

## **LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES**

### **BOURDON, ESSAI DE TOXICITÉ AIGUË PAR CONTACT**

#### **INTRODUCTION**

1. La présente Ligne directrice est une méthode d'essai en laboratoire destinée à évaluer la toxicité aiguë par contact des pesticides et d'autres produits chimiques pour des bourdons ouvriers adultes. Elle s'inspire principalement de la ligne directrice n° 214 de l'OCDE – Abeille domestique, essai de toxicité aiguë par contact (1), van der Steen *et al.* (1996) (2) et Hanewald *et al.* (2013) (3). Cette méthode d'essai a d'abord été soumise à des essais inter-laboratoires menés par un groupe international de l'ICPPR (*International Commission for Plant-Pollinator Relationships*) chargé des essais inter-laboratoires en 2014 puis par un groupe international de l'OCDE chargé des essais inter-laboratoires en 2015 (4). Lors de ces essais inter-laboratoires, les espèces suivantes ont été utilisées avec succès : *Bombus terrestris* et *Bombus impatiens*. Le présent essai est également applicable à d'autres espèces de bourdons, mais cela n'a pas été documenté.

2. Les pollinisateurs tels que les bourdons peuvent être exposés à des résidus de produits phytopharmaceutiques (PPP) ou d'autres produits chimiques, soit par contact (contact direct ou transfert indirect) soit par ingestion d'aliments contaminés. Pour examiner le risque potentiel par contact avec un produit chimique, une étude de toxicité aiguë peut être menée en laboratoire en exposant les bourdons ouvriers adultes au produit chimique concerné.

3. Avant d'appliquer la présente Ligne directrice à un mélange en vue de générer des données à des fins réglementaires, il convient d'examiner si et, dans l'affirmative, pourquoi cet essai peut fournir des résultats appropriés à cet effet. Ces questions ne se posent pas si l'essai du mélange est prescrit par la réglementation.

## REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITATIONS

4. Lorsqu'on apprécie et évalue les caractéristiques toxiques d'un produit chimique, il peut être nécessaire de déterminer la toxicité aiguë par contact pour les bourdons lorsque des bourdons risquent d'être exposés à ce produit chimique. L'essai de toxicité aiguë par contact vise à déterminer la toxicité intrinsèque des pesticides et d'autres produits chimiques pour les bourdons. Les résultats de cet essai devraient être mis à profit pour établir la nécessité d'une évaluation plus poussée. Cette méthode peut être utilisée, en particulier, dans des programmes séquentiels destinés à évaluer les risques des produits chimiques testés pour les pollinisateurs, selon la progression séquentielle suivante : essais de toxicité en laboratoire, essais en conditions semi-naturelles et essais sur le terrain. Les produits chimiques peuvent être testés en tant que matières actives ou en tant que préparations chimiques.

5. Cette méthode vise à déterminer la  $DL_{50}$  (voir l'annexe pour les définitions) à la suite d'une exposition unique de bourdons travailleurs adultes au produit chimique testé. Les données doivent être utilisées dans le cadre d'un programme d'évaluation des risques adapté aux pollinisateurs. La présente Ligne directrice sur les bourdons doit être considérée comme un essai de niveau inférieur s'inscrivant dans le cadre d'un programme global d'évaluation des risques pour les pollinisateurs.

## PRINCIPE DE L'ESSAI

6. Des bourdons ouvriers adultes sont exposés au produit chimique testé dissout dans un véhicule approprié, par application directe sous forme d'aérosol sur la partie dorsale du thorax (gouttelette). L'essai dure au minimum 48 heures. Si le taux de mortalité augmente de 10 % ou plus entre 24 heures et 48 heures dans un ou plusieurs traitements alors que la mortalité des témoins reste à un niveau acceptable, c'est-à-dire  $\leq 10\%$ , il convient de prolonger l'essai jusqu'à 96 heures au maximum. La mortalité est notée tous les jours et comparée avec les valeurs des témoins. On analyse les résultats afin de calculer la  $DL_{50}$  et la DSEO, si possible, à 24 heures et à 48 heures et, au cas où l'étude est prolongée, à 72 heures et à 96 heures.

