

Abschlussbericht Teilprojekt 2

# Honig- und Wildbienen unter Stress

## Projektverbund BayÖkotox

Ökotoxikologische Bewertung von Stoffen in der Umwelt

### Projektnehmende/Bearbeitende

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Lehrstuhl für Verhaltensphysiologie und Soziobiologie

Prof. Dr. Ricarda Scheiner

Lehrstuhl für Tierökologie und Tropenbiologie

Prof. Dr. Ingolf Steffan-Dewenter

Sarah Manzer

Antonia Schuhmann

Am Hubland

97074 Würzburg

Tel.: 0931 3184745

E-Mail: [ricarda.scheiner@uni-wuerzburg.de](mailto:ricarda.scheiner@uni-wuerzburg.de)

Web: <https://www.biologie.uni-wuerzburg.de/startseite/>

### Berichtszeitraum:

1. Februar 2020 bis 15. Juni 2023

### Finanziert durch

Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz

Rosenkavalierplatz 2

81925 München



finanziert durch  
Bayerisches Staatsministerium für  
Umwelt und Verbraucherschutz



# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Inhaltsverzeichnis</b> .....  | <b>2</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....   | <b>4</b>  |
| <b>1 Kurzzusammenfassung</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>2 Einleitung</b> .....  | <b>6</b>  |
| <b>3 Aufgabenstellung</b> .....  | <b>7</b>  |
| 3.1 Arbeitspaket 1: Auswirkungen von Insektizid-Fungizid-Mischungen auf die Mortalität und das Verhalten von Honigbienen und Hummeln im Labor und Freiland.....  | 7         |
| 3.2 Arbeitspaket 2: Auswirkungen von Insektizid-Fungizid-Mischungen auf die Honigbienenentwicklung.....  | 7         |
| 3.3 Arbeitspaket 3: Wirkung von Insektizid-Fungizid-Mischungen auf die Volksentwicklung und den Polleneintrag in neun realen Agrarlandschaften Bayerns mit unterschiedlicher Nutzungsintensität und Blüten-Ressourcen-Verfügbarkeit..... | 8         |
| <b>4 Vorgehensweise</b> .....  | <b>8</b>  |
| 4.1 Planung und Ablauf der Arbeiten.....   | 8         |
| 4.2 Übersicht der Pflanzenschutzmittel und derer Wirkstoffe.....   | 9         |
| 4.3 Arbeitspaket 1: Auswirkungen von einer Insektizid-Fungizid-Mischung auf die Mortalität und das Verhalten von Honigbienen und Hummeln im Labor und Freiland.....  | 10        |
| 4.3.1 Aufgabe 1: Mortalität von Honigbienen und Hummeln unter kombiniertem Stress durch Insektizid und Fungizid.....   | 10        |
| 4.3.2 Aufgabe 2: Empfindlichkeit für Zuckerwasser von Honigbienen und Hummeln unter kombiniertem Stress durch Insektizid und Fungizid....  | 11        |
| 4.3.3 Aufgabe 3: Kognitive Fähigkeiten von Honigbienen und Hummeln unter kombiniertem Stress durch Insektizid und Fungizid.....  | 12        |
| 4.3.4 Aufgabe 4: Sammelverhalten von Honigbienen und Hummeln unter kombiniertem Stress durch Insektizid und Fungizid.....  | 14        |
| 4.4 Arbeitspaket 2: Auswirkungen von Insektizid-Fungizid-Mischungen auf die Honigbienenentwicklung.....  | 15        |
| 4.5 Arbeitspaket 3: Wirkung von Insektizid-Fungizid-Mischungen auf die Volksentwicklung und den Polleneintrag in 9 realen Agrarlandschaften Bayerns mit unterschiedlicher Nutzungsintensität und Blüten-Ressourcen-Verfügbarkeit         | 17        |
| <b>5 Ergebnisse und Diskussion</b> .....   | <b>21</b> |
| 5.1 Arbeitspaket 1: Auswirkungen von einer Insektizid-Fungizid-Mischung auf die Mortalität und das Verhalten von Honigbienen und Hummeln im Labor und Freiland.....  | 21        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 5.1.1    | Aufgabe 1: Mortalität von Honigbienen und Hummeln unter kombiniertem Stress durch Insektizid und Fungizid .....  | 21        |
| 5.1.2    | Aufgabe 2: Empfindlichkeit für Zuckerwasser von Honigbienen und Hummeln unter kombiniertem Stress durch Insektizid und Fungizid....  | 22        |
| 5.1.3    | Aufgabe 3: Kognitive Fähigkeiten von Honigbienen und Hummeln unter kombiniertem Stress durch Insektizid und Fungizid .....   | 23        |
| 5.1.4    | Aufgabe 4: Sammelverhalten von Honigbienen und Hummeln unter kombiniertem Stress durch Insektizid und Fungizid .....   | 27        |
| 5.2      | Arbeitspaket 2: Auswirkungen von Insektizid-Fungizid-Mischungen auf die Honigbienenentwicklung .....   | 29        |
| 5.3      | Arbeitspaket 3: Wirkung von Insektizid-Fungizid-Mischungen auf die Volksentwicklung und den Polleneintrag in 9 realen Agrarlandschaften Bayerns mit unterschiedlicher Nutzungsintensität und Blüten-Ressourcen-Verfügbarkeit | 32        |
| 5.3.1    | Ressourcenangebot der verschiedenen Standorte.....   | 32        |
| 5.3.2    | Volksentwicklung.....  | 33        |
| 5.3.3    | Diskussion Völkerversuch .....   | 35        |
| <b>6</b> | <b>Zusammenfassung .....</b>   | <b>38</b> |
| 6.1      | Arbeitspaket 1: Auswirkungen von Insektizid-Fungizid-Mischungen auf die Mortalität und das Verhalten von Honigbienen und Hummeln im Labor und Freiland .....   | 38        |
| 6.2      | Arbeitspaket 2: Auswirkungen von Insektizid-Fungizid-Mischungen auf die Honigbienenentwicklung .....   | 39        |
| 6.3      | Arbeitspaket 3: Wirkung von Insektizid-Fungizid-Mischungen auf die Volksentwicklung und den Polleneintrag in 9 realen Agrarlandschaften Bayerns mit unterschiedlicher Nutzungsintensität und Blüten-Ressourcen-Verfügbarkeit | 39        |
| <b>7</b> | <b>Ausblick.....</b>   | <b>40</b> |
| <b>8</b> | <b>Veröffentlichungen .....</b>  | <b>40</b> |
|          | <b>Literaturverzeichnis.....</b>   | <b>41</b> |
|          | <b>Abbildungsverzeichnis.....</b>  | <b>44</b> |
|          | <b>Anhang .....</b>  | <b>49</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|       |  |
|-------|--|
| fr    | feldrealistisch  |
| fr*10 | zehnfach höher als feldrealistisch                           |
| GLM   | generalized linear model                                     |
| GLMM  | generalized linear mixed model                               |
| PSM   | Pflanzenschutzmittel   |
| PER   | Rüsselstreckantwort (englisch: proboscis extension response) |
| RFID  | radio frequency identification                               |
| SBI   | Sterol-Biosynthese inhibierend                               |

