

DISS. ETH NO. 28814

Impacts of potentially interacting stressors on the solitary model bee  
species *Osmia bicornis* under laboratory and semi-field conditions

A thesis submitted to attain the degree of

**DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH**

(Dr. Sc. ETH Zurich)

presented by

**JANINE MELANIE SCHWARZ**

Master of Science ETH in Biology  
ETH Zurich, Switzerland

born on 13.07.1990  
from Villigen AG, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Jaboury Ghazoul, examiner  
Dr. Matthias Albrecht, co-examiner  
Prof. Ingolf Steffan-Dewenter, external co-examiner

2022

# Summary

The global loss of biodiversity is a major threat to the functioning and resilience of ecosystems. Insect pollinators, particularly bees, are highly important for the pollination of wild plants and crops, but alarming declines of their diversity and abundance have been recorded in recent years. Bees are under pressure from multiple stressors, mainly resulting from agricultural intensification accompanied by the loss of habitat, high inputs of pesticides and diminishing availabilities of floral food resources. These do not act in isolation, but might add up or interact in unpredictable ways, potentially reinforcing each other. Exposure to pesticides, particularly insecticides, can cause manifold negative impacts on bees. For instance, trace levels of neonicotinoid insecticides, which can be present, for example, in flower pollen or nectar, can induce sub-lethal effects on bees by impairing foraging behaviour, learning abilities, reproduction or development, with negative implications for population dynamics and pollination services. But there is also emerging evidence for negative impacts of fungicides and herbicides, which represent the types of pesticides most highly used globally. As the vast majority of studies on the consequences of different stressors on bees have been performed on social honey- or bumblebees, large knowledge gaps remain as to their potential impacts on solitary bees. In the European Union, efforts are being made to halt the ongoing decline of pollinators, for instance via the EU pollinators initiative and the EU biodiversity strategy. One particular goal is to reduce the use and risk of pesticides by 50% by 2030. It is therefore crucial to understand which pesticides pose harm to bees and to develop suitable mitigation strategies. To minimize negative impacts associated with pesticide use, new substances need to undergo an environmental risk assessment (ERA) procedure before they can be authorized on the market. The ERA is, however, heavily criticized for not protecting bee pollinators adequately, for example, because risks on wild bees, risks resulting from exposure to multiple stressors or sub-lethal effects are not assessed.

In this thesis, we tackled knowledge gaps concerning the potential interactive effects of multiple stressors on solitary bees. We focused on pesticide exposure and nutritional stress using the Red mason bee *Osmia bicornis* as a model species. By conducting controlled semi-field and laboratory/greenhouse experiments, we investigated the potential direct and interactive effects of two pesticides at realistic exposure levels, as well as of pesticide exposure and different types of nutrition, on different life stages of *O. bicornis*. We chose two focal pesticides, the novel insecticide sulfoxaflor and the widely used fungicide azoxystrobin. Sulfoxaflor is highly debated due to its similar mode of action to problematic neonicotinoid insecticides, which were partially banned recently, and its use is expected to increase in the future. In **chapters 1 and 2**, we studied the effects of these two pesticides alone and in combination on adult survival, reproduction, offspring mortality, size and sex ratio, foraging performance, nest recognition and pollination service in a large semi-field study with free-flying bees. Sulfoxaflor was applied five days before crop flowering, as requested by mitigation measures in different European

countries at the time of the study. In **chapter 3**, we designed a laboratory/greenhouse experiment to test the single and combined effects of the focal pesticides on the foraging performance and learning ability of adults on an artificial flower meadow. We also assessed whether the pesticides directly affected the nutritional intake (sugar solution) of adults. In **chapter 4**, we studied the effects of pesticides and nutritional diversity on the development and survival of larvae in a laboratory experiment. We further investigated whether a more diverse pollen nutrition might mitigate the negative impacts of pesticides.

Our results show that sulfoxaflor is unlikely to negatively affect *O. bicornis* fitness when spray application is conducted at least five days before crop flowering, which reduces exposure of flower-visiting bees. On the other hand, if bees are exposed to sulfoxaflor levels likely encountered shortly after spraying, negative impacts were found, including impairments of learning as well as larval development and survival. For azoxystrobin, we did not find significant negative effects, but observed trends suggest that this fungicide might impair foraging performance, nest recognition and nutritional intake of adults as well as survival of larvae. Interestingly, we found evidence for potential antagonistic interactions between sulfoxaflor and azoxystrobin, which call for further studies to investigate the underlying mechanisms. We also demonstrated that a more diverse pollen nutrition clearly benefits the development of *O. bicornis* larvae as compared to nutrition consisting of a lower pollen diversity. Contrary to our expectation, however, a more diverse nutrition did not mitigate the negative impacts of pesticides in our study.