## CRITÈRES DE VALIDITÉ DE L'ESSAI

7. La validité de l'essai repose sur les conditions suivantes :
- le taux de mortalité du témoin traité avec de l'eau ne doit pas dépasser 10 % à la fin de l'essai. En cas d'utilisation d'un solvant, le taux de mortalité du témoin avec solvant ne doit pas dépasser 10 % à la fin de l'essai.
  - le taux de mortalité du groupe traité avec l'étalon de toxicité doit être supérieur ou égal à 50 % à la fin de l'essai.

## DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

### *Organisme testé :*

8. Des bourdons ouvriers adultes (*Bombus* spp.) sont utilisés pour cet essai de toxicité aiguë par contact.

9. Il faut utiliser des colonies de bourdons de taille moyenne, avec un couvain à tous les stades de développement et une reine pondreuse, contenant ~60-80 bourdons ouvriers, pour collecter les bourdons destinés à l'essai. Il est recommandé d'utiliser les colonies dans la semaine qui suit leur date de livraison.

### ***Cages d'essai***

10. Les bourdons sont placés dans des cages individuelles. Ce système empêche les luttes de pouvoir (entre les bourdons ouvriers dépourvus de reine) pouvant provoquer des décès et permet d'évaluer avec précision le comportement des bourdons (« perturbés » ou « non perturbés »).

11. On utilise des cages faciles à nettoyer ou jetables à ventilation naturelle. Tout matériau approprié peut être employé, par exemple des cages en acier inoxydable, en carton, en toile métallique, en plastique, en bois, etc. La dimension des cages d'essai doit être adaptée à la taille des bourdons (minimum 15 cm<sup>3</sup>).

12. Pour de plus amples informations, se reporter à l'ANNEXE 2.

### ***Collecte et répartition au hasard des bourdons***

13. Les bourdons ouvriers adultes sont retirés (sans anesthésie) des colonies sous lumière rouge ou en état d'engourdissement avant d'être transférés dans les cages d'essai. Seuls sont utilisés les bourdons ouvriers qui peuvent être prélevés sans enlever la couche de coton (si une couche de coton est présente) dans les colonies - pour de plus amples informations, se reporter à l'ANNEXE 2. Les bourdons de très petite taille et surtout les bourdons de très grande taille doivent être exclus de l'essai par inspection visuelle. Les bourdons sortis récemment, reconnaissables à leur fourrure grisâtre, ainsi que les faux-bourdons et les reines ne doivent pas être utilisés dans cet essai.

14. Les bourdons utilisés dans cet essai sont pesés individuellement. Par la suite, les bourdons sont répartis au hasard dans les différents groupes de traitements.

### ***Manipulations et conditions d'alimentation***

15. Les manipulations et notamment le traitement et les observations peuvent s'effectuer à la lumière (du jour, rouge ou artificielle). Pour tous les groupes de traitement, des solutions nutritives de saccharose dans l'eau dont la concentration finale s'élève à 500 g/l (50 % en poids par unité de volume) sont préparées et fournies *ad libitum* aux bourdons au moyen d'un dispositif d'alimentation approprié tel que des seringues en plastique disponibles dans le commerce d'une contenance de 2 ml dont l'embout a été coupé.

### ***Préparation de l'organisme d'essai***

16. Les bourdons doivent être acclimatés aux conditions d'essai (notamment aux cages individuelles) pendant au moins huit heures avec un accès *ad libitum* à une solution de saccharose à 50 % (en poids par unité de volume). Les bourdons moribonds doivent être retirés et remplacés par des bourdons sains avant le début de l'essai. Par conséquent, il est nécessaire de mettre en cage et d'acclimater un nombre de bourdons supérieur aux besoins de l'essai. Le pourcentage conseillé est 5 % du nombre total de bourdons utilisés pour l'essai.

