 05, 11 januari 2011). [www.compendiumvoordeleefomgeving.nl](http://www.compendiumvoordeleefomgeving.nl). CBS, Den Haag; Planbureau voor de Leefomgeving, Den Haag/Bilthoven en Wageningen UR, Wageningen.
13. Chauzat MP, Carpentier P, Martel AC, Bougeard S, Cougoule N, Porta P, et al. (2009) Influence of pesticide residues on honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) colony health in France. *Environmental Entomology* 38:514–523.
14. Nguyen BK, Saegerman C, Pirard C, Mignon J, Widart J, Tuirionet B, et al. (2009) Does imidacloprid seed-treated maize have an impact on honey bee mortality? *Journal of Economic Entomology* 102:616–623.
15. Genersch E, von der Ohe W, Kaatz H, Schroeder A, Otten C, Büchler R, et al. (2010) The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* 41:332–35.

16. Bayer Crop Science, Brochure\_Calypso\_160805.pdf  
[http://www.bayercropscience.nl/BAYER/CropScience/BCS\\_NL.nsf/id/8A6E66B14683C02BC125758F005FF511/\\$file/Brochure\\_Calypso\\_160805.pdf?open](http://www.bayercropscience.nl/BAYER/CropScience/BCS_NL.nsf/id/8A6E66B14683C02BC125758F005FF511/$file/Brochure_Calypso_160805.pdf?open)
17. Van Dijk TC, Van Staalduinen MA, Van der Sluijs JP (2013) Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid. PLoS ONE 8(5): e62374. DOI: 10.1371/journal.pone.0062374
18. Van Der Zee R, Brodschneider R, Brusbardis V, Charrière JD, Chlebo R, Coffey MF, et al. (2014) Results of international standardised beekeeper surveys of colony losses for winter 2012–2013: analysis of winter loss rates and mixed effects modelling of risk factors for winter loss. Journal of Apicultural Research 53(1):19–34. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.53.1.02>
19. Drager K, Hay J (2012) Exploiting random intercepts: two case studies in sociophonetics. Language Variation and Change 24(1): 59–78. <http://dx.doi.org/10.1017/S0954394512000014>
20. R Development Core Team (2011) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing; Vienna, Austria. ISBN 3–900051–07–0. <http://www.R-project.org/>
21. SANCO/12571/2013 Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.  
[http://ec.europa.eu/food/plant/plant\\_protection\\_products/guidance\\_documents/docs/qualcontrol\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/plant_protection_products/guidance_documents/docs/qualcontrol_en.pdf)
22. OIE Terrestrial Manual (2008), 6<sup>th</sup> Edition (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals), World Organisation for Animal Health, page 428.  
[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.02.07\\_VARROOSIS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.07_VARROOSIS.pdf)
23. Chantawannakul P, Ward L, Boonham N, Brown M (2006) A scientific note on the detection of honey bee viruses using real-time PCR (TaqMan) in Varroa mites collected from a Thai honey bee (*Apis mellifera*) apiary. Journal of Invertebrate Pathology 91: 69–73.
24. Botías C, Martín-Hernández R, Días J, García-Palencia P, Matabuena M, Juarranz A, et al. (2011) The effect of induced queen replacement on *Nosema* spp. infection in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. Environmental Microbiology 14: 845–59.
25. Kleijn D, Raemakers I (2008) A retrospective analysis of pollen host plant use by stable and declining bumblebee species. Ecology 89: 1811–1823.
26. Van Der Zee R, Gray A, Holzmann A, Pisa L, Adjlane N, Brodschneider R, et al. (2013) Standard survey methods for estimating colony losses and explanatory risk factors in *Apis mellifera*. In Dietemann V, Ellis J D, Neumann P (editors), The COLOSS BEEBOOK, Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* research. Journal of Apicultural Research 52(4): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.18>
27. Liebig G (2001) How many varroa mites can be tolerated by a honey bee colony? Apidologie 32: 482–484.
28. Goulson, D (2013) An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. Journal of Applied Ecology 50(4):977–987; DOI: 10.1111/1365-2664.12111
29. Jeschke P, Nauen R, Schindler M, Elbert A (2011) Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59:2897–2908.
30. Becher MA, Osborne JL, Thorbek P, Kennedy PJ, Grimm V (2013) Towards a systems approach for understanding honeybee decline: a stocktaking and synthesis of existing models. Journal of Applied Ecology 50: 868–880.
31. Rortais A, Arnold G, Halm MP, Touffet-Briens F (2005) Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. Apidologie 36: 71–83.
32. Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, Roe MR (2004) Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. Crop Protection 23:371–378.
33. Laurino D, Porporato M, Patetta A, Manino A (2011) Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: laboratory tests. Bulletin of Insectology 64(1) :107–113, ISSN 1721–8861.
34. Maccagnani B, Ferrari R, Zucchi L, Bariselli M (2008) Difendersi dalle cavallette, ma tutelare le api. L'Informatore Agrario 64 (25): 53–56.



