

Inventariserend onderzoek naar
de potentiële blootstelling van
aquatische organismen aan
plantenmateriaal van Bt-Mais

CGM 2015-02

ONDERZOEKSRAPPORT

Inventariserend onderzoek naar de potentiële blootstelling van aquatische organismen aan plantenmateriaal van Bt-Mais

Eindrapport



Een rapportage van FLORON en Bioclear b.v.
In opdracht van de Commissie Genetische Modificatie (COGEM)

Januari 2015



FLORON
POSTBUS 9010
6500 GL NIJMEGEN
www.floron.nl



Bioclear bv
POSTBUS 2262
9727 DL GRONINGEN
www.bioclear.nl

Colofon

© 2015 FLORON, Nijmegen.

FLORON is een merknaam van Stichting RAVON. Dit project is uitgevoerd door Stichting RAVON in samenwerking met Bioclear b.v.

Tekst: Edwin Dijkhuis, Johan Loermans (FLORON), Marco de Graaff en Marlea Wagelmans (Bioclear)

Foto omslag: Overzicht deellocatie FL01-02 (Geffen) met Tauber stuifmeelval © Johan Loermans

Wijze van citeren: Dijkhuis, J.E., M. Wagelmans, M. de Graaff en J. Loermans, 2015. Inventariserend onderzoek naar de potentiële blootstelling van aquatische organismen aan plantenmateriaal van Bt-Mais. Stichting RAVON, Nijmegen. Rapport 2013-022.

Dit rapport is samengesteld in opdracht van de Commissie Genetische Modificatie (COGEM). De meningen die in het rapport worden weergegeven, zijn die van de auteurs en weerspiegelen niet noodzakelijkerwijs de mening van de COGEM.

Begeleidingscommissie:

Dr. Willem Jan de Kogel (Plant Research International/COGEM lid (voorzitter beg.cie))

Dr. Boet Glandorf (Bureau GGO)

Dr. Tom de Jong (Universiteit Leiden/COGEM lid)

Dr. Steven Declerck (NIOO)

Bart Erkamp, MSc (COGEM secretariaat)

VOORWOORD

In opdracht van de Commissie Genetische Modificatie (COGEM), is het voorliggend onderzoek uitgevoerd om inzicht te krijgen in de potentiële blootstelling van aquatische organismen aan Bt-eiwitten in genetisch gemodificeerde (gg-) maïspollen en de mogelijke effecten hiervan op deze organismen.

Bij de teelt van gg-gewassen kan transgeen plantmateriaal in het oppervlaktewater terecht komen. Dit roept de vraag op of dit een potentieel risico vormt voor aquatische organismen. Onderzoek in de Verenigde Staten heeft laten zien dat tijdens de teelt van insecten-resistente Bt-Mais, aquatische organismen blootgesteld kunnen worden aan Bt-plantmateriaal en Bt-eiwitten. De teelt van Mais vindt in Nederland echter op een andere manier plaats dan in de Verenigde Staten. In de VS wordt alleen de kolf geoogst, waardoor er veel plantmateriaal op de akker achterblijft dat door windverspreiding in het oppervlaktewater kan belanden. In Nederland wordt de gehele plant geoogst en blijft slechts de stoppel achter op het land. In het Nederlandse teeltsysteem zal transgeen plantmateriaal daardoor voornamelijk in de vorm van pollen in het aquatisch milieu terechtkomen. Over de mate waarin dit gebeurt, en daarmee over de potentiële blootstelling van aquatische organismen, zijn echter weinig gegevens bekend. Om die reden heeft de COGEM het voorliggende onderzoek voor de Nederlandse situatie laten uitvoeren.

Gebaseerd op literatuuronderzoek en een veldstudie wordt in dit rapport beschreven wat de potentiële blootstelling van aquatische organismen aan maïspollen is. De belangrijkste conclusie is dat het in de Nederlandse teeltsituatie aannemelijk is dat aquatische organismen worden blootgesteld aan plantmateriaal en pollen van Mais. Dit is vooral het geval als de teeltpercelen binnen enkele meters grenzen aan oppervlakteater. Echter, in het geval van de teelt van Bt-Mais worden de risico's van Bt-eiwitten in het aquatische milieu als zeer laag ingeschat. Hierbij is uitgegaan van de in de veldstudie gemeten pollendepositie en aantallen maïspollen in het oppervlaktewater en in de literatuur beschreven dosis-effect relaties.

Dit onderzoek is uitgevoerd door Edwin Dijkhuis, Johan Loermans (FLORON), Marco de Graaff en Marlea Wagelmans (Bioclear b.v.) en is begeleid door een commissie bestaande uit experts op het gebied van (aquatische) ecologie, entomologie en GGO- regelgeving.

Voorzitter van de begeleidingscommissie,

Dr. W.J. de Kogel

SUMMARY

Background and objective

In this study the potential exposure of aquatic organisms to Bt proteins in Corn pollen have been examined. When GM crops are grown, transgenic plant material may reach the surface water. During flowering, pollen end up in a ditch and the same account for plant material remaining on the field after the harvest. Research in the United States [29] shows that during cultivation of insect-resistant Bt Corn, aquatic organisms can be exposed to Bt plant material and Bt proteins. However, cultivation conditions in the Netherlands are different from that in the United States, where only the cob is harvested and the plant material is left behind on the field. Due to dispersal by wind this plant material ends up in large quantities in ditches and waterways. In the Netherlands the whole plant is harvested, except the stubble, and plant material is scarcely left on the field. It is therefore assumed that in the Netherlands plant material from Corn reaches the aquatic environment mainly in the form of pollen. Data on pollen deposition and accumulation of pollen in waterways seems not to be present. This lack of data prompted the Commission on Genetic Modification (COGEM) to conduct research for the Dutch situation.

The objective of this study was to gain insight into the potential exposure of aquatic organisms to Bt proteins in Corn pollen and estimating the possible effects of this exposure.

Design and conduct research

The research was carried out in phases. We started with a literature review to gain insight in the different routes of exposure and dose-effect relationships. Next, a field study was conducted to determine pollen deposition and dispersion in surface water. For this purpose, samples were taken in waterways bordering plots with Corn. A total of nine sub locations have been sampled across three areas in the Netherlands. At each sub location the following compartments have been sampled:

- The layer of air just above the water surface in the watercourse (deposition of pollen).
- The water column (dispersion of pollen).
- The sediment (accumulation of pollen).

In addition a column test was carried out in order to determine how long pollen of Corn are residing in the water column. In phase 3 the results of the literature study and field study were combined and potential effects on aquatic organisms to Bt proteins in Corn pollen were estimated. Also, just after the harvest, a visual inspection of the waterways was conducted to verify the assumption that crop residues of Corn in the Dutch situation do not end up in waterways.

Results and conclusions

Corn is wind pollinated. One plant produces 2 to 25 million pollen that are often released at a quiet dry day. The distance that Corn pollen can disperse varies from a few meters to several hundred meters. If there is no or little wind most pollen will be deposited within a meter of the Corn plant. This is the result of the high settling velocity (about 20-30 cm per second) of the relatively heavy Corn pollen. Dispersal of Corn pollen up to several hundred meters is described in the literature and is explained by turbulence, in which Corn pollen end up in a higher layer of air.

Corn pollen can end up in water systems by wind dispersal. In the Netherlands, there is a high probability that Corn plots are bordered by ditches and waterways, particularly at the transition from sand to peat and clay (polders, stream valleys). No references have been found on the run off of Corn pollen from Corn plots into surface water due to heavy rainfall, but it cannot be excluded. The field study described in this report shows that pollen from Corn actually end up in Dutch water systems. The number of pollen that is deposited decreases with increasing distance from the Corn plot. The measured pollen deposition just above the water surface ranged from 30,000 to 4,000,000 pollen per m². This is a factor 350 lower than theoretically expected. In the field study, a small quantity of pollen may have been missed, because the

pollen traps were placed in the field at the beginning of flowering. However, this does not explain the big difference between the calculated and measured pollen deposition.

In literature little information is found about the fate of pollen after their deposition on the water surface. The results of the column test show that Corn pollen can stay afloat for a long time. This is due to the surface water tension and the fact that pollen grains are water repellent. Floating pollen can be transported by water and accumulate between the riparian vegetation and near dams. This aspect has not been investigated in this study. Once pollen enters the water column, however, they quickly sink to the bottom. In practise, due to turbulence of the surface water, floating pollen is likely to end up in the water column more quickly than observed in the column test. Also part of the pollen remains suspended and does not settle directly. In the field study an average concentration of 220 Corn pollen per litre of water is measured.

In literature little information is found on the fate of Corn pollen, and their proteins, in the water column. There are indications that Corn pollen lyse if they come in contact with water, releasing the proteins present in the pollen. This is supported by the fact that the water in the column test became cloudy and started smelling within two days, probably due to the degradation of proteins. In the case of Bt-Corn, Bt-proteins are released when the pollen lyse. There are indications that freely dissolved Bt proteins are not stable, with half-lives of 4 days. Bt proteins can adsorb to soil particles and can then be persistent. This adsorption reduces the bioavailability of Bt-protein and thereby potential harmful effects to aquatic organisms. However, the number of studies that looked into numbers of deposited Corn pollen in the aquatic environment, concentrations of dissolved Bt proteins and their persistence in water is low.

In the field study as described in this report it has been established that Corn pollen accumulate in the sediment. The measured numbers range from 446 to 1,924 pollen per ml sampled sediment. Converted to the sampled surface area the number of pollen in the top 4 cm of the sediment is on average 35 million pollen per m². With the analytical method used, however, no differentiation can be made between recent and older pollen. The measured accumulation can therefore also be the result of several years of Corn cultivation.

In literature several routes have been described by which aquatic organisms can be exposed to Bt-pollen and/or Bt-proteins from Corn. For example, Corn pollen can be eaten directly by fish, filter feeding macro invertebrates and zooplankton. Thus, organisms that graze or convert organic material may be exposed to Bt Corn pollen in an indirect way. In the literature, speculations are made on adsorption of Bt Corn pollen or Bt proteins to algae. In this way, algae itself are exposed and also the organisms that feed on algae. Little is known about the uptake and degradation mechanisms of Corn pollen by aquatic organisms.

Literature on the effects of Bt proteins and Bt Corn pollen on aquatic organisms is scarce. Bt proteins may have negative effects on water fleas (*Daphnia magna*), caddis *Helicopsyche borealis*, aquatic larvae of the caddisfly *Trichoptera* and the chironomid *Chironomus dilutes*. Finally, there is evidence that Bt leaf litter has an effect on the species composition of aquatic organisms that colonize the leaf litter.

There are several Bt proteins, each having a specific effect on a certain pest species. The concentrations which show negative effects on aquatic organisms are different for these different Bt-proteins. For the Dutch situation especially Cry1Ab is important because this protein is present in MON810, the only Corn event that is allowed to be cultivated in the Netherlands. For this Bt-protein negative effects are not to be expected at concentrations below 150 mg/l. The highest concentration Cry1Ab in the theoretical calculations (worst case scenario) is 6.9×10^{-5} mg/l. For Bt-protein Cry3Bb1 the theoretical concentration

is 1.6×10^{-2} mg/l, which is comparable to concentrations at which effects occur in literature, 2.0×10^{-2} mg/l. For this protein negative effects cannot be excluded.

In the field study the pollen deposition was 30,000 to 4,330,000 pollen/m², measured on two to seven metres distance from the Corn plots. These numbers are comparable to what is found in literature. Assuming a pollen weight of 0.7 µg, this is equivalent to a maximum of 2.0 g pollen/m². The calculated maximum concentration of Bt-proteins in this number of pollen is 1.3×10^{-5} mg Cry1F/l and 4.8×10^{-7} mg Cry1Ab/l. These concentrations are a factor 1,000,000 lower than the concentrations at which negative effects have been reported in literature. Based on these data no negative effects on aquatic organisms are expected.

Eighteen sites were visited after harvest to verify that no crop residues remains on the Corn plots and in the surrounding surface water after harvesting. Macro residues derived from Corn were present in the surface water at 13 out of 18 (72%) inspected locations. The number of crop residues per inspected section of 150-200 meters was consistently low (1 to a maximum of 16 pieces). This random test shows that crop residues of Corn can also end up in aquatic systems in The Netherlands.

It can be concluded that:

1. It is likely that aquatic organisms are exposed to plant material and pollen of Corn in The Netherlands. This is particularly the case if the cultivation takes place adjacent to surface water.
2. In the case of the cultivation of Bt Corn the potential risks of Bt proteins for organisms in the aquatic environment are assessed as very low. This is based on the measurements of pollen deposition, numbers of pollen in surface water in the field study and on dose-effect relations described in literature.

Recommendations

The risk assessment as performed in this study is based on a very small number of studies described in the literature. Therefore it is recommended to conduct additional research on the effects of Bt Corn pollen on aquatic organisms or to carry out a new risk assessment in due course, as new literature may become available on this subject.

It also appears that there is only limited information available regarding the processes to which Corn pollen are exposed at the moment that they enter the aquatic environment. In particular, elucidation of the following processes is of importance:

- The degree of consumption of Corn pollen by aquatic organisms present;
- The speed at which Corn pollen lyse in the aquatic environment;
- The speed at which Bt proteins are degraded in the aquatic environment.

SAMENVATTING

Aanleiding en doelstelling

In dit onderzoek is de potentiële blootstelling van aquatische organismen aan Bt-eiwitten in maispollen afkomstig van genetische gemodificeerde (gg) Bt planten onderzocht. Wanneer gg-gewassen worden geteeld, kan transgeen plantenmateriaal in het oppervlaktewater terecht komen. Tijdens de bloei kan pollen een sloot inwaaien en na de oogst kan plantenmateriaal dat op het veld achterblijft in het water terechtkomen. Uit onderzoek uit de Verenigde Staten [29] blijkt dat bij de teelt van insectenresistente Bt-Mais aquatische organismen aan transgeen plantmateriaal en Bt-eiwitten blootgesteld kunnen worden. De teeltsituatie in Nederland verschilt echter van de teeltsituatie in de Verenigde Staten waar voor Mais de kolven worden geoogst en het plantmateriaal op het veld achterblijft, waarna het door windverspreiding in grote hoeveelheden in greppels en waterwegen terecht komt. In Nederland wordt de gehele plant geoogst (uitgezonderd de wortelkruit) en blijft er nauwelijks plantmateriaal achter op de akker. Aangenomen wordt dat plantenmateriaal van Mais voornamelijk in de vorm van stuifmeel het aquatische milieu bereikt. Gegevens over pollendepositie en accumulatie van pollen in waterwegen lijkt echter niet aanwezig te zijn. Dit was aanleiding voor de Commissie Genetische Modificatie (COGEM) om onderzoek te laten doen naar de Nederlandse situatie.

De doelstelling van dit onderzoek was het verkrijgen van inzicht in de potentiële blootstelling van aquatische organismen aan Bt-eiwitten in maispollen en het inschatten van de mogelijke effecten hiervan.

Opzet en uitvoering onderzoek

Het onderzoek is gefaseerd uitgevoerd. Gestart is met een literatuuronderzoek om inzicht te krijgen in de verschillende processen binnen dit vraagstuk zoals blootstellingsroutes en dosis-effect relaties. Vervolgens is een bemonsteringstudie uitgevoerd om stuifmeeldepositie en verspreiding in oppervlaktewater vast te stellen. Hiertoe zijn monsters genomen in watergangen die grenzen aan percelen met Mais. In totaal zijn negen deellocaties bemonsterd, verspreid over drie deelgebieden in Nederland. Daarbij zijn op elke deellocatie de volgende compartimenten bemonsterd:

- De luchtlaag vlak boven het wateroppervlak in de watergang (depositie van stuifmeel).
- De waterkolom (dispersie van stuifmeel).
- De waterbodem (accumulatie van stuifmeel).

Ter aanvulling is tevens een kolomproef uitgevoerd om vast te stellen hoe lang stuifmeel van Mais in de waterkolom verblijft. In fase 3 zijn tenslotte zijn de uitkomsten van de literatuur- en bemonsteringsstudie gecombineerd en is een inschatting gemaakt van de mogelijke effecten die aquatische organismen ondervinden indien ze worden blootgesteld aan Bt-eiwitten in maispollen. Tevens is vlak na de oogst een visuele inspectie van de watergangen uitgevoerd om te verifiëren of de veronderstelling dat gewasresten van Mais in de Nederlandse situatie de watergangen niet bereiken klopt.

Resultaten en conclusies

Mais is een windbestuiver. Eén plant produceert 2 tot 25 miljoen pollen die vaak op een rustige droge dag losgelaten worden. Uit de geraadpleegde literatuur komt naar voren dat de afgelegde afstand van maispollen varieert van enkele meters tot enkele honderden meters. Als er geen of weinig wind staat zullen de meeste pollen binnen een meter van de plant terecht komen. Dit is het gevolg van de hoge valsnelheid (circa 20-30 cm per seconde) van de relatief zware maispollen. Verspreiding van maispollen tot op meerdere honderden meters afstand van het maisperceel is in de literatuur beschreven en wordt verklaard door turbulentie, waarbij de maispollen in een hogere luchtlaag terecht komen en zich daardoor verder kunnen verspreiden.

Maispollen kunnen door de windverspreiding in watersystemen terecht komen. Met name op de overgangen van zand naar veen en klei (polders, beekdalen) is de kans groot dat percelen van Mais grenzen aan sloten. Over het afstromen van maispollen bij sterke regenval zijn geen referenties gevonden, maar kan niet worden uitgesloten. De bemonsteringstudie toont aan dat pollen van Mais ook daadwerkelijk in Nederlandse watersystemen terecht komen. De aantallen nemen af met toenemende afstand tot het maisperceel. De gemeten pollendepositie vlak boven het wateroppervlak varieerde van 30.000 tot 4.000.000 pollen per m². Deze pollendepositie ligt een factor 350 lager dan wat theoretisch werd verwacht. Omdat de pollenvallen zijn geplaatst bij aanvang van de bloei, is mogelijk dat een klein deel van de pollen is gemist. Maar dit verklaart niet het grote verschil.

Er is in de literatuur weinig informatie gevonden over wat er met de pollen gebeurt op het moment dat deze het wateroppervlak raken. Uit de resultaten van de kolomproef blijkt dat pollen van Mais lang kunnen blijven drijven. Dit is het gevolg van de oppervlaktewaterspanning en het feit dat stuifmeelkorrels waterafstotend zijn. Drijvende pollen kunnen via het water worden getransporteerd en zich ophopen tussen de oevervegetatie en bij dammen. Naar dit aspect is in de bemonsteringstudie geen onderzoek gedaan. Eenmaal in de waterkolom zinken ze echter snel naar de bodem. Turbulentie van het oppervlaktewater zorgt er in de praktijk waarschijnlijk voor dat pollen sneller vanuit de drijfslag in de waterkolom terecht komen, maar ook dat een deel van de pollen blijft zweven in het oppervlaktewater en niet direct bezinkt. In de bemonsteringsstudie zijn in het oppervlaktewater gemiddelde concentraties van 220 maispollen/l gemeten.

Ook is er in de literatuur weinig informatie gevonden over wat er met maispollen, en hun eiwitten, in de waterkolom gebeurt. Er zijn in de literatuur indicaties dat maispollen lyseren als ze in contact komen met water, waarbij de in de maispollen aanwezige eiwitten vrijkomen. Het feit dat het water in de uitgevoerde kolomproef binnen twee dagen troebel werd en begon te stinken wijst hier ook op. In het geval van Bt-Mais komen bij het lyseren van de pollen Bt-eiwitten vrij. Er zijn indicaties dat vrij opgeloste Bt-eiwitten niet stabiel zijn met halfwaardetijden van 4 dagen. Aan de andere kant kunnen Bt-eiwitten adsorberen aan gronddeeltjes en daardoor persistent zijn. Door deze adsorptie zou de biologische beschikbaarheid van Bt-eiwitten verminderen en daarmee ook de potentiële schadelijke effecten. Het aantal studies waarin gekeken is naar de hoeveelheid maispollen in het aquatisch milieu, de hoeveelheid opgeloste Bt-eiwitten en de persistentie daarvan is echter schaars.

In het veldonderzoek is vastgesteld dat maispollen accumuleren in de waterbodem. De gemeten aantallen variëren van 446 tot 1.924 pollen per ml bemonsterde waterbodem. Omgerekend naar het bemonsterde oppervlak bedraagt het aantal pollen in de bovenste 4 cm van het sediment gemiddeld 35.000.000 pollen/m². Met de gebruikte analysemethode kan echter geen onderscheid gemaakt worden in recente en oudere pollen. De gemeten accumulatie kan daarom ook het resultaat van meerdere jaren maisteelt zijn.

Er zijn in literatuur verschillende routes beschreven waarop aquatische organismen kunnen worden blootgesteld aan Bt-maispollen en/of Bt-eiwitten. Zo kunnen maispollen direct opgegeten worden door vissen, filtervoedende macro-invertebraten en zoöplankton. Organismen die grazen of organisch materiaal omzetten kunnen via deze weg op een indirecte manier blootgesteld worden aan Bt-maispollen. Ook wordt in de literatuur gespeculeerd over de adsorptie van Bt-maispollen en/of Bt-eiwitten aan algen. Op deze manier worden algen zelf blootgesteld en ook de organismen die zich met algen voeden. Er is echter weinig bekend van de opname en afbraak mechanismen van maispollen door aquatische organismen.

Literatuur betreffende de effecten van Bt-eiwitten en Bt-maispollen op aquatische organismen is schaars. Bt-eiwitten kunnen negatieve effecten hebben op watervlooien (*Daphnia magna*), de kokerjuffer *Helicopsyche borealis*, aquatische larven van de schietmot *Trichoptera* en van de vedermug *Chironomus dilutus*. Hierbij zijn *Daphnia magna* en *Trichoptera* soorten die ook in Nederland worden aangetroffen. Tot slot zijn er

aanwijzingen dat Bt-bladafval een effect heeft op de soortensamenstelling van aquatische organismen die het bladafval koloniseren.

Er zijn verschillende Bt-eiwitten, elke met een specifiek werking op een bepaalde plaagsoort. De effecten van deze verschillende Bt-eiwitten op aquatische organismen zijn dus niet één op één met elkaar te vergelijken. Voor de Nederlandse situatie is vooral het eiwit CRy1Ab van belang omdat dit Bt-eiwit aanwezig is in Mon810, de enige Bt-Mais event die in Nederland geteeld mag worden. Voor dit Bt-eiwit worden geen negatieve effecten verwacht onder een concentratie van 150 mg/l. De hoogste concentratie in de theoretische modelberekeningen bedraagt $6,9 * 10^{-5}$ mg Cry1Ab/l. Voor het Bt-eiwit Cry3Bb1 bedraagt de theoretische concentratie $1,6 * 10^{-2}$ mg/l, wat vergelijkbaar is met de concentraties waarbij in de literatuur effecten worden gevonden: $2,0 * 10^{-2}$ mg/l. Voor dit eiwit kunnen, op basis van de worst case modelberekeningen, negatieve effecten op aquatische soorten niet uitgesloten worden.

In het veldonderzoek bedroeg de gemeten pollendepositie 30.000 tot 4.330.000 pollen/m², op 2 tot 7 meter afstand van de maispercelen. Dit aantal is vergelijkbaar met wat in de literatuur is gevonden. Dit komt, uitgaande van een pollengewicht van 0,7 µg, overeen met maximaal 2,0 g pollen/m². De berekende concentratie Bt-eiwitten bij deze hoeveelheid pollen bedraagt maximaal $1,3 * 10^{-5}$ mg Cry1F/l en $4,8 * 10^{-7}$ mg Cry1Ab/l. Deze concentraties liggen een factor 1.000.000 lager dan de concentraties waarbij in de literatuur negatieve effecten zijn gemeten. Op basis van hiervan worden geen negatieve effecten op aquatische organismen verwacht.

Om te verifiëren dat er, uitgezonderd de achterblijvende stoppels, in principe geen gewasresten op het land achterblijven en dat deze dus niet in het omliggende oppervlaktewater terecht kunnen komen, zijn in het veldonderzoek 18 locaties bezocht na de oogst. Afgezien van de bij de oogst achterblijvende stoppels bleken op 13 van de 18 (72%) geïnspecteerde locaties macroresten van maïs in het oppervlaktewater aanwezig te zijn. Het aantal gewasresten per geïnspecteerd traject van 150-200 meter was telkens gering (1 tot maximaal 16 stuks). Deze steekproef maakt duidelijk dat gewasresten van Mais ook in Nederlandse situatie in aquatische systemen terecht kunnen komen.

Geconcludeerd kan worden dat:

1. Het in de Nederlandse teeltsituatie aannemelijk is dat aquatische organismen kunnen worden blootgesteld aan plantenmateriaal en pollen van Mais. Dit is met name het geval als de teeltpercelen binnen enkele meters grenzen aan oppervlaktewater.
2. In het geval van de teelt van Bt-Mais de risico's van Bt-eiwitten in het aquatische milieu als zeer laag worden ingeschat, uitgaande van de in deze veldstudie gemeten pollendepositie en aantallen maispollen in het oppervlaktewater en in de literatuur beschreven dosis-effect relaties.

Aanbevelingen

De risico-inschatting in dit onderzoek is gebaseerd op een zeer gering aantal in de literatuur beschreven onderzoeken. Daarom wordt aanbevolen aanvullend onderzoek uit te voeren naar de effecten van Bt-maispollen op aquatische organismen of te zijner tijd, als daartoe op basis van nieuwe literatuurreferenties aanleiding toe is, een nieuwe risico-inschatting uit te voeren.

Tevens is gebleken dat er slechts beperkt informatie voorhanden is betreffende de processen waaraan maispollen worden blootgesteld op het moment dat zij terecht komen in het aquatisch milieu. Met name opheldering van de volgende processen is van belang:

- Mate van consumptie van maispollen in het water door de aanwezige organismen;
- Snelheid waarmee maispollen lyseren in het aquatische milieu;
- Snelheid waarmee Bt-eiwitten worden afgebroken in het aquatisch milieu.

INHOUD

1	INLEIDING	10
1.1	Opdrachtverlening	10
1.2	Achtergrond en doelstelling	10
1.3	Opzet onderzoek en fasering	10
1.4	Leeswijzer	11
2	LITERATUURSTUDIE	12
2.1	Opzet	12
2.2	Mais	12
2.2.1	Maisteelt en genetische modificatie	12
2.2.2	Maisteelt in Nederland	13
2.2.3	Teelt van andere Maissoorten in Nederland	13
2.2.4	Morfologie	15
2.2.5	Windverspreiding van pollen	15
2.2.6	Resume	19
2.3	Maispollen in aquatische systemen	19
2.3.1	Aquatische systemen in Nederland	19
2.3.2	Transport en blootstelling	21
2.3.3	Blootstellingseffecten van Bt-eiwitten	24
2.3.4	Inschatting risico's	26
2.3.5	Resume	26
3	BEMONSTERINGSSTUDIE	28
3.1	Opzet	28
3.2	Veldmetingen	28
3.2.1	Selectie bemonsteringslocaties	28
3.2.2	Bemonstering en analyses	30
3.2.3	Weersomstandigheden tijdens bemonstering	34
3.2.4	Bespreking resultaten	35
3.3	Kolomproef	37
3.3.1	Uitvoering	37
3.3.2	Resultaten	39
3.3.3	Bespreking resultaten	40
3.4	Visuele inspectie watergangen na Maisoogst	41
3.4.1	Uitvoering	41
3.4.2	Waarnemingen	41
4	DISCUSSIE	43
5	CONCLUSIES & AANBEVELINGEN	48
5.1	Conclusies	48
5.2	Aanbevelingen	50
	LITERATUUR	51
	BIJLAGE 1 – Ligging deellocaties bemonsteringstudie per zoekgebied	55
	BIJLAGE 2 – Locatiefoto's	59
	BIJLAGE 3 – Aanvullende informatie deellocaties	61
	BIJLAGE 4 – Analysemethode pollen	62
	BIJLAGE 5 – Analysecertificaat pollenanalyses	63
	BIJLAGE 6 – Resultaat berekeningen	64
	BIJLAGE 7 – Modelberekening pollentransport	66
	BIJLAGE 8 – Verslag visuele inspectie watergangen na de oogst	69

1. INLEIDING

1.1. Opdrachtverlening

In opdracht van de Commissie Genetische Modificatie (COGEM) is een inventariserend onderzoek uitgevoerd naar de potentiële blootstelling van aquatische organismen aan plantenmateriaal van Bt-Mais en de mogelijke effecten daarvan. De werkzaamheden zijn uitgevoerd door een samenwerkingsverband, bestaande uit FLORON en Bioclear b.v.

