

ILVO



Flanders

is agriculture and fisheries

**Veldproef:
effect van de toevoeging van een mengsel
van stearine- en palmitinezuur (stearine
genaamd) aan bijenwas op de ontwikkeling
van het werksterbijenbroed**

Eindrapport: 30 juni 2017

Dr. Wim Reybroeck

ILVO-T&V, Melle, België

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Wim Reybroeck', written in a cursive style.

Inleiding

In 2016 signaleerden imkers problemen in verband met de slechte ontwikkeling en afsterven van het bijenbroed na het plaatsen van nieuwe op industriële schaal geproduceerde waswafels. Na analyses bleek de afwijkende bijenwas een sterk verhoogd gehalte aan stearine- en palmitinezuur te bevatten wat wijst op de toevoeging van stearine. De toevoeging van 20 à 30 % stearine werd niet alleen in België gesignaleerd maar ook in Duitsland en Nederland. Er zijn weinig literatuurgegevens beschikbaar over de effecten van stearine op het bijenbroed. Daarom heeft de Federale Overheidsdienst Volksgezondheid, Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu aan het Instituut voor Landbouw-, Visserij- en Voedingsonderzoek in Melle (BE) gevraagd om deze studie uit te voeren.

Doelstellingen

Onderzoeken of toevoeging van stearine aan bijenwas leidt tot mortaliteit van een gedeelte van het werksterbroed ('hagelschot').

Indien mortaliteit wordt vastgesteld, bepaling van de mate van mortaliteit bij diverse percentages stearine.

Materiaal en methoden

Referentiebijenwas

Als referentie werd bijenwas uit Kameroen gebruikt: 'Geselecteerde gegoten bijenwas', Dadant Blatt, 41x26,3 cm, Lot 460, Tht. 13/02/2020 (afkomstig van een Belgische producent van was-raten) = ('Ref'). De was bevat zeer lage gehalten aan pesticiden (analyseresultaat gekend) en voldoet inzake smeltpunt, zuur- en estergehalte zoals bepaald voor zuivere bijenwas (¹).

Stearine

De gebruikte stearine is een mengsel van de (predominante) verzadigde vetzuren palmitinezuur C16 en stearinezuur C18 (CAS-nr. 67701-03-5) verkregen uit ruwe palmolie (afkomstig van een Belgische producent van vetzuren) met een samenstelling zoals weergegeven in *Tabel 1*.

Tabel 1. Samenstelling van de in de veldproeven gebruikte stearine (analyse producent).

Stearine Oorsprong: Palmolie	Palmitine- zuur C16:0	Stearine- zuur C18:0	Andere (C12,C14, C15, C17, C18:1, C20)	Zuurwaarde	Verzepings- getal (mg KOH/g)	Smeltpunt
	43,5%	54,2%	2,3%	206,1	206,1	Ca. 56 °C

Gegoten waswafels met toegevoegde stearine

De referentiebijenwas werd hersmolten in een pyrexbeaker om er in het labo opnieuw gegoten waswafels ('A') van te maken in een waswafeltoestel 'Normal 350 x 200' (Graze, Weinstadt, DE) met waterkoeling. De gegoten waswafels ('A') hebben dezelfde samenstelling als de aangekochte waswafels.

Aan de was werd in toenemende gewichtconcentraties stearine toegevoegd, nl. 15, 20, 25, 30,

(¹) Zoals vastgesteld in Verordening (EU) nr. 231/2012 tot vaststelling van de specificaties van de in de bijlagen II en III bij Verordening (EG) nr. 1333/2008 van het Europees Parlement en de Raad opgenomen levensmiddelen-additieven (zuurwaarde en verzepingswaarde), en overeenkomstig de relevante literatuur.

35 en 40%. Van de verschillende wassamenstellingen werden telkens waswafels gegoten op dezelfde wijze als ('A'). De bekomen gegoten waswafels zijn: 15% ('B'), 20% ('C'), 25% ('D'), 30% ('E'), 35% ('F') en 40% stearine ('G').

Stalen ('A'), ('B'), ('D') en ('F') van de met stearine gemengde bijenwas werden in het in analyse van bijenwas gespecialiseerd laboratorium Ceralyse (Celle, DE) geanalyseerd op zuurwaarde, esterwaarde, verzepingsgetal en het gehalte aan koolwaterstoffen (zie verder 'Resultaten en bespreking'). Tevens werd op deze stalen bij Ceralyse een gaschromatografische analyse uitgevoerd (zie verder 'Resultaten en bespreking').

Parallel onderzochte waswafelstaal

('H'): Industrieel geproduceerde bijenwasraat van een producent van wasraten. Het resultaat van staal H wordt niet opgenomen in dit rapport.

Bijenvolken en bijenstand

De bijenstand bevindt zich op de Brusselsesteenweg 370 te Melle. Er werd gebruikt gemaakt van 4 bijenkasten type Dadant Blatt, bevolkt met de Europese honingbij (*Apis mellifera*). Twee koninginnen (*Carnica Troiseck*) zijn gekweekt door Jacques Levrau en bevrucht in Kreverhille in 2016, één koningin (F1 - *Carnica Troiseck*) is gekweekt door André Decaluwe en standbevrucht in 2016 terwijl de laatste koningin een jonge koningin (2017) betreft, dochter van een koningin van Willy Geirnaert en standbevrucht in Melle.