35. Ramirez-Romero R, Chaufaux J, Pham-Delègue M (2005) Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. *Apidologie* 36: 601–611.
36. Koninklijk Nederlands Meteorologisch Instituut KNMI, Ministerie van infrastructuur en Milieu. [http://www.knmi.nl/klimatologie/maand\\_en\\_seizoenoverzichten/](http://www.knmi.nl/klimatologie/maand_en_seizoenoverzichten/)
37. Wallner K (1999) Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie* 30: 235–248.
38. Retschnig G, Williams GR, Odemer R, Boltin J, Di Poto C, Mehlmann MM, et al. (2015) Effects, but no interactions, of ubiquitous pesticide and parasite stressors on honey bee (*Apis mellifera*) lifespan and behaviour in a colony environment. *Environmental Microbiology* 03/2015 DOI: 10.1111/1462-2920.12825
39. Wille M, Wille H (1983) Vergleichende pollenanalytische Untersuchungen des Rückhaltens in Pollenfallen, Ermittlungsjahre 1981 und 1982, *Schweiz. Bienenztg* 5, 253–268.
40. Wille H, Wille M, Kilchenmann V, Imdorf A, Bühlmann G (1985) Pollenernte und Massenwechsel von drei *Apis mellifera* Völkern auf demselben Bienenstand in zwei aufeinanderfolgenden Jahren, *Revue Suisse de Zoologie* 92: 897–914.
41. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) (National Institute for Public Health and Environment), Ministry of Health, Welfare and Sports, Grootschalige Concentratie- en Depositiekaarten Nederland (2013).
42. Simon-Delso N, San Martin G, Bruneau E, Minsart LH, Mouret C, Hautier L (2014) Honeybee colony disorder in crop areas: The role of pesticides and viruses. *PLoS ONE* 9(7): e103073. DOI:10.1371/journal.pone.0103073
43. Koninklijk Meteorologisch Instituut KMI. <http://www.meteo.be/meteo/view/nl/6470205-Zomer+2011.html>
44. Ravoet J, Maharramov J, Meeus I, De Smet L, Wenseleers T, Smagghe G, et al. (2013) Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality. *PLoS ONE* 8(8): e72443. DOI: 10.1371/journal.pone.0072443