This thesis provides novel results concerning the impacts of single and combined stressors on different life stages of the solitary bee *O. bicornis* and can thereby help to develop mitigation strategies to reduce the risks of pesticides on pollinators. Recently, the outdoor use of sulfoxaflor has been banned in the European Union, however, applications into flowering crops are still practiced in other parts of the world. Our findings suggest that a mitigation measure, restricting the use of sulfoxaflor to at least five days before flowering, should be respected globally to minimize impacts on bee pollinators. We further provide evidence for direct positive effects of pollen diversity on developing larvae, showing that the maintenance and creation of areas high in floral resources is essential for promoting bees in agricultural landscapes.

## Zusammenfassung

Der weltweite Verlust der biologischen Vielfalt ist eine große Bedrohung für das Funktionieren und die Widerstandsfähigkeit von Ökosystemen. Bestäuberinsekten, insbesondere Bienen, sind für die Bestäubung von Wildpflanzen und Nutzpflanzen von großer Bedeutung, doch wurde in den letzten Jahren ein alarmierender Rückgang ihrer Vielfalt und Abundanz festgestellt. Die Bienen stehen unter dem Druck zahlreicher Stressfaktoren, die hauptsächlich auf die Intensivierung der Landwirtschaft und dem damit einhergehenden Verlust von Lebensraum, dem hohen Einsatz von Pestiziden und der abnehmenden Verfügbarkeit von Nahrungsressourcen zurückzuführen sind. Diese Faktoren wirken nicht isoliert, sondern können sich addieren oder auf unvorhersehbare Weise zusammenwirken und sich möglicherweise gegenseitig verstärken. Die Exposition gegenüber Pestiziden, insbesondere Insektiziden, kann sich auf vielfältige Weise negativ auf Bienen auswirken. So können beispielsweise Spuren von Neonikotinoiden, die in Blütenpollen oder -nektar enthalten sein können, subletale Wirkungen auf Bienen haben, indem sie das Nahrungssuchverhalten, die Lernfähigkeit, die Fortpflanzung oder die Entwicklung beeinträchtigen, was sich negativ auf die Populationsdynamik und die Bestäubungsleistung auswirkt. Es gibt aber auch neue Hinweise auf negative Auswirkungen von Fungiziden und Herbiziden, den weltweit am häufigsten verwendeten Pestiziden. Da die überwiegende Mehrheit der Studien über die Auswirkungen verschiedener Stressfaktoren auf Bienen an sozialen Honigbienen oder Hummeln durchgeführt wurden, bestehen noch große Wissenslücken hinsichtlich ihrer potenziellen Auswirkungen auf Solitärbienen. In der Europäischen Union werden Anstrengungen unternommen, um dem anhaltenden Rückgang der Bestäuber Einhalt zu gebieten, beispielsweise im Rahmen der EU-Initiative für Bestäuber und der EU-Biodiversitätsstrategie. Ein besonderes Ziel ist es, den Einsatz und das Risiko von Pestiziden bis 2030 um 50% zu reduzieren. Daher ist es von entscheidender Bedeutung zu verstehen, welche Pestizide Bienen schaden und geeignete Strategien zur Schadensbegrenzung zu entwickeln. Um die mit dem Einsatz von Pestiziden verbundenen negativen Auswirkungen zu minimieren, müssen neue Substanzen eine Umweltverträglichkeitsprüfung (UVP) durchlaufen, bevor sie auf dem Markt zugelassen werden können. Die UVP wird jedoch stark kritisiert, weil sie Bienen nicht ausreichend schützt, da beispielsweise Risiken für Wildbienen, Risiken durch die Exposition gegenüber mehreren Stressoren oder subletale Effekte nicht bewertet werden.

In dieser Arbeit haben wir uns mit den Wissenslücken in Bezug auf die möglichen interaktiven Auswirkungen mehrerer Stressoren auf Solitärbienen befasst. Wir konzentrierten uns auf Pestizidexposition und Ernährungsstress, wobei wir die Rote Mauerbiene *Osmia bicornis* als Modellart verwendeten. In kontrollierten Halbfeld- und Labor-/Gewächshaus-Experimenten untersuchten wir die potenziellen direkten und interaktiven Auswirkungen von zwei Pestiziden bei realistischen Expositionsniveaus sowie von Pestizidexposition und unterschiedlicher Ernährung auf verschiedene Lebensstadien von *O. bicornis*. Wir wählten zwei zentrale Pestizide, das neuartige Insektizid