### *Préparation des doses*

17. Le produit chimique testé doit être appliqué sous forme de solution dans un véhicule, à savoir un solvant organique ou une solution d'eau osmosée, contenant un tensioactif approprié (ce dernier réduit la tension superficielle, ce qui permet la répartition homogène du produit chimique testé sur l'animal ; voir l'ANNEXE 2, « Tensioactif »). Le tensioactif est ajouté à tous les traitements y compris tous les témoins et traitements contenant l'étalon de toxicité. Si le produit chimique testé est hydrosoluble, on utilise de l'eau comme solvant. Si le produit chimique testé est peu soluble dans l'eau, on peut utiliser un solvant organique tel que l'acétone. La concentration du solvant utilisé dépend de la solubilité du produit chimique testé et doit être la même pour tous les niveaux de traitement et le témoin avec solvant. Tout autre solvant peut être utilisé tant que le critère de validité du groupe témoin traité avec le solvant est respecté.

18. Des solutions témoins appropriées doivent être préparées si un solvant, un solubilisant, un dispersant, etc. ont été employés. Deux groupes témoins séparés doivent alors être utilisés, l'un étant traité avec de l'eau et l'autre avec le solvant, le solubilisant, le dispersant, etc. à la même concentration que la/les dose(s) de produit chimique testé.

### *Vérification analytique*

19. Une fois au cours de la phase expérimentale, au moins une aliquot de la concentration la plus faible et un aliquot de la concentration la plus élevée de ces solutions nutritives doivent être prélevés et stockés directement après la préparation des solutions nutritives dans un congélateur à une température inférieure ou égale à  $-18^{\circ}\text{C}$  aux fins de détermination analytique de la concentration réelle du produit chimique d'essai. Si une solution-mère a été utilisée pour la préparation des solutions nutritives, un échantillon supplémentaire de cette solution-mère est également prélevé pour la détermination analytique.

20. Si un nouveau lot de produit chimique d'essai doit être utilisé pendant l'essai, un autre échantillon est nécessaire pour les concentrations les plus faibles et les plus fortes aux fins de la vérification analytique de chaque nouveau lot de produit chimique d'essai. Idéalement, les études doivent être réalisées avec le même lot de produit chimique.

## **MODE OPÉRATOIRE**

### *Groupes testés et groupes témoins*

21. Le nombre de doses et de réplicats testés doit répondre aux exigences statistiques pour la détermination de la  $DL_{50}$  avec des limites de confiance de 95 %. Normalement, cinq doses formant une série géométrique, dont le facteur d'échelle n'excède pas 2.2 et qui couvrent la gamme de doses pour la  $DL_{50}$  sont nécessaires pour l'essai. Le nombre de doses doit être déterminé en fonction de la pente de la courbe de toxicité (dose/mortalité) et compte tenu de la méthode statistique choisie pour l'analyse des résultats. Si la toxicité du produit chimique n'est pas connue, un essai de détermination de l'ordre de grandeur est recommandé dans un premier temps, afin de choisir des valeurs appropriées.

22. En cas d'essai de détermination de la relation dose-réponse, il faut utiliser au minimum 30 réplicats (cages) contenant chacun un bourdon par traitement. Si le produit chimique testé est faiblement toxique, un essai limite peut être effectué avec 50 réplicats (cages) pour chaque traitement

témoin et chaque traitement contenant le produit chimique testé et au moins 30 réplicats pour l'étalon de toxicité.

23. Remarque : une colonie ne suffit pas pour effectuer un essai de détermination de la relation dose-réponse. Par conséquent, des bourdons ouvriers issus de plusieurs colonies (au moins trois) sont nécessaires. Il faut veiller à ce que les bourdons issus des différentes colonies soient répartis au hasard entre les différents groupes de traitement afin d'éviter tout effet de colonie au sein d'un groupe de traitements.