Proefopzet

Er werd gebruik gemaakt van aangekochte waswafels van goede bijenwas ('Ref'). Deze werden op het formaat gesneden van hoogselraampjes type Dadant Blatt, binnenafmetingen 13x41 cm. In deze waswafels werden vier openingen van 8x8 cm (= 64 cm²) aangebracht waarin telkens een stukje uit te testen gegoten waswafel past (Figuur 1). De waswafel met de openingen en de stukjes gegoten waswafel worden op hun plaats gehouden door een op de juiste positie aangebrachte en ingesmolten bedrading. Op elk testraam werd steeds een stukje gegoten referentiewas aangebracht als een soort interne controle.



Figuur 1. Voorstelling op schaal van een Dadant Blatt hoogselraam met 4 stukken uit te testen waswafel (1 referentiewaswafel en 3 verschillende situaties).

Elk testraampje werd apart in een bijenvolk in het hoogsel gehangen om de wasraat door de werksters te laten opbouwen. Na 2 tot 3 dagen werd in het betreffend bijenvolk de koningin opgezocht en op het testraampje met opgebouwde wasraat opgesloten door langs beide zijden een kadertje met platte koninginnenrooster aan te brengen (= arrestraam). Het arrestraam werd in het midden van het hoogsel geplaatst. Op die manier kan de koningin enkel op het betreffende raampje eitjes leggen. Na 2 dagen werd de koningin van het raam verwijderd en losgelaten in de broedruimte beneden onder een koninginnenrooster zodat er geen verstoring door het later herbeleggen van cellen door de koningin kan optreden. Het belegd testraam werd telkens gecontroleerd of elk celletje met een eitje belegd was en tevens gefotografeerd. Het testraampje werd na deze controles in het volk teruggeplaatst ter verdere ontwikkeling van het werksterbroed, die ook opgevolgd werd. De laatste controle (en foto-opnames) vond telkens plaats op het moment dat alle larven verpopt waren en het broed verzegeld was. In die fase kan zeer goed het onderscheid gemaakt worden tussen open cellen waarin het eitje/larve afgestorven is en de gesloten cel met een nog levende pop. De detailfoto's van elke situatie werden daartoe geprint en de open en gesloten cellen manueel geteld. Op die manier kan het percentage overleving berekend worden. Gezien een bijenraat langs beide zijden van de waswafel (middenwand) opgebouwd wordt heeft men voor elk testraampje resultaten voor zowel de linker- als de rechterzijde, m.a.w. resultaten voor ongeveer een 210 cellen voor elke zijde.

Deze aanpak laat toe om zo veel als mogelijke externe invloedfactoren (koningin, voeding, ...) op de overleving van het broed uit te schakelen. De positie binnen het raam zelf heeft mogelijks een invloed; om die reden werden de posities van de stukjes waswafel binnen de raat bij de herhaling gewijzigd: elke situatie wordt minimaal *in duplo* getest. Daarbij wordt de parallele situatie in een tweede bijenkast (andere koningin) getest. Daarbij worden wel de stukjes waswafel op een andere positie gemonteerd: positie 1 naar positie 3; positie 2 naar positie 4; positie 3 naar positie 1; positie 4 naar positie 2.

Er werden proeven uitgevoerd in de periode 27 april - 20 juni 2017 met verschillende klimatologische omstandigheden. Bij de eerste testen was het zeer koud met weinig dracht, de tweede periode zeer warm met veel dracht van de acacia (*Robinia*), terwijl in het begin van de derde testperiode de temperaturen en de dracht normaal waren maar naar het einde toe was het opnieuw zeer warm met veel dracht (*Castanea*).

Niettegenstaande in alle gevallen zo goed als elk celletje van alle testramen belegd was, werd nadien in enkele gevallen vastgesteld dat de eitjes in de cellen tegen de raamkant niet verder verzorgd werden in de koude weerperiode bij het testraam 1 in kolonie 4 (zwakste kolonie). Bij dit testraam werd voor positie 1 en 4 enkel de helft van de cellen, gelegen naar het midden toe, geteld (blauwe aanduiding in Tabel 2).

Anderzijds werd in de warme periode vastgesteld dat cellen met eitjes snel met nectar en halfrijpe honing werden gevuld in sterke kolonies. De tellingen van de betreffende posities werden geannuleerd (met geel aangeduid in Tabel 2). Opmerkelijk is dat dit nooit op de posities 2 en 3 voorkwam behalve bij testraam 4 dat volledig geannuleerd werd. Tevens werd vastgesteld dat dit minder snel voorkwam bij de referentiewas ('A').

In *Tabel 2* wordt een overzicht gegeven van de verschillende testramen en de geteste waswafels.

Tabel 2. Overzicht van de verschillende testramen, de positie van de geteste waswafels en de datum waarop de koningin op arrest geplaatst werd.

Testraam	Zijde	Waswafel				Startdatum
		Positie 1	Positie 2	Positie 3	Positie 4	
1	links	A	B	C	D	30/04/2017
	rechts	D	C	B	A	
2	links	A	E	F	G	30/04/2017
	rechts	G	F	E	A	
3	links	A	H	D	H	30/04/2017
	rechts	H	D	H	A	
1bis	links	C	D	A	B	25/05/2017
	rechts	B	A	D	C	
2bis	links	F	G	A	E	25/05/2017
	rechts	E	A	G	F	
5	links	C	D	A	B	05/06/2017
	rechts	B	A	D	C	

Legende:

Blauw: resultaten gebaseerd op telling van de helft (gericht naar het midden) van het ingebracht stuk bijenwas wegens geen volledige verzorging van het broed (koude);

Geel: resultaten geannuleerd wegens aanwezigheid van nectar/halfrijpe honing.