## Appendix

Tabel S1. Referentie materiaal gewasbeschermingsmiddelen

Pesticide	Origin <sup>(1)</sup>	Purity	Stock solution		
			Concentration	Solvent <sup>(2)</sup>	Concentration mix
			ug/ml		(µg/ml)
6-Chloronicotinic acid	S	99.0	2000	MeOH	20
Acetamiprid	S	99.9	2000	MeOH	1.0
Clothianidin	S	99.9	2000	MeOH	4.0
Coumaphos	E	96.0	2000	ACN	4.0
DMA	S	99.0	2000	MeOH	50
DMF	S	97.0	2000	MeOH	10
DMPF	S	99.7	500	MeOH	10
Fipronil	E	98.0	2000	MeOH	1.0
Fipronil-sulfone	E	99.5	2000	ACN	1.0
Fipronil-carboxamide	E	96.5	100	ACN	1.0
Fipronil-desulfinyl	E	96.5	100	ACN	1.0
Fipronil-sulfide	E	99.5	1000	MeOH	1.0
Fluvalinate-tau	E	91.0	2000	ACN	20
Imidacloprid	E	99.0	2000	MeOH	1.0
Imidacloprid olefin	B	97.9	500	MeOH	10
Imidacloprid urea	B	99.4	500	MeOH	1.0
Imidacloprid, 5-hydroxy	B	96.7	500	MeOH	10
Imidacloprid, desnitro	B	97.9	500	MeOH	1.0
Imidacloprid, desnitro olefin	B	99.9	500	MeOH	1.0
Piperonyl butoxide	E	92.5	2000	ACN	1.0
Propiconazole	E	97.0	2000	MeOH	10
Thiacloprid	E	99.5	1000	MeOH	2.0
Thiamethoxam	E	99.5	2000	MeOH	4.0
Triflumizole	S	99.8	2000	MeOH	2.0

<sup>(1)</sup> S = Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Nederland; E = Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Duitsland; B = Bayer Crop Science, Mijdrecht, Nederland, <sup>(2)</sup> ACN = acetonitrile; MeOH = methanol

Tabel S2. Lijst van analytes met MS/MS parameters

Pesticide	m/z Precursor ion	DP (V)	m/z Product ions	CE (V)	CXP (V)
6-Chloronicotinic acid	155.9	-50	111.9	-14	-13
Acetamiprid	223	51	126.0/73.0	29/79	10/12
Clothianidin	249.9	46	169.1/132.0	17/23	12/10
Coumaphos	363	85	227.0/307.0	35/23	15/15
DMA	122	91	107.1/77.1	23/37	8/10
DMF	150	41	107.1/77.0	27/53	8/12
DMPF	163	76	122.1/107.2	23/33	8/8
Fipronil	434.9	-50	329.7/249.9	-18/-36	-21/-17
Fipronil-carboxamide	452.9	-80	348.0/303.8	-22/-34	-23/-21
Fipronil-desulfinyl	387	-50	350.8/281.8	-20/-44	-25/-17
Fipronil-sulfide	418.9	-40	261.9/382.8	-40/-16	-17/-11
Fipronil-sulfone	450.9	-30	281.9/414.7	-40/-22	-19/-29
Fluvalinate-tau	503	30	181.0/208.1	35/17	12/14
Imidacloprid	256.1	41	209.0/175.1	21/25	14/12
Imidacloprid olefin	253.9	56	171.2/204.9	25/21	12/14
Imidacloprid urea	212.2	41	128.0/99.1	25/25	10/8
Imidacloprid, 5-hydroxy	271.9	51	146.1/225.1	39/23	10/16
Imidacloprid, desnitro	210.9	76	90.1/72.9	47/77	8/6
Imidacloprid, desnitro olefin	208.9	66	126.0/73.0	29/67	10/8
Piperonyl butoxide	356.2	31	177.1/119.1	19/47	25/25
Propiconazole	342	106	159.0/69.1	37/23	10/6
Thiacloprid	253	90	126.0/186.0	29/19	15/15
Thiamethoxam	292	41	210.9/180.9	17/31	14/12
Triflumizole	346	26	278.0/73.1	15/21	18/10