#### *Traitement des témoins en cas d'emploi d'un solvant*

24. Si un solvant est utilisé, deux témoins, à savoir un groupe témoin traité avec de l'eau et un groupe témoin traité avec le solvant, sont inclus dans l'essai. Les écarts statistiquement significatifs entre le témoin traité avec de l'eau et le témoin traité avec le solvant sont testés. S'il n'y a pas d'écart statistiquement significatif entre le témoin contenant de l'eau et le témoin avec solvant, les deux témoins peuvent être regroupés en vue d'évaluations statistiques plus poussées. En cas d'écart statistique, le témoin avec solvant est utilisé pour le calcul de la  $DL_{50}$  et pour les corrections de la mortalité dans les traitements contenant le produit chimique testé.

#### *Étalon de toxicité*

25. Il faudrait utiliser une dose de l'étalon de toxicité entraînant un taux de mortalité escompté supérieur ou égal à 50 % à la fin de l'essai afin de démontrer la sensibilité des bourdons et la fiabilité du système d'essai. Une dose de 10 µg de matière active (diméthoate) par bourdon permet d'obtenir un taux de mortalité supérieur ou égal à 50 % après une exposition aiguë par contact (4). D'autres étalons de toxicité pourraient toutefois être acceptables, s'il existe suffisamment de données qui permettent de démontrer la sensibilité escomptée des bourdons.

#### *Exposition*

26. Les bourdons anesthésiés ( $CO_2$ ) ou engourdis sont pesés puis traités individuellement par application locale. Un volume de 2 µl de solution contenant le produit chimique testé ou les témoins à la concentration appropriée doit être appliqué à l'aide d'un microapplicateur ou d'une pipette sur la face dorsale du thorax de chaque bourdon. D'autres volumes peuvent être utilisés si cela se justifie. Après l'application, les bourdons sont remis dans leurs cages d'essai individuelles dans lesquelles on leur fournit *ad libitum* une solution de saccharose à 50 % (en poids par unité de volume).

#### *Conditions d'essai*

27. Entre les évaluations et les manipulations, les bourdons doivent être gardés à l'obscurité dans des conditions climatiques contrôlées, à une température de  $25 \pm 2^\circ C$  et une humidité relative de  $60 \pm 20 \%$ . Les conditions climatiques doivent être enregistrées en continu au moyen d'un matériel approprié et étalonné. Les déviations de courte durée ( $\leq 2$  h) par rapport aux plages recommandées sont parfois inévitables (en raison de la manipulation des installations, par exemple) ; en principe, ces déviations ne devraient pas avoir d'incidence majeure sur les résultats de l'essai.

*Durée*

28. Après exposition au produit testé, les bourdons sont observés pendant au moins 48 heures. Si le taux de mortalité s'accroît de 10 % ou plus entre 24 heures et 48 heures dans un ou plusieurs groupes de traitements alors que la mortalité des témoins ne dépasse pas un niveau acceptable inférieur ou égal à 10 %, la durée de l'essai devrait être prolongée jusqu'à 96 heures au maximum.

*Observations et mesures*

29. La mortalité est relevée 4 - 5 heures après le début de l'administration du produit chimique testé, puis 24 heures et 48 heures plus tard. Si une période d'observation prolongée est requise, d'autres évaluations devront être pratiquées 72 h et 96 h après celle-ci.

30. De plus, les effets sublétaux doivent être notés chaque jour au même moment que les évaluations du taux de mortalité. Les effets sublétaux seront notés comme suit :

**non perturbé** = Les bourdons se comportent normalement (y compris des phases naturelles d'inactivité).

**perturbé** = Les bourdons se tiennent sur leurs pattes et essaient de marcher mais montrent des signes de coordination réduite.

**moribond** = Les bourdons n'arrivent pas à marcher et ne bougent que très faiblement leurs pattes et leurs antennes ; ils ne réagissent que faiblement à des stimulations telles que de la lumière ou un souffle d'air ; ils peuvent se rétablir, mais meurent le plus souvent.