Resultaten en bespreking

- a) Resultaten analyses wasstalen van referentiewas en van was vermengd met stearine (Ceralyse, Celle, DE)

De resultaten van de analyse bij Ceralyse op zuurwaarde, esterwaarde, verzepingsgetal en het gehalte aan koolwaterstoffen bij monsters ('A'), ('B'), ('D') en ('F') zijn weergegeven in Tabel 3.

Tabel 3. Analyseresultaten Ceralyse

	Zuurwaarde	Esterwaarde	Verzepingsgetal (mg KOH/g)	Totaal koolwaterstoffen	Stearine toegevoegd
Normale waarden ⁽¹⁾	17-24	70-80	87-104	13-13,5 % (Afrikaanse origine)	---
Staal ('A')	18,8	75,4	94,2	13,9 %	0 % (100 % 'Ref') = ('A')
Staal ('B')	47,3	65,0	112,3	11,5 %	15 % (85 % 'Ref')
Staal ('D')	65,7	57,3	123,0	10,4 %	25 % (75 % 'Ref')
Staal ('F')	84,7	49,8	134,5	8,8 %	35 % (65 % 'Ref')

Uit de resultaten blijkt dat toevoeging van stearine resulteert in een stijging van de zuurwaarde en het verzepingsgetal. Anderzijds daalt de esterwaarde en daalt het percentage koolwaterstoffen.

Bij de resultaten merkt Ceralyse op dat het gehalte aan koolwaterstoffen iets hoger is dan normaal voor bijenwas van Kameroense oorsprong ('A'). Dit kan te wijten zijn aan de toevoeging van een zeer kleine hoeveelheid koolwaterstoffen (zoals paraffine) of aan het feit dat de bijenwas voor een groot deel bestaat uit oude raten waardoor dit gehalte iets kan verhogen. Uit literatuur blijkt dergelijke kleine afwijking geen enkele invloed te hebben op de broedontwikkeling.

Bij Ceralyse werd ook een gaschromatografische analyse uitgevoerd. In de chromatogrammen zijn de pieken voor palmitine- en stearinezuur duidelijk aanwezig bij de monsters ('B'), ('D') en ('F'). De chromatogrammen van de referentiewas ('A') en wasstaal ('D') zijn weergegeven in Annex 1.

b) Resultaten broedsterfte

Alle aangeboden waswafels werden door de bijen goed opgebouwd en nadien volledig door de koninginnen belegd. Afsterven van broed vond plaats in het begin van het larvestadium. De tellingen werden uitgevoerd op het moment dat al het overlevend broed verpopt is (gesloten cellen) wat het tellen vereenvoudigt. De resultaten van de tellingen zijn weergegeven in Tabel 4. Daarbij werd de overleving ook berekend ten opzichte van de overleving bekomen met de referentiewas (Kameroen) op dezelfde zijde van het testraampje. Er werd geen afsterven tijdens het popstadium vastgesteld: de poppen ontwikkelden zich tot imago (volwassen bijen).

Tabel 4. Resultaten van de overleving van het werksterbroed in bijenwas van verschillende samenstelling.

Raampje	Zijde	Situatie	Overleving (%)	Gemiddelde overleving (%)	Overleving t.o.v. referentie (%)	Gemiddelde overleving t.o.v. referentie (%)	Code
1	L	A	66,3	67,5	100	100,0	Ref Kameroen
	R		68,8		100		
	L	B	29,8	34,5	45,0	51,0	15% stearine
	R		39,2		57,0		
	L	C	29,8	31,7	45,0	46,9	20% stearine
	R		33,5		48,7		
	L	D	32,7	27,8	49,3	41,3	25% stearine
	R		22,9		33,3		
2	L	A	85,9	88,8	100,0	100,0	Ref Kameroen
	R		91,7		100,0		
	L	E	40,5	35,7	47,2	40,4	30% stearine
	R		30,9		33,7		
	L	F	26,9	29,3	31,3	33,0	35% stearine
	R		31,7		34,6		
	L	G	35,8	30,4	41,6	34,4	40% stearine
	R		25,0		27,3		

Raampje	Zijde	Situatie	Overleving (%)	Gemiddelde overleving (%)	Overleving t.o.v. referentie (%)	Gemiddelde overleving t.o.v. referentie (%)	Code
3	L	A	90,9	89,6	100,0	100,0	Ref Kameroen
	R		88,2		100,0		
	L	H					Commerciële was
	R						
	L	D	47,1	49,5	51,8	55,3	25% stearine
	R		51,9		58,9		
	L	H					Commerciële was
	R						
1bis	L	D	25,6	18,7	32,2	26,3	25% stearine
	R		11,7		20,4		
	L	A	79,7	68,5	100,0	100,0	Ref Kameroen
	R		57,4		100,0		
2bis	L	F	24,1	22,0	27,3	25,1	35% stearine
	R		19,9		22,9		
	L	G	33,6	33,1	38,0	37,8	40% stearine
	R		32,6		37,5		
	L	A	88,4	87,6	100,0	100,0	Ref Kameroen
	R		86,8		100,0		
	L	E	33,0	31,8	37,3	36,2	30% stearine
	R		30,5		35,1		
5	L	D	38,8	42,5	46,0	48,9	25% stearine
	R		46,1		51,8		
	L	A	84,3	86,7	100,0	100,0	Ref Kameroen
	R		89,0		100,0		

De resultaten van de herhalingen per situatie zijn samengevat in Tabel 5. Tevens werd de overleving berekend ten opzichte van de overleving bekomen bij de referentiewas langs de zelfde zijde van het testraam. Deze resultaten zijn weergegeven in Tabel 6.