De volgende 2 data sets kunnen worden gedownload op

Tabel S3. Validatie voor honing

Pesticide	SL	Recovery								
		1x SL			2x SL			10x SL		
	(µg/kg)	N	Avg.(%)	RSD(%)	n	Avg.(%)	RSD(%)	n	Avg.(%)	RSD(%)
6-Chloronicotinic acid	10	10	26	15	8	23	21	10	22	19
Acetamiprid	0.50 <sup>(1)</sup>	10	94	4.5	8	94	4.6	10	90	5.7
Clothianidin	2.0	10	92	9.3	8	93	5.7	10	92	5.3
Coumaphos	2.0 <sup>(2)</sup>	8	92	6.7	6	90	6.8	8	88	7.6
DMA	25	10	82	12	8	85	7.6	10	88	14
DMF	5.0	10	88	5.0	8	89	5.5	10	87	3.9
DMPF	5.0 <sup>(3)</sup>	10	89	4.0	8	89	5.9	10	65	20
Fipronil	0.50	10	108	15	8	99	12	10	103	7.2
Fipronil-carboxamide	0.50	10	94	8.3	8	92	7.4	10	96	3.0
Fipronil-desulfinyl	0.50	10	104	12	8	95	6.9	10	98	4.3
Fipronil-sulfide	0.50	10	106	15	8	95	9.2	10	101	5.0
Fipronil-sulfone	0.50	10	99	12	8	92	7.9	10	96	3.5
Fluvalinate-tau	10 <sup>(4)</sup>	10	78	6.8	8	79	5.9	10	82	10
Imidacloprid	0.50 <sup>(5)</sup>	10	90	14	8	91	7.1	10	91	3.2
Imidacloprid olefin	5.0	10	96	10	8	94	13	10	94	5.4
Imidacloprid urea	0.50	10	93	5.7	8	92	3.7	10	91	3.9
Imidacloprid 5-hydroxy	5.0	10	94	2.8	8	92	6.1	10	91	5.0
Imidacloprid, desnitro	0.50	10	70	4.2	8	67	4.6	10	95	6.8
Imidacloprid, desnitro olefin	0.50	10	74	5.2	8	73	5.4	10	91	3.8
Piperonyl-butoxide	0.50	8	85	3.3	6	82	3.3	8	84	2.9
Propiconazole	5.0 <sup>(6)</sup>	10	96	3.5	8	93	5.0	10	93	4.4
Thiacloprid	1.0 <sup>(7)</sup>	10	93	2.5	8	93	6.1	10	91	5.4
Thiamethoxam	2.0	10	95	5.4	8	94	5.0	10	92	4.8
Triflumizole	1.0	10	93	4.1	8	92	5.9	10	91	5.1

<sup>(1)</sup> LOD = 0.20 µg/kg, <sup>(2)</sup> LOD = 1.5 µg/kg, <sup>(3)</sup> LOD = 2.5 µg/kg, <sup>(4)</sup> LOD = 4.0 µg/kg, <sup>(5)</sup> LOD = 0.30 µg/kg, <sup>(6)</sup> LOD = 1.0 µg/kg, <sup>(7)</sup> LOD = 0.25 µg/kg

Tabel S4. Validatie voor bijen

Pesticide	SL	Recovery								
		1x SL			2x SL			10x SL		
	(µg/kg)	n	Avg. (%)	RSD (%)	n	Avg. (%)	RSD (%)	n	Avg. (%)	RSD (%)
6-Chloronicotinic acid	10	4	29	9.5	4	30	20	4	27	15
Acetamiprid	0.50 <sup>(1)</sup>	8	85	9.1	8	83	9.5	6	79	9.7
Clothianidin	2.0	8	88	26	8	93	18	6	80	23
Coumaphos	2.0 <sup>(2)</sup>	8	81	3.3	8	84	6.0	6	82	11
DMA	25	8	61	17	8	73	8.6	6	76	16
DMF	5.0	8	86	8.9	8	83	6.6	6	87	9.2
DMPF	5.0	8	84	3.8	8	87	6.1	6	49	7.5
Fipronil	0.50	4	81	15	4	85	6.9	4	82	3.7
Fipronil-carboxamide	0.50	8	84	7.6	8	89	3.4	6	87	12
Fipronil-desulfinyl	0.50	4	78	5.6	4	79	5.0	4	86	9.3
Fipronil-sulfide	0.50	4	86	8.3	4	89	5.7	4	84	4.7
Fipronil-sulfone	0.50	4	88	9.6	4	90	4.6	4	86	3.7
Fluvalinate-tau	10	8	74	25	8	76	22	6	84	11
Imidacloprid	0.50 <sup>(3)</sup>	8	102	11	8	96	12	6	98	16
Imidacloprid olefin	5.0	8	102	16	8	107	20	6	105	23
Imidacloprid urea	0.50	8	86	6.6	8	87	6.6	6	87	13
Imidacloprid, 5-hydroxy	5.0	8	112	21	8	118	34	6	113	30
Imidacloprid, desnitro	0.50 <sup>(4)</sup>	8	67	3.8	8	67	8.9	6	86	5.0
Imidacloprid, desnitro olefin	0.50	8	68	2.2	8	70	10	6	80	4.9
Piperonyl-butoxide	0.50	8	79	8.7	8	79	17	6	86	6.1
Propiconazole	5.0 <sup>(5)</sup>	8	82	4.9	8	86	5.1	6	84	13
Thiacloprid	1.0 <sup>(6)</sup>	8	90	18	8	92	14	6	83	12
Thiamethoxam	2.0	8	94	15	8	95	17	6	82	18
Triflumizole	1.0	8	83	4.3	8	85	5.0	6	81	8.9