**ESSAI LIMITE**

31. Dans certains cas (par exemple, lorsqu'on s'attend à ce qu'un produit chimique d'essai soit peu toxique), il peut se révéler approprié d'exécuter un essai limite, avec 100 µg de matière active ou de produit chimique/bourdon, afin de démontrer que la  $DL_{50}$  est supérieure à cette valeur. Le même protocole devrait être appliqué, notamment les témoins pertinents et l'étalon de toxicité, mais au lieu d'utiliser 30 réplicats par groupe de traitements, il est nécessaire d'utiliser 50 réplicats, sauf pour l'étalon de toxicité, pour lequel au moins 30 réplicats doivent être utilisés. Si l'on constate une mortalité statistiquement significative, il convient de mener une étude complète de détermination de la relation dose-réponse. Si l'on observe des effets sublétaux, ils devront être notés comme indiqué ci-dessus.

**RÉSULTATS ET RAPPORT***Traitement des données*

32. Les résultats sont récapitulés sous forme de tableaux, montrant pour chaque groupe d'essai (tous les témoins, groupes traités avec l'étalon de toxicité et groupes traités avec le produit chimique), le nombre de bourdons employé, la mortalité à chaque observation et le nombre de bourdons présentant des effets sublétaux. Les données sur la mortalité doivent être analysées par les méthodes statistiques appropriées (par exemple, la méthode des probits, Weibull, la probabilité binomiale, le modèle dose-réponse avec

ajustement). On trace des courbes dose-effet pour chaque moment d'observation recommandé (24 h, 48 h, et, si nécessaire, 72 h, 96 h) et on calcule les pentes des courbes et les doses létales médianes ( $DL_{50}$ ) avec des limites de confiance de 95 %. La correction de la mortalité chez les témoins peut être envisagée et réalisée au moyen de la méthodologie appropriée (p.ex. Abbott, (5)). Les effets observés doivent être exprimés en  $\mu\text{g}$  de produit chimique testé par bourdon ( $\mu\text{g}/\text{bourdon}$ ).

### *Rapport d'essai*

33. Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes :

#### *Produit chimique d'essai et étalon de toxicité :*

- Substance mono-constituant : apparence physique, solubilité dans l'eau et autres propriétés physicochimiques pertinentes ; identification chimique telle que désignation IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si cela est faisable en pratique, etc. (y compris la teneur en carbone organique s'il y a lieu).
- Substance multi-constituants, UVCB (substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques) et mélanges : caractérisés dans la mesure du possible par l'identité chimique (voir ci-dessus), la teneur et les propriétés physicochimiques pertinentes des constituants.
- source, numéro de série et/ou de lot, si possible ;
- solubilité du produit chimique d'essai dans l'eau ou le solvant, si possible ;
- aspect physique et autres propriétés physico-chimiques pertinentes ;
- identification chimique (nom de la substance chimique, nom UICPA ou numéro CAS, par exemple).

#### *Système d'essai :*

- nom scientifique, espèce du bourdon, fournisseur, âge approximatif de la colonie en semaines (si possible), méthode de collecte, date de collecte, poids de chaque bourdon soumis à l'essai ;
- toute information pertinente sur les colonies utilisées pour la collecte des bourdons d'essai, en particulier certificat sanitaire, toute maladie des adultes, les prétraitements éventuels, etc. si possible.

#### *Conditions d'essai :*

- description de la conception de l'essai : nombre de groupes de traitements (témoins et étalons de toxicité compris), nombre de réplicats pour chaque groupe de traitements, doses testées du produit chimique d'essai ;

- température et humidité relative lors de la phase expérimentale et de l'acclimatation ;
- sources de lumière lors des évaluations et des manipulations ;
- description des cages d'essai (type, matériau, dimension, dispositif d'alimentation, etc.) ;
- préparation des doses de produit chimique d'essai : solvant, tensioactif, etc. utilisé ;
- volume de solution d'essai appliqué ;
- description du microapplicateur d'aérosol ;
- anesthésiants utilisés ;
- lieu et date de l'essai.