Bespreking

Op alle testramen was de overleving van het werksterbroed lager bij de was met toegevoegde stearine dan de overleving bij de referentiewas en dit ongeacht het weder, de dracht, de bijenkoningin of het bijenvolk. In de meeste gevallen was het afsterven van werksterbroed zeer beperkt bij de referentiewas. Wel werd soms het afsterven van het broed vastgesteld in de cellen waar de raamdraad was ingesmolten.

De toevoeging van 15% stearine aan bijenwas geeft een significante mortaliteit van werksterbroed in de cellen opgetrokken op waswafels van dergelijke was. Hogere toevoegingen (tot 40%) leiden tot toename van de mortaliteit. Gerelateerd tot de mortaliteit van werksterbroed in de referentiewas bedraagt de gemiddelde mortaliteit bij de was met stearinetoevoeging minimum 49,0% (bij 15% stearine). De hoogste gemiddelde mortaliteit bedraagt 71,0% (bij 35% stearine).

Tabel 5. Samenvatting van de resultaten van de overleving van het werksterbroed in bijenwas van verschillende samenstelling (per situatie).

Overleving (%) per wastype							
A	B	C	D	E	F	G	H
66,3	29,8	29,8	32,7	40,5	26,9	35,8	
68,8	39,2	33,5	22,9	30,9	31,7	25,0	
85,9			47,1	33,0	24,1	33,6	
91,7			51,9	30,5	19,9	32,6	
90,9			25,6				
88,2			11,7				
79,7			38,8				
57,4			46,1				
88,4							
86,8							
84,3							
89,0							
Gemiddelde overleving (%) per wastype							
81,5	34,5	31,7	34,6	33,7	25,7	31,7	

Tabel 6. Samenvatting van de resultaten van de overleving van het werksterbroed in bijenwas van verschillende samenstelling (per situatie) gerelateerd naar de overleving bij referentiewas.

Overleving (%) gerelateerd naar de overleving bij referentiewas per wastype							
A	B	C	D	E	F	G	H
100,0	45,0	45,0	49,3	47,2	31,3	41,6	
100,0	57,0	48,7	33,3	33,7	34,6	27,3	
100,0			51,8	37,3	27,3	38,0	
100,0			58,9	35,1	22,9	37,5	
100,0			32,2				
100,0			20,4				
100,0			46,0				
100,0			51,8				
100,0							
100,0							
100,0							
100,0							
Gemiddelde overleving (%) gerelateerd naar de overleving bij referentiewas per wastype							
100,0	51,0	46,9	43,0	38,3	29,0	36,1	

Conclusie

De resultaten tonen aan dat bijenwas met toegevoegde stearine (in de geteste percentages vanaf 15 %) niet geschikt is voor gebruik als grondstof voor de productie van waswafels voor de bijenteelt.

Opmerkingen bij de resultaten

De aandacht wordt erop gevestigd dat de proef werd uitgevoerd met heel zuivere referentiewas en in gezonde bijenvolken. In veel praktijkgevallen bevat bijenwas nog een bepaald percentage toegevoegde koolwaterstoffen (zoals paraffine) en een hoger gehalte aan residuen van pesticiden die mogelijks een bijkomende (elkaar versterkende) negatieve invloed kunnen uitoefenen op de ontwikkeling van het bijenbroed.

Andere soorten stearine (bijvoorbeeld van een andere oorsprong en met een andere verhouding palmitinezuur/stearinezuur) kunnen een verschillend resultaat opleveren.

De studie geeft slechts een beeld van het effect van stearine op een heel korte tijdsspanne van de levenscycli van een bijenbestand. Met hoge broedverliezen worden de overlevingskansen van een bijenvolk ernstig ingeperkt.