<sup>(1)</sup> LOD = 0.20 µg/kg, <sup>(2)</sup> LOD = 0.40 µg/kg, <sup>(3)</sup> LOD = 0.30 µg/kg, <sup>(4)</sup> LOD = 0.20 µg/kg, <sup>(5)</sup> LOD = 2.0 µg/kg, <sup>(6)</sup> LOD = 0.20 µg/kg

Tabel S5. Validatie voor opgeslagen pollen in bijenbrood

Pesticide	SL	Recovery								
		1x SL			2x SL			10x SL		
	(µg/kg)	n	Avg. (%)	RSD (%)	n	Avg. (%)	RSD (%)	n	Avg. (%)	RSD (%)
6-Chloronicotinic acid	10	6	21	8.5	6	21	14	6	21	7.1
Acetamiprid	0.50 <sup>(1)</sup>	6	95	16	6	82	5.8	6	82	4.7
Clothianidin	2.0	6	85	13	6	85	10	6	80	11
Coumaphos	2.0 <sup>(2)</sup>	6	85	3.0	6	80	6.8	6	84	2.4
DMA	25	6	61	9.8	6	62	6.8	6	68	4.3
DMF	5.0 <sup>(3)</sup>	6	105	21	6	86	12	6	90	7.6
DMPF	5.0	6	74	4.2	6	74	7.8	6	45	10
Fipronil	0.50	6	78	9.7	6	80	18	6	81	9.0
Fipronil-carboxamide	0.50	6	90	7.2	6	83	15	6	91	9.1
Fipronil-desulfinyl	0.50	6	70	20	6	76	5.7	6	84	4.6
Fipronil-sulfide	0.50	6	85	4.5	6	81	9.4	6	86	3.9
Fipronil-sulfone	0.50	6	77	10	6	76	8.7	6	87	4.5
Fluvalinate-tau	10	6	73	21	6	61	25	6	70	10
Imidacloprid	0.50 <sup>(4)</sup>	2	128	28	6	129	30	6	91	17
Imidacloprid olefin	5.0	6	85	12	6	80	9.0	6	81	4.3
Imidacloprid urea	0.50 <sup>(5)</sup>	6	61	40	6	87	9.4	6	82	16
Imidacloprid, 5-hydroxy	5.0	6	79	15	6	78	13	6	78	6.9
Imidacloprid, desnitro	0.50 <sup>(6)</sup>	6	50	10	6	51	6.0	6	64	2.6
Imidacloprid, desnitro olefin	0.50	6	44	19	6	40	6.6	6	53	1.3
Piperonyl-butoxide	0.50	6	100	21	6	78	14	6	77	5.8
Propiconazole	5.0 <sup>(7)</sup>	6	81	5.5	6	78	8.4	6	85	3.5
Thiacloprid	1.0 <sup>(8)</sup>	6	55	52	6	69	29	6	73	3.0
Thiamethoxam	2.0	6	81	6.8	6	86	9.1	6	86	3.7
Triflumizole	1.0	6	82	3.6	6	78	5.8	6	83	2.9