## 1 Kurzzusammenfassung

Im Teilprojekt 2 „Honig- und Wildbienen unter Stress“ wurden synergistische Effekte von Mischungen aus Insektiziden und Fungiziden auf die Mortalität, das Verhalten, die Entwicklung und den Polleneintrag von Honig- und Wildbienen untersucht. Besonders im Fokus standen Auswirkungen auf Geschmack, Lernverhalten und Orientierungs- bzw. Sammelflugverhalten der Honig- und Wildbienen. Zudem wurde der Einfluss der Pflanzenschutzmittel-Kombination auf die Entwicklung von Honigbienen betrachtet. Die mögliche Kompensation negativer Auswirkungen von Insektizid-Fungizid-Mischungen auf Honigbienen in artenreichen Landschaften wurde in einem Feldversuch untersucht.

Die höhere Konzentration der Pflanzenschutzmittel zeigte negative Effekte auf die Sterblichkeit, die kognitiven Fähigkeiten, die Flugaktivität und die Larvenentwicklung der Honigbienen. Bei den Hummeln konnten hingegen keine negativen Auswirkungen nachgewiesen werden.

Mit unserem Projekt leisten wir einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Wirkung multipler Stressoren (Insektizid-Fungizid-Mischungen) auf das Verhalten, die Individualentwicklung und den Polleneintrag von Honig- und Wildbienen. Es kann als Pilotprojekt für die Aufklärung von Stress durch Pflanzenschutzmittel bei anderen Insekten dienen. Durch die Optimierung und Etablierung unserer Methoden sollen des Weiteren Möglichkeiten geschaffen werden, die Bewertung der Mischtoxizität, zum Beispiel in Zulassungsverfahren, zu unterstützen.

## 2 Einleitung

Insekten leisten einen zentralen Beitrag als Bestäuber von Feldfrüchten und Wildpflanzen, allerdings sind sie stark bedroht [1]. Als einer der Hauptfaktoren, der zu einem Rückgang von Honigbienen und Wildbienen führt, gilt der großflächige Einsatz von Pflanzenschutzmitteln (PSM) in der Landwirtschaft [2, 3]. Die Honigbiene wird bereits als Modellorganismus für Untersuchungen zur Wirkung einzelner Insektizide oder Fungizide verwendet, während es zu Wildbienen deutlich weniger Studien gibt [4].

Fungizide werden allgemein als für Bienen unschädlich eingestuft, obwohl ihre Wirkung auf Insekten nicht in gleichem Maße erforscht ist wie die der Insektizide [5]. Auf welche Weise Fungizide jedoch im