Annex 1 . Chromatogrammen

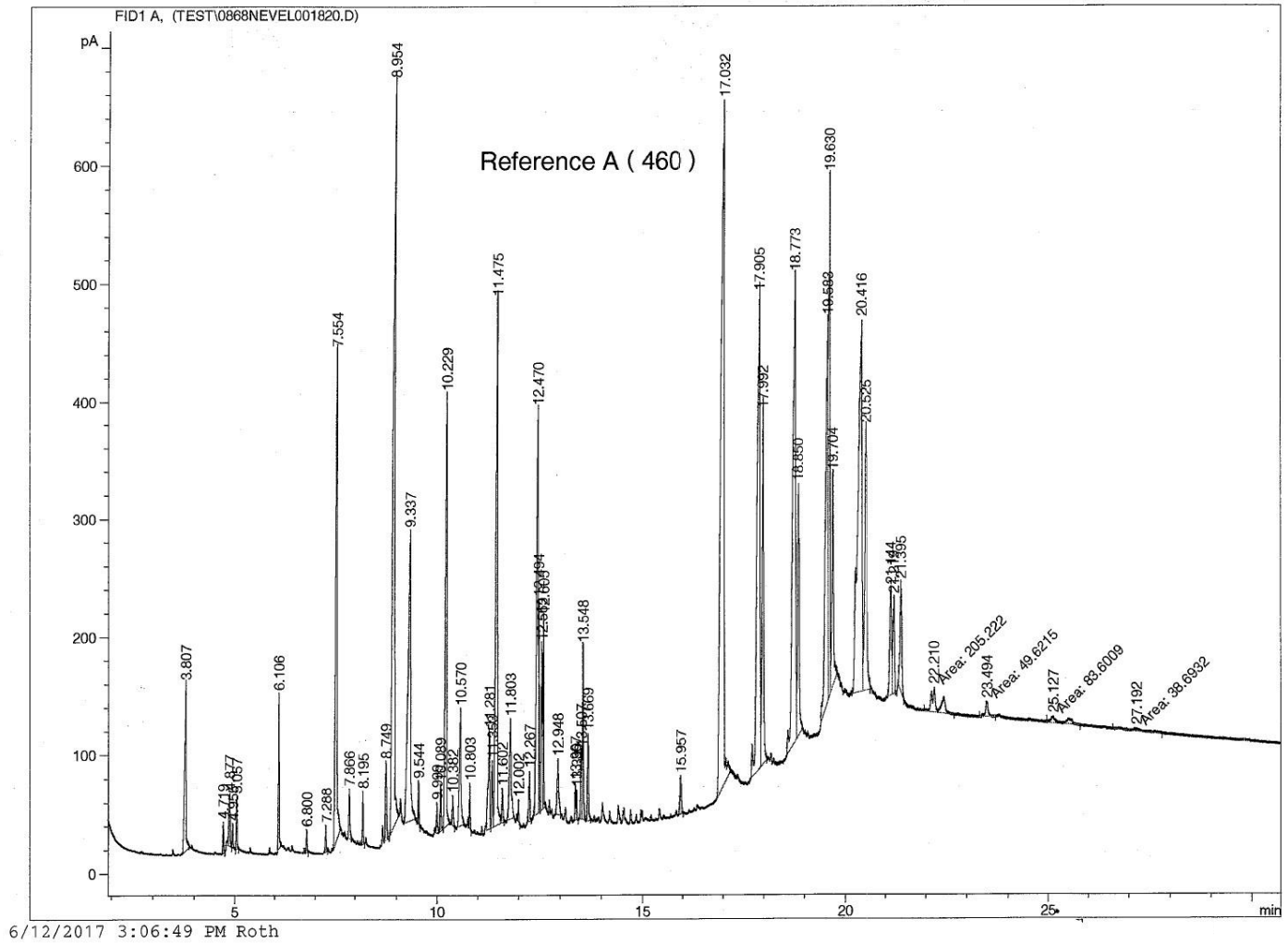


Fig. 2. Chromatogram van de referentiewas ('A').