*Résultats :*

- données brutes : mortalité à chaque dose testée et à chaque observation ;
- Concentration nominale du produit chimique testé et concentration mesurée dans les solutions d'essai, et méthode analytique utilisée;
- graphique des courbes dose-effet à la fin de l'essai, si possible ;
- mortalité chez les témoins et pour l'étalon de toxicité ;
- valeurs de la  $DL_{50}$ , avec des limites de confiance de 95 %, à chaque heure d'observation recommandée, pour le produit chimique d'essai ;
- DSEO, si possible ;
- méthodes statistiques utilisées pour la détermination de la  $DL_{50}$  et de la DSEO ;
- effets sublétaux observés ;
- tout écart par rapport à la Ligne directrice et toute autre information pertinente.

## RÉFÉRENCES

- (1) OECD (1998). OECD guideline for testing of chemicals, No.214: Honeybees, acute contact toxicity test. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (2) Steen. J.J.M. van der, Gretenkord, C. Schaefer, H. (1996). Methods to determine the acute oral and contact LD50 of pesticides for bumble bees (*Bombus terrestris* L.) Proceedings ICPBR 6th Symposium on the Hazard of Pesticides to Bees 1996 Braunschweig, Germany
- (3) Hanewald, N., et al. (2013). Optimizing laboratory toxicity test methods for Bumblebees (*Bombus terrestris* L.) (Presented by BASF SE on the SETAC Conference in Glasgow 2013)
- (4) OECD (2017). Report of the International Ring Test for the Standardisation of an Acute Oral and Contact Test on Bumblebees in the Laboratory in 2015. Series on Testing and Assessment No.269, ENV Publications. OECD, Paris.
- (5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, 265-267.

Références recommandées pour le traitement des données :

- (6) OECD (2006) Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD Environment Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 54, 147 p.

ANNEXE 1DÉFINITIONS :

Toxicité aiguë par contact : elle désigne les effets néfastes survenant après l'administration par application locale d'une dose unique d'un produit chimique testé en l'espace de 96 h.

Dose : quantité de produit chimique testé administré. Elle est exprimée en masse de produit chimique testé par animal ( $\mu\text{g}$ /bourdon).

DL<sub>50</sub> (dose létale médiane) par contact : dose unique d'un produit chimique, obtenue par calcul statistique, supposée entraîner la mort de 50 % des animaux lorsqu'elle est administrée par contact. La DL<sub>50</sub> est exprimée en  $\mu\text{g}$  du produit chimique testé par bourdon. Pour les pesticides, le produit chimique testé peut être une matière active ou une préparation chimique contenant une ou plusieurs matières actives.

DSEO (dose sans effet observé) : dose à laquelle aucun écart de mortalité statistiquement significatif n'est observé par rapport au témoin.

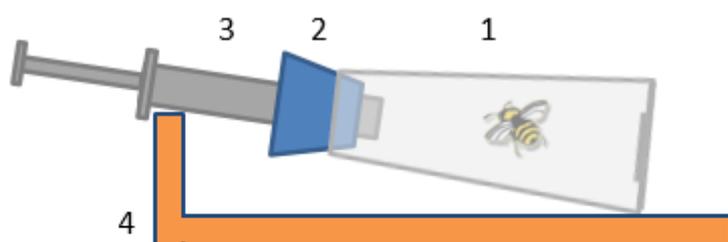
ANNEXE 2

RECOMMANDATIONS GÉNÉRALES DU GROUPE CHARGÉ DES ESSAIS INTER-LABORATOIRES :

Cages d'essai :

Chaque bourdon doit être placé dans une cage individuelle pendant l'essai.