1.2. Achtergrond en doelstelling

COGEM laat ter ondersteuning van haar werkzaamheden onderzoek door derden verrichten. In dit onderzoek zijn de mogelijke effecten van genetisch gemodificeerd Bt plantenmateriaal op aquatische organismen onderzocht. In het verleden is al wel onderzoek verricht naar de effecten van gg-gewassen op niet-doelwitorganismen als bijen, vlinders en predatoren, maar nog niet naar aquatische organismen.

Wanneer genetisch gemodificeerde gewassen (gg-gewassen) worden geteeld, kan transgeen plantenmateriaal in het oppervlaktewater terecht komen. Tijdens de bloei kan stuifmeel een sloot inwaaien en na de oogst kan plantenmateriaal dat op het veld achterblijft in het water terechtkomen. Uit onderzoek uit de Verenigde Staten [29] blijkt dat bij de teelt van insectenresistente Bt-Mais aquatische organismen hierdoor aan transgeen plantmateriaal en Bt-eiwitten blootgesteld kunnen worden. De mogelijke nadelige effecten voor aquatische organismen spelen tot nu toe geen belangrijke rol in de discussie over de milieuveiligheid van gg-gewassen. De teeltsituatie in Nederland verschilt echter van de teeltsituatie in de Verenigde Staten waar bij Mais de kolven worden geoogst en het plantmateriaal op het veld achterblijft, waarna het door windverspreiding in grote hoeveelheden in greppels en waterwegen terecht komt. In Nederland wordt de gehele plant geoogst (uitgezonderd de wortelkluit) en blijft er nauwelijks plantmateriaal achter op de akker. Aangenomen wordt dat plantenmateriaal van Mais voornamelijk in de vorm van stuifmeel het aquatische milieu bereikt. Gegevens over pollendepositie en accumulatie van pollen in waterwegen lijkt echter niet aanwezig te zijn. Dit was aanleiding voor de Commissie Genetische Modificatie (COGEM) om onderzoek te laten doen naar de Nederlandse situatie.

De doelstelling van dit onderzoek was het verkrijgen van inzicht in de potentiële blootstelling van aquatische organismen aan Bt-eiwitten in maispollen en het inschatten van de mogelijke effecten hiervan. Tevens is geverifieerd of de veronderstelling klopt dat plantenmateriaal in de Nederlandse situatie de watergangen niet bereikt.

1.3. Opzet onderzoek en fasering

Om de mogelijke nadelige effecten van gg-gewassen op aquatische organismen in kaart te brengen is er een theoretische basis middels literatuuronderzoek nodig om inzicht te krijgen in de verschillende processen binnen dit vraagstuk zoals blootstellingsroutes en dosis-effect relaties. Deze kennis is gecombineerd met daadwerkelijke veldmetingen om stuifmeeldepositie en verspreiding in oppervlaktewater vast te stellen. Op basis van de twee lijnen is tenslotte een inschatting gemaakt van de mogelijke effecten die aquatische organismen ondervinden indien ze worden blootgesteld aan Bt-eiwitten in stuifmeel.

Het project is gefaseerd uitgevoerd:

Fase 1. In de eerste fase is een literatuuronderzoek uitgevoerd en is beoordeeld of de opzet van de bemonsteringstudie moest worden aangescherpt en/of aangevuld.

Fase 2. In de tweede fase is een bemonsteringsstudie uitgevoerd.

Fase 3. In de derde fase zijn de uitkomsten van de bemonsteringsstudie en de literatuurstudie gecombineerd.

In de oorspronkelijke aanvraag betrof het onderzoek aan vier gewassen: Mais, koolzaad, aardappel en suikerbiet. In overleg met de begeleidingscommissie is besloten het onderzoek te beperken tot Mais. Redenen hiervoor zijn:

1. Mais produceert veel stuifmeel, dat bovendien door de wind wordt verspreid. De overige gewassen worden bestoven door insecten (koolzaad en aardappel) of door een combinatie van beide (Suikerbiet). Bovendien produceren zowel Suikerbiet als Aardappel geen tot slechts weinig stuifmeel. Stuifmeel van Mais zal zich verder verspreiden dan stuifmeel van gewassen die afhankelijk zijn van insecten voor de bestuiving. De kans dat van een van deze vier gewassen stuifmeel in het oppervlaktewater terecht komt is bij Mais het grootst (worst-case scenario);
2. De stuifmeelkorrels van Mais zijn, vanwege de grootte, goed tot op soortniveau te determineren. Die van de andere gewassen niet, determinatie is hier slechts tot op familieniveau mogelijk;
3. Mais is een van de eerste gg-gewassen die in Nederland kan worden geteeld;
4. Een beperking van het aantal te onderzoeken gewassen geeft de mogelijkheid tot intensiever bemonsteren (meer locaties en/of meer monsters per locaties en/of meer monsters in de tijd).

1.4. Leeswijzer

Hoofdstuk 2 (literatuurstudie) geeft een overzicht van de teelt van Mais in Nederland, de verspreiding van maispollen en de factoren die hierop van invloed zijn. Ook wordt ingegaan op de transportroutes van maispollen in het aquatische milieu en de beschikbare kennis omtrent de effecten van *Bacillus thuringiensis* (Bt)-eiwitten op aquatische organismen. De opzet en resultaten van de uitgevoerde veldmetingen om de daadwerkelijke stuifmeeldepositie en verspreiding van maispollen in het oppervlaktewater vast te stellen staan beschreven in hoofdstuk 3 (bemonsteringsstudie). Ook de ter aanvulling uitgevoerde kolomproef, om vast te stellen hoe lang stuifmeel van Mais blijft drijven en in de waterkolom verblijft komt in dit hoofdstuk aan bod. In hoofdstuk 4 (discussie) zijn de uitkomsten van de bemonsteringsstudie en de literatuurstudie gecombineerd. Tenslotte worden in hoofdstuk 5 de overall conclusies en aanbevelingen uit deze studie gepresenteerd.

2. LITERATUURSTUDIE

2.1. Opzet

In dit hoofdstuk zijn de resultaten van de literatuurstudie weergegeven. Dit literatuuronderzoek heeft als doel inzicht te verkrijgen in de al beschikbare kennis over transportroutes, blootstellingsroutes en blootstellingseffecten van (Bt-)maispollen op aquatische organismen. Hiervoor is de al bestaande literatuur en kennis in kaart gebracht. Hierbij is gebruik gemaakt van wetenschappelijke databases (SCOPUS en Pubmed) en niet-wetenschappelijke databases (internet).

De centrale vragen waar dit literatuuronderzoek zich op heeft gericht zijn:

1. Hoe worden maispollen en daarmee Bt-eiwitten verspreid en wat zijn de afstanden die door maispollen afgelegd kunnen worden?
2. In welke mate komen maispollen en daarmee Bt-eiwitten in het aquatisch milieu terecht en zijn ze persistent?
3. a: Welke aquatische organismen worden blootgesteld?
b: Wat zijn de effecten van Bt-eiwitten op aquatische organismen?

In paragraaf 2.2 wordt de teelt en de fysiologie van Mais en de fysiologie en de verspreiding van maispollen behandeld. Daarnaast worden enkele factoren besproken die een effect hebben op de verspreidingsafstand van maispollen. In paragraaf 2.3 tenslotte, wordt ingegaan op de transportroutes van maispollen in het aquatisch milieu en de effecten van Bt-eiwitten op aquatische organismen. Verwijzingen naar de geraadpleegde literatuur zijn weergegeven met een [cijfer] dat verwijst naar de literatuurlijst.

2.2. Mais

In deze paragraaf wordt de teelt van Mais en de genetische modificatie van Mais met Bt-genen behandeld. Daarnaast worden de morfologie van maisplanten en maispollen beknopt beschreven. Tot slot wordt ingegaan op de verspreiding van maispollen en de factoren die hierop van invloed zijn, zoals de horizontale en verticale windsnelheid en de fysische eigenschappen van de pollen.

2.2.1 *Maisteelt en genetische modificatie*

Mais (*Zea mays L.*) behoort tot de Grassenfamilie (*Poaceae*) en is een graangewas dat oorspronkelijk afkomstig is uit Midden-Amerika. Mais wordt al vanaf de jaren dertig in Nederland geteeld, waarbij het in eerste instantie om korrelmais bij gemengde agrarische bedrijven ging. Korrelmais is een maisvariant die vooral geteeld wordt om de droge korrel en meestal bedoeld is voor de mengvoerindustrie [2]. Later, en tot op heden, werd door agrariërs massaal overgestapt op de zetmeelrijke snijmais.

Mais is het enige genetisch gemodificeerde (Bt) gewas dat in de Europese Unie wordt geteeld. Wereldwijd wordt er op ruim 35 miljoen hectare Bt-Mais geteeld en deze aantallen nemen de laatste jaren sterk toe [3, 4]. Op het moment zijn er 28 Bt-Mais events in de EU goedgekeurd voor voedselgebruik. Daarnaast mag één Bt-Mais event in Europa ook worden geteeld (MON810) en heeft de Europese Commissie voorgesteld een tweede Mais event voor de teelt toe te staan [5]. MON810 wordt momenteel vooral in Spanje geteeld (80.000 hectare) maar ook in Portugal, Tsjechië, Roemenië en Slowakije [5]. In Nederland mag MON810 wel worden geteeld, maar dit wordt (nog) niet gedaan, omdat de plaagsoorten (nog) niet in Nederland aanwezig zijn. Het feit dat er wereldwijd een enorme toename is in het gebruik en de teelt van insectenresistente Bt-

gewassen duidt erop dat deze gewassen als een belangrijke oplossing worden gezien tegen vraat en de hoge milieueconomische belasting door het gebruik van insecticiden.

Bij MON810 is een gen ingebracht, afkomstig van de bodembacterie *Bacillus thuringiensis* (Bt). Dit gen codeert voor de aanmaak van het Bt-toxine dat aangeduid wordt met de code Cry1Ab (VIB-MON810). Hierdoor produceert MON810 een natuurlijk insecticide dat specifiek gericht is tegen de Europese stengelboorder, een rups die de maisoogst enorme schade toe kan brengen. Er zijn vele variaties van Bt-eiwitten, die elk zeer specifiek zijn tegen bepaalde insecten uit o.a. de orde van de *Lepidoptera* (schubvleugeligen) en de *Coleoptera* (kevers) [6, 7].

2.2.2. Maisteelt in Nederland

Momenteel wordt in Nederland voornamelijk de zetmeelrijke snijmais geteeld [8]. Het gaat in totaal om meer dan 200.000 hectare (tabel 1 [9]). Snijmais wordt vooral geteeld op zand- en dalgronden (70%) en daarnaast ook op klei- (20%) en lössgrond (<5%). De meeste Mais wordt geteeld op de zandgronden in het oosten van Nederland (Figuur 1). In Nederland wordt het gehele gewas met blad, stengel en kolven verhakselde met een hakselaar en vervolgens ingekuuld. Bij de oogst blijft, vanwege de grotere hoeveelheid aanhelevende grond, een stoppellingte van circa 10-15 cm staan [10]. Aangenomen wordt dat er, uitgezonderd de achterblijvende stoppel, in principe geen gewasresten op het land achterblijven en deze dus niet in het omliggende milieu terecht komen. Na de oogst wordt het product ingekuuld en gebruikt voor de rundveehouderij.



Figuur 1. De Maisteeltlocaties in Nederland in 2012 (LGN 7 databestand; met dank aan Gerard Hazen, Alterra Wageningen UR)

2.2.3 Teelt van andere maissoorten in Nederland

Als gevolg van het klimaat is de omvang van de korrelmaisteelt beperkt ten opzichte van snijmais (Tabel 1). Samen met de teelt van corn cob mix (CCM) en maiskolvensilage (MKS) bedraagt dit in totaal circa 30.000 hectare. Het areaal suikermais in Nederland bedraagt circa 350 hectare [8]. De Mais wordt geoogst in september en oktober.

Tabel 1. Teeltgegevens van snij- en korrelmais[9]

Jaartal	2011		2012		2013	
	Korrelmais	Snijmais	Korrelmais	Snijmais	Korrelmais	Snijmais
Beteeld (ha)	16.570	229.637	15.505	231.811	15.512	230.287
Geogst (ha)	16.570	228.741	15.505	231.811	15.512	230.287
Bruto opbrengst per ha (x1000 kg)	12,3	46,2	12,3	46,0	10,6	42,9
Totale bruto opbrengst (x1000 kg)	204.400	10.558.587	191.363	10.670.262	163.843	9.870.241

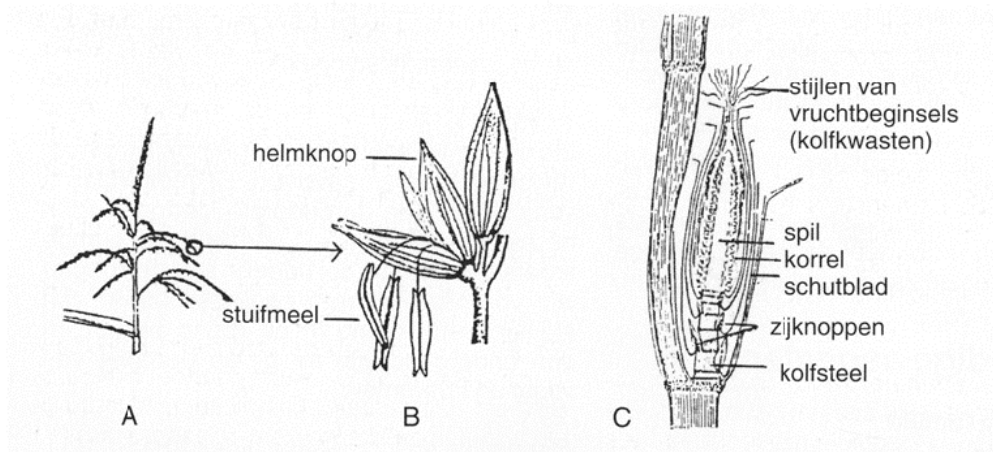
2.2.4 Morfologie

Maisplanten

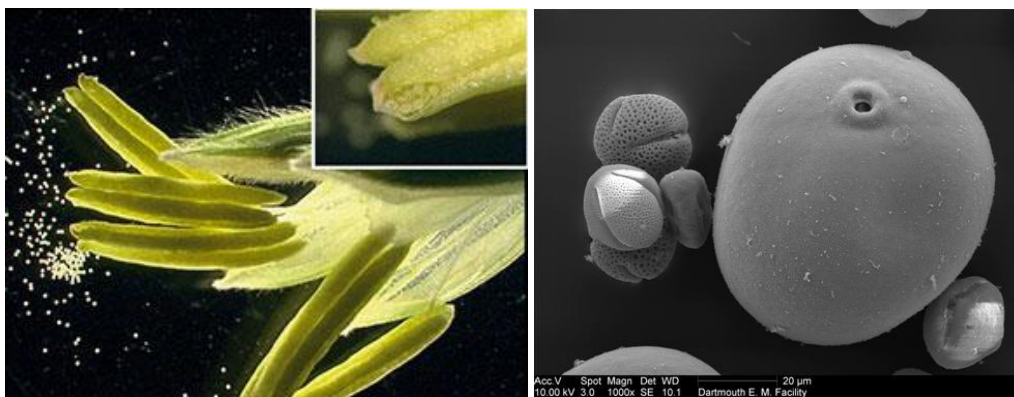
Mais is een tweeslachtige en eenhuizige plant, wat wil zeggen dat zowel mannelijke als vrouwelijke bloemen aan één plant aanwezig zijn. De mannelijke bloeiwijze, de pluim, verschijnt aan de top van de stengel. De vrouwelijke bloeiwijze, de kolf, wordt in de bladoksels gevormd. De pluim heeft een aantal horizontaal uitstaande zijtakken waarop zich de helmknoppen bevinden (figuur 2). In de helmknoppen bevindt zich het stuifmeel [10]. In het algemeen toont de mannelijke bloei een geringe voorsprong in tijd op de vrouwelijke bloei. Dit beperkt de kans op zelfbestuiving en bevordert kruisbestuiving. Kort na de bloei sterft de pluim af. In een gemiddeld jaar zal, uitgaande van een zaaitijdstip van eind april, de vrouwelijke bloei omstreeks 20 juli plaatsvinden (circa 7 weken na zaaien) en circa twee weken later eindigen. Het tijdstip van bloei is sterk rasafhankelijk. Daarnaast spelen groeiomstandigheden, met name temperatuur, een belangrijke rol [10].

Maispollen

Maispollen zijn lichtgeel, eivormig en met een diameter van 76-80 µm tot 103-106 µm (volledig gehydrateerde pollen) behoren ze tot de grootste van alle grassen [11]. Ze wegen tussen de 0,2 en 0,7 µg per korrel [12]. Het oppervlak van maispollen is bezaaid met kleine uitsteeksels. Pollen worden al bij een lichte bries of vibratie door de maisplant losgelaten. Vaak worden ze met droog weer “losgelaten” gedurende een periode van 5-8 dagen [11]. Ze vallen meestal vanaf de pluim op de stijlen van de vrouwelijke bloemen van de buurplanten [13, 14]. Een maisplant produceert tussen de 2 miljoen en 25 miljoen pollen [15, 16]. De concentraties Bt-eiwitten in maispollen kunnen variëren tussen minder dan de 0,08 µg per gram drooggewicht voor Cry1Ab in de event MON810 tot 16,4 – 27,2 µg per gram drooggewicht voor Cry1 F in de event TC1507 [17].



Figuur 2: Schematische weergave van de maispluim (A en B) en de kolf (C) [10].



Figuur 3. Het vrijkomen van pollen vanuit de helmknoppen van de maisplant (links) en een scanning elektronen microscoop foto van maispollen (grote bol is stuifmeelkorrel van Mais) [18, 19]

2.2.5 Windverspreiding van maispollen

Mais is een windbestuiver waarvan de pollen, afhankelijk van de weersomstandigheden, tot honderden meters verspreid kunnen worden [15]. In de volgende subparagrafen worden zowel de horizontale verspreiding van maispollen als enkele factoren die van invloed zijn op de verspreiding zoals weersomstandigheden behandeld. Pollen kunnen ook via het regenwater of gehecht aan gronddeeltjes afvloeien naar het oppervlaktewater. Er is geen literatuur gevonden met betrekking tot het afvloeien van pollen via het regenwater of gehecht aan gronddeeltjes. Deze route is bij dit onderzoek buiten beschouwing gelaten.

Horizontale verspreiding van maispollen

In de in de literatuur gevonden onderzoeken waarin de horizontale verspreiding van maispollen is onderzocht wordt veelal gebruik gemaakt van kruisbestuivingsexperimenten. Deze experimenten vinden vaak plaats op grote maispercelen waarbij een selecte groep donorplanten wordt gebruikt die qua fenotype afwijkt van de omliggende receptorplanten.

Tabel 2 laat een overzicht zien van studies die gedaan zijn naar de verspreiding van maispollen. Luna et al. 2001 [20] hebben bijvoorbeeld onderzoek gedaan naar de verspreiding van pollen door middel van kruisbestuiving experimenten in Mexico. In het onderzochte gebied (4.000 m²) was de windsnelheid maximaal 4,4 m/s in de middag en vonden de meeste kruisbestuivingen plaats tussen de 10-200 meter van de donor plant. Daarnaast vonden zij geen kruisbestuivingen op een

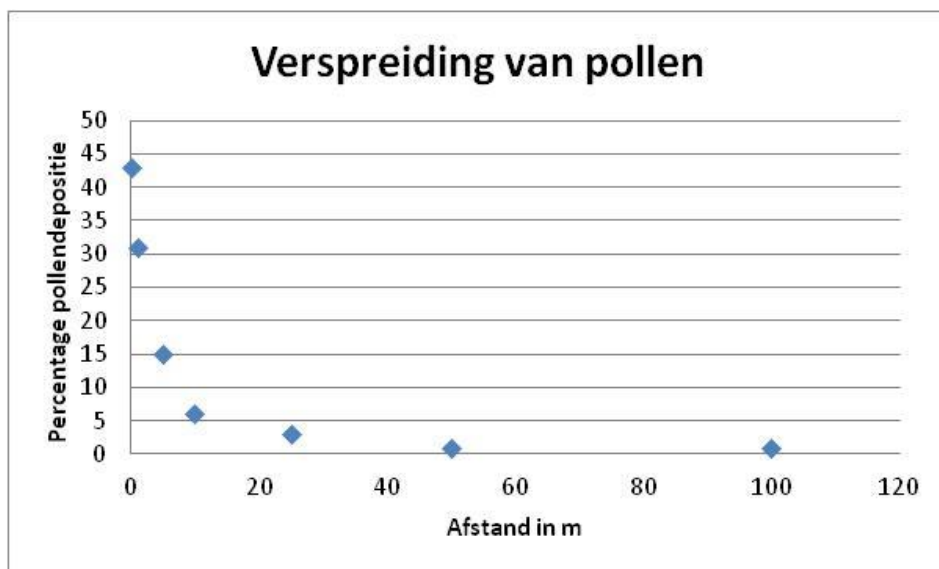
afstand verder dan 300 meter van de donorplant. In kruisbestuiving experimenten met Bt-Mais en non-Bt-Mais in 2009 en 2010 in Rosemount, Minnesota (US) vonden Burkness en Hutchison (2012) [17] dat 75% van de kruisbestuiving plaatsvond in een straal van 3 meter rondom de donorplant. Jemison en Vayda (2001) [16] laten zien dat 99% van de pollen op een afstand tot 15 meter van de donorplant terecht komt. Raynor et al. (1972) [21] laten zien dat het grootste deel van de pollen op slechts 1 meter van de plant terecht komt en 5% van de totaal geproduceerde pollen tot een afstand van 60 meter van de donorplant.

Aan de hand van de gemiddelde depositiesnelheid concluderen Bannert en Stamp (2007) [15] dat maispollen er ongeveer 5 seconden over doen om van de pluim naar de kolf te vallen wanneer er geen wind staat (horizontale windsnelheid verwaarloosbaar) en er geen sprake is van een verticale wind als gevolg van thermische en turbulente effecten. Hierbij gaan zij ervan uit dat bij een gemiddelde maisplant de mannelijke bloeiwijze, de pluim, zich op ongeveer 2,5 meter hoogte bevindt en de vrouwelijke bloeiwijze, de kolf, op 1 meter hoogte. Op basis van bovenstaande aannames hebben Bannert en Stamp (2007) berekend dat bij constante windsnelheden van 0-11 m/s, de maispollen maximaal 55 meter vanaf de donorplant terecht kunnen komen. Het veldonderzoek van Bannert en Stamp (2007) laat via een twee jaar durend onderzoek in Zwitserland zien dat maispollen over een afstand van 371 meter verspreid kunnen worden. Van de Wiel et al. (2008) [22] hebben veldexperimenten op 3 locaties in Nederland gedaan waarbij de mate van verspreiding van Bt-maispollen (MON 810) op 2 verschillende afstanden (25 en 250 meter) tot de donorplant werden getest. Uit de resultaten blijkt dat er uitkruising van Bt-maispollen met de receptorplanten plaatsvond op zowel 25 als 250 meter, met gemiddeld 18 keer meer kruisbestuivingen op een afstand van 25 meter in vergelijking met 250 meter.

Naast kruisbestuiving experimenten zijn er ook studies die gebruik maken van het direct opvangen van pollen door middel van pollenvallen. Het onderzoek van Jarosz et al. (2003) [23] in Frankrijk is hier een goed voorbeeld van. Zij laten zien dat het grootste deel van de pollen op een afstand van 0-10 meter terecht komt en dat er 3 keer meer pollen terecht komen op een afstand van 0-3 meter in vergelijking met een afstand van 3-10 meter. Daarnaast kwam een fractie van de pollen (minder dan 10 %) op een afstand van 30 meter terecht. Deze experimenten vonden plaats bij een relatief lage windsnelheid van 0-1 m/s. In een ander onderzoek tonen Jarosz et al (2005) [24] aan dat maispollen tot wel 1.000 meter verspreid kunnen worden bij een windsnelheid tot 7 m/s en een verticale verspreiding tot 6-7 meter hoogte kunnen bereiken. Jarosz et al (2005) laten verder zien dat de horizontale verspreiding van maispollen tussen de 0 en 400 meter is bij windsnelheden tussen de 0 en 7 m/s. Ook hier blijkt het grootste deel van de pollen op een afstand van ongeveer 0-50 meter van de donorplant terecht te komen. Sears et al (2000) [50] hebben onderzoek gedaan naar verspreiding van maispollen op 9 verschillende locaties. Hieruit blijkt dat 95 % van de pollen terecht komt binnen 10 m (zie figuur 4). Opvallend hierbij is dat dit geldt voor alle richtingen.

Tabel 2. *Overzicht van studies die gedaan zijn naar de verspreiding van maispollen*

Type experiment	Locatie	Windsnelheid (m/s)	Verspreidings afstand	Ref.
Kruisbestuiving	Mexico	Max. 4,4	10-200 meter	[20]
Kruisbestuiving Bt-Mais	VS	0,6-3,7	75% 0-3 meter	[17]
Kruisbestuiving	VS	-	0-15 meter	[16]
Kruisbestuiving	VS	-	95% 0-1 meter 5% 1-60 meter	[21]
Kruisbestuiving	Zwitserland	Gemiddeld 2, met range van 0-7,8 m/s	0-371 meter	[15]
Kruisbestuiving Bt-Mais	Nederland	-	Zowel op 25 meter als op 250 meter	[22]
Pollenvallen	Frankrijk	0,1	95% 0-10 meter 4% 0-30 meter	[23]
Pollenvallen	Frankrijk	0,5-7	0-1.000 meter/grootste deel 0-30 meter	[24]
Pollenvallen	Canada	-	95 % 0-10 m 5 % 10-100 m (zie ook figuur 4) Verspreiding in alle richtingen	[50]



Figuur 4. *Verspreiding van maispollen op basis van Sears et al (2000) [50]*

Verticale verspreiding van maispollen

Bannert en Stamp (2007) [15] berekenden dat bij constante windsnelheden van 0-11 m/s, de maispollen maximaal 55 meter vanaf de donor plant terecht kunnen komen. In veldexperimenten vonden zij dat maispollen tot meerdere honderden meters verspreid konden worden (subparagraaf 2.4.1). Het verschil tussen de berekening en de praktijk wordt door Bannert en Stamp (2007) verklaard door het effect van de verticale windsnelheid. Deze verticale verspreiding

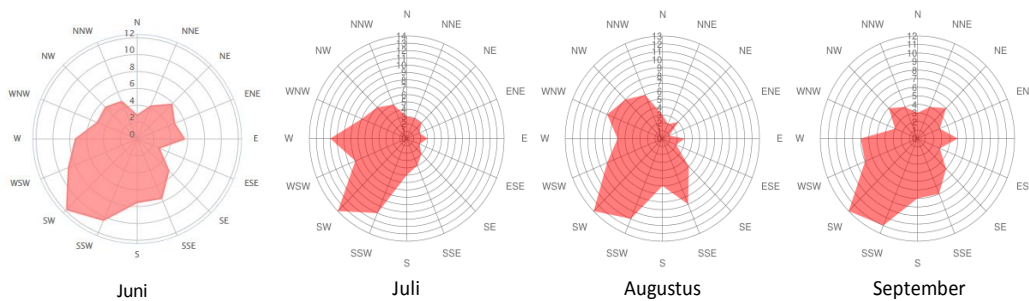
is de verspreiding van maispollen in de hoogte. Dit wordt veroorzaakt door turbulentie in de lucht. Turbulentie wordt door sterke windstoten en opwaartse wind veroorzaakt als gevolg van opwarming van het aardoppervlak. Door de verticale windsnelheid komen maispollen hoog in de lucht terecht waardoor deze verder verspreid kunnen worden. Verschillende onderzoeken laten zien dat maispollen op hoogtes tot 7 meter voorkomen tijdens een bloeiperiode als gevolg van verticale windsnelheid [24, 25].

Effect van windsnelheid op de verspreiding van maispollen

De verspreiding van maispollen (richting en afstand) is sterk afhankelijk van de windsnelheden (paragraaf 2.4.1). Bij hogere windsnelheden kunnen pollen verder horizontaal verspreid worden [15]. In tabel 3 en figuur 5 zijn windstatistieken voor de Bilt weergegeven voor de periode 2002 tot en met 2013. In Nederland is de overheersende windrichting zuidwest. Dat betekent dat de maispollen overwegend noordoostelijk van de teeltgebieden terecht zullen komen. De gemiddelde windsnelheid in Nederland is rond de 7 à 8 m/s. Maar er zijn grote regionale verschillen, langs de kust waait het over het algemeen harder dan in het oosten van het land, daar waar de meeste Mais wordt geteeld. Bij deze windsnelheden zouden maispollen tot honderden meters verspreid kunnen worden (Tabel 2) wanneer tevens sprake is van turbulentie.

Tabel 3. Gemiddelde windstatistieken in de Bilt (Nederland) tussen 2002 en 2013 [26]

Maand	Juni	Juli	Augustus	September
Dominante windrichting	ZW	ZW	ZW	ZW
Gemiddelde windsnelheid (m/s)	7	8	7	7
Gemiddelde temperatuur (°C)	17	19	18	15



Figuur 5. Gemiddelde windrichting en windkracht (m/s) in de Bilt (Nederland) tussen 2002 en 2013 [26]

Effect van fysische eigenschappen van maispollen op de verspreiding

Naast de horizontale en verticale windsnelheid kunnen de fysische eigenschappen van maispollen invloed hebben op de verspreidingsafstand. Een voorbeeld hiervan is het gewicht, vorm en grootte van de maispollen. Zo zullen maispollen die lichter zijn verder verspreid worden door de wind in vergelijking met maispollen die zwaarder zijn [13]. De hoeveelheid water in maispollen heeft bijvoorbeeld een grote invloed op de grootte en dichtheid van de pollen waardoor de depositiesnelheid verandert wat van invloed is op de maximale verspreiding. Verschillende onderzoeken laten zien dat, afhankelijk van de natuurlijke variatie in grootte en hoeveelheid water in de maispollen, de depositie snelheid varieert tussen de 20 en 31 centimeter per seconde [11, 25]. Aylor et al. (2003) [11] beschrijven dat de depositiesnelheid van droge pollen 34% lager is dan die van verse (natte). Drogere pollen zijn minder zwaar waardoor ze, ten opzichte van zwaardere pollen, over grotere afstanden verspreid kunnen worden. Bovenstaande impliceert dat droge weersomstandigheden (of relatief droog seizoen) resulteren in een verdere verspreiding van pollen in vergelijking met natte weersomstandigheden (regen, hoge luchtvochtigheid).

2.2.6 *Resumé*

Momenteel wordt in Nederland meer dan 200.000 hectare snijmais geteeld. Maispollen hebben een diameter van 76-80 μm tot 103-106 μm en behoren tot de grootste van alle grassen. Een maisplant produceert miljoenen pollen die vaak op een rustige droge dag losgelaten worden en al dan niet met de wind meegevoerd worden. De bloeitijd van Mais is kort, de geproduceerde pollen worden vanaf eind juli binnen een kort tijdsbestek van circa 2 weken vrijgelaten. De grootte van de pollen heeft een sterke invloed op de verspreiding van de pollen door de wind. Immers, grotere pollen zijn zwaarder waardoor de depositiesnelheid ook toeneemt. Voor maispollen is de gemiddelde depositiesnelheid 20 en 31 centimeter per seconde. De depositiesnelheid is ook afhankelijk van de hoeveelheid vocht in de pollen. Uit de geraadpleegde literatuur komt naar voren dat de afgelegde afstand van maispollen varieert van enkele meters tot enkele honderden meters. Als er geen of weinig wind staat zullen de pollen binnen een meter van de plant terecht komen. Bij windsnelheden van 7 à 8 m/s (gemiddelde windsnelheid in Nederland tijdens de bloeiperiode) kan een deel van de maispollen tot honderden meters worden verspreid. Factoren zoals de horizontale en verticale windsnelheid en de fysische eigenschappen van maispollen zijn van invloed op de verspreidingsafstand.

2.3 **Maispollen in aquatische systemen**

Wanneer Bt-Mais wordt geteeld, kan transgeen plantenmateriaal op twee manieren in het water terecht komen. Ten eerste kunnen de pollen tijdens de bloei waterwegen inwaaien en ten tweede kan plantenmateriaal dat na de oogst op het veld is achtergebleven in nabijgelegen open water terechtkomen. Blootstelling van aquatische organismen aan Bt-materiaal zal naar verwachting in Nederland echter voornamelijk plaatsvinden door depositie van pollen in waterwegen, omdat in Nederland de gehele plant, met uitzondering van de wortelkluif, geoogst wordt waardoor nauwelijks plantenmateriaal achterblijft op de velden. Aangezien maispollen enkele meters tot enkele honderden meters door de wind verspreid kunnen worden (paragraaf 2.2.5), betekent dit dat pollen van Mais in het oppervlaktewater terecht kunnen komen als het maisveld in de buurt van oppervlaktewater ligt. In deze paragraaf zijn beknopt de verschillende watersystemen in Nederland beschreven. Vervolgens worden de transport- en blootstellingsroutes van maispollen in aquatische systemen behandeld. Tot slot worden de effecten van Bt-eiwitten op aquatische organismen beschreven.

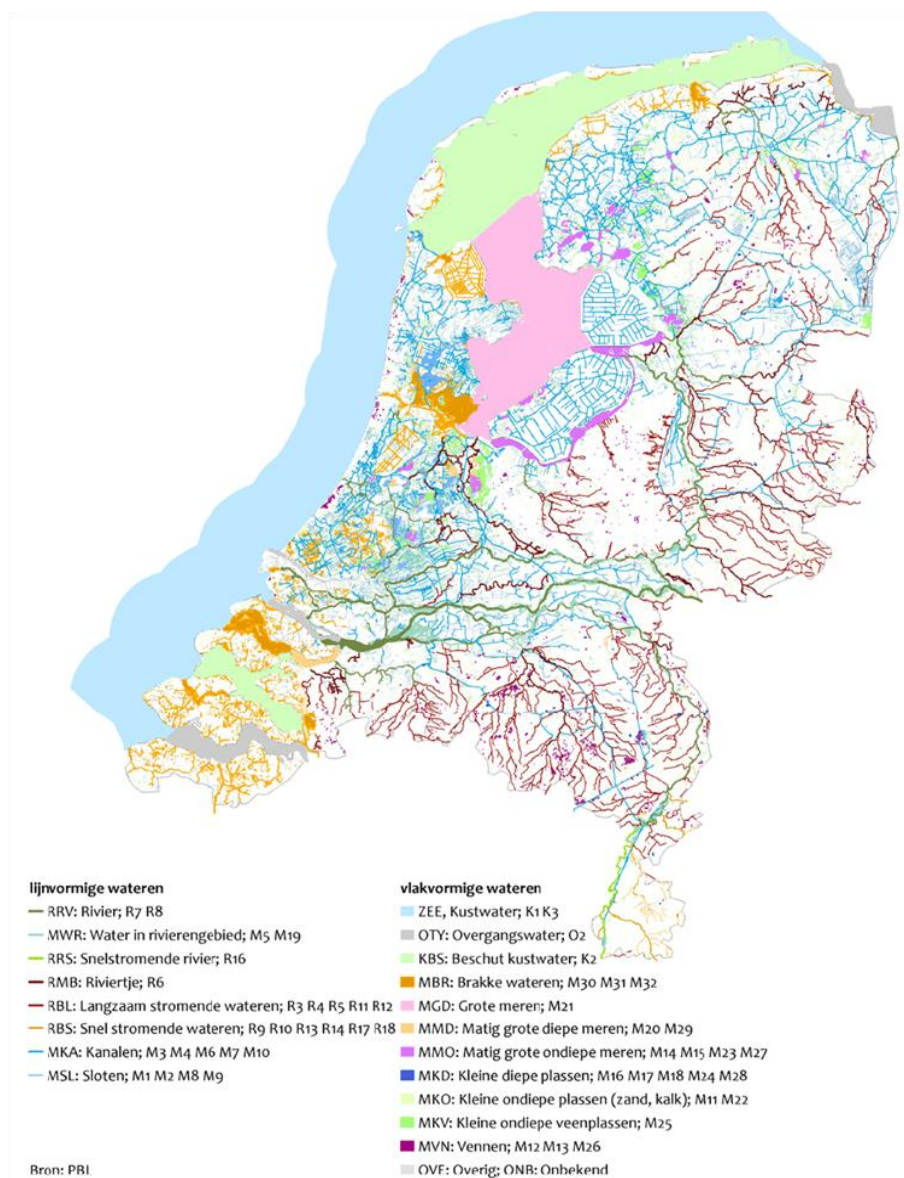
2.3.1 *Aquatische systemen in Nederland*

Nederland heeft een grote verscheidenheid aan oppervlaktewater. In de Kaderrichtlijn Water (KRW) is een indeling gemaakt in verschillende typen oppervlaktewater. Er wordt onderscheid gemaakt in (definities afkomstig van [27]):

- De stromende wateren (snel en langzaam stromende wateren).
Als de stroomsnelheid meer dan 50 cm/s is, is er sprake van een snel stromend water. De stromende wateren worden verdeeld in bovenlopen (smaller dan 3 meter), middenlopen (breedte 3 - 8 meter), benedenlopen (breedte > 8 meter), riviertjes (breedte 8 - 25 meter) en rivieren (breedte meer dan 25 meter). De rivieren gaan over in estuaria met een (beperkt) getijverschil voordat zij in zee stromen. Veel kleinere rivieren gaan in laag Nederland over in kanalen.
- De stilstaande wateren zijn te verdelen in meren, kanalen en vennen.
De meren zijn te verdelen naar diepe en ondiepe meren en naar grootte en bodemsoort. Kanalen zijn gegraven watergangen, die in de KRW worden aangeduid als kunstmatige wateren. Alle andere wateren zijn natuurlijke wateren of sterk veranderde wateren. Vennen zijn kleine plassen die gevoed worden met regen of lokaal grondwater en vaak in natuurgebieden liggen.

- Sloten zijn, net zoals kanalen, gegraven watergangen voor de ontwatering van het landelijk gebied. Deze hebben vaak stilstaand water en, vooral in het hoge deel van Nederland, kunnen 's zomers droogvallen. In het lage deel van Nederland liggen veel sloten; vooral in veengebieden bestaat 10 tot 20% van het gebied uit sloten.

Figuur 6 geeft de verscheidenheid in watersystemen in Nederland weer. Aan de hand van figuur 1 kan gesteld worden dat de meeste Mais in Noord-Brabant, Gelderland, Overijssel en Limburg geteeld wordt. Op basis van figuur 1 en 5 kunnen geen uitspraken worden gedaan over de exacte locaties van de specifieke teeltgebieden en de afstanden tot specifieke watersystemen. Om hier uitspraken over te doen is verder onderzoek en meer gedetailleerde data nodig. Het is echter waarschijnlijk dat in zijn algemeenheid gesteld kan worden dat er verspreid door heel Nederland Mais wordt geteeld en dat met name op de overgangen van zand naar veen deze teeltgebieden kunnen grenzen aan een van de bovengenoemde watertypen. De kans is dus zeer groot dat maispollen in het Nederlandse oppervlaktewater terecht komen.



Figuur 6. Watertypen Nederland, Planbureau voor de leefomgeving [28].

2.3.2 Transport- en blootstellingsroutes

Het feit dat in sommige streken maisvelden in de buurt van sloten, rivieren of andere watersystemen liggen betekent dat er plantenmateriaal in deze systemen terecht kan komen. Voor de Nederlandse situatie is vooral het transport van maispollen naar aquatische systemen van belang. Aangezien maispollen tientallen meters af kunnen leggen, is het aannemelijk dat maispollen in nabije sloten, beken en meren terecht komen. Echter, tot dusver is het aantal studies dat maispollen in aquatisch systemen werkelijk kwantificeert zeer schaars [29]. Rosi-Marshall et al (2007) [29] tonen aan dat maispollen in het aquatisch milieu terecht kunnen komen. Zij vonden dat 0,1–1,0 g/m² maispollen per jaar in watersystemen in Indiana (VS) terecht komen die op 1,7 tot 36,3 meter afstand liggen van de maisvelden (Tabel 4).

Tabel 4: Maispollen in waterwegen

Locatie	Concentratie	Afstand tot het maisveld	Afstanden afgelegd in het water	Ref.
Watersystemen in Indiana (VS)	0.1-1 gram maispollen /m ² /jaar (3.5x10 ⁶ pollen korrels per gram)	1,7 tot 36,3 meter	20-60 meter (radioactief gelabeld)	[29]

Niet alleen maispollen komen in watersystemen terecht. Chinees onderzoek naar de hoeveelheid pollen in de Shiyang rivier laat zien dat meer dan 30 soorten pollen in het watersysteem voorkomen, voornamelijk afkomstig van sparren (*Picea*) en grassen (*Poaceae*) [30]. Hierbij berekenden Zhu et al. (2002) dat de Shiyang rivier jaarlijks 1,3X10¹⁵ pollen per jaar vervoert. Davis (1968) [31] laat ook zien dat er vele soorten pollen in sedimenten van Frains Lake (VS) accumuleren tot 21.000 pollen per cm² per jaar. Hierbij ging het vooral om pollen afkomstig van eiken, grassen en ambrosia, maar er werden ook pollen gevonden van berken, dennen en wilgen.

Er is vooralsnog weinig bekend over de hoeveelheid pollen in de Nederlandse watersystemen. Op basis van een aantal aannames is berekend hoeveel maispollen, en daarmee hoeveel Bt-eiwitten, theoretisch in een watersysteem terecht kunnen komen. In tabel 5 zijn de aannames opgenomen alsmede de theoretische hoeveelheid maispollen en Bt-eiwitten (zie berekening in bijlage 7). Hierbij is uitgegaan van een drietal situaties:

- worst case waarbij alle pollen die worden geproduceerd op 1m² land ook terecht komen op 1m² oppervlaktewater.
- Realistisch worst case scenario waarbij uitgegaan wordt van windverspreiding en maximale aantallen pollen, maximaal gewicht pollen en maximale concentratie eiwitten.
- Realistisch gemiddeld scenario waarbij uitgegaan wordt van windverspreiding, gemiddeld aantal pollen, gemiddeld gewicht pollen en gemiddelde concentratie eiwitten.

Uit de modelberekening (worst case) volgt een maximale hoeveelheid pollen in oppervlaktewater van 858 g/m², resulterend in een maximale concentratie van 858 mg/l (circa 1.226.000.000 pollen/l) in de sloot (uitgaande van homogene menging). Deze berekende hoeveelheid is minimaal een factor 350 hoger dan aangetroffen in de literatuur (tabel 4).

Tijdens de bloeiperiode kunnen maispollen op 2 manieren in een aquatisch systeem terechtkomen. Ze worden in de eerste plaats door de wind getransporteerd. Ook kunnen ze met regenwater, bij zware regenval, van het land afstromen en vervolgens in een watersysteem terecht komen. Over deze laatste transportroute is geen literatuur gevonden.

Tabel 5. Theoretische hoeveelheid maispollen

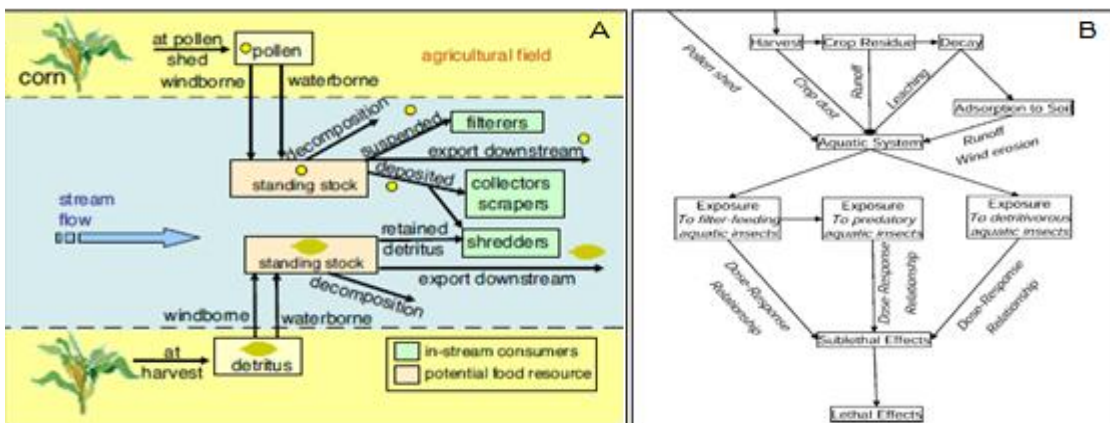
Parameter	Aanname	Ref.
Verspreidingsafstand	95 % 0-10 m 5 % 10-100 m	[50]
Aantal pollen per plant	2-25 miljoen Gemiddeld 13,5 miljoen	[15, 16]
Gewicht pollen	0,2 – 0,7 µg per stuk Gemiddeld 0,5 µg per stuk	[12]
Concentratie Bt-eiwitten	0,08 µg/g pollen Cry1Ab MON810 (detectielimiet) 16,4-27,2 (gemiddeld 21,9) µg/g pollen Cry1F TC1507 18,8 µg/g pollen Cry3Bb1	[17, 37]
Plantafstand	15 cm	
Afstand tot sloot	1 m	
Slootdimensies	1 m breed 1 m diep	
Worst case	Alle pollen die op 1m ² worden geproduceerd komen terecht op 1m ² oppervlaktewater	
<u>Uitkomsten modelberekening</u>		
<i>Worst case</i>		
Berekende hoeveelheid pollen	1.226.000.000 pollen 858 g/m ² 858 mg/l	
Berekende hoeveelheid Bt-eiwitten	6,9 * 10 ⁻⁵ g/m ² Cry1Ab MON810 2,3 * 10 ⁻² g/m ² Cry1F TC1507 1,6 * 10 ⁻² g/m ² Cry3Bb1 6,9 * 10 ⁻⁵ mg/l Cry1Ab MON810 2,3 * 10 ⁻² mg/l Cry1F TC1507 1,6 * 10 ⁻² mg/l Cry3Bb1	
<i>Realistisch worst case</i>		
Berekende hoeveelheid pollen	621.000.000 pollen 435 g/m ² 435 mg/l	
Berekende hoeveelheid Bt-eiwitten	3,5 * 10 ⁻⁵ g/m ² Cry1Ab MON810 1,2 * 10 ⁻² g/m ² Cry1F TC1507 8,2 * 10 ⁻³ g/m ² Cry3Bb1 3,5 * 10 ⁻⁵ mg/l Cry1Ab MON810 1,2 * 10 ⁻² mg/l Cry1F TC1507 8,2 * 10 ⁻³ mg/l Cry3Bb1	
<i>Realistisch gemiddeld</i>		
Berekende hoeveelheid pollen	336.000.000 pollen 168 g/m ² 168 mg/l	
Berekende hoeveelheid Bt-eiwitten	1,3 * 10 ⁻⁵ g/m ² Cry1Ab MON810 3,7 * 10 ⁻³ g/m ² Cry1F TC1507 3,2 * 10 ⁻³ g/m ² Cry3Bb1 1,3 * 10 ⁻⁵ mg/l Cry1Ab MON810 3,7 * 10 ⁻³ mg/l Cry1F TC1507 3,2 * 10 ⁻³ mg/l Cry3Bb1	

De berekende hoeveelheden pollen zijn minimaal een factor 100 hoger dan gevonden in de veldstudie van Rosi-Marshall et al [29].

Als de maispollen eenmaal in het water terecht komen kunnen deze, en de Bt eiwitten die zich in Bt-maispollen bevinden, in contact komen met aquatische organismen. Zo kunnen maispollen afgebroken worden door micro-organismen of opgegeten worden door bijvoorbeeld macro-invertebraten zoals filtervoeders (filterers), grazers (scrapers) en knippers (shredders) (Figuur 6A, B; [29, 32]). Filtervoeders zijn organismen die leven van plankton en ander in het water zwevend voedsel. Voorbeelden van filtervoeders zijn zoetwatermosselen, sommige kokerjuffers en watervlooien. Grazers zijn herbivoren die plantaardig materiaal van bodem, stenen en planten schrapen zoals zoetwater slakjes. Knippers zijn een groep invertebraten die organisch materiaal omzetten in een kleinere fractie; voorbeelden zijn vlokreeften en steenvlieglarven.

In het terrestrische milieu kunnen Bt-eiwitten aan grond en klei adsorberen waarbij de halfwaardetijden (de tijd waarbij 50% van de Bt eiwitten is afgebroken) variëren van enkele dagen tot maanden [7]. Adsorptie van Bt-eiwitten aan grond zorgt ervoor dat de biologische beschikbaarheid van deze eiwitten vermindert en slechts beperkte microbiële afbraak zou kunnen plaatsvinden [32]. Onderzoeken naar de persistentie van Bt-eiwitten in de grond in het terrestrische milieu laten zien dat deze varieert van <1 dag tot 56 dagen (zoals samengevat door [7]). Onderzoek van Li et al. (2007) [33] laat zien dat de volledige afbraak van aan grond geadsorbeerde Bt-eiwitten in een rijstveld zeer langzaam gaat (na 135 dagen nog 15% restant).

Bt-eiwitten kunnen in opgeloste vorm in watersystemen voorkomen [34]. Dit blijkt ook uit een onderzoek van Li et al. (2010) [33] die aantonen dat maispollen in het water lyseren waarbij een deel van de inhoud van de maispollen in het water terechtkomt ([6]). Over de persistentie en adsorptie van Bt-eiwitten in het aquatisch milieu (waterbodembodem en waterkolom) is echter weinig bekend in vergelijking met de persistentie van Bt-eiwitten in het terrestrische milieu [32]. Douville et al. (2005) [35] hebben de persistentie van geadsorbeerde Bt-eiwitten aan grond (terrestrisch) en in het oppervlaktewater onderzocht. Zij vonden dat de Bt-eiwitten sneller werden afgebroken in het water dan in grond (met halfwaardetijden van respectievelijk 4 en 9 dagen). In de literatuurstudie van Carstens et al. (2012) wordt geconcludeerd dat Bt-eiwitten niet stabiel zijn in oppervlaktewater met halfwaardetijden korter dan 3 dagen waarbij een snelle adsorptie aan de waterbodembodem plaatsvindt [6]. Tank et al. [34] hebben, 6 maanden na de oogst van Bt-Mais, zowel Mais restafval als opgeloste Bt-eiwitten in meerdere waterstromen in Indiana (VS) gemeten. Rosi-Marshall et al. (2007) [29] vermelden zijdelings dat maispollen aan algen adsorberen. Op deze manier komen algen, en mogelijk ook aquatische organismen die algen eten, in aanraking met maispollen.



Figuur 7. Transport en blootstellingroutes van maispollen in het aquatisch milieu in kaart gebracht door A: Rosi-Marshall (2007) [29] en B: Priboda en Coats (2008) [32]

2.3.3 Blootstellingseffecten van Bt-eiwitten

Studies naar de persistentie van Bt-eiwitten in het aquatisch milieu en de effecten op aquatische organismen zijn schaars [6, 7, 34]. Er zijn verschillende Bt-eiwitten, allemaal specifiek voor een bepaalde plaagsoort. De effecten van deze verschillende Bt-eiwitten op aquatische organismen zijn dus niet één op één met elkaar te vergelijken. In tabel 6 zijn uitkomsten van een aantal studies samengevat. De Environmental Protection Agency (EPA) in de VS laat via een worst-case berekening zien dat er maximaal $3,9 \cdot 10^{-3}$ mg/l Bt-eiwit (Cry3Bb1) in het water opgelost kan zijn. Hierbij wordt uitgegaan van een 1 hectare grote waterplas, 2 meter diepe drainage sloten en een 10 hectare maisveld aansluitend aan de waterplas. Dit komt overeen met onze realistische gemiddelde berekening voor dit eiwit (in sloten, zie tabel 5).

Rosi-Marshall et al. (2007) [29] tonen aan dat aquatische larven van de filtervoedende *Trichoptera* (schietsmotten) maispollen opnemen tijdens de bloeiperiode van Mais (Tabel 6). Rosi Marshall et al 2007 [29] laten vervolgens in laboratoriumexperimenten zien dat een zeer hoge concentratie Bt-maispollen met Cry1Ab ($2,75 \text{ g/m}^2$) een hogere mortaliteit (25%) tot gevolg heeft bij de larven van de schietmot *Helicopsyche borealis* (kokerjuffers). Dit komt overeen met $2,2 \cdot 10^{-7} \text{ g Bt-eiwit/m}^2$. Overigens is deze concentratie maispollen een factor 2 tot 3 keer hoger dan gevonden in de veldstudie in hetzelfde onderzoek. In ditzelfde onderzoek werd geen effect gevonden wanneer de concentratie Bt-maispollen gelijk was aan de concentratie zoals gemeten in de veldexperimenten ($0,055 \text{ g pollen/m}^2$, overeenkomend met $4,4 \cdot 10^{-9} \text{ g Bt-eiwit/m}^2$). Kokerjuffers zijn een voedselbron voor onder andere vissen en amfibieën. Chambers et al. (2010) [36] laten zien dat de groei van de larven van de schietmot *Lepidostoma liba* negatief beïnvloed wordt wanneer deze met Bt-blad gevoerd wordt gedurende 29 dagen. In tegenstelling tot de larven van de schietmot *Lepidostoma liba* ondervonden de vlokreeft *Hyalella azteca* en de zoetwaterslak *Gyraulus sp.* geen groei effecten in ditzelfde experiment.

Onderzoek uitgevoerd voor de EPA laat zien dat de LC_{50} waarde (concentratie waarbij 50% van de organismen dood gaat) voor de watervlo *Daphnia magna* hoger dan $2,82 \cdot 10^{-3} \text{ mg/l Bt-Cry3Bb1}$ is ([37]; Tabel 6). In dit onderzoek zijn behalve de effecten op de mortaliteit geen andere effecten aangetroffen. Hierdoor concludeert de EPA dat er geen effecten te verwachten zijn van gg-maispollen op de groei en mortaliteit in geval van incidentele blootstelling [37]. Vergelijkbare resultaten met *Daphnia magna* zijn gevonden in een studie van Mendelsohn et al. (2003) [38]. Zij vonden geen effecten van Bt-eiwitten (Cry1Ab en Cry1F) tot 150 mg/l . Onderzoek van Böhn et al. (2008, 2010; [39, 40]) laat met behulp van 42 daagse voeding experimenten zien dat *Daphnia magna* sterk negatieve effecten ondervindt van Bt-Mais ten opzichte van non Bt-Mais. Zo vonden ze dat minder vrouwtjes geslachtsrijp werden, een lagere eiproductie en een hogere mortaliteit hadden (Tabel 6). Prihoda en Coats (2008) [32] hebben de toxiciteit van MON863 Mais (met Bt Cry3Bb1) op de aquatische larven van de vedermug *Chironomus dilutus* getest. Zij vonden een significante afname in overleving bij concentraties van $30 \cdot 10^{-3} \text{ mg Bt CryBb1/l}$. Ze vonden echter ook dat de overgebleven larven geen effecten van de Bt-eiwitten ondervonden. Onderzoek uitgevoerd voor de EPA concludeert dat Bt-eiwitten geen negatieve effecten hebben op de mortaliteit en het gedrag van meervallen [37].

Verder laten Axelson et al. (2011) [41] zien dat er onder invloed van Bt-eiwitten in bladafval een verandering in soortensamenstelling van aquatische organismen (25-33% meer soorten) kan plaatsvinden (Tabel 6). De geteste ordes komen ook voor in de Nederlandse wateren.

Opgemerkt wordt dat maispollen zelf ook een effect kunnen hebben op organismen. Hier is in dit onderzoek niet op gefocust.

Tabel 6: Overzicht gemeten effecten blootstelling aquatische organismen aan Bt-eiwitten

Organisme	Analyse	Effect	Ref.
Larven van <i>trichoptera</i> (schietmotten)*	Veldstudie tijdens bloeitijd	50% van de gevangen larven had maispollen opgenomen	[29]
Larven <i>Helicopsyche borealis</i> (kokerjuffers)**	Laboratorium experiment, 18 dagen gevoerd met algen en pollen	25% hogere mortaliteit bij 2,75 g/m ² Bt-maispollen	[29]
Larven <i>Helicopsyche borealis</i> (kokerjuffers)**	Laboratorium experiment, 18 dagen gevoerd met algen en pollen	Geen effect bij 0,055 g/m ² Bt-maispollen	[29]
<i>Daphnia magna</i> (watervlo)*	Acute toxiciteit test (48 uur blootstelling) (18,8 µg Cry3Bb1 per g pollen)	LC50 > 150 mg/l maispollen 2,82 * 10 ⁻³ mg/l Cry3Bb1	[37]
<i>Daphnia magna</i> (watervlo)*	-	Geen effecten voor 100 en 150 mg/l Cry1Ab en 100 mg/l Cry1F	[38]
<i>Daphnia magna</i> (watervlo)*	42 dagen experimenten dagelijks gevoerd met 100 µl Bt-Mais (Cry1Ab, Dekalb818 YG) en non Bt-Mais (dekalb 818) met een deeltjes grootte van 2-4 µm (optimale voedsel grootte)	<i>D. Magna</i> gevoerd met Bt-Mais t.o.v. non Bt-Mais: -hogere mortaliteit -minder vrouwtjes geslachtsrijp -lagere ei productie	[39, 40]
Larven <i>Chironomus dilutus</i> (vedermug)**	10 dagen gevoerd met MON863 wortel extract	20% afname in overleving bij 3,0 *10 ⁻² mg Bt CryBb1/l	[32]
Aquatische organismen die bladafval in waterstromen in Zweden koloniseren. <i>Ephemeroptera</i> *, <i>Plecoptera</i> , <i>Trichoptera</i> * en <i>Coleoptera</i> *	Veldexperimenten in Zweden naar de decompositie van Bt-bladafval in rivieren. (van de bomen <i>Populus tremula</i> en <i>Populus tremuloides</i>) - Decompositiesnelheid - Effecten van Bt-bladafval op de soortensamenstelling van koloniserende aquatische organismen	- Vergelijkbare decompositie snelheden van Bt- en non-Bt bladafval in water -Verandering in soortensamenstelling van aquatische organismen (25-33% meer soorten)	[41]
Larven van de schietmot <i>Lepidostoma liba</i> ** , de vlokreeft <i>Hyaella azteca</i> ** en de zoetwaterslak <i>Gyraulus sp.</i> *	Laboratorium experimenten: Verschillende macro invertebraten werden Bt- en non- Bt blad gevoerd gedurende 29 dagen	<i>Lepidostoma liba</i> : Significante afname groei <i>Hyaella azteca</i> : Geen effecten <i>Gyraulus sp.</i> : Geen effecten	[36]
<i>Ictalurus punctatus</i> ** (Kanaalmeerval)	8 weken durende toxiciteit studie	Geen effecten met een dieet dat 35% Cry3Bb1 eiwitten bevat	[37]

*: soort komen in Nederland voor

** : soort komt niet in Nederland voor

2.3.4. *Inschatting risico's*

Op basis van de resultaten van de theoretische modelberekening (worst case en gemiddeld scenario) en de gegevens uit de literatuur (tabel 6) is een risico inschatting gemaakt. Deze inschatting is gemaakt op basis van afzonderlijke Bt-eiwitten, waar informatie over blootstellingseffecten beschikbaar is. Daarbij is onderscheid gemaakt in concentraties per m² (tabel 7) en concentraties per liter (tabel 8).

Tabel 7. *Risico-inschatting Cry1Ab in g/m²*

	Pollen/ m ²	Bt-eiwit (g/m ²)	Factor t.o.v literatuur
Literatuur	9.625.000	2,2 * 10 ⁻⁶	-
Worst case scenario	1.226.000.000	6,9 * 10 ⁻⁵	10 hoger
Gemiddeld scenario	336.000.000	1,3 * 10 ⁻⁵	10 hoger

Voor Cry1Ab is op basis van de modelberekeningen mogelijk sprake van een risico voor aquatische organismen. Echter, de theoretische pollendepositie is minimaal een factor 100 hoger dan gemeten in de veldstudie van Rosi-Marshall et al [29].

Tabel 8. *Risico-inschatting Bt-eiwitten in mg/l*

	Pollen/ m ²	Bt-eiwit (mg/l)			Factor t.o.v literatuur
		Cry1Ab	Cry1F	Cry3Bb1	
Literatuur	9.625.000	> 100 > 150	> 100	2,8 * 10 ⁻³ tot 2,0 * 10 ⁻²	-
Worst case scenario	1.226.000.000	6,9 * 10 ⁻⁵	2,3 * 10 ⁻²	1,6 * 10 ⁻²	Gelijk tot 1.000.000 lager
Gemiddeld scenario	336.000.000	1,35 * 10 ⁻⁵	3,7 * 10 ⁻³	3,1 * 10 ⁻³	Gelijk tot 1.000.000 lager

NB: De concentratie Cry1Ab is berekend op basis van de detectielimiet voor dit eiwit. In MON810, de event die in Nederland is toegestaan, is de concentratie Bt-eiwit in pollen lager dan de detectielimiet. Dat betekent dat de risico's waarschijnlijk overschat worden.

Op basis van tabel 8 worden op basis van modelberekeningen geen negatieve effecten van Bt-eiwitten op aquatische organismen verwacht.

2.3.5 *Resumé*

Onderzoek in de Verenigde Staten wijst uit dat maispollen van Bt planten in watersystemen terecht komen. Het is zeer aannemelijk dat pollen van Bt-Mais ook in het Nederlandse oppervlaktewater terechtkomen aangezien 1) door heel Nederland Mais geteeld wordt en 2) Nederland een waterland is waarbij er vele meren, sloten en greppels (rivieren, beken) zijn waardoor het aannemelijk is dat maispercelen aan waterlichamen kunnen grenzen. (Bt)-maispollen komen hoofdzakelijk via de wind in watersystemen terecht. Over het afstromen van maispollen bij sterke regenval zijn geen referenties gevonden, maar kan niet worden uitgesloten. In het oppervlaktewater kunnen (Bt)maispollen in contact komen met aquatische organismen zoals filtervoeders, grazers en knippers en al dan niet een negatief effect veroorzaken. Bt-eiwitten zijn in opgeloste vorm gemeten in het oppervlaktewater, tot zes maanden na de oogst. Bt-eiwitten adsorberen aan gronddeeltjes en kunnen dan persistent zijn. Door deze adsorptie zou de biologische beschikbaarheid van Bt-eiwitten verminderen en daarmee ook de mogelijk schadelijke effecten. Literatuur betreffende de effecten van Bt-eiwitten en Bt-maispollen op aquatische

organismen is schaars. Tabel 6 vat een selectie van onderzoeken naar de effecten van Bt-eiwitten en Bt-maispollen op aquatische organismen samen. Zo is er onder andere bekend dat Bt-eiwitten negatieve effecten kunnen hebben op watervlooien (*Daphnia magna*), de kokerjuffer *Helicopsyche borealis*, aquatische larven van de schietmot *Trichoptera* en van de vedermug *Chironomus dilutus*. *Trichoptera* en *Daphnia magna* komen ook in Nederland voor. Tot slot zijn er aanwijzingen dat Bt-bladafval een effect heeft op de soortensamenstelling van aquatische organismen die het bladafval koloniseren.

Om vast te stellen of Bt-eiwitten vanuit maispollen terecht kunnen komen in het aquatisch ecosysteem en of daar negatieve effecten van te verwachten zijn, is berekend hoeveel Bt-eiwitten theoretisch in het aquatisch systeem terecht kunnen komen. De theoretisch berekende concentraties Bt-eiwitten in waterwegen in het realistisch gemiddelde scenario ($3,7 \cdot 10^{-3}$ mg Bt-eiwitten Cry3Bb1/l) zijn vergelijkbaar met de concentraties waarbij effecten zijn aangetroffen, zoals deze beschreven worden in de literatuur ($2,8 \cdot 10^{-3} - 3,0 \cdot 10^{-2}$ mg Bt- eiwitten/l). Dat betekent dat op basis van de berekende hoeveelheid Bt-eiwitten mogelijk negatieve effecten op aquatische organismen worden verwacht. Echter, als gekeken wordt naar Cry1Ab, aanwezig in maisevent MON810 welke is toegestaan in Nederland, dan wordt geen negatief effect op aquatische organismen verwacht. Belangrijk hierbij is op te merken dat het her een vergelijking op basis van een beperkt aantal studies betreft.

3. BEMONSTERINGSSTUDIE

3.1. Opzet

In de bemonsteringsstudie lag de nadruk op het vaststellen van de mate van blootstelling van aquatische organismen aan stuifmeel van het gewas Mais. Tevens is geverifieerd of de veronderstelling dat gewasresten van Mais in de Nederlandse situatie de watergangen niet bereiken klopt.

Om te kunnen vaststellen of aquatische organismen daadwerkelijk kunnen worden blootgesteld aan stuifmeel van Mais is het noodzakelijk om vast te stellen of dit stuifmeel ook daadwerkelijk in de watergangen terecht kan komen. Hiertoe zijn in deze studie monsters genomen in negen watergangen die grenzen aan percelen met Mais. Het betreft een observatiestudie, bedoeld om antwoord te krijgen op de deelvragen:

1. Komt stuifmeel van Mais in watergangen terecht, en in welke mate?
2. In hoeverre treedt daarbij accumulatie op in de waterbodem?

Om vast te stellen hoe lang stuifmeel van Mais in de waterkolom verblijft is in aanvulling een kolomproef uitgevoerd. Dit om inzicht te krijgen in de vragen:

1. Hoe lang blijft stuifmeel van Mais drijven?
2. Hoe snel bezinkt het?

Wanneer gg-gewassen worden geteeld, kan transgeen plantenmateriaal in het water terecht komen. In tegenstelling tot de Amerikaanse situatie is de verwachting dat er in Nederland geen plantenmateriaal van Mais (uitgezonderd de wortelkluit) op het land achter blijft tijdens de oogst en dat gewasresten de watergangen niet zullen bereiken. Om deze aanname te verifiëren is vlak na de oogst een visuele inspectie van de watergangen uitgevoerd.

Voorafgaand aan de uitvoering van de bemonsteringsstudie is een plan van aanpak opgesteld. Dit plan is besproken met de begeleidingscommissie op 9 april 2014. De uiteindelijke aanpak is vastgelegd in de deelrapportage “Opzet fase 2. Bemonsteringsstudie. FLORON, d.d. 26 mei 2014”. Het onderzoek is conform dit werkplan uitgevoerd.

In de navolgende paragrafen wordt achtereenvolgens ingegaan op de uitvoering en resultaten van:

- Veldmetingen, om de daadwerkelijke stuifmeeldepositie en verspreiding van maispollen in het oppervlaktewater vast te stellen (paragraaf 3.2);
- Kolomproef, om vast te stellen hoe lang stuifmeel van Mais blijft drijven en in de waterkolom verblijft (paragraaf 3.3);
- Visuele inspectie watergangen, om te verifiëren of de veronderstelling dat gewasresten van Mais in de Nederlandse situatie de watergangen niet bereikt klopt (paragraaf 3.4).

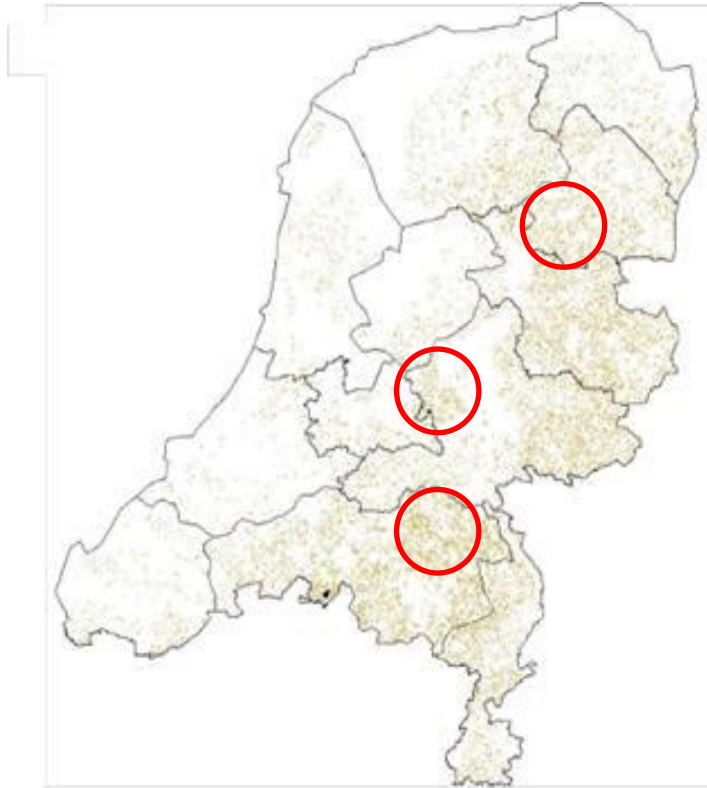
3.2. Veldmetingen

3.2.1. Selectie bemonsteringslocaties

In de studie is uitgegaan van het bemonsteren van negen verschillende deellocaties, verspreid over drie zoekgebieden in Nederland. In figuur 8 is een overzicht gegeven van de percelen waar in 2012 Mais is geteeld. In deze figuur zijn de drie (zoek)gebieden weergegeven waarbinnen de deellocaties zijn uitgezocht.

Het betreft de volgende drie zoekgebieden:

1. De omgeving van Meppel-Ruinen (Drenthe).
2. De omgeving van Amersfoort (Utrecht).
3. De omgeving van 's-Hertogenbosch – Oss (Noord-Brabant).



Figuur 8. De percelen met Mais in Nederland in 2012 en de drie zoekgebieden waarbinnen bemonsteringslocaties zijn gezocht.

Het gaat om relatief laag gelegen gebieden, met in de zomer watervoerende sloten. Binnen elk zoekgebied zijn drie deellocaties geselecteerd die voldoen aan de volgende randvoorwaarden:

- De te bemonsteren deellocatie (watergang) grenst direct aan een perceel waarop Mais wordt verbouwd. Bij voorkeur is gezocht naar watergangen die aan twee zijden worden begrensd door percelen bij Mais.
- De watergangen bevatten het hele jaar water en worden niet te sterk ingesloten door rietkragen, of andere opgaande vegetaties die stuifmeel kunnen vangen.
- De watergangen zijn goed toegankelijk. Dat wil zeggen dat er een schouwpad langs loopt. De focus lag op waterschapsleidingen.
- Het betreft niet of slechts langzaam stromend water.

Aanvullend hierop is geselecteerd op locaties die niet direct grenzen aan een weg of fietspad, dus enigszins uit het zicht liggen (om vernieling van de pollenvallen te voorkomen).

De selectie van de deellocaties heeft eind juni 2014 plaatsgevonden. Hiertoe is een bezoek gebracht aan de drie zoekgebieden en is gezocht naar locaties die voldeden aan bovengenoemde randvoorwaarden. Dat bleek minder eenvoudig dan op voorhand gedacht. Het kostte relatief veel tijd om geschikte locaties te vinden. Dit gold met name voor de zoekgebieden Utrecht en Drenthe. Maisakkers gelegen aan voor het onderzoek geschikte watergangen blijken maar weinig voor te komen.



Figuur 9: Overzicht deellocatie FL02-01 bij Hoogland (Utrecht)

Van elke geselecteerde deellocatie zijn vervolgens de volgende zaken vastgelegd:

1. De oriëntatie van de watergang ten opzichte van de percelen Mais.
2. De precieze locatie van de deellocatie (Amersfoort coördinaten).
3. De breedte en diepte van de watergang en afstand tot de maisakker.
4. Een overzichtsfoto van de deellocatie.

Tabel 9 geeft een overzicht van de geselecteerde deellocaties en de gebruikte coderingen. Bijlage 1 bevat overzichtskaarten met daarop de ligging van de deellocaties per zoekgebied. Een foto overzicht van de deellocaties is opgenomen in bijlage 2. Bijlage 3 tenslotte bevat gegevens over positionering en afstand van de watergangen tot de percelen Mais en de dimensionering van de watergang.

Tabel 9: Overzicht geselecteerde deellocaties

Deellocatie	Codering	Zoekgebied	Locatie	Coördinaten	
				X	Y
1	FL01-01	Noord-Brabant	Geffen - Rietkampsestraat 4	159,809	418,049
2	FL01-02	Noord-Brabant	Geffen – De Gement 5	160,700	418,350
3	FL01-03	Noord-Brabant	Nuland – Polderweg 6	158,694	418,044
4	FL02-01	Utrecht	Hoogland – Hogesteeg 13A	157,100	468,100
5	FL02-02	Utrecht	Nijkerk - De Veenhuis 1	158,214	470,254
6	FL02-03	Utrecht	Nijkerk – De Veenhuis 3 en 4	158,284	470,659
7	FL03-01	Drenthe	Uffelte – Anserweg 8	216,450	533,300
8	FL03-02	Drenthe	Ansen – Ruinerdijk 20	218,350	532,300
9	FL03-03	Drenthe	Ruinerwold - Hesselterweg	215,200	528,900

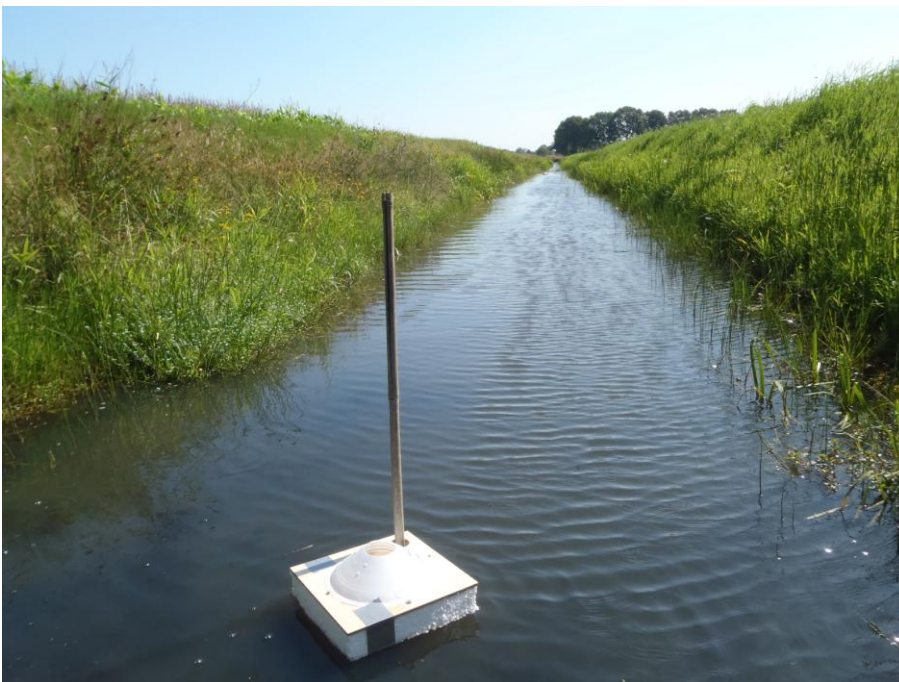
3.2.2. Bemonstering en analyses

Om te kunnen vaststellen of aquatische organismen daadwerkelijk kunnen worden blootgesteld aan stuifmeel van Mais is het noodzakelijk om vast te stellen of dit stuifmeel ook daadwerkelijk in de watergangen terecht kan komen. Hiertoe zijn de volgende compartimenten bemonsterd:

1. De luchtlaag vlak boven het wateroppervlak (depositie van stuifmeel). Hiervoor is gekozen omdat het bemonsteren van het wateroppervlak enkele praktische bezwaren met zich meebrengt. Vers stuifmeel is namelijk waterafstotend en zal zich op het wateroppervlak verzamelen (drijfslag), waarna het onder invloed van wind en stroming zal ophopen in de oevervegetatie en/of aanspoelgordels. Dit ‘gedrag’ maakt het moeilijk om te bepalen waar watermonsters moeten worden genomen. Door het bemonsteren van de luchtlaag vlak boven het wateroppervlak worden deze problemen omzeild.
2. De waterkolom (dispersie van stuifmeel).
3. De waterbodem (accumulatie van stuifmeel).

Ad 1. Bemonstering luchtlaag (depositie)

Om stuifmeel net boven het wateroppervlak af te vangen is gebruik gemaakt van Tauber stuifmeelvalen. De Tauber stuifmeelval maakt gebruik van passieve bemonstering en wordt in Amerika en Europa veel gebruikt in studies naar de dagelijks en (vooral) jaarlijkse stuifmeeldepositie in verschillende vegetatietypen. Omdat deze vallen niet commercieel verkrijgbaar zijn, zijn voor deze studie vallen gemaakt conform de specificaties zoals die staan op www.pollentrapping.net. Door deze stuifmeelval, met behulp van een polystyreenplaat, op het wateroppervlak te laten drijven is de depositie van stuifmeel van Mais op het wateroppervlak vastgesteld. De stuifmeelvalen zijn hiertoe midden in de watergang geplaatst en werden met behulp van een stok op zijn plaats gehouden, zodanig dat de vallen met het stijgen of dalen van de waterspiegel konden meebewegen. De stuifmeelvalen zijn bij het inzetten voorzien van een dun laagje kraanwater om de pollen in op te vangen. De stuifmeelvalen zijn na inzetten, afhankelijk van de deellocatie, tussen de 11 en 14 dagen blijven staan.



Figuur 10. Tauber stuifmeelval op deellocatie FL03-02 bij Ansen (Drenthe)

De betreffende waterschappen zijn voorafgaand op de hoogte gebracht van de plaatsing van de stuifmeelvalen. De vallen zijn voorzien van de tekst “FLORON, wetenschappelijke onderzoek” en vermelding van telefoonnummer en verwachte einddatum.

Omdat de Tauber stuifmeelvalen midden in de watergang goed zichtbaar zijn, en daarmee gevoelig voor vandalisme, zijn op elke deellocatie tevens back-up valen geplaatst. Deze bestonden uit horizontaal geplaatste objectglasjes voorzien van een plakstrip. Deze back-up stuifmeelvalen zijn gelijktijdig met de Tauber stuifmeelvalen geplaatst en opgehaald.

Bij het ophalen is de inhoud van de Tauber stuifmeelval overgebracht in een monsterpot, waarbij de valen goed zijn nagespoeld met kraanwater. Om uit het analyseresultaat (aantal maispollen/ml) uiteindelijk de pollenflux (aantal pollen/m² wateroppervlak) te kunnen berekenen is zowel het monstervolume bepaald (door de monsterpotten zowel leeg als vol te wegen) als de diameter van de opening in de pollenvallen.

Ad2. Bemonstering waterkolom

Voor het bemonsteren van de waterkolom zijn met behulp van een slangenpomp watermonsters van 3 liter genomen op circa 25 cm onder het wateroppervlak. De waterkolom is op twee tijdstippen, met een interval van circa 14 dagen, bemonsterd. De tijdstippen vielen samen met het plaatsen en ophalen van de Tauber stuifmeelvalen.

Ad3. Bemonstering waterbodem

Om vast stellen in hoeverre er ook accumulatie van stuifmeel in de waterbodem optreedt zijn monsters genomen van de waterbodem. Daarbij is gebruik gemaakt van een Multisampler. Dit is een bemonsteringsapparaat (met een doorzichtige buis) die speciaal geschikt is voor een ongestoorde bemonstering van waterbodems en veel bij waterbodemonderzoek wordt toegepast. De monsters zijn genomen uit het midden van de watergang. Daarbij is alleen de toplaag van de waterbodem bemonsterd. De diameter en dikte van de bemonsterde laag zijn vastgelegd, zodat de uiteindelijke analyseresultaten kunnen worden omgerekend naar aantallen per ml bodemvolume en m² waterbodem. De dikte van de bemonsterde laag bedroeg varieerde van 2 tot 7 cm en bedroeg gemiddeld 4 centimeter (zie bijlage 6). De monsternamen van de waterbodem viel samen met het ophalen van de Tauber stuifmeelvalen.

Bemonstering

Om te vermijden dat ruimtelijke heterogeniteit tot te grote variatie in de resultaten leidt zijn op elke geselecteerde deellocatie drie monsters (van elk van drie compartimenten) genomen met een onderlinge afstand van ongeveer 50 meter, waarvan een mengmonster is gemaakt. Deze mengmonsters zijn vervolgens geanalyseerd op aanwezigheid van stuifmeel.

Resume:

- Er zijn monsters genomen binnen drie zoekgebieden
- Per zoekgebied zijn drie deellocaties bemonsterd
- Op elke deellocatie zijn drie monsters genomen van elk van de compartimenten (luchtlaag, waterkolom en sediment), die vervolgens per compartiment zijn gemengd.

De bemonsteringsopzet is samengevat in tabel 10.