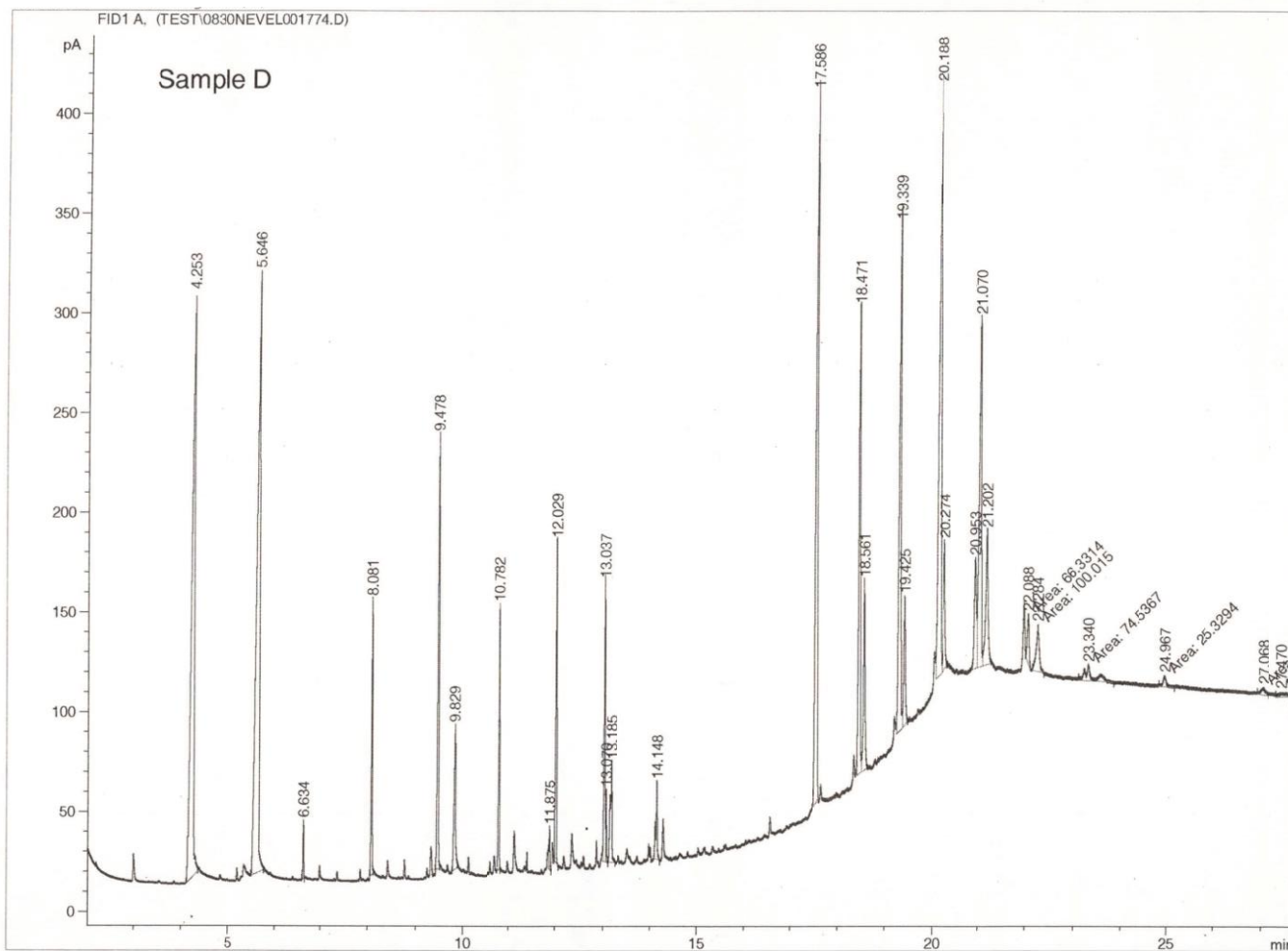


Fig. 3. Chromatogram van wasstaal D (met 25% stearine). De eerste twee grote pieken zijn respectievelijk palmitinezuur en stearinezuur.

Annex 2. Foto's

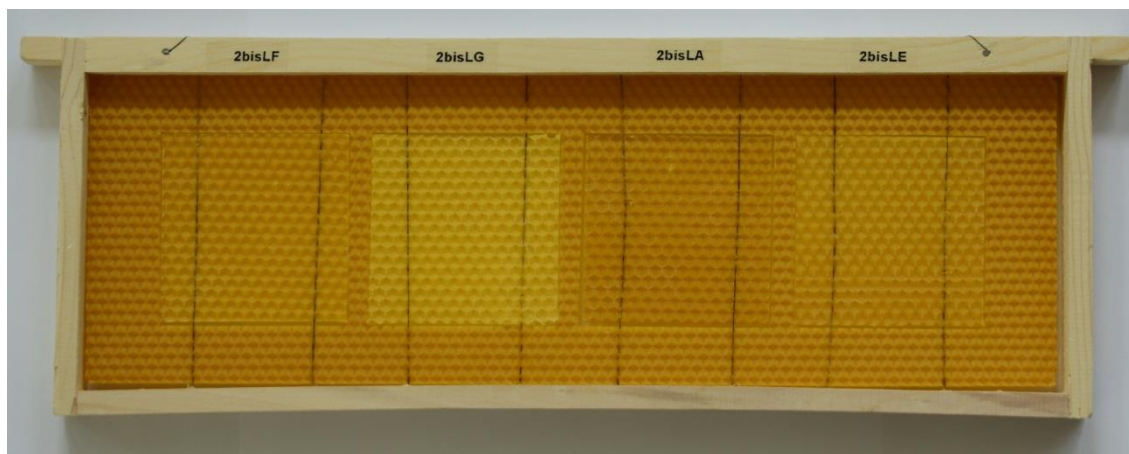


Foto 1: Startfase testraam 2bis, linkerzijde.

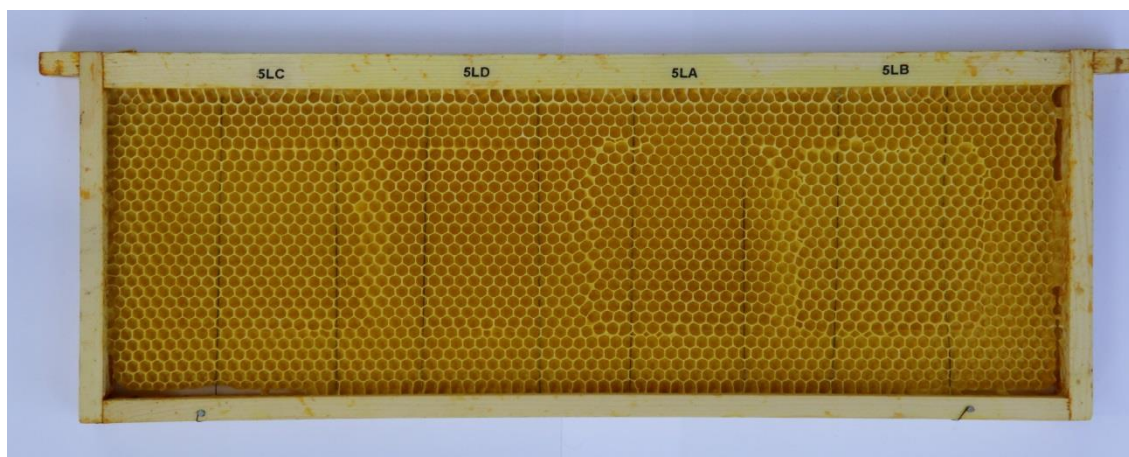


Foto 2: Halfopgebouwd testraam 5, linkerzijde.