Le groupe chargé des essais inter-laboratoires propose les systèmes Nicot® queen (voir photos ci-jointes) équipés de seringues en plastique de 2 ml dont l'embout a été coupé pour agrandir l'ouverture d'alimentation des bourdons. Les cages sont placées l'une à côté de l'autre pour permettre un contact olfactif et visuel entre les individus.



- 1 = „Nicot“ system cage
- 2 = pierced rubber plug
- 3 = clipped off 2 mL syringe (feeding source)
- 4 = rack

« Nicot » system cage	cage « Nicot® »
Pierced rubber plug	bouchon en caoutchouc percé
Clipped off 2 mL syringe (feeding source)	seringue de 2 ml sans embout (source d'alimentation)
rack	support

Figure 1 : Illustration d'une cage individuelle : les bourdons sont placés individuellement dans des cages Nicot® et nourris au moyen de seringues. Les seringues sont légèrement inclinées vers le bas afin que la nourriture glisse par l'ouverture des seringues (en particulier lorsqu'elle est fournie ad libitum). Les seringues sont maintenues en place au moyen d'un bouchon en caoutchouc percé au milieu.

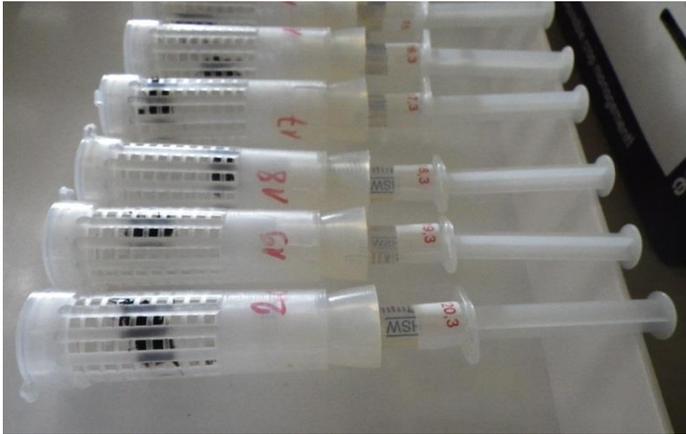


Figure 2 : Illustration d'une installation d'essai : plusieurs cages sont placées l'une à côté de l'autre pour permettre un contact olfactif et visuel entre les individus. (photo : Bayer Cropscience)

#### ***Tensioactif :***

- Il est nécessaire d'utiliser un tensioactif pour appliquer de façon homogène l'aérosol sur le dos des bourdons. En 2014, lors du premier essai inter-laboratoires international de l'ICPPR, le Tween 80 avait été choisi comme tensioactif. Or la plupart des laboratoires ont signalé que le Tween 80 n'était pas approprié pour les bourdons poilus. Par conséquent, lors de l'atelier de 2015, il a été décidé d'utiliser le Triton X pour l'essai inter-laboratoires de l'OCDE. Le Triton X assure une répartition homogène et il est par conséquent recommandé comme tensioactif pour les essais de toxicité aiguë par contact chez le bourdon. Si la faisabilité est montrée, d'autres tensioactifs réduisant la tension superficielle peuvent être également utilisés.

#### ***Calendrier de l'essai :***

- Bien que des colonies soient disponibles sur le marché toute l'année en Europe centrale, l'expérience des participants aux essais inter-laboratoires (communication lors des ateliers de 2014, 2015 et 2016) a montré que la variabilité de la consommation alimentaire et de la mortalité des bourdons augmentait l'hiver. Par conséquent, les essais sont recommandés de mars à octobre uniquement afin d'accroître la fiabilité et la reproductibilité de l'essai.

#### ***Complément d'information sur la collecte et la répartition au hasard des bourdons :***

- Il est vivement recommandé d'utiliser des colonies de bourdons recouvertes d'une couche de coton. En effet, d'après les expériences menées en laboratoire, les ouvriers sont les premiers à grimper sur la couche de coton tandis que les très jeunes bourdons et les mâles restent dans le nid. Cela facilite donc la sélection des bourdons ouvriers.