Tabel 10. Bemonsteringsopzet

Zoekgebied	Deellocatie	1 ^e bezoek		2 ^e bezoek		Totaal
		Water	Lucht#	Water	Sediment	
1	FL01-01	1	1	1	1	
	FL01-02	1	1	1	1	
	FL01-03	1	1	1	1	
2	FL02-01	1	1	1	1	
	FL02-02	1	1	1	1	
	FL02-03	1	1	1	1	
3	FL03-01	1	1	1	1	
	FL03-02	1	1	1	1	
	FL03-03	1	1	1	1	
Subtotaal		9	9	9	9	36

betreft een monster dat gedurende een periode van circa twee weken is verzameld

De bemonstering is uitgevoerd door FLORON. Het tijdstip van bemonstering is afgestemd op het hoogtepunt van de bloei van Mais. Op deze manier is uitgegaan van een worst case scenario (maximaal stuifmeelaanbod). Om dit tijdstip te bepalen is vanaf begin juli in Noord-Brabant (vanwege de zuidelijke ligging, dus warmer) gelet op het in bloei komen van de maisplanten. De eerste mannelijke bloeiaaren begonnen eind week 29 te bloeien. De stuifmeelvallen zijn vervolgens vanaf begin week 30 (tussen 21 en 24 juli) geplaatst, eerst in Noord-Brabant, daarna in Utrecht en tenslotte in Drenthe. Alle pollenvallen zijn op 4 augustus opgehaald. De datum van plaatsing komt overeen met het moment (rond 20 juli) waarop Mais in een gemiddeld jaar in Nederland begint te bloeien. Bij het ophalen van de stuifmeelvallen is op elke deellocatie gecontroleerd of de maisplanten daadwerkelijk waren uitgebloeid. Daarbij is gekeken naar zowel mannelijke bloeiaar (bruin en geen stuifmeel meer uit de helmhokjes) als vrouwelijke kolven (stempels bruin (niet meer ontvankelijk voor stuifmeel)). Dit was op alle deellocaties het geval. Er bleek weinig verschil in bloeitijd te zijn tussen Noord-Brabant, Utrecht en Drenthe.

Afwijkingen

Bij het ophalen van de stuifmeelvallen zijn de volgende afwijkingen geconstateerd:

1. De drie stuifmeelvallen op deellocatie FL02-01 bleken te zijn weggehaald. Omdat ook de back-ups zijn verwijderd is op deze deellocatie de bemonstering van de luchtlaag komen te vervallen.
2. Op de deellocatie FL01-01 bleek de inhoud van één van de drie stuifmeelvallen te zijn vervuild met vogelpoep. Besloten is om dit deelmonster niet op te mengen met de andere twee deelmonsters. De stuifmeelanalyse is derhalve uitgevoerd op een mengmonster van twee herhalingen in plaats van de geplande drie.

Uitvoering stuifmeel analyses

De (meng)monsters zijn, na opwerking, met behulp van een doorvallend lichtmicroscop, geanalyseerd op aanwezigheid van stuifmeel van Mais. Voor een uitgebreidere beschrijving van de gebruikte analysemethode wordt verwezen naar bijlage 4. De stuifmeelkorrels van Mais zijn, vanwege de grootte, goed tot op soortniveau te determineren.

De stuifmeelanalyses zijn uitgevoerd door EARTH Integrated Archeology b.v.

3.2.3. Weersomstandigheden tijdens bemonsteringsperiode

Gegevens over weersomstandigheden (met name windrichting en snelheid) tijdens de bemonsteringsperiode zijn opgevraagd bij het KNMI en samengevat in tabel 11. Het betreft gegevens van de weersstations Volkel, De Bilt en Hoogeveen. Tevens is de oriëntatie en afstand van de monsterpunten ten opzichte van de maispercelen weergegeven en het aantal dagen dat de watergang min of meer benedenwinds van het betreffende maisperceel lag.

Tabel 11. Weersomstandigheden tijdens bemonsteringsperiode

Locatie	Oriëntatie t.o.v. maisperceel	Afstand (m) tot maisperceel	Overheersende windrichting tijdens bemonstering	Aantal dagen benedenwinds	Gemiddelde windsnelheid m/s
FL01-01	NNW	7	Overwegend westelijk (ZW-W) en oostelijk (NO)	4	2,6 (1,1-4,0)
FL01-02	ZZW	6		7	
FL01-03	O en W	6 en 7		14	
FL02-01	ZW	4	Overwegend westelijk (ZZW-NW) en oostelijk (NO)	5	2,7 (1,4-4,3)
FL02-02-01	ZW en NO	2 en 2		11	
FL02-02-02	ZO	2		6	
FL02-02-03	ZO	2		6	
FL02-03	ZO en NW	4 en 4		9	
FL03-01	ZO	4	Overwegend westelijk (W-ZW) en oostelijk (NO-ZO)	7	2,7 (1,6-3,9)
FL03-02	ZZO	3		5	
FL03-03-01	ZO	4		7	
FL03-03-02	ZO	4		7	
FL03-03-03	ZO en NW	5 en 5		10	

3.2.4. Resultaten

Tabel 12 geeft een overzicht van het aantal maispollen in de drie bemonsterde compartimenten. Het analyserapport is weergegeven in bijlage 5. De uitgevoerde omrekeningen van de analyseresultaten naar eenheden per cm² wateroppervlak (depositie lucht) of cm² waterbodem (accumulatie) zijn weergegeven in bijlage 6.

Tabel 12. Analyseresultaten

Locatie	Compartiment				
	Lucht ¹⁾		Water (aanvang) ²⁾	Water (eind) ²⁾	Waterbodem
	pollen/cm ²	Bemonsteringsduur d ⁻¹	pollen/l	pollen/l	pollen/cm ²
FL01-01	21*	14	37	50	11.018
FL01-02	58	14	305	54	1.707
FL01-03	42	14	0	25	0
FL02-01	Vervallen [#]	12,1	65	0	2.368
FL02-02	433	12,1	1.770	98	4.114
FL02-03	228	12,1	99	0	2.315
FL03-01	3	11,3	0	0	2.924
FL03-02	14	11,3	0	147	5.186
FL03-03	4	11,3	124	1.180	1.487
Gemiddeld	101		267	173	3.456

1) Betreft totaal aantal maispollen dat gedurende de bemonsteringsperiode in de watergang terecht is gekomen

2) Aantal maispollen op 25 cm beneden het wateroppervlak

Analyse is komen te vervallen vanwege weghalen pollenvallen door onbekenden

* Betreft analyse op mengmonster van 2 in plaats van 3 deelmonsters, vanwege vervuiling van derde monster

3.2.4. *Bespreking resultaten*

In alle pollenvallen zijn maispollen aangetroffen. Omgerekend naar aantallen per cm^2 wateroppervlak varieert het aantal pollen van 3-14 (Drenthe) tot 228-433 (Utrecht) pollen per cm^2 . Dit komt neer op een pollendepositie van 30.000 tot 4.000.000 pollen per m^2 op een afstand van 7 tot 2 meter tot het maisveld.

Er is een sterke correlatie tussen het aantal pollen en de afstand tot het naastgelegen maisperceel (figuur 10). De aantallen nemen af met toenemende afstand tot het maisperceel (Pearson correlatie is 0,74), waarbij is aangetekend dat het patroon in hoge mate wordt bepaald door de Utrechtse meetpunten. Omdat de pollenvallen midden in de watergangen waren opgesteld is het aannemelijk dat de pollen ook daadwerkelijk op het oppervlaktewater terecht zijn komen.

De bemonsterde watergangen hebben een gemiddelde diepte van 0,5 meter. Als wordt uitgegaan van een homogene verdeling van de pollen in het oppervlaktewater dan resulteert dit in concentraties van 60 tot 8.000 pollen per liter oppervlaktewater (gemiddeld 2.000).

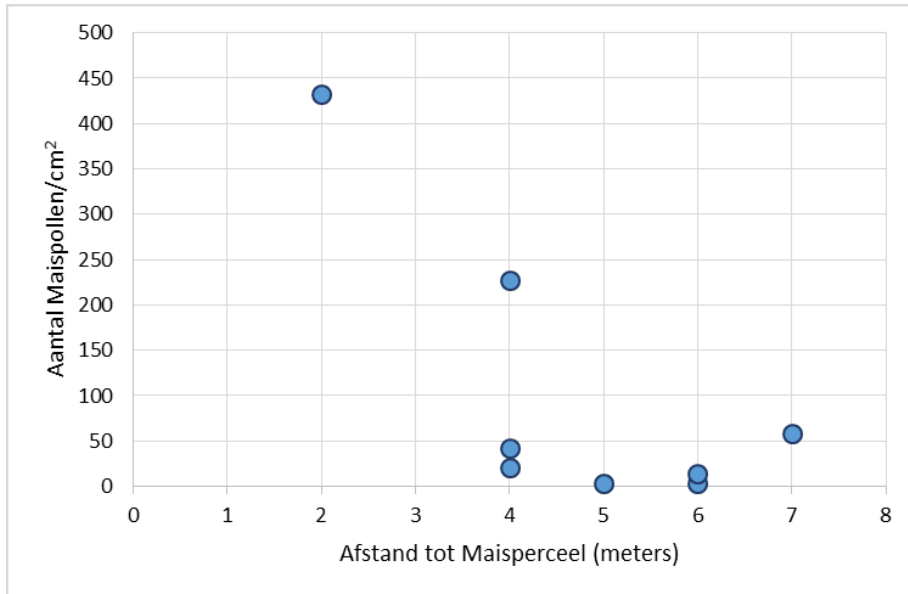
De maximaal gemeten pollendepositie (4.000.000 pollen/ m^2) ligt circa een factor 120 (realistisch scenario) tot 350 (worst case scenario) lager dan wat is berekend in de modelberekening (zie tabel 5). Wel komen de aantallen overeen met de aantallen (350.000 – 3.500.000 pollen/ m^2) die in de literatuur staan beschreven (zie tabel 4). Om de uitkomsten van de Taubervallen te verifiëren zijn van een viertal locaties (FL01-01, FL01-02, FL03-01 en FL03-02) de back-up pollenvallen (dekglasjes met dubbelzijdig tape) bekeken onder de microscoop. De resultaten zijn weergegeven in bijlage 6. De gemeten pollendepositie in deze back-up monsters (variërend van 2 tot 31 pollen/ cm^2) liggen in ongeveer dezelfde ordegrrootte als de aantallen zoals die is gemeten in de Tauber-vallen (variërend van 3-58 pollen/ cm^2).

De Tauber-pollenva is ontwikkeld om de uitkomsten van modelberekeningen van pollendisversie te verifiëren met veldmetingen [49]. Er zijn verschillende studies uitgevoerd waarin de werking van de Tauber-pollenva is vergeleken met andere bemonsteringsmethoden, zoals de Burkard-pollenva die veel gebruikt wordt voor het nauwkeurig meten van allergenen in de lucht [46, 47, 48]. Uit deze studies blijkt dat er een sterke correlatie is tussen de aantallen die respectievelijk gevonden worden in de Tauber-pollenva (passieve methode op basis van zwaartekracht) en de Burkard-pollenva (actieve methode waarbij lucht wordt aangezogen). Dit betekent dat de resultaten van de Tauber-pollenvallen een goed beeld geven van de pollendepositie ter plekke.

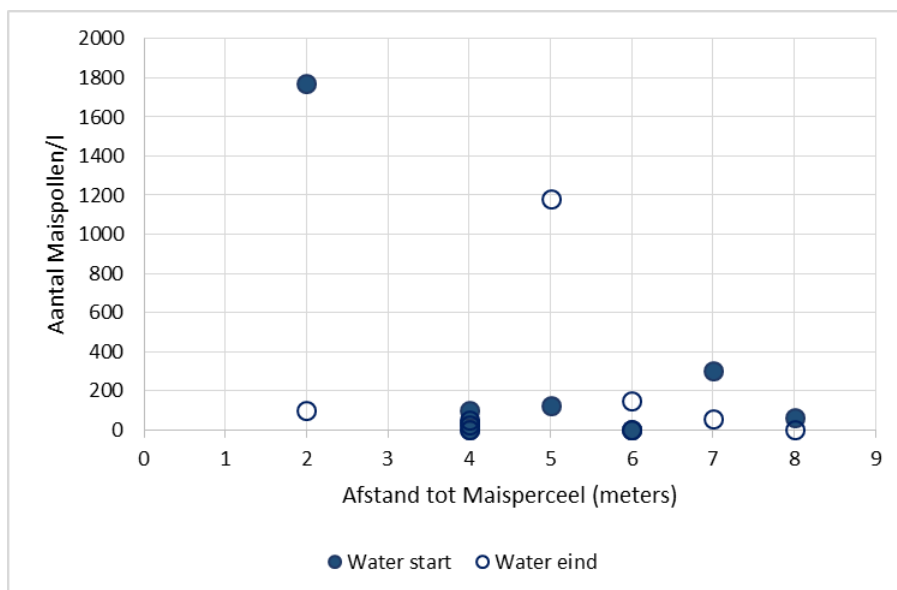
De pollenvallen zijn geplaatst bij aanvang van de bloei (zie paragraaf 3.2.2) op het moment dat de eerste maisplanten in bloei kwamen. Hierdoor is de start van de bloei net gemist (maar niet de hoofdbloei). De totale pollendepositie ligt dus in werkelijkheid wel iets hoger dan wat is gemeten, maar het verklaart niet het grote verschil met de modelmatig verwachte depositie.

Op twee tijdstippen is de hoeveelheid pollen in het oppervlaktewater gemeten op 25 cm beneden het wateroppervlak, bij het inzetten en ophalen van de pollenvallen. Deze tijdstippen komen overeen met de aanvang en einde van de bloeiperiode. In 67% van zowel de start als eindmonsters zijn pollen van Mais aangetroffen, variërend in concentraties van 25 tot 1.770 pollen per liter (gemiddeld 267 bij aanvang en 173 aan het eind). Deze gemiddelde aantallen zijn lager dan wat op basis van de pollendepositie is berekend (gemiddeld 2.000 pollen/l bij homogene verdeling over de waterkolom). Dit is te verklaren doordat de pollen gedurende de bemonsteringsperiode deels in de drijfslag blijven hangen en wegstromen of in de oeverzone terecht komen. Ook bezinken maispollen snel zodra ze zich eenmaal in de waterkolom bevinden

(zie ook resultaten kolomproef in paragraaf 3.3). De aanwezigheid van maispollen in het oppervlaktewater bij aanvang duidt erop dat de Mais op dat moment in bloei stond.



Figuur 11: Hoeveelheid maispollen per cm² wateroppervlak in relatie tot de afstand tot het aangrenzende Maisveld



Figuur 12: Hoeveelheid maispollen per liter bij aanvang en aan het eind van de bloeiperiode in relatie tot de afstand tot het aangrenzende maisveld

De hoogste aantallen pollen zijn gemeten in de watergangen die het dichtst bij een maisperceel liggen (figuur 12), maar de variatie tussen de monsterpunten is groot. Bij de startmonsters is er een correlatie tussen het aantal pollen in het oppervlaktewater en de afstand tot het maisperceel en tevens de mate van pollendepositie (Pearson correlatie respectievelijk 0,59 en 0,88). Bij de eindmonsters is deze correlatie niet aanwezig (Pearson correlatie respectievelijk 0,05 en 0,23). Dit laatste heeft waarschijnlijk te maken met een combinatie van een sterk verminderde pollendepositie (einde bloei) en het gedrag van de pollen zodra ze eenmaal op het wateroppervlak terecht zijn gekomen.

In acht van negen waterbodemmonsters zijn maispollen aangetroffen in hoge aantallen, variërend van 446 tot 1.924 pollen per ml bemonsterde waterbodem. Dit wijst erop dat maispollen accumuleren in de bovenste paar centimeter van de waterbodem. Omgerekend naar het bemonsterde oppervlak bedraagt het aantal pollen in de bovenste 4 cm van het sediment gemiddeld 3.500 pollen/cm² (= 35.000.000 pollen/m²). Deze accumulatie is gezien de gemeten pollendepositie (maximaal 4.000.000 pollen/m² wateroppervlak) mogelijk het resultaat van tientallen jaren maisteelt in de directe omgeving. Een kanttekening hierbij is dat de monsters zijn genomen in het midden van de watergang. Dit is meestal het diepste gedeelte waarin zich het sediment (en dus ook de pollen) zich ophoopt. De resultaten van de sedimentmonsters kunnen dus niet één op één worden vergeleken met de gemeten pollendepositie. Er kan met de gebruikte telmethode ook geen onderscheid gemaakt worden in recent (dit jaar) en ouder pollen. Dit heeft te maken met de toegepaste opwerking, waarbij de sedimentmonsters met zuur worden opgekookt. Wat overblijft zijn alleen de omhulsels van de pollen die vervolgens worden geteld. Deze opwerking is bij sedimentmonsters noodzakelijk om storend organisch materiaal te verwijderen (mededeling EARTH Integrated Archeology b.v).

Uit de resultaten blijkt dat pollen van Mais daadwerkelijk in het aan de maispercelen grenzende oppervlaktewater terecht komen en daar accumuleren in de waterbodem. Daarbij is er een correlatie met de afstand tot het maisperceel. Hoe dichter de watergang bij het maisveld ligt, hoe hoger de pollendepositie, en hoe meer pollen er in het oppervlaktewater terecht komen.

3.3. Kolomproef

3.3.1. Uitvoering

Uit het literatuuronderzoek (zie hoofdstuk 2) blijkt dat er weinig gegevens over het gedrag van stuifmeel beschikbaar zijn nadat het stuifmeel op het wateroppervlak terecht is gekomen. Inzicht in vragen als: 1. Blijft stuifmeel van Mais drijven? en 2. Hoe snel bezinkt het? is gewenst om vast te stellen hoe lang stuifmeel van Mais in de waterkolom verblijft.

Om deze vragen te beantwoorden is een eenvoudige kolomproef uitgevoerd. Er is gebruik gemaakt van glazen kolommen (in drievoud) met een diameter van 18 cm en een hoogte van 50 centimeter. Deze zijn gevuld met kraanwater. Vervolgens is stuifmeel van Mais opgebracht, door verse mannelijke pluimen met stuifmeel boven het wateroppervlak uit te schudden (zie figuur 13), totdat er een egale laag met stuifmeel visueel zichtbaar is (zie figuur 14). Daarbij is het pollen gezeefd om te voorkomen dat er teveel helmhokjes op het wateroppervlak terecht komen. Vervolgens is visueel gevolgd wat er met het pollen gebeurt en zijn op gezette tijden met een steekpipet (vaste diepte van 25 cm beneden het wateroppervlak) monsters van 50 ml genomen, dit om het verloop van de stuifmeelconcentratie in de tijd te volgen. In totaal zijn op deze wijze per kolom vijf steekmonsters genomen, waarvan 1 kort na inzetten. Aan het eind van het experiment is van elke kolom de inhoud gemengd, waarna hiervan een monster is genomen. Dit monster geeft een indruk van de totale hoeveelheid stuifmeel die bij aanvang is opgebracht. In totaal zijn van twee herhalingen drie monsters geanalyseerd op stuifmeel (totaal zes monsters). De overige monsters zijn ingevroren om, indien nodig, in een later stadium op terug te kunnen grijpen mocht dat nodig zijn.



Figuur 13. Opbrengen van stuifmeel door verse mannelijke pluimen boven de kolommen uit te schudden

Om van te voren een idee te krijgen hoe lang de kolom moet blijven staan, en op welke momenten dus monsters moeten worden genomen, is voor aanvang een eenvoudige test gedaan. In deze test is stuifmeel van Mais, op dezelfde wijze als hiervoor is beschreven, uitgestrooid in een glazen kolom gevuld met kraanwater. Vervolgens is visueel gevolgd wat er met het pollen gebeurt. Er zijn geen monsters genomen. Deze test was o.a. bedoeld om de frequentie van monsternamen in de kolomproef te kunnen vaststellen.



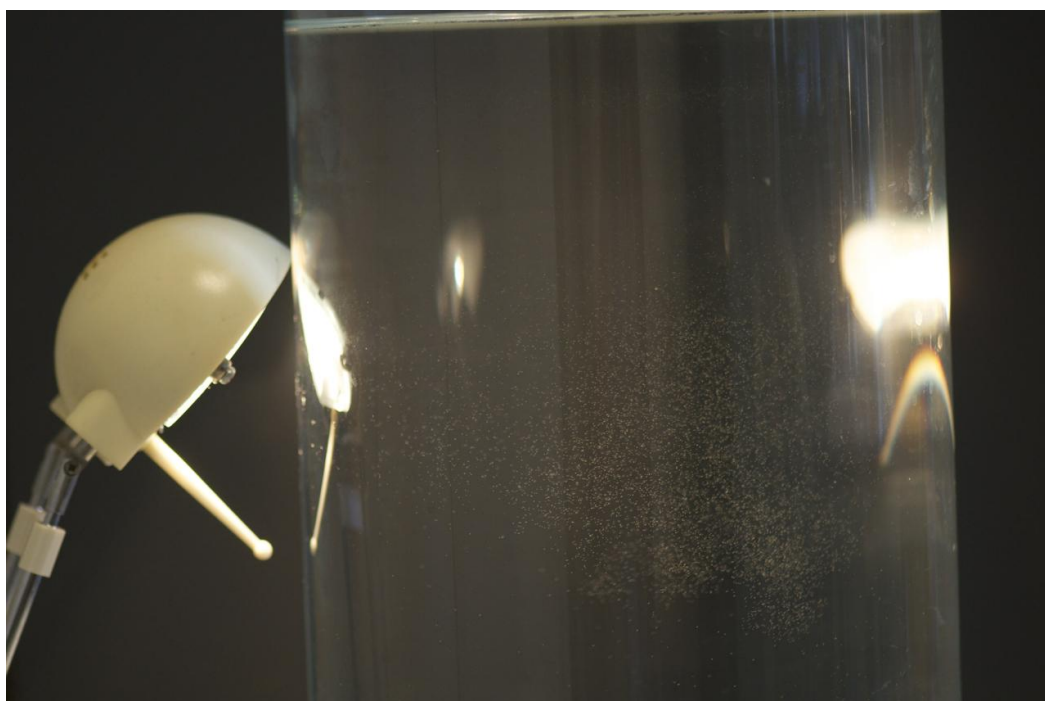
Figuur 14. Macrofoto van het wateroppervlak van de kolom, direct na inzetten. De afzonderlijke stuifmeelkorrels zijn hierop goed te zien. Ter inschatting van de grootte, het helmboekje op de foto heeft een lengte van circa 6 mm.

3.3.2. Resultaten

Tijdens de uitvoering van de kolomproeven zijn de volgende observaties gedaan:

- De pollen zijn dusdanig groot dat ze na het opbrengen met het blote oog zichtbaar zijn.
- Een deel van de pollen blijft na het opbrengen drijven en een deel bezinkt direct.
- De zinksnelheid van de pollen is bepaald door te bepalen hoe lang de “pollenwolk” erover doet om de bodem van de kolom te bereiken. De pollen leggen in 6-8 minuten een afstand af van 35 cm. De bezinksnelheid bedraagt daarmee 3,5-6,8 cm per minuut.
- Twee uur na inzetten is er sprake van een visueel heldere waterkolom, met pollen op het wateroppervlak en op de bodem van de kolom. Mogelijk dat de kolom al eerder helder was, dit is echter niet gecontroleerd.
- Het aandeel pollen verschuift slechts heel langzaam van het wateroppervlak naar de bodem.
- Na 10 dagen drijven er nog steeds veel pollen op het wateroppervlak.
- Vanaf circa 2 dagen na het inzetten wordt het water in kolom langzaam troebel en vertoont het water een rottingsgeur (rotte eieren-lucht). De troebeling is waarschijnlijk het gevolg van bacteriegroei (niet geverifieerd).
- Als de waterspiegel in beroering wordt gebracht (aanvullende proef), door tegen de glazen kolom te tikken, ontstaat er weer een wolk met zinkende pollen (zie figuur 15). Beweging van het wateroppervlak verhoogt dus de snelheid waarmee de pollen bezinken.

Op basis van deze observaties is besloten tot een kolomproef van twee dagen. In tabel 13 is het bemonsteringsschema weergegeven.



Figuur 15. Wolk van zinkende pollen, direct nadat het wateroppervlak in beroering is gebracht door tegen de kolom te tikken.

De monsters 01, 04 en 06 van twee van de drie kolommen, die zijn genomen op respectievelijk 1, 21 en 45 uur na inzetten, zijn na afloop geanalyseerd op het aantal maispollen. De resultaten van deze analyses zijn weergegeven in tabel 14. De analysecertificaten zijn weergegeven in bijlage 5.

Tabel 13. Bemonsteringsschema kolomproeven

Monster	Datum	Tijd	Tijd na inzetten (uren)	Opmerkingen/waarnemingen
	29/07/2014	11:00	0	Pollen opgebracht
01	29/07/2014	12:00	1	Pollen op wateroppervlak, minder op de bodem
02	29/07/2014	14:00	2	-
03	29/07/2014	18:00	7	Aandeel pollen op bodem is toegenomen
04	30/07/2014	08:00	21	Meer pollen op bodem dan op wateroppervlak
05	31/07/2014	08:00	45	Meer pollen op bodem dan op wateroppervlak
06	31/07/2014	08:00	45	Na opmengen kolominhoud

Tabel 14. Analyseresultaten kolomproeven

Tijd na inzetten (uren)	maispollen/ml	
	Kolom 1	Kolom 2
0	-	-
1	72	9
2	-	-
7	-	-
21	19	10
45	-	-
45 – na opmenging	10	58

- Niet geanalyseerd

3.3.3. Bespreking resultaten

Opgemerkt wordt dat de interpretatie van het pollengedrag grotendeels gebaseerd is op de visuele waarnemingen. Het aantal pollentellingen dat tijdens de kolomproef is uitgevoerd is gering, waardoor hier verder geen kwantitatieve conclusies aan kunnen worden verbonden.

De resultaten en observaties laten zien dat de stuifmeelkorrels zich óf op het wateroppervlak óf op de bodem van de kolom bevinden. Het aantal stuifmeelkorrels in de waterkolom, na respectievelijk 1 en 21 uur is relatief laag. Twee uur na inzetten is sprake van visueel heldere waterkolom. De stuifmeelkorrels van Mais bezinken met een snelheid van circa 3,5-6,8 cm per minuut zodra ze zich in de waterkolom bevinden. De gemiddelde waterdiepte in de bemonsterde watergangen (zie bijlage 3) bedroeg ongeveer 50 cm. Op basis van bovenstaande bezinksnelheid bedraagt de verblijftijd in het oppervlaktewater, uitgaande van stilstaand water, ongeveer 7-14 minuten. In de bemonsteringsstudie zijn in het oppervlaktewater gemiddelde concentraties van 270 (bij aanvang bloei) en 170 (na de bloei) maispollen/l gemeten (zie tabel 10). Op basis van de resultaten van de kolomproef werd verwacht dat het aantal maispollen in het oppervlaktewater lager zou zijn. De verschillen worden mogelijk verklaard door het feit dat in de veldsituatie sprake is van depositie van pollen gedurende meerdere dagen (in kolomproef eenmalig) en dat er meer turbulentie is (onder invloed van de wind en stroming). Hierdoor blijven er meer pollen in de waterkolom zweven dan het geval is in de kolom met stilstaand water.

10 dagen na opbrengen bevinden zich nog steeds stuifmeelkorrels op het wateroppervlak. Stuifmeelkorrels zijn hydrofoob (stoten water af), waardoor ze kunnen blijven drijven. De observatie dat een deel van de drijvende stuifmeelkorrels zinkt na beroering van het wateroppervlak is een indicatie dat ook de oppervlaktewaterspanning een rol speelt. Het wateroppervlak gedraagt zich als een veerkrachtige laag waarop de stuifmeelkorrels als het ware

blijven 'liggen'. In de kolomproeven staat het wateroppervlak stil. Dit zal in de praktijk niet het geval zijn. Door stroming, regen en de invloed van de wind is het wateroppervlak in beweging. In de praktijk zullen de pollen naar verwachting daarom minder lang blijven drijven dan in de kolomproef.

Vanaf circa 2 dagen na het inzetten wordt het water in kolom langzaam troebel (bacteriegroei) en begint het te stinken. Omdat er verder geen organisch materiaal in de kolommen aanwezig is betekent dit dat de bacteriegroei wordt veroorzaakt door afbraak van de inhoud van de opgebrachte stuifmeelkorrels (o.a. eiwitten).

3.4. Visuele inspectie watergangen na maisoogst

3.4.1. Uitvoering

Om te verifiëren of de veronderstelling klopt dat gewasresten van Mais in de Nederlandse situatie de watergangen niet bereiken is vlak na de oogst een visuele inspectie van de watergangen uitgevoerd. De inspectie is op de volgende manier uitgevoerd:

- De watergangen die ook bemonsterd zijn in de veldstudie (negen stuks) zijn, over de lengte van het bemonsterde traject (circa 100-200 meter), geïnspecteerd op de aanwezigheid van visueel herkenbare macroresten van Mais die drijven op het wateroppervlak. Naast deze negen watergangen zijn per zoekgebied aanvullend nog drie watergangen extra geïnspecteerd. In totaal zijn 18 watergangen nagelopen (zes per zoekgebied). De ligging van de geïnspecteerde watergangen is weergegeven in bijlage 1.
- Deze 18 watergangen zijn tevens, om de circa 25 meter, gedregd met een hark om vast te stellen of er macroresten van Mais op de bodem van de watergang aanwezig zijn.
- En ten slotte is gekeken of er gewasresten van Mais (anders dan wortelkluiten) op het perceel (met nadruk op de perceelranden grenzend aan de watergang) zijn achtergebleven.

Indien gewasresten van Mais werden aangetroffen dan zijn deze beschreven en tevens gefotografeerd.

3.4.2. Waarnemingen

Op 13 van de 18 (72%) geïnspecteerde locaties zijn macroresten van Mais in het oppervlaktewater aangetroffen (zie figuur 16 voor een compilatie van aangetroffen resten). Het gaat in alle gevallen om lage aantallen (1-16 stuks) maisresten per geïnspecteerd traject. In bijlage 8 is een beknopt verslag per geïnspecteerde watergang opgenomen.

De aangetroffen gewasresten in het water betreffen hele stengels (inclusief bladeren, kolf en mannelijke bloeiaren), losse kolven en bladeren en duidelijk zichtbaar verhakselde maisresten. Het aantal waargenomen gewasresten kan een onderschatting zijn, omdat een aantal sloten tijdens of vlak na de oogsttijd ook zijn gemaaid/geschoond. Het maaisel wordt, mogelijk inclusief maisresten, boven op het talud neergelegd.

Wanneer de maisplanten dicht naast een watergang staan, is de kans op de aanwezigheid van maisresten in het water en op het talud hoger dan op de percelen waar dit niet het geval is. Tevens blijven dan vaak (van de buitenste rij Mais) halve of hele stengels op het land achter, die nog overeind staan of soms vanaf het talud in het water hangen.

Daarnaast blijven op het talud en langs de akkerrand vaak stengels, kolven en bladeren achter op het land, al dan niet verhakseld tot kleinere stukken. Ook bij de ingang van een perceel blijven vaak stengels liggen. Het verschilt per perceel hoeveel gewasresten van Mais achterblijven.



Maisplant in het water drijvend



Maisplant (stengel met kolf en bladeren) in het water hangend



Maiskolf in het water drijvend



Meerdere Maiskolven drijven in een watergang



Hele stengels en verhakselde resten blijven achter op de akkerrand en het talud.



Langs de watergang blijven frequent gave planten en half afgemaaide stengels overeind staan.

Figuur 16. Voorbeelden van aangetroffen gewasresten van Mais in watergangen

4. DISCUSSIE

4.1 Onderzoeksvragen

Wanneer gg-gewassen worden geteeld, kan transgeen plantenmateriaal in het water terecht komen. Om de mogelijke nadelige effecten van gg-gewassen op aquatische organismen in kaart te brengen zijn in deze studie een literatuur- (hoofdstuk 2) en veldonderzoek (hoofdstuk 3) uitgevoerd. Daarbij is als uitgangspunt genomen dat plantenmateriaal alleen in de vorm van stuifmeel het aquatische milieu bereikt omdat wordt verwacht dat er in Nederland geen plantenmateriaal op het land achterblijft tijdens de oogst. De focus van het onderzoek lag daarom vooral op het verkrijgen van inzicht in de mate van potentiële blootstelling van aquatische organismen aan Bt eiwitten in maispollen en het inschatten van de mogelijke effecten hiervan.

In de oorspronkelijke aanvraag betrof het onderzoek aan vier gewassen: Mais, Koolzaad, Aardappel en Suikerbiet. In overleg met de begeleidingscommissie is besloten het onderzoek te beperken tot Mais, omdat de kans dat van een van deze vier gewassen stuifmeel in het oppervlaktewater terecht komt bij Mais het grootst is (zie ook paragraaf 1.3).

In dit hoofdstuk zijn de uitkomsten van het literatuur- en veldonderzoek gecombineerd om de volgende onderzoeksvragen te beantwoorden:

1. Waar wordt welke Mais geteeld, op welke manier wordt er geoogst en klopt de aanname dat gewasresten van Mais in de Nederlandse situatie de watergangen niet bereikt?
2. Welke factoren hebben invloed op de verspreiding van maispollen en tot op welke afstand kunnen maispollen zich verspreiden?
3. Komt stuifmeel van Mais - en daarmee Bt-eiwitten - in watergangen terecht? Zo ja, in welke mate? en:
 - a) Op welke wijze vindt blootstelling van aquatische organismen aan maispollen plaats?
 - b) Welke groepen van aquatische organismen hebben een grote kans om met maispollen in aanraking te komen?
 - c) Wat zijn de mogelijke effecten op deze aquatische organismen als deze worden blootgesteld aan pollen van Bt-Mais?

4.2. Waar wordt welke Mais geteeld, op welke manier wordt er geoogst en klopt de aanname dat gewasresten van Mais in de Nederlandse situatie de watergangen niet bereiken?

Momenteel wordt in Nederland vooral de zetmeelrijke snijmais geteeld. Met meer dan 200.000 hectare is dit veel meer dan bijvoorbeeld korrelmais of suikermais. De meeste Mais wordt geteeld in Noord-Brabant, Gelderland, Overijssel en Limburg op zand- en dalgronden (70%), klei- (20%) en lössgrond (<5%) (zie Figuur 1, paragraaf 2.2.2). Nederland is rijk aan water. Met name op de overgangen van zand naar veen (polders, beekdalen) is de kans groot dat percelen van Mais grenzen aan sloten en waterschapsleidingen. Bij het selecteren van onderzoek locaties voor het veldonderzoek is hiervan gebruik gemaakt door de "zoekgebieden" in Noord-Brabant, Utrecht en Drenthe op dergelijke overgangen te positioneren. Aan water grenzende maispercelen bleken in deze gebieden voor te komen.

Vrijwel de gehele maisplant wordt met blad, stengel en kolven verhakseld met een maishakselaar en vervolgens ingekuuld. Bij de oogst blijft normaliter, vanwege de grotere hoeveelheid aanklevende grond, een stoppellengete van circa 10-15 cm staan. Aangenomen wordt dat er,

uitgezonderd de achterblijvende stoppel, in principe geen gewasresten op het land achterblijven en dat deze dus niet in het omliggende oppervlaktewater terecht kunnen komen. Om dit te verifiëren zijn in het veldonderzoek 18 locaties (zes per zoekgebied) bezocht na de oogst. Op 13 van de 18 (72%) geïnspecteerde locaties (trajecten van 150-200 meter lang) zijn macroresten van Mais in het oppervlaktewater aangetroffen (zie paragraaf 3.4.2). Het aantal gewasresten per geïnspecteerd traject was telkens gering (1 tot maximaal 16 stuks). Voor een deel betrof het morsingen (gehakselde delen), maar de aanwezigheid van hele kolven in het water kan ook duiden op het verslepen door dieren. De grootste kans op gewasresten in het water betrof percelen waar Mais erg dicht op een watergang staat en waar een deel van de buitenste rij Mais op het land achterblijft. Deze steekproef maakt duidelijk dat gewasresten van Mais ook in Nederlandse situatie in aquatische systemen terecht kunnen komen. Wel is de aangetroffen hoeveelheid gewasresten veel geringer dan in de Amerikaanse situatie waar alleen de kolven worden geoogst en het plantmateriaal op het veld achterblijft, waarna het door windverspreiding in grote hoeveelheden in greppels en waterwegen terecht komt.

4.3. Welke factoren hebben invloed op de verspreiding van maispollen en tot op welke afstand kunnen maispollen zich verspreiden?

Mais is een windbestuiver wat betekent dat de wind een belangrijke factor is voor de verspreiding van de maispollen. Mais produceert, afhankelijk van het ras, tussen de 2 en 25 miljoen pollen per plant. De bloeiperiode is kort, vaak maar 5-8 dagen. De pollen worden al bij een lichte bries of vibratie door de maisplant losgelaten, vooral met droog weer. Maispollen zijn, ten opzichte van andere graspollen, zeer groot en zwaar. Hierdoor komen ze, als er geen wind staat, vooral terecht op de buurplanten. De depositiesnelheid is hoog, circa 20-30 cm per seconde. Deze depositiesnelheid is mede afhankelijk van het vochtgehalte van de pollen. Drogere pollen zijn tot 34% minder zwaar dan verse pollen en zullen dus een lagere valsnelheid hebben. Uitgaande van een gemiddelde gewashoogte van 2,50 meter doet maispollen er 8 tot 12,5 seconden over om vanaf de pluim op de grond te vallen. Als er geen of zeer weinig wind staat zal het gros van de pollen daarom binnen een meter van de plant terecht komen. Bij windsnelheden van 7 à 8 m/s (gemiddelde windsnelheid in Nederland tijdens de zomermanden) kan een deel van de maispollen zich over enkele tientallen meters verspreiden. Grosso modo belandt gemiddeld 95 % van de pollen binnen 10 m van de plant.

Uit de geraadpleegde literatuur komt naar voren dat de horizontale verspreiding van maispollen varieert van enkele meters tot enkele honderden meters. Over het algemeen geldt dat het grootste deel van de pollen op een afstand van ongeveer 0-50 meter van de donorplant terecht komt en dat de hoeveelheid pollen snel afneemt met toenemende afstand tot de donorplant. Dit blijkt ook uit het uitgevoerde veldonderzoek waarin de gemeten pollendepositie afneemt met toenemende afstand tot het maisperceel. Verspreiding van maispollen tot op meerdere honderden meters afstand kan worden verklaard door turbulentie in de lucht. Deze turbulentie wordt door onder andere sterke windstoten en opwaartse wind veroorzaakt als gevolg van opwarming van het aardoppervlak. Door de verticale windsnelheid komen maispollen hoog in de lucht terecht waardoor deze verder verspreid kunnen worden. Verschillende onderzoeken laten zien dat maispollen op hoogtes tot 7 meter voorkomen.

4.4. Komt stuifmeel van Mais - en daarmee Bt-eiwitten - in watergangen terecht ? Zo ja, in welke mate en:

- **Op welke wijze vindt blootstelling van aquatische organismen aan maispollen plaats?**
- **Welke groepen van aquatische organismen hebben een grote kans om met maispollen in aanraking te komen ?**
- **Wat zijn de mogelijke effecten op deze aquatische organismen als deze worden blootgesteld aan pollen van Bt-Mais?**

Uit de voorgaande twee paragrafen kan worden geconcludeerd dat, met name op de overgangen van zand naar veen (polders, beekdalen), percelen van Mais in de Nederlandse situatie kunnen grenzen aan sloten en waterschapsleidingen. Aan water grenzende maispercelen bleken in de "zoekgebieden" van het uitgevoerde veldonderzoek voor te komen. De afstand van de maispercelen tot deze watergangen varieerde van 2 tot 7 meter. Aangezien het grootste deel van de maispollen op korte afstand van de donorplant terecht komt is het aannemelijk om te veronderstellen dat een deel van de maispollen ook daadwerkelijk in het oppervlaktewater terecht komt. In de veldstudie is dit geverifieerd. Uit de resultaten blijkt dat maispollen inderdaad in het oppervlaktewater terecht komen. De vlak boven het wateroppervlak gemeten pollendepositie varieerde van 30.000 tot 4.000.000 pollen per m², en nam af met toenemende afstand tot het maisperceel (Pearson correlatie van 0,74). Dit komt overeen met wat in de literatuur is gevonden (tabel 4). Omdat de gemeten pollendepositie een factor 400 lager ligt dan wat is berekend (realistisch gemiddeld scenario) in de modelberekening (zie tabel 5) zijn van een viertal locaties ook de back-up pollenvallen (dekglasjes met dubbelzijdig tape) geanalyseerd. Deze gaven geen aanleiding om te twifelen aan de resultaten van de Tauber-pollenvallen. Omdat de pollenvallen zijn geplaatst bij aanvang van de bloei is de start van de bloei niet gemist. De totale pollendepositie ligt dus in werkelijkheid wel iets hoger dan wat is gemeten, maar het verklaart niet het verschil met de modelmatig verwachte depositie. Mogelijk is het verschil veroorzaakt door de grotere afstand van de maisvelden tot de watergangen (2 tot 7 m) ten opzichte van de berekening (1 m). Een andere mogelijke oorzaak kan worden gezocht in de overheersende windrichting tijdens de hoofdbloei, waardoor een deel van de pollen niet in de watergang terecht is gekomen.

Uit de kolomproef blijkt dat stuifmeelkorrels van Mais lang blijven drijven. Dit is het gevolg van de oppervlaktewaterspanning en het feit dat stuifmeelkorrels hydrofoob zijn (stoten water af). Door beroering van het wateroppervlak bleek telkens een deel van de opgebrachte pollen te zinken. In de kolomproeven staat het wateroppervlak echter stil. Dit zal in de praktijk niet het geval zijn. Door stroming, regen en de invloed van de wind is het wateroppervlak in beweging en zullen de pollen naar verwachting daarom minder lang blijven drijven dan in de kolomproef. Doordat pollen blijven drijven kunnen ze echter ook met het water worden getransporteerd en zich ophopen tussen de oevervegetatie en bij dammen. Naar dit aspect is in de bemonsteringstudie geen onderzoek gedaan.

In de veldstudie zijn concentraties gemeten van 0 tot 1.770 pollen per liter (gemiddeld 220). Deze gemiddelde aantallen zijn lager dan wat op basis van de gemeten pollendepositie is berekend (gemiddeld 2.000 pollen/l bij homogene verdeling over de waterkolom). Dit is te verklaren doordat de pollen gedurende de bemonsteringsperiode deels in de drijfslag blijven hangen en wegstromen of in de oeverzone terecht komen.

Op welke wijze vindt blootstelling van aquatische organismen aan maispollen plaats?

Blootstelling van aquatische organismen aan maispollen kan plaatsvinden vanaf het moment dat de pollen op het wateroppervlak terechtkomen. Uit de literatuur komt naar voren dat pollen in het sediment kunnen accumuleren. Dit is bevestigd in de veldstudie waarin maispollen zijn

aangetroffen in de waterbodem, variërend van 446 tot 1.924 pollen per ml bemonsterde waterbodem. Omgerekend naar het bemonsterde oppervlak bedraagt het aantal pollen in de bovenste 4 cm van het sediment gemiddeld 35.000.000 pollen/m². Deze accumulatie is, gezien de gemeten pollendepositie (maximaal 4.000.000 pollen/m² wateroppervlak), mogelijk het resultaat van vele jaren maisteelt in de directe omgeving. Preferente ophoping van sediment (en dus ook de pollen) in het diepste deel van de watergang, daar waar ook de sedimentmonsters zijn genomen, speelt daarbij mogelijk ook een rol. De resultaten van de sedimentmonsters kunnen dus niet één op één worden vergeleken met de gemeten pollendepositie. Er kan met de gebruikte analysemethode, waarbij de sedimentmonsters met zuur worden opgekookt en alleen de lege omhulsels van de pollen bewaard blijven, ook geen onderscheid gemaakt worden in recente (levensvatbare) en oudere (lege) pollen.

Er is beperkte informatie aanwezig over de transportroutes van maispollen in de waterkolom. Uit de resultaten van de kolomproef blijkt dat pollen van Mais lang kunnen blijven drijven. Eenmaal in de waterkolom zinken ze echter snel naar de bodem. Turbulentie van het oppervlaktewater zorgt er in de praktijk waarschijnlijk voor dat pollen sneller vanuit de drijfslag in de waterkolom terecht komen, maar ook dat een deel van de pollen blijft zweven in het oppervlaktewater en niet direct bezinkt. De plek waar een pollen het wateroppervlak raakt zou dan niet noodzakelijkerwijs de plek zijn waar aquatische organismen met het Bt-eiwit in de pollen in aanraking komen. Over de relatie tussen de transportroutes en de werkelijke locatie van blootstelling is vrijwel geen informatie gevonden.

Er is eveneens weinig kennis over wat er met Bt-maispollen en Bt-eiwitten in het water gebeurt. Er zijn indicaties dat, eenmaal in het water, de Bt-maispollen lyseren waardoor de Bt-eiwitten vrijkomen. Dit zou ook verklaren waarom het water in kolomproef binnen twee dagen troebel werd en begon te stinken als gevolg van bacteriegroei op de vrijkomende eiwitten. Er zijn indicaties dat vrij opgeloste Bt-eiwitten niet stabiel zijn met halfwaardetijden van 4 dagen. Echter, de hoeveelheid studies naar de hoeveelheid maispollen in het aquatisch milieu, de hoeveelheid opgeloste en geadsorbeerde Bt-maispollen en Bt-eiwitten en de persistentie daarvan zijn schaars.

Er zijn verschillende manieren waarop aquatische organismen blootgesteld kunnen worden aan (Bt)-maispollen. Zo kunnen maispollen (met name de eiwitrijke inhoud na lyseren) afgebroken worden door micro-organismen. Naast afbraak door bacteriën kunnen (Bt)-maispollen ook direct opgegeten worden door vissen en filtervoedende macro-invertebraten en zoöplankton. Daarnaast kunnen (Bt)-maispollen geadsorbeerd zijn aan grond, plantenmateriaal of dood organisch materiaal. Er zijn in verschillende onderzoeken zowel opgeloste als aan gronddeeltjes geadsorbeerde Bt-eiwitten gemeten. Organismen die grazen of organisch materiaal omzetten kunnen via deze weg op een indirecte manier blootgesteld worden aan (Bt)-maispollen. Ook wordt in de literatuur gespeculeerd over de adsorptie van (Bt)-maispollen en/of Bt-eiwitten aan algen. Op deze manier worden algen zelf blootgesteld en ook de organismen die zich met algen voeden.

Welke groepen van aquatische organismen hebben een grote kans om met maispollen in aanraking te komen?

Als de maispollen eenmaal in het water terecht komen kunnen deze in contact komen met aquatische organismen. Daar kunnen ze afgebroken worden door micro-organismen of opgegeten worden door bijvoorbeeld macro-invertebraten zoals filtervoeders, grazers en knippers. Er is echter weinig bekend van de opname- en afbraakmechanismen van maispollen door aquatische organismen. In dit literatuuronderzoek is voornamelijk gefocust op studies welke gericht zijn op de effecten van Bt-eiwitten op aquatische organismen.

Wat zijn de effecten van Bt-eiwitten op aquatische organismen?

Onderzoeken die zich specifiek richten op de effecten van Bt-maispollen op aquatische organismen zijn schaars. De uitkomsten van deze onderzoeken zijn ook niet eenduidig. Toxiciteitsexperimenten laten zien dat Bt-eiwitten geen effect of een negatief effect kunnen hebben op aquatische organismen. Er is bijvoorbeeld aangetoond dat hoge concentraties Bt-maispollen ($2,75 \text{ g/m}^2$) meer mortaliteit (25%) veroorzaken bij de larven van de schietmot *Helicopsyche borealis*. Deze concentratie maispollen is echter niet representatief voor de concentraties die tot dusver in watersystemen zijn gemeten. Onderzoek naar de effecten van Bt-eiwitten ($3,0 \cdot 10^{-2} \text{ mg Bt CryBb1/l}$) op de larven van *Chironomus dilutus* (vedermug) geeft ook geen eenduidig antwoord. Hierbij zijn zowel negatieve als neutrale effecten gevonden op de mortaliteit. Andere onderzoeken wijzen uit dat verschillende Bt-eiwitten geen effect hebben op de geteste aquatische organismen (watervlooien en vissen). Uitgebreidere overzichtsrappporten en artikelen [6, 37] stellen in zijn algemeenheid en via worst-case benaderingen dat het risico van Bt-eiwitten in het aquatisch milieu zeer laag is. Dit is echter gebaseerd op een relatief klein aantal onderzoeken.

Via een eenvoudige modelberekening (zie subparagraaf 2.3.2.) is bepaald wat de verwachte concentratie aan maispollen in Nederlandse waterwegen is en daarmee tevens de verwachte concentratie aan Bt-eiwitten indien deze afkomstig zouden zijn van Bt-Mais. Theoretisch wordt maximaal 857 g/m^2 (of 857 mg/l) aan maispollen verwacht in een sloot van 1 m breed en 1 m diep die gelegen is op 1 meter afstand van het maisperceel. De berekende hoeveelheid Bt-eiwitten bedraagt daarmee maximaal $6,7 \cdot 10^{-5} \text{ mg Cry1Ab/l}$ tot $2,3 \cdot 10^{-2} \text{ mg Cry1F/l}$ (of $6,7 \cdot 10^{-5} \text{ g Cry1Ab/m}^2$ tot $2,3 \cdot 10^{-2} \text{ g Cry1F/m}^2$). Op basis van de concentratie eiwitten welke theoretisch terecht zou kunnen komen in de watergangen, kunnen negatieve effecten op aquatische organismen niet worden uitgesloten.

In het veldonderzoek zijn hoeveelheden van $0,02 - 2,0 \text{ g pollen/m}^2$ aangetroffen. Dit is vergelijkbaar met het literatuuronderzoek maar een factor 400 lager dan theoretisch berekend (worst case situatie). De concentratie Bt-eiwitten bij deze hoeveelheid pollen bedraagt maximaal $2,4 \cdot 10^{-7} \text{ g Cry1Ab /m}^2$ tot $6,6 \cdot 10^{-5} \text{ g Cry 1F/m}^2$. Op basis van de verwachte concentratie Bt-eiwitten in de veldstudie worden geen negatieve effecten op aquatische organismen verwacht.

5. CONCLUSIES & AANBEVELINGEN

5.1. Conclusies

Op basis van het binnen deze studie uitgevoerde literatuur- (hoofdstuk 2) en veldonderzoek (hoofdstuk 3) worden de volgende conclusies getrokken:

- In Nederland kunnen maispercelen grenzen aan oppervlaktewater. De kans hierop is het grootst op de overgangen van zand naar veen en/of klei (polders, beekdalen).
- De aanname dat er in de Nederlandse situatie, vanwege de oogst van de gehele maisplant, geen plantenmateriaal van Mais op het land achterblijft en uiteindelijk in het aquatische milieu terecht komt blijkt onjuist. Afgezien van de bij de oogst achterblijvende stoppels bleken op 13 van de 18 (72%) in deze studie geïnspecteerde locaties macroresten van Mais in het oppervlaktewater aanwezig te zijn. Het aantal gewasresten per geïnspecteerd traject van 150-200 meter was telkens gering (1 tot maximaal 16 stuks). Deze steekproef maakt duidelijk dat gewasresten van Mais ook in Nederland in aquatische systemen terecht komen, maar in geringe mate.
- In het veldonderzoek is vastgesteld dat maispollen in het oppervlaktewater van de aan de maispercelen grenzende watergangen terecht komt. De gemeten pollendepositie varieerde van 40.000 tot 4.000.000 pollen per m² wateroppervlak. De resultaten zijn in overeenstemming met het beeld dat volgt uit de literatuurstudie.
- Uit het veldonderzoek blijkt dat zowel plantenmateriaal als pollen van Mais in het oppervlaktewater terecht kan komen. Verwacht wordt dat dit ook in het geval van de teelt van Bt-Mais het geval zal zijn.
- Uit het veldonderzoek blijkt dat hoe dicht de watergang bij het maisperceel ligt, hoe hoger de pollendepositie, en hoe meer pollen er in het oppervlaktewater terecht komen. Dit is het gevolg van de hoge valsnelheid (circa 20-30 cm per seconde) van de relatief zware maispollen. Uit de literatuur volgt dat gemiddeld 95 % van de pollen binnen 10 m van de plant valt. Verspreiding van maispollen tot op meerdere honderden meters afstand van het maisperceel is in de literatuur beschreven en wordt verklaard door turbulentie, waarbij de maispollen in een hogere luchtlaag (tot 7 meter is aangetoond) terecht komen en zich daardoor verder kunnen verspreiden.
- Er is in de literatuur weinig informatie gevonden over wat er met de pollen gebeurt op het moment dat deze het wateroppervlak raken. Uit de resultaten van de binnen deze studie uitgevoerde kolomproef blijkt dat (een deel van) de maispollen lang (dagen) blijft drijven. Dit is het gevolg van de oppervlaktewaterspanning en het feit dat stuifmeelkorrels waterafstotend zijn. Drijvende pollen kunnen met het water worden getransporteerd en zich ophopen tussen de oevervegetatie en bij dammen. Naar dit aspect is in de bemonsteringstudie geen onderzoek gedaan.
- Ook is er in de literatuur weinig informatie gevonden over wat er met maispollen, en eventuele eiwitten daarin, in de waterkolom gebeurt. Er zijn in de literatuur indicaties dat maispollen lyseren als ze in contact komen met water, waarbij de in de maispollen aanwezige eiwitten vrijkomen. Het feit dat het water in de uitgevoerde kolomproef binnen twee dagen troebel werd en begon te stinken wijst hier ook op. In het geval van Bt-Mais komen bij het lyseren van

de pollen Bt-eiwitten vrij. Er zijn indicaties dat vrij opgeloste Bt-eiwitten niet stabiel zijn met halfwaardetijden van 4 dagen. Het aantal studies waarin gekeken is naar de hoeveelheid maispollen in het aquatisch milieu, de hoeveelheid opgeloste Bt-eiwitten en de persistentie daarvan is echter schaars.

- In het veldonderzoek is vastgesteld dat maispollen accumuleren in de waterbodem. De gemeten aantallen variëren van 446 tot 1.924 pollen per ml bemonsterde waterbodem. Omgerekend naar het bemonsterde oppervlak bedraagt het aantal pollen in de bovenste 4 cm van het sediment gemiddeld 35.000.000 pollen/m². Deze accumulatie kan gezien de gemeten pollendepositie alleen het resultaat zijn van vele tientallen jaren maisteelt in de directe omgeving. Met de gebruikte analysemethode kan geen onderscheid gemaakt worden in recente en oudere pollen. Ook is niet onderzocht of de pollen nog eiwitten bevatten.
- Er zijn in literatuur verschillende routes beschreven waarop aquatische organismen kunnen worden blootgesteld aan Bt-maispollen en/of Bt-eiwitten. Zo kunnen maispollen direct opgegeten worden door vissen, filtervoedende macro-invertebraten en ander zoöplankton. Organismen die grazen of organisch materiaal omzetten kunnen via deze weg op een indirecte manier blootgesteld worden aan Bt-maispollen. Ook wordt in de literatuur gespeculeerd over de adsorptie van Bt-maispollen en/of Bt-eiwitten aan algen. Op deze manier worden algen zelf blootgesteld en ook de organismen die zich met algen voeden. Er is echter weinig bekend van de opname- en afbraakmechanismen van maispollen door aquatische organismen.
- Onderzoeken die zich specifiek richten op de effecten van Bt-maispollen op aquatische organismen zijn schaars en de uitkomsten niet eenduidig. De concentraties waarbij negatieve effecten op aquatische organismen zijn aangetoond, zijn hoger dan en daarmee niet representatief voor de concentraties zoals deze in watersystemen zijn aangetroffen. In tabel 15 is een samenvatting opgenomen van de risico-inschatting voor verschillende Bt-eiwitten voor zowel de theoretisch berekende hoeveelheid pollen als de hoeveelheid pollen zoals deze is gevonden in de veldstudie. Op basis van deze berekende concentraties Bt-eiwitten worden geen negatieve effecten op aquatische organismen verwacht.

Tabel 15. Samenvatting mogelijke negatieve effecten bij blootstelling aquatische organismen aan Bt-eiwitten in pollen van Mais in de Nederlandse teeltsituatie op basis van tabel 5 en 6

	pollen/m ²	Bt-eiwit (mg/l)			Factor t.o.v literatuur
		Cry1Ab	Cry1F	Cry3Bb1	
Literatuur	9.625.000	> 100 > 150	> 100	2,8 * 10 ⁻³ tot 2,0 * 10 ⁻²	-
Worst case scenario	1.226.000.000	6,9 * 10 ⁻⁵	2,3 * 10 ⁻²	1,6 * 10 ⁻²	Gelijk tot 1.000.000 lager
Gemiddeld scenario	336.000.000	1,35 * 10 ⁻⁵	3,7 * 10 ⁻³	3,1 * 10 ⁻³	Gelijk tot 1.000.000 lager
Veldstudie	4.330.000	4,8 * 10 ⁻⁷	1,3*10 ⁻⁴	1,1*10 ⁻⁴	10 tot 100.000.000 lager
n	30.000	3,4*10 ⁻⁹	9,2*10 ⁻⁷	7,9*10 ⁻⁷	10.000 tot 1.000.000.000 lager

NB: De concentratie Cry1Ab is berekend op basis van de detectielimiet voor dit eiwit. In MON810, de event die in Nederland is toegestaan, is de concentratie Bt-eiwit in pollen lager dan de detectielimiet. Dat betekent dat de risico's voor dit eiwit waarschijnlijk overschat worden.

Geconcludeerd kan worden dat:

1. Het in de Nederlandse teeltsituatie aannemelijk is dat aquatische organismen kunnen worden blootgesteld aan plantenmateriaal en pollen van Mais. Dit is met name het geval als de teeltpercelen binnen enkele meters grenzen aan oppervlakteater.
2. In het geval van de teelt van Bt-Mais de risico's van Bt-eiwitten in het aquatische milieu als zeer laag worden ingeschat, uitgaande van de in deze veldstudie gemeten pollendepositie en aantallen maispollen in het oppervlaktewater en in de literatuur beschreven dosis-effect relaties.

Opgemerkt wordt dat deze risico inschatting gebaseerd is op een zeer gering aantal in de literatuur beschreven onderzoeken. Daarnaast wordt opgemerkt dat er te weinig inzicht is in het gedrag van zowel de maispollen als het eiwit in het oppervlaktewater (lysis, halfwaardetijden). En tenslotte dient opgemerkt te worden dat blootstelling aan maispollen waarschijnlijk slechts een paar weken per jaar plaatsvindt.

5.2. Aanbevelingen

Omdat de risico inschatting in dit onderzoek gebaseerd is op een zeer gering aantal in de literatuur beschreven onderzoeken wordt aanbevolen aanvullend onderzoek uit te voeren naar de effecten van Bt-maispollen op aquatische organismen of te zijner tijd, als daartoe op basis van nieuwe literatuurreferenties aanleiding toe is, een nieuwe risico-inschatting uit te voeren.

Tevens is gebleken dat er slechts beperkt informatie voorhanden is betreffende de processen waaraan maispollen worden blootgesteld op het moment dat zij terecht komen in het aquatisch milieu. Met name opheldering van de volgende processen is van belang:

- Mate van consumptie van maispollen in het water door de aanwezige organismen;
- Snelheid waarmee maispollen lyseren in het aquatische milieu;
- Snelheid waarmee Bt-eiwitten worden afgebroken in het aquatisch milieu.

LITERATUUR

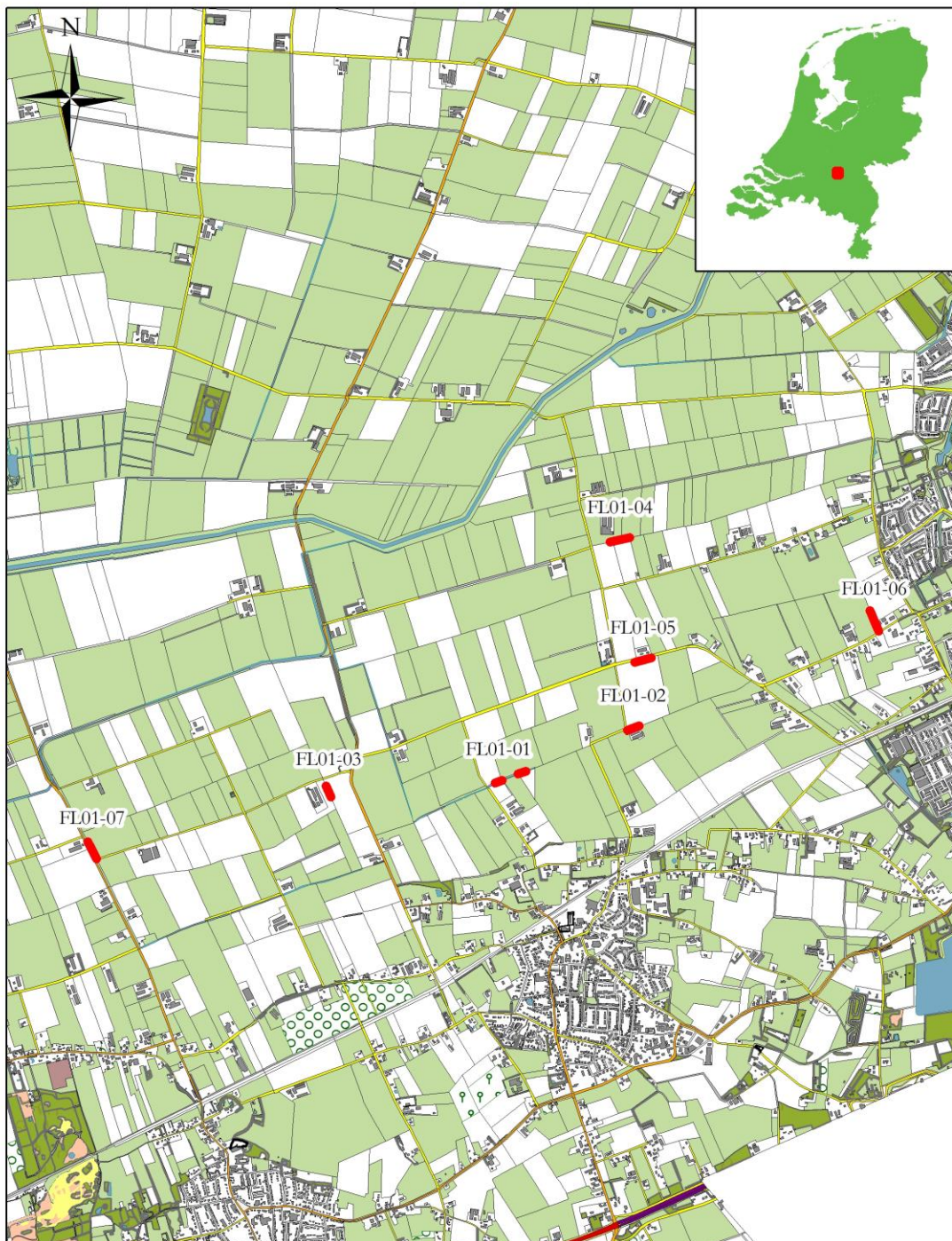
1. EFSA and COGEM, *International scientific Workshop "Non-Target Organisms and Genetically Modified Crops: Assessing the effects of Bt proteins"*, 2012, European Food Safety Authority (EFSA) and the Netherlands Commission on Genetic Modification (COGEM).
2. Kennisakker. www.kennisakker.nl.
3. GMO-compass. www.gmo-compass.org.
4. James, C., *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012*, 2012, International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications.
5. Europa-nu. www.europa-nu.nl.
6. Carstens, K., J. Anderson, P. Bachman, A. Schrijver, G. Dively, B. Federici, M. Hamer, M. Gielkens, P. Jensen, W. Lamp, S. Rauschen, G. Ridley, J. Romeis, and A. Waggoner, *Genetically modified crops and aquatic ecosystems: considerations for environmental risk assessment and non-target organism testing*. Transgenic Research, 2012. **21**(4): p. 813-842.
7. Clark, B.W., T.A. Phillips, and J.R. Coats, *Environmental fate and effects of bacillus thuringiensis (Bt) proteins from transgenic crops: A review*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(12): p. 4643-4653.
8. Van den Brink, L., C.B. Bus, J.A.M. Groten, L.A.P. Lotz, R.D. Timmer, and C. Van de Wiel, *Gewas- en teeltbeschrijving van suikerbiet, Mais en aardappel in relatie tot verspreiding van genetisch materiaal: Mate van verspreiding van genetisch materiaal in de landbouwpraktijk naar andere rassen, verwante soorten of naar het milieu*, 2008, Universiteit Wageningen; Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
9. CBS. www.cbs.nl.
10. Van Schooten, H., B. Philipsen, and J. Groten, *Handboek snijMais2012*, Wageningen: Wageningen UR Livestock Research.
11. Aylor, D.E., N.P. Schultes, and E.J. Shields, *An aerobiological framework for assessing cross-pollination in maize*. Agricultural and Forest Meteorology, 2003. **119**(3-4): p. 111-129.
12. Marceau, A., S. Saint-Jean, B. Loubet, X. Foueillassar, and L. Huber, *Biophysical characteristics of maize pollen: Variability during emission and consequences on cross-pollination risks*. Field Crops Research, 2012. **127**: p. 51-63.
13. VCBIO. www.vcbio.science.ru.nl.
14. Pollennieuws. www.pollennieuws.nl.
15. Bannert, M. and P. Stamp, *Cross-pollination of maize at long distance*. European Journal of Agronomy, 2007. **27**(1): p. 44-51.
16. Jemison, J.M. and M.E. Vayda, *Cross Pollination From Genetically Engineered Corn*. The journal of agrobiotechnology management and economics, 2001. **4**(2): p. 87-92.
17. Burkness, E.C. and W.D. Hutchison, *Bt pollen dispersal and Bt kernel mosaics: Integrity of non-Bt refugia for lepidopteran resistance management in Maize*. Journal of Economic Entomology, 2012. **105**(5): p. 1773-1780.
18. CIL. www.cellimagelibrary.org.
19. IPM. www.ipm.missouri.edu.
20. Luna V, S., J. Figueroa M, B. Baltazar M, R. Gomez L, R. Townsend, and J.B. Schoper, *Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control*. Crop Science, 2001. **41**(5): p. 1551-1557.
21. Raynor, G.S., E.C. Ogden, and J.V. Hayes, *Dispersion and Deposition of Corn Pollen from Experimental Sources1*. Agron. J., 1972. **64**(4): p. 420-427.
22. Van De Wiel, C.C.M., R.M.W. Groeneveld, O. Dolstra, E.J. Kok, I.M.J. Scholtens, J.T.N.M. Thissen, M.J.M. Smulders, and L.A.P. Lotz, *Pollen-mediated gene flow in maize tested for coexistence of GM and non-GM crops in the Netherlands: Effect of isolation distances between fields*. NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences, 2009. **56**(4): p. 405-423.
23. Jarosz, N., B. Loubet, B. Durand, A. McCartney, X. Foueillassar, and L. Huber, *Field measurements of airborne concentration and deposition rate of maize pollen*. Agricultural and Forest Meteorology, 2003. **119**(1-2): p. 37-51.
24. Jarosz, N., B. Loubet, B. Durand, X. Foueillassar, and L. Huber, *Variations in Maize Pollen Emission and Deposition in Relation to Microclimate*. Environmental Science & Technology, 2005. **39**(12): p. 4377-4384.

25. Chamecki, M., R. Hout, C. Meneveau, and M.B. Parlange, *Concentration profiles of particles settling in the neutral and stratified atmospheric boundary layer*. *Boundary-Layer Meteorology*, 2007. **125**(1): p. 25-38.
26. Windfinder. www.windfinder.com.
27. CvdL. www.compendiumvoordeleefomgeving.nl.
28. van Puijenbroek, P.J.T.M. and J. Clement, *Basiskaart Aquatisch: de Watertypenkaart. Het oppervlaktewater in de TOP10NL geclassificeerd naar watertype*, 2012, Planbureau voor de leefomgeving.
29. Rosi-Marshall, E.J., J.L. Tank, T.V. Royer, M.R. Whiles, M. Evans-White, C. Chambers, N.A. Griffiths, J. Pokelsek, and M.L. Stephen, *Toxins in transgenic crop byproducts may affect headwater stream ecosystems*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007. **104**(41): p. 16204-16208.
30. Zhu, Y., F.H. Chen, B. Cheng, J.W. Zhang, and D.B. Madsen, *Pollen assemblage features of modern water samples from the Shiyang River drainage, arid region of China*. *Acta Botanica Sinica*, 2002. **44**(3): p. 367-372.
31. Davis, M.B., *Pollen grains in lake sediments: Redeposition caused by seasonal water circulation*. *Science*, 1968. **162**(3855): p. 796-799.
32. Prihoda, K.R. and J.R. Coats, *Aquatic fate and effects of Bacillus thuringiensis CRY3BB1 protein: Toward risk assessment*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008. **27**(4): p. 793-798.
33. Li, Y., K. Wu, Y. Zhang, and G. Yuan, *Degradation of Cry1Ac protein within transgenic Bacillus thuringiensis rice tissues under field and laboratory conditions*. *Environmental Entomology*, 2007. **36**(5): p. 1275-1282.
34. Tank, J.L., E.J. Rosi-Marshall, T.V. Royer, M.R. Whiles, N.A. Griffiths, T.C. Frauendorf, and D.J. Treering, *Occurrence of maize detritus and a transgenic insecticidal protein (Cry1Ab) within the stream network of an agricultural landscape*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010. **107**(41): p. 17645-17650.
35. Douville, M., F. Gagné, L. Masson, J. McKay, and C. Blaise, *Tracking the source of Bacillus thuringiensis Cry1Ab endotoxin in the environment*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2005. **33**(3): p. 219-232.
36. Chambers, C.P., M.R. Whiles, E.J. Rosi-Marshall, J.L. Tank, T.V. Royer, N.A. Griffiths, M.A. Evans-White, and A.R. Stojak, *Responses of stream macroinvertebrates to Bt maize leaf detritus*. *Ecological Applications*, 2010. **20**(7): p. 1949-1960.
37. EPA, *Bt Cry3Bb1 Corn Biopesticide Registration Action Document*, 2007, United States Environmental Protection Agency.
38. Mendelsohn, M., J. Kough, Z. Vaituzis, and K. Matthews, *Are Bt crops safe?* *Nature Biotechnology*, 2003. **21**(9): p. 1003-1009.
39. Bøhn, T., R. Primicerio, D.O. Hessen, and T. Traavik, *Reduced fitness of Daphnia magna fed a Bt-transgenic maize variety*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2008. **55**(4): p. 584-592.
40. Bøhn, T., T. Traavik, and R. Primicerio, *Demographic responses of Daphnia magna fed transgenic Bt-maize*. *Ecotoxicology*, 2010. **19**(2): p. 419-430.
41. Axelsson, E.P., J. Hjältén, C.J. Leroy, T.G. Whitham, R. Julkunen-Tiitto, and A. Wennström, *Leaf litter from insect-resistant transgenic trees causes changes in aquatic insect community composition*. *Journal of Applied Ecology*, 2011. **48**(6): p. 1472-1479.
42. Equipment, B.S. www.burkard.co.uk.
43. Pardoe, H.S., T. Giesecke, W.O. van der Knaap, H. Svitavská-Svobodová, E.V. Kvavadze, S. Panajiotidis, A. Gerasimidis, I.A. Pidek, M. Zimny, J. Świeta-Musznicka, M. Latalowa, A.M. Noryśkiewicz, E. Bozilova, S. Tonkov, M.V. Filipova-Marinova, J.F.N. van Leeuwen, and L. Kalniņa, *Comparing pollen spectra from modified Tauber traps and moss samples: Examples from a selection of woodlands across Europe*. *Vegetation History and Archaeobotany*, 2010. **19**(4): p. 271-283.
44. Giesecke, T., S.L. Fontana, W.O. van der Knaap, H.S. Pardoe, and I.A. Pidek, *From early pollen trapping experiments to the Pollen Monitoring Programme*. *Vegetation History and Archaeobotany*, 2010. **19**(4): p. 247-258.
45. Dijkhuis, E., I. Dinkla, W. de Kogel, T. de Jong, S. Declerck, B. Glandorf, B. Erkamp, and M. Vrolijk, *1ste bijeenkomst begeleidingscommissie Blootstelling aquatische organismen aan plantenmateriaal van gg-gewassen*, 2013.

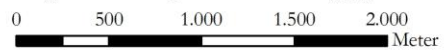
46. Levetin, E., C.A. Rogers & S.A. Hall, *Comparison of pollen sampling with a Burkard Spore Trap and an Tauber Trap in a warm temperate climate*. Grana, 2000. **39**: p. 294-302.
47. Latorre, F., E.J. Romero and Y.V. Mancini, *Comparative study of different methods for capturing airborne pollen, and effects of vegetation and meteorological variables*. Aerobiologica, 2008. **24**: p. 107-120.
48. O'Rourke, M.K., *The implications of atmospheric pollen rain for fossil pollen profiles in the arid southwest*. Dissertation University of Arizona, 1986.
49. Giesecke, T., S.L. Fontana, W.O. Van der Knaap, H.S. Pardoe and I.A. Pidek, *From early pollen trapping experiments to the Pollen Monitoring Programme*. Veget Hist Archaeobot, 2010. **19**: p. 247-258.
50. Sears M.K., D. Stanley-Horn, Impact of Bt Corn pollen on monarch butterfly populations. In Fairbairn C., G. Scoles, A. McHughen (Eds) Proceedings of the 6th International Symposium on Biosafety of Genetically modified Organisms. University Extension Press, Canada, 2000.

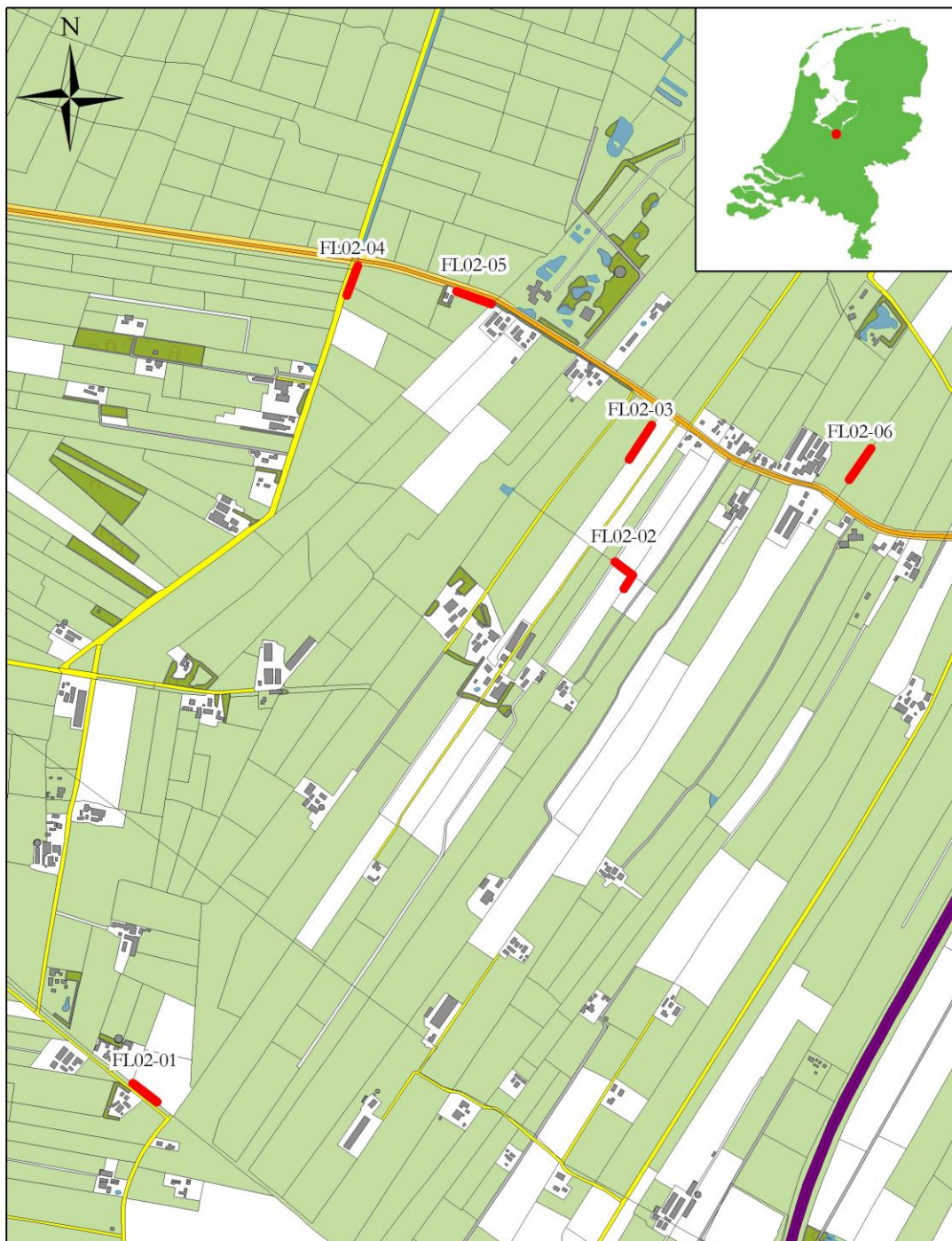
BIJLAGEN

Bijlage 1 –ligging deellocaties bemonsteringstudie per zoekgebied

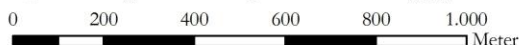


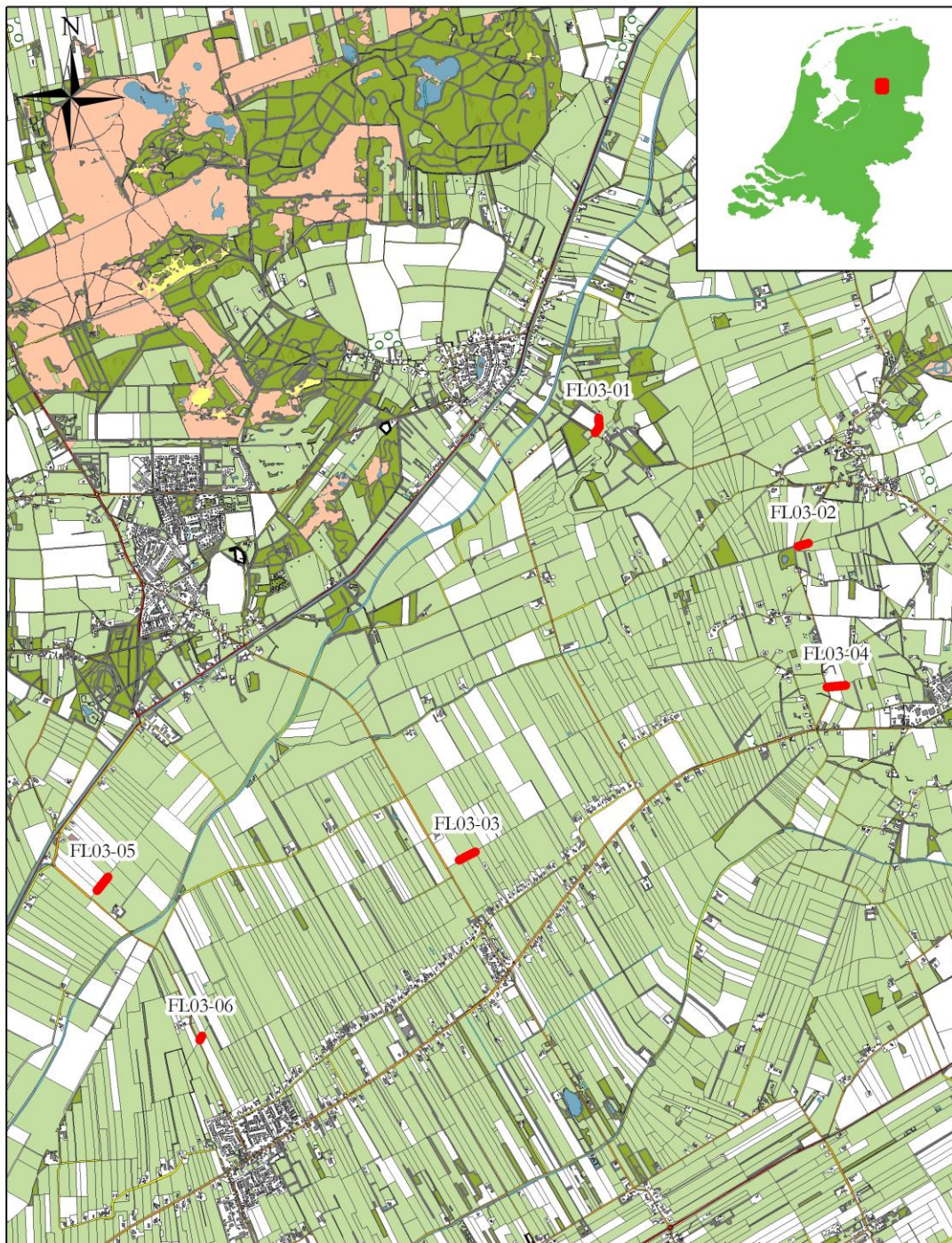
Bijlage: 1a, ligging deellocaties bemonsteringsstudie Noord-Brabant
Projecttitel: Blootstelling van aquatische organismen aan plantmateriaal van gg-gewassen
Projectcode: FL2013.022
Datum: 22 oktober 2014





Bijlage: 1b, ligging deellocaties bemonsteringsstudie Utrecht
Projecttitel: Blootstelling van aquatische organismen aan plantmateriaal van gg-gewassen
Projectcode: FL2013.022
Datum: 2 oktober 2014





Bijlage: 1c, ligging deellocaties bemonsteringsstudie Drenthe
Projecttitel: Blootstelling van aquatische organismen aan plantmateriaal van gg-gewassen
Projectcode: FL2013.022
Datum: 22 oktober 2014



Bijlage 2. Locatie foto's



Deellocatie 1: Geffen - Rietkampsestraat 4



Deellocatie 2: Geffen – De Gement 5



Deellocatie 3: Nuland – Polderweg 6



Deellocatie 4: Hoogland – Hogesteeg 13A



Deellocatie 5: Nijkerk - De Veenhuis 1



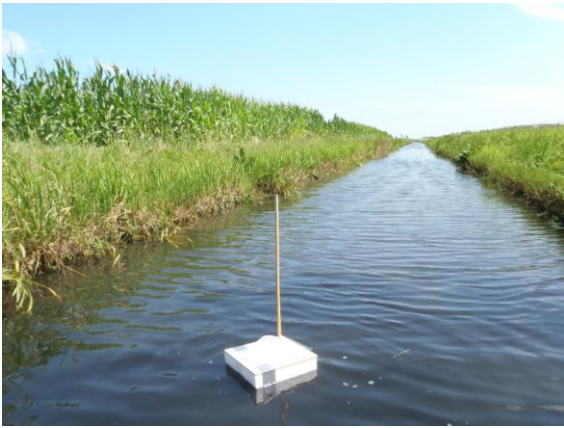
Deellocatie 6: Nijkerk - De Veenhuis 3



Deellocatie 7: Uffelte – Anserweg 8



Deellocatie 8: Ansen – Ruinerdijk 20



Deellocatie 9: Ruinervold - Hesselterweg

Bijlage 3. Aanvullende informatie deellocaties

BRABANT		Startdatum	21-7-2014						
		Einddatum	4-8-2014						
Deellocatie	Monsterpunt	Coördinaten		Breedte watergang	Diepte watergang	Afstand tot maisakker	Afstand tot 2e maisakker	Orientatie t.o.v. maisakker	
		x	y	m	m	m	m		
FL01-01	1	159832	418055	6,6	0,5	4,6		NNW	
FL01-01	2	159867	418072	6,6	0,4	4,5		NNW	
FL01-01	3	160061	418144	7,0	0,5	4,3		ZZW	
FL01-02	1	160592	418356	5,6	0,4	7,5		ZZW	
FL01-02	2	160634	418371	5,7	0,4	6,3		ZZW	
FL01-02	3	160680	418390	5,4	0,4	6,3		ZZW	
FL01-03	1	158765	417911	5,5	0,5	4,3	6,6	O en W	
FL01-03	2	158747	417957	6,0	0,5	4,7	6,6	O en W	
FL01-03	3	158729	417999	5,9	0,5	4,5	7,4	O en W	

UTRECHT		startdatum	23-7-2014						
		einddatum	4-8-2014						
Deellocatie	Monsterpunt	Coördinaten		Breedte watergang	Diepte watergang	Afstand tot maisakker	Afstand tot 2e maisakker	Orientatie t.o.v. maisakker	
		x	y	m	m	m	m		
FL02-01	1	157057	468933	3,6	0,5	7,9	-	ZW	
FL02-01	2	157023	468962	4,0	0,5	7,5	-	ZW	
FL02-01	3	156988	468988	3,6	0,6	8,4	-	ZW	
FL02-02	1	158191	470272	1,6	0,2	2,0	2,0	ZW en NO	
FL02-02	2	158205	470240	1,5	0,2	2,2	-	ZO	
FL02-02	3	158176	470197	1,6	0,2	2,2	-	ZO	
FL02-03	1	158267	470626	4,1	0,6	9,4	3,4	ZO en NW	
FL02-03	2	158241	470589	3,9	0,7	9,6	4,9	ZO en NW	
FL02-03	3	158216	470556	3,6	0,7	9,5	3,1	ZO en NW	

DRENTHE		Startdatum	24-7-2014						
		Einddatum	4-8-2014						
Deellocatie	Monsterpunt	Coördinaten		Breedte watergang	Diepte watergang	Afstand tot maisakker	Afstand tot 2e maisakker	Orientatie t.o.v. maisakker	
		x	y	m	m	m	m		
FL03-01	1	215965	533339	3,9	0,61	6,15	-	ZO	
FL03-01	2	215951	533380	3,75	0,6	5,8	-	ZO	
FL03-01	3	215937	533425	3,8	0,6	5,5	-	ZO	
FL03-02	1	218404	532300	3,1	0,52	6,3	-	ZZO	
FL03-02	2	218444	532310	3	0,5	5,3	-	ZZO	
FL03-02	3	218487	532323	2,8	0,46	6,1	-	ZZO	
FL03-03	1	215116	529279	4	0,65	4,95	-	ZO	
FL03-03	2	215157	529303	4,1	0,61	5,35	-	ZO	
FL03-03	3	215198	529328	4,9	0,3	5,9	5,4	ZO en NW	

Bijlage 4. Analysemethode pollen

Bijlage bij offerte analyse recente pollenmonsters

Introductie specialisten

Arnoud Maurer MA is opgeleid aan het laboratorium voor palynologie en paleobotanie van het Groninger Instituut voor Archeologie (GIA) aan de Rijksuniversiteit Groningen. Sinds november 2011 is hij werkzaam bij EARTH Integrated Archaeology B.V. als paleo-ecoloog. Zijn collega, Robine Houchin MSc, is in april 2011 bij EARTH begonnen en is senior paleo-ecoloog. Zij heeft haar doctoraal studie Biologie in 2007 afgerond aan de Universiteit van Leiden. Beide hebben veel (diverse) ervaring met palynologisch onderzoek aan recente, geologische en archeologische contexten in binnen- en buitenland. Zij staan onder leiding van de zeer ervaren palynoloog dr. S. Bohncke (VU, wetenschappelijke back-up).

Analysemethode bodem- en watermonsters

Bodemmonsters

Het sediment wordt eerst vijf minuten gekookt met 10% Kalium hydroxide (KOH) en vervolgens nog vijf minuten met 1% Sodium pyrofosfaat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$). Dan worden 2 tabletten met exotische sporen van *Lycopodium* sp. toegevoegd (waarbij $\bar{X}=18583$, $s=\pm 3820$ en $v=\pm 4,1\%$). Daarna wordt een druppel van 10% zoutzuur (HCl) toegevoegd voor het oplossen van de tabletten en eventueel kalk in het monster. Dit residu wordt gezeefd over een zeef met maaswijdten van 6-8 μm en daarna over een zeef met maaswijdten van 200 μm . Dan volgt de acetolyse om het overblijvende organische materiaal, met uitzondering van de pollen, op te lossen. Hierbij wordt het monster opgewarmd in een mengsel van één volume zwavelzuur (H_2SO_4) en negen volumes azijnzuuranhydride ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$) in een waterbad bij een temperatuur tot 100°C gedurende circa tien minuten. Vervolgens worden de pollen in het residu gescheiden van de zwaardere fractie met behulp van Sodium polytungstate met een soortelijk gewicht van 2.0. Tenslotte wordt van het pollenresidu een preparaat gemaakt door middel van fixatie met glycerol.

Benodigde omvang per analyse: 10 milliliter sediment per monster

Watermonsters

Bij het watermonster van 2.5 liter worden 2 tabletten met exotische sporen van *Lycopodium* sp. toegevoegd (waarbij $\bar{X}=18583$, $s=\pm 3820$ en $v=\pm 4,1\%$). Vervolgens wordt het monster gezeefd over een zeef met maaswijdten van 6 μm en voorbehandeld met waterstoffluoride (HF) en acetolyse. Tenslotte wordt van het pollenresidu een preparaat gemaakt door middel van fixatie met glycerol.

Daarna worden de preparaten met behulp van een doorvallend-lichtmicroscop met een vergroting tot 1000 maal geïnspecteerd op de aanwezigheid van pollenkorrels van maïs, koolzaad, aardappel en suikerbiet.

Benodigde omvang per analyse: 2.5-5 liter water per monster uit sloot of kanaal

Mogelijke problemen en oplossingen

Van de vier te onderzoeken gewassen (maïs, aardappel, koolzaad en suikerbiet) is alleen het stuifmeel van maïs met zekerheid, door middel van grootte, tot op soortniveau te determineren.

Aardappel is grotendeels (80-100%) zelfbestuivend waardoor de verspreiding van het stuifmeel beperkt is. Stuifmeelkorrels van aardappel vertonen in grote lijnen overeenkomsten met pollen van Zwarte Nachtschade en echte Lampionplant. Deze zijn van dezelfde grootte en hebben drie gaten (poren) en groeven (colpen) in de pollenwand (tricolporaat). Er bestaan echter cultivars van aardappel die meer dan drie van deze groeven en poren hebben (stephano- danwel pericolporaat danwel syncolpaaat) en op basis daarvan te onderscheiden zijn van Zwarte Nachtschade en echte Lampionplant. Stuifmeelkorrels van aardappel kunnen worden onderscheiden wanneer voor het onderhavige onderzoek een veld wordt geselecteerd met daarop een aardappelcultivar met stuifmeelkorrels die niet van het tricolporate type zijn.

De stuifmeelkorrels van koolzaad zijn niet tot op soort te determineren, maar blijven steken op familieniveau: *Brassicaceae*.

Ditzelfde probleem geldt voor het determineren van stuifmeel van suikerbiet. Stuifmeelkorrels van suikerbiet zijn moeilijk te onderscheiden van stuifmeelkorrels van melde- en ganzevoetsoorten.

Suikerbiet, een tweejarig cultuurgewas, wordt overigens meestal vóór de bloei geoogst. Een enkele maal bloeit suikerbiet voortijdig (zgn. schieters). Deze schieters worden over het algemeen voor de bloei

door de boer verwijderd. Om een zo goed mogelijk beeld van het uitgangsmateriaal van maïs, aardappel, koolzaad en suikerbiet te krijgen, wordt daarom één referentiepreparaat gemaakt van alle vier gewassen gezamenlijk.

Bijlage 5. Analysecertificaat

Onderzoek naar het voorkomen van stuifmeelkorrels van **Mais** in watergangen

A. Maurer

Rapport EARTH 2014-31

Opdrachtgever Stichting RAVON (team FLORON), FL2013.022

© 2014 www.earth-arch.eu

Materiaal

Ten behoeve van onderzoek naar de aanwezigheid van stuifmeelkorrels van Mais (*Zea mays*) in watergangen rondom maisakkers zijn in totaal 35 palynologische monsters onderzocht. Deze monsters zijn afkomstig van 3 locaties. Op elke locatie zijn op drie plekken vier monsters genomen:

- één monster afkomstig uit de bodem van de waterloop (10 ml sediment);
- één monster uit een pollentrap welke vlak boven het oppervlak van de waterloop was gesitueerd (500 ml water);
- één monster uit de waterloop tijdens het begin van de bloeiperiode van mais (3000 ml water);
- één monster aan het einde van de bloeiperiode van mais (3000 ml water).

Methode

Van de waterbodemmonsters is 10 ml sediment geprepareerd volgens de standaard absolute pollenbereidingsmethode van Erdtman¹, aan het Laboratorium Sedimentanalyse van de VU Amsterdam. De monsters uit de pollentrap en het water zijn eerst gefiltreerd over een zeef met een maaswijdte van 7 µm waarna ze ook volgens de methode Erdtman zijn bereid.

Na het bereiden van de palynologische monsters is het pollenmateriaal op een prepareerglasje gefixeerd met glycerine-gel. Ten behoeve van de analyse op palynologische resten is het soortenspectrum bepaald. Hiertoe zijn de palynologische resten op naam gebracht en geteld. Bij de determinatie en interpretatie is gebruik gemaakt van standaardliteratuur², met naamgeving volgens de drieëntwintigste druk van Heukels' flora van Nederland³.

Na het tellen van de monsters zijn, met behulp van de toegevoegde lycopodiumsporen, pollenconcentraties per ml bepaald.

De formule voor het berekenen van pollenconcentraties (aantal pollen per ml) is:

Pollenconcentratie (per ml) = 37166 (toegevoegd lycopodium sporen) x geteld aantal recente stuifmeelkorrels / getelde lycopodiumsporen / aantal ml van het uitgangsvolume.

¹ Met toevoeging van exotische sporen van *Lycopodium* sp., waarbij $\bar{X} = 18583$ (Lycopodia), $s = \pm 3820$ en $v = \pm 4,1\%$. Deze toevoeging is gedaan om concentraties te kunnen berekenen. Erdtman 1960.

² Beug 2004.

³ Van der Meijden 2005.

Hieronder volgt een overzicht van de monsters met de concentratie stuifmeelkorrels van Mais per milliliter.

Naam monster	Zea mays
FL01-01 waterbodem	1922
FL01-01 water start	0,04
FL01-01 water eind	0,05
FL01-01 pollentrap	6,93
FL01-02 waterbodem	446
FL01-02 water start	0,3
FL01-02 water eind	0,05
FL01-02 pollentrap	12,6
FL01-03 waterbodem	0
FL01-03 water start	0
FL01-03 water eind	0,02
FL01-03 pollentrap	15,77
FL02-01 waterbodem	591
FL02-01 water start	0,07
FL02-01 water eind	0
FL02-02 waterbodem	951
FL02-02 water start	1,77
FL02-02 water eind	0,1
FL02-02 pollentrap	60
FL02-03 waterbodem	632
FL02-03 water start	0,1
FL02-03 water eind	0
FL02-03 pollentrap	50,32
FL03-01 waterbodem	676
FL03-01 water start	0
FL03-01 water eind	0
FL03-01 pollentrap	1,55
FL03-02 waterbodem	1416
FL03-02 water start	0
FL03-02 water eind	0,15
FL03-02 pollentrap	6,8
FL03-03 waterbodem	496
FL03-03 water start	0,12
FL03-03 water eind	1,18
FL03-03 pollentrap	2,31

Tabel I: Aantal stuifmeelkorrels van mais per bemonsterde milliliter

Tevens een overzicht van de kolommonsters met de concentratie stuifmeelkorrels van Mais per milliliter.

Naam monster	Zea mays
KL01-01	72,1
KL01-04	18,6
KL01-06	9,9
KL02-01	8,6
KL02-04	9,8
KL02-06	57,6

Tabel 2: Aantal stuifmeelkorrels van mais per bemonsterde milliliter

Literatuur

- Beug, H.,-J., 2004. *Leitfaden der Pollenbestimmung für Mitteleuropa und angrenzende Gebiete*. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München.
- Erdtman, G., 1960. The acetolysis method. - *Svensk Botanisk Tidskrift*, 54, pp. 561 - 564

Bijlage 6. Resultaat berekeningen

Pollenvallen											
Monstercode	Inzetten		Ophalen		Bemonsteringstijd dagen	Gewicht leeg gram	Gewicht totaal gram	Monstervolume ml	Oppervlak ¹⁾ cm ²	Maispollen aantal/l	Depositie aantal maispollen/cm ²
	Datum	Tijd	Datum	Tijd							
FL01-01 ²⁾	21-7-2014	9:30	4-8-2014	9:00	14	67	207	139	46	6.925	21
FL01-02	21-7-2014	10:30	4-8-2014	10:00	14	67	382	315	69	12.599	58
FL01-03	21-7-2014	12:00	4-8-2014	11:00	14	67	251	183	69	15.767	42
FL02-01	23-7-2014	12:00	4-8-2014	14:00	12,1	vervallen					
FL02-02	23-7-2014	9:00	4-8-2014	12:30	12,1	67	563	496	69	60.003	433
FL02-03	23-7-2014	10:00	4-8-2014	13:30	12,1	67	379	312	69	50.317	228
FL03-01	24-7-2014	9:00	4-8-2014	16:00	11,3	67	216	148	69	1.549	3
FL03-02	24-7-2014	10:30	4-8-2014	16:50	11,3	67	222	155	69	6.803	15
FL03-03	24-7-2014	12:30	4-8-2014	17:45	11,3	67	190	123	69	2.313	4
Gemiddeld										19.534	101
1) Som oppervlak opening van 3 pollenvallen (doorsnede opening bedraagt 5,4 cm)											
2) Som van 2 in plaats van 3 pollenvallen											

Back-up pollenvallen								
Monstercode	Inzetten		Ophalen		Bemonsterstijd dagen	Oppervlak tape cm ²	Maispollen totaal	Maispollen aantal/cm ²
	Datum	Tijd	Datum	Tijd				
FL01-01	21-7-2014	09:30	4-8-2014	09:00	14	13,5	22	2
FL01-01	21-7-2014	09:30	4-8-2014	09:00	14	13,5	164	12
FL01-01	21-7-2014	09:30	4-8-2014	09:00	14	13,5	46	3
							<i>gemiddeld</i>	6
FL01-02	21-7-2014	10:30	4-8-2014	10:00	14	13,5	24	2
FL01-02	21-7-2014	10:30	4-8-2014	10:00	14	13,5	57	4
FL01-02	21-7-2014	10:30	4-8-2014	10:00	14	13,5	13	1
							<i>gemiddeld</i>	2
FL03-01	24-7-2014	09:00	4-8-2014	16:00	11,3	13,5	116	9
FL03-01	24-7-2014	09:00	4-8-2014	16:00	11,3	13,5	166	12
FL03-01	24-7-2014	09:00	4-8-2014	16:00	11,3	13,5	93	7
							<i>gemiddeld</i>	9
FL03-02	24-7-2014	10:30	4-8-2014	16:50	11,3	13,5	431	32
FL03-02	24-7-2014	10:30	4-8-2014	16:50	11,3	13,5	395	29
FL03-02	24-7-2014	10:30	4-8-2014	16:50	11,3	13,5	437	32
							<i>gemiddeld</i>	31

Waterbodem												
Monstercode	Monstername Datum	Gewicht leeg gram	Gewicht totaal gram	Monster gram	Oppervlak bemonsterde laag ¹⁾ cm ²	Dikte bemonsterde laag (cm)			Monstervolume ml	Maispollen		Accumulatie aantal maispollen/cm ²
						1	2	3		aantal/ml waterbodem	aantal maispollen/cm ²	
FL01-01	4-aug	67	340	273	12,6	6,2	4,0	7,0	216	1.922		11.022
FL01-02	4-aug	67	343	276	12,6	4,0	2,0	5,0	138	446		1.635
FL01-03	4-aug	67	412	344	12,6	4,0	5,0	3,0	151	0		0
FL02-01	4-aug	67	298	231	12,6	3,0	5,0	4,0	151	591		2.365
FL02-02	4-aug	67	359	291	12,6	4,0	4,0	5,0	163	951		4.120
FL02-03	4-aug	67	365	297	12,6	3,0	4,0	4,0	138	632		2.317
FL03-01	4-aug	67	334	266	12,6	4,0	4,0	5,0	163	676		2.928
FL03-02	4-aug	67	300	232	12,6	4,0	4,0	3,0	138	1.416		5.191
FL03-03	4-aug	67	267	199	12,6	3,0	2,0	4,0	113	496		1.487
Gemiddeld						3,9	3,8	4,4		792		3.452
1) Totaal bemonsterd oppervlak waterbodem (inwendige diameter multisampler is 4 cm)												

Water bij aanvang (bemonsterd op 25 cm-oppervlak)			
Monstercode	Monstername Datum	Monster ml	Maispollen aantal/l
FL01-01	21-7-2014	3000	37
FL01-02	21-7-2014	3000	305
FL01-03	21-7-2014	3000	0
FL02-01	23-7-2014	3000	65
FL02-02	23-7-2014	3000	1.770
FL02-03	23-7-2014	3000	99
FL03-01	24-7-2014	3000	0
FL03-02	24-7-2014	3000	0
FL03-03	24-7-2014	3000	124
<i>Gemiddeld</i>			267
Water bij eind (bemonsterd op 25 cm-oppervlak)			
Monstercode	Monstername Datum	Monster ml	Maispollen aantal/l
FL01-01	4-8-2014	3000	50
FL01-02	4-8-2014	3000	54
FL01-03	4-8-2014	3000	25
FL02-01	4-8-2014	3000	0
FL02-02	4-8-2014	3000	98
FL02-03	4-8-2014	3000	0
FL03-01	4-8-2014	3000	0
FL03-02	4-8-2014	3000	147
FL03-03	4-8-2014	3000	1.180
<i>Gemiddeld</i>			173

Bijlage 7. Berekening theoretische hoeveelheid pollen en Bt-eiwitten in oppervlaktewater

Parameter	Aanname		
Verspreidingsafstand	95 % 0-10 m 5 % 10-100 m		
Aantal pollen per plant	2-25 miljoen Gemiddeld 13,5 miljoen		
Gewicht pollen	0,2 – 0,7 µg per stuk Gemiddeld 0,5 µg per stuk		
Concentratie Bt-eiwitten	0,08 – 21,9 µg/g (max 27,4) pollen	CryBb1	18,8 µg/g pollen
Plantafstand	15 cm		
Afstand tot sloot	1 m		
Lengte maisveld	100 m		
Slootdimensies	1 m breed 1 m diep		

Worst case scenario: de hele wereld bestaat uit mais. Alles wat op 1 m² wordt geproduceerd, komt ook op 1m² neer.

Gewicht pollen per plant =	aantal pollen * gewicht per pollen			
		17500000 µg		
		17,5 g		
planten staan 15 cm uit elkaar				
aantal planten op 1 m ²		49 planten		
Pollen per m ²		857,5 g pollen		
Hoeveelheid Bt eiwitten /m ²		68,6 µg/m ²	Cry1Ab MON810	6,86E-05 g/m ²
		23495,5 µg/m ²	Cry1F TC1507	2,35E-02 g/m ²
		16121 µg/m ²	CryBb1	1,61E-02 g/m ²
Evenredige verdeling in het water				
slootdimensies 1*1*1 m	1000 l			
concentratie pollen		0,8575 g/l	857,5	
concentratie Bt-eiwitten		0,069 µg/l	Cry1Ab MON810	6,86E-05 mg/l
		23,496 µg/l	Cry1F TC1507	2,35E-02 mg/l
		16,121 µg/l	CryBb1	1,61E-02 mg/l

Realistisch worst case scenario: Maximaal aantal pollen, maximaal gewicht pollen, maximale concentratie eiwitten
 Gewicht pollen per plant = aantal pollen * gewicht per pollen

17500000 µg
 17,5 g

planten staan 15 cm uit elkaar

aantal planten op 1 m²

49 planten

Pollen per m²

857,5 g pollen

Focus is voornamelijk op de bulk van de pollen (95%)

verspreidingsafstand is 10 m. Vanwege afstand tot sloot, effectief 9 m maisveld

Uitgaande van pollenverdeling [50]

afstand (m)	0	1	5	10	25	50	100
Pollendepositie (%)	43	31	15	6	3	1	1
Gewicht pollen	368,725	265,825	128,625	51,45			

rij 1 levert	265,825
rij 2 levert	32,15625
rij 3 levert	32,15625
rij 4 levert	32,15625
rij 5 levert	32,15625
rij 6 levert	10,29
rij 7 levert	10,29
rij 8 levert	10,29
rij 9 levert	10,29
Totaalgewicht pollen per m ²	435,61

Hoeveelheid Bt eiwitten /m ²	34,8488 µg/m ²	Cry1Ab MON810	3,48E-05 g/m ²
	11848,592 µg/m ²	Cry1F TC1507	1,18E-02 g/m ²
	8189,468 µg/m ²	CryBb1	8,19E-03 g/m ²

Evenredige verdeling in het water			
slootdimensies 1*1*1 m	1000 l		
concentratie pollen	0,43561 g/l	435,61	
concentratie Bt-eiwitten	0,035 µg/l	Cry1Ab MON810	3,48E-05 mg/l
	11,936 µg/l	Cry1F TC1507	1,19E-02 mg/l
	8,189 µg/l	CryBb1	8,19E-03 mg/l

Realistisch gemiddeld scenario: gemiddeld aantal pollen, gemiddeld gewicht, gemiddelde concentratie aan eiwitten
 Gewicht pollen per plant = aantal pollen * gewicht per pollen
 6750000 µg
 6,75 g

planten staan 15 cm uit elkaar
 aantal planten op 1 m2 49 planten
 Pollen per m2 330,75 g pollen

Focus is voornamelijk op de bulk van de pollen (95%)
 verspreidingsafstand is 10 m. Vanwege afstand tot sloot, effectief 9 m maisveld

Uitgaande van pollenverdeling [50]

afstand (m)	0	1	5	10	25	50	100
Pollendepositie (%)	43	31	15	6	3	1	1
Gewicht pollen	142,2225	102,5325	49,6125	19,845			
rij 1 levert		102,5325					
rij 2 levert		12,40313					
rij 3 levert		12,40313					
rij 4 levert		12,40313					
rij 5 levert		12,40313					
rij 6 levert		3,969					
rij 7 levert		3,969					
rij 8 levert		3,969					
rij 9 levert		3,969					
Totaalgewicht pollen per m2		168,021					
Hoeveelheid Bt eiwitten /m2	13,44168 µg/m2	Cry1Ab MON810			1,34E-05 g/m2		
	3679,6599 µg/m2	Cry1F TC1507			3,68E-03 g/m2		
	3158,7948 µg/m2	CryBb1			3,16E-03 g/m2		
Evenredige verdeling in het water slootdimensies 1*1*1 m concentratie pollen concentratie Bt-eiwitten	1000 l	0,168021 g/l	168,021				
		0,013 µg/l	Cry1Ab MON810		1,34E-05 mg/l		
		3,680 µg/l	Cry1F TC1507		3,68E-03 mg/l		
		3,159 µg/l	CryBb1		3,16E-03 mg/l		

Bijlage 8. Verslag visuele inspectie

Locatie	Gewasresten Mais in watergang	Waarnemingen
FL0101	ja	1 hele stengel in water en elders 1 blad. Op talud nauwelijks resten (door schonen sloot?), wel bovenop taludrand/akkerrand stukken stengel, kolf en blad.
FL0102	nee	Mais netjes geoogst. Bijna geen resten op het land, slechts een enkele kolf langs akkerrand. Geen resten op talud of water mogelijk dankzij schonen van sloot.
FL0103	-	Mais nog niet geoogst
FL0104	ja	2 hele stengels in water. Hele kolf en stukje stengel met blad op bodem sloot. Juist langs slootkant Mais slordig geoogst: veel halve stengels met blad en kolven laten staan of liggen naast talud. Sloot niet geschoond.
FL0105	nee	Geen resten in water, op talud en op perceel. Mais volledig/netjes gemaaid/geoogst. Slechts enkel blad op akker.
FL0106	ja	5 hele stengels (incl. kolven) in water en 11 stengels hangend vanaf talud in het water. Mais netjes geoogst, maar op talud resten aanwezig.
FL0107	ja	1 stukje gehakselde kolf op bodem in sloot. Verder hier en daar stukjes kolf op talud. Sloot geschoond en op oever gelegd.
FL0201	nee	Schouwpad tussen akker en sloot erg breed. Mais volledig geoogst, waardoor er nauwelijks resten op het land achter zijn gebleven. Geen resten op schouwpad en in water.
FL0202	ja	Enkele stukjes blad en stengel in water drijvend. Sloot wel geschoond (onderschatting?). Voornamelijk resten blad en kolf op bovenzijde taludrand. Weinig resten op het land.
FL0203	ja	6 Stukken of hele kolven in het water drijvend of op bodem sloot. Buitenste rij Mais naast sloot slordig gemaaid. Veel resten (kolven, blad en stengels) op het land liggend en nog staande (halve) planten.
FL0204	ja	2 stengels hangen vanaf talud in het water met kolf, stengel en blad. Veel (stukken) stengels en kolven en blad langs talud. Helofyten langs sloot houden resten van water af. Waar helofyten afwezig zijn, wel resten in het water.
FL0205	ja	Hele kolf en 3 stukken kolf in waterdrijvend of op bodem sloot. Hier en daar hele stengels op rand akker staand. Sloot geschoond/gemaaid.
FL0206	ja	1 kolf in water. Volledig geoogst, op talud nauwelijks resten aanwezig. Op akkerrand wel meer kolven te zien, maar geen stengels.
FL0301	ja	5 hele stengels in water en op schouwpad. Alleen bij ingang akker (1 ^e 25 meter) resten aanwezig (van de kar gevallen tijdens draaien machine op de weg). De rest van de sloot, talud en schouwpad geen resten te zien.
FL0302	ja	4 kolven in het water drijvend en stengels en kolven (alleen bij ingang perceel). De rest van de sloot en talud en land geen resten te zien. Op het land alles geoogst en verdwenen, grond geëgaliseerd. Zelfs geen wortelkluiten meer te zien van de Mais.
FL0303	nee	Geen resten in water. Op rand talud en akker blad, kolven en (korte) stengels aanwezig (incl. sloot maaisel). Een enkel blad en kolf op taludrand bij water.
FL0304	ja	1 blad in water. Verder enkel blad op talud. Langs akkerrand en op schouwpad weinig kolven en liggende stengels aanwezig.
FL0305	nee	Stengels , kolven en blad op het talud vlakbij het water. Smalle sloot riet weerhoudt kolfjes van watergang.
FL0306	ja	Hele stengels hangend vanaf talud in water. Op schouwpad stengels, bladeren en kolven aanwezig.