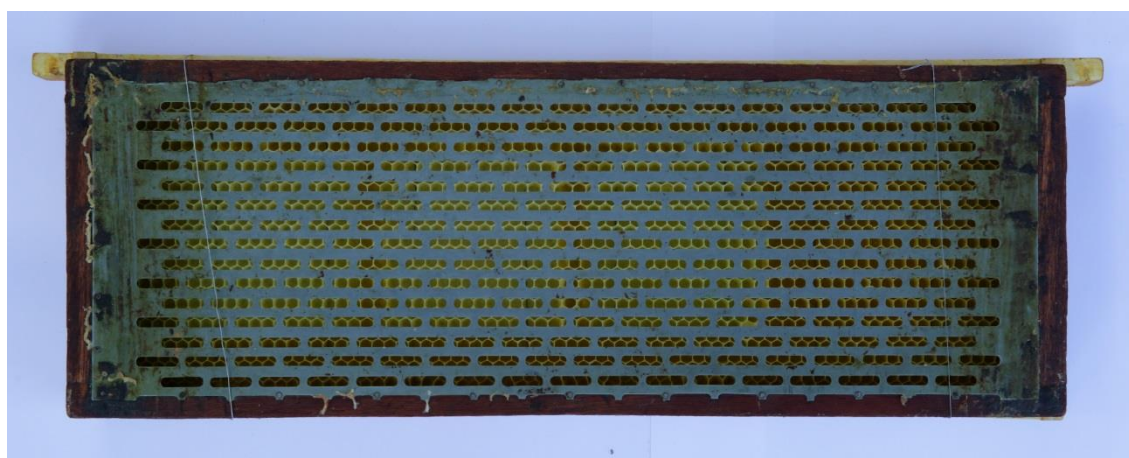


Foto 3: Raampjes met koninginnenrooster rond testraam (= arrestraam).

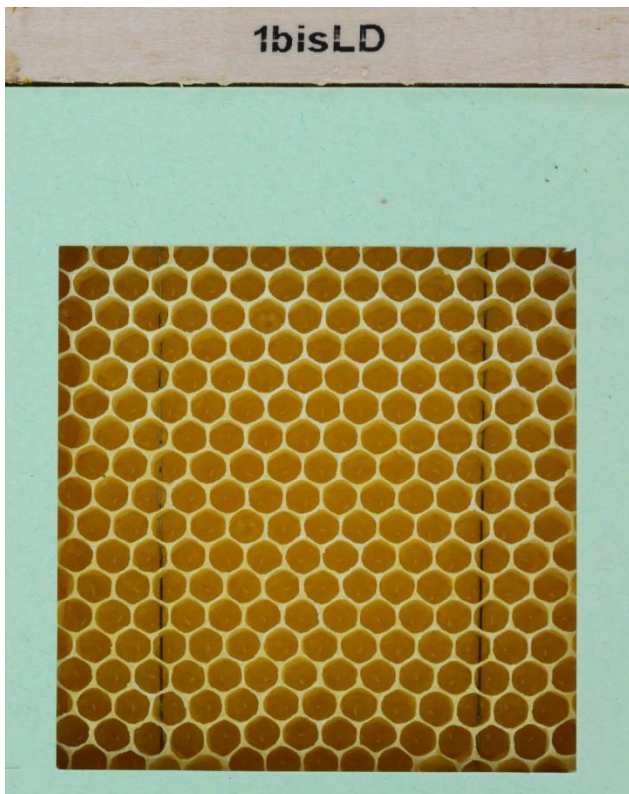


Foto 4. Detail van wasraatje ('D') op testraam 1bis, linkerkzijde, volledig belegd met eitjes.

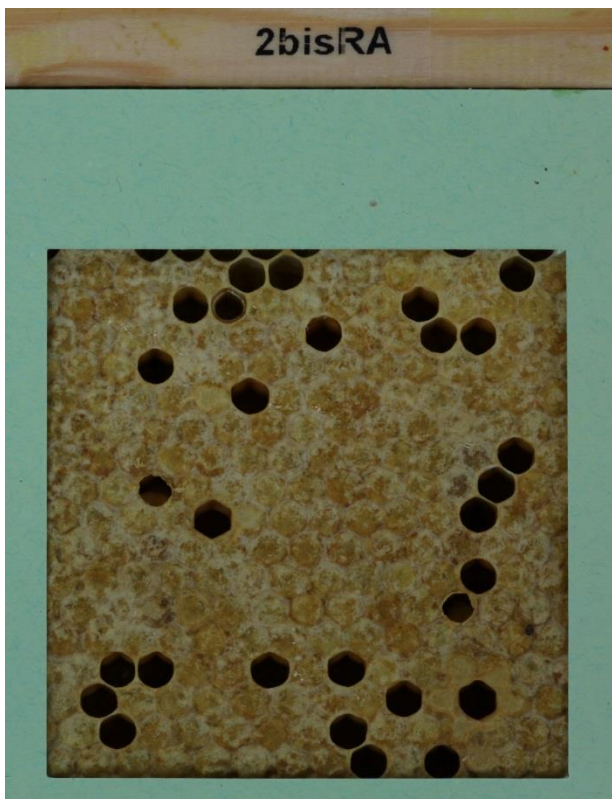


Foto 5. Detail eindfase voor wasraatje ('A') (referentie) op testraam 2bis, rechterzijde zoals gebruikt bij het tellen van de open en gesloten cellen.

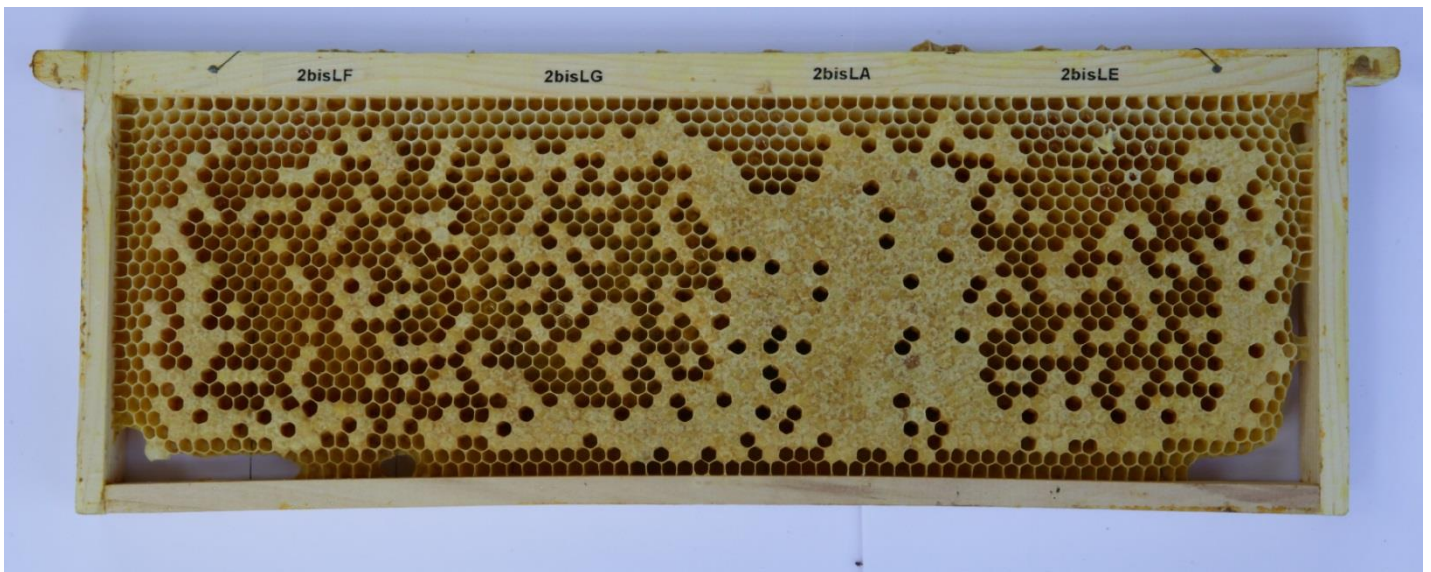


Foto 6. Eindfase testraam 2bis, linkerzijde.

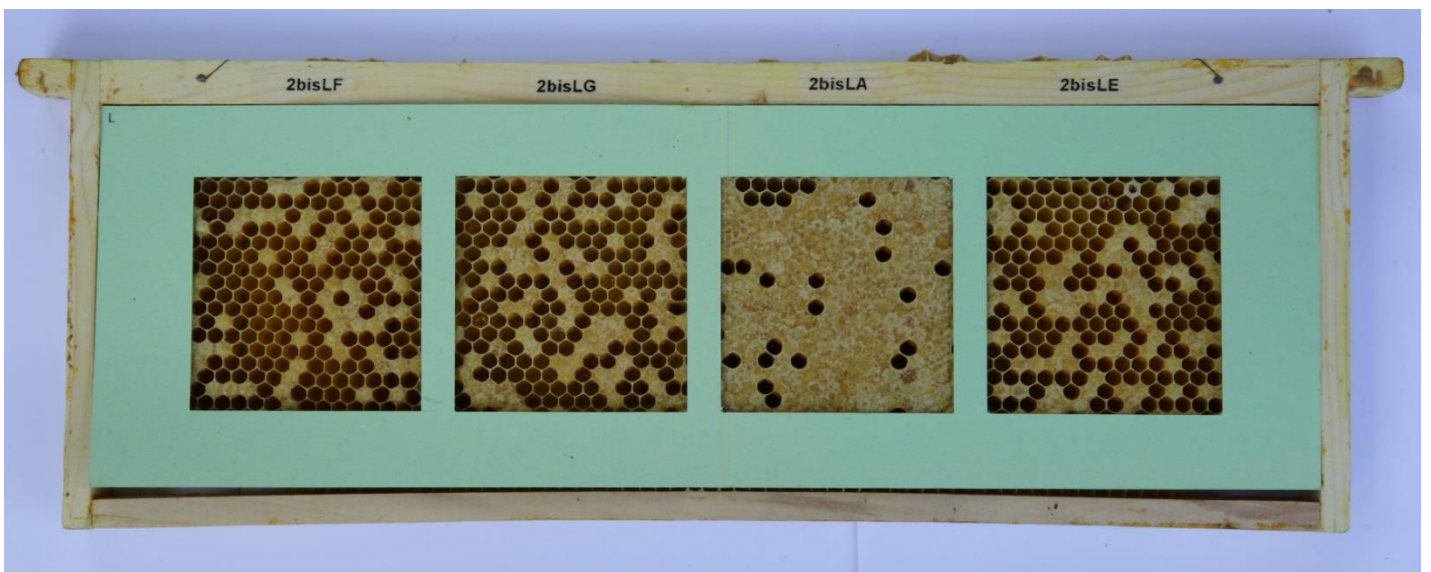


Foto 7. Eindfase testraam 2bis, linkerzijde, met sjabloon.