Sulfoxaflor und das weit verbreitete Fungizid Azoxystrobin. Sulfoxaflor ist aufgrund seiner ähnlichen Wirkungsweise wie die problematischen Neonikotinoide, die vor kurzem teilweise verboten wurden, sehr umstritten, und es wird erwartet, dass sein Einsatz in Zukunft zunehmen wird. In den **Kapiteln 1 und 2** haben wir die Auswirkungen dieser beiden Pestizide allein und in Kombination auf das Überleben von erwachsenen Bienen, die Fortpflanzung, die Sterblichkeit sowie die Grösse und das Geschlechterverhältnis der Nachkommen, die Leistung bei der Nahrungssuche, die Nesterkennung und die Bestäubungsleistung in einer großen Halbfeldstudie mit frei fliegenden Bienen untersucht. Sulfoxaflor wurde fünf Tage vor der Blüte der Kulturpflanzen ausgebracht, wie dies zum Zeitpunkt der Studie in verschiedenen europäischen Ländern im Rahmen von Bekämpfungsmaßnahmen gefordert wurde. In **Kapitel 3** haben wir ein Labor-/Gewächshaus-Experiment entworfen, um die einzelnen und kombinierten Wirkungen der beiden Pestizide auf die Nahrungssuche und die Lernfähigkeit der erwachsenen Bienen auf einer künstlichen Blumenwiese zu testen. Außerdem wurde untersucht, ob die Pestizide die Nahrungsaufnahme (Zuckerlösung) der erwachsenen Tiere direkt beeinflussen. In **Kapitel 4** untersuchten wir die Auswirkungen von Pestiziden und Nahrungsvielfalt auf die Entwicklung und das Überleben von Larven in einem Laborexperiment. Außerdem haben wir untersucht, ob eine vielfältigere Pollennahrung die negativen Auswirkungen von Pestiziden abmildern könnte.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass es unwahrscheinlich ist, dass Sulfoxaflor die Fitness von *O. bicornis* negativ beeinflusst, wenn die Spray Applikation mindestens fünf Tage vor der Blüte erfolgt, was eine Exposition der blütenbesuchenden Bienen reduziert. Werden die Bienen hingegen Sulfoxaflormengen ausgesetzt, die wahrscheinlich kurz nach dem Sprühen auftreten, wurden negative Auswirkungen festgestellt, einschließlich Beeinträchtigungen der Lernfähigkeit sowie der Larvenentwicklung und des Überlebens. Für Azoxystrobin fanden wir keine signifikanten negativen Auswirkungen, aber die beobachteten Trends deuten darauf hin, dass dieses Fungizid die Nahrungssuche, die Nesterkennung und die Nahrungsaufnahme der erwachsenen Bienen, sowie das Überleben der Larven beeinträchtigen könnte. Interessanterweise fanden wir Hinweise auf potenzielle antagonistische Wechselwirkungen zwischen Sulfoxaflor und Azoxystrobin, was weitere Studien zur Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen erforderlich macht. Wir konnten auch nachweisen, dass eine vielfältigere Pollennahrung die Entwicklung von *O. bicornis*-Larven eindeutig begünstigt, verglichen mit einer Ernährung, die aus einer geringeren Pollendiversität besteht. Entgegen unserer Erwartung konnte eine vielfältigere Nahrung die negativen Auswirkungen von Pestiziden in unserer Studie jedoch nicht abmildern.

Diese Arbeit liefert neue Ergebnisse zu den Auswirkungen einzelner und kombinierter Stressfaktoren auf verschiedene Lebensstadien der Solitärbiene *O. bicornis* und kann somit dazu beitragen, Strategien zur Verringerung der Risiken von Pestiziden für Bestäuber zu entwickeln. Vor kurzem wurde die Anwendung von Sulfoxaflor im Freiland in der Europäischen Union verboten, in anderen Teilen der Welt wird es jedoch weiterhin in blühenden Kulturen eingesetzt. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin,

dass eine Abhilfemaßnahme, nämlich die Beschränkung des Sulfoxafloreinsatzes auf mindestens fünf Tage vor der Blüte, weltweit beachtet werden sollte, um die Auswirkungen auf Bienen zu minimieren. Darüber hinaus liefern wir Belege für direkte positive Auswirkungen der Pollenvielfalt auf die sich entwickelnden Larven und zeigen, dass die Erhaltung und Schaffung von Gebieten mit hohem Blütenangebot für die Förderung von Bienen in Agrarlandschaften von entscheidender Bedeutung ist.