<sup>(1)</sup> LOD = 0.25 µg/kg, <sup>(2)</sup> LOD = 1.0 µg/kg, <sup>(3)</sup> LOD = 4.0 µg/kg, <sup>(4)</sup> LOD = 0.75 µg/kg; LOQ = 1.0 µg/kg,

<sup>(5)</sup> LOQ = 1.0 µg/kg, <sup>(6)</sup> LOD = 0.20 µg/kg, <sup>(7)</sup> LOD = 2.5 µg/kg, <sup>(8)</sup> LOD = 0.80 µg/kg; LOQ = 2.0 µg/kg

Tabel S6. Aantal geanalyseerde monsters per matrix voor iedere component

Component	bijen			Pollen in bijenbrood			Honing		
	Samp <sup>(1)</sup>	Pos <sup>(2)</sup>	Range <sup>(3)</sup>	Samp <sup>(1)</sup>	Pos <sup>(2)</sup>	Range <sup>(3)</sup>	Samp <sup>(1)</sup>	Pos <sup>(2)</sup>	Range <sup>(3)</sup>
6-Chloronicotinic acid	42	0/0	na	42	0/0	na	42	0/0	na
Acetamiprid	84	1/1	0.52	79	2/3	0.65–5.2	80	1/6	0.8–3.7
Clothianidin	43	0/0	na	42	0/0	na	42	0/0	na
Coumaphos	84	2/2	5.0–12	79	9/5	4.1–26	80	0/2	2.3–2.7
DMA <sup>(4)</sup>	43	0/0	na	42	0/0	na	42	0/0	na
DMF <sup>(5)</sup>	84	0/0	na	79	0/1	6.2	80	0/2	17.8–22
DMPF <sup>(6)</sup>	84	0/0	na	79	0/2	7.6–9.8	80	1/1	6.4
Fipronil	84	0/0	na	79	0/2	2.1–2.9	80	0/0	na
Fipronil carboxamide	43	0/0	na	42	0/0	na	42	0/0	na
Fipronil desulfinyl	43	0/0	na	42	0/1	0.9	42	0/0	na
Fipronil sulfide	43	0/0	na	42	0/0	na	42	0/0	na
Fipronil sulfone	43	0/0	na	42	0/0	na	80	0/0	na
Fluvalinate-tau	84	0/0	na	79	0/2	13–23	80	0/0	na
Imidacloprid	84	2/0	na	79	3/1	1.1	80	2/2	1.0
Imidacloprid olefin	43	0/0	na	42	0/0	na	42	0/0	na
Imidacloprid urea	43	0/0	na	42	0/0	na	42	0/0	na
Imidacloprid, 5-hydroxy	43	0/0	na	42	0/0	na	42	0/0	na
Imidacloprid, desnitro	84	0/1	0.65	79	5/0	na	80	0/0	na
Imidacloprid, desnitro olefin	43	0/0	na	42	0/0	na	42	0/0	na
Piperonyl butoxide	84	0/0	na	79	0/6	0.5–2.3	80	0/0	na
Propiconazole	84	2/0	na	78	0/2	8.3–371	80	0/0	na
Thiacloprid	84	5/5	1.1–3.8	79	0/19	1.0–66	80	8/13	1.4–15
Thiamethoxam	43	0/0	na	42	0/0	na	42	0/0	na
Triflumizole	43	0/0	na	42	0/0	na	42	0/0	na

(1) Number of analysed samples, (2) Number of positive samples: >LOD < LOQ (trace amount) / >LOQ, (3) range of positive samples >LOQ in µg/kg, (4) amitraz metabolite: dimethylaniline, (5) amitraz metabolite: dimethylphenylformamide, (6) amitraz metabolite: dimethylphenyl-N-methylformamide, na: not available

**N. B. De ondersteunende data sets:**

**S1 Dataset.** Excel data spreadsheet. Data for all the colonies for re-creation of the significant results.

**S2 Dataset.** Excel data spreadsheet. Data for the 75 colonies used in the final model fitting with the relevant variables.

Kunt u downloaden via de link aan het eind van het originele PLoS ONE artikel. Het originele artikel kunt u downloaden met deze link:

<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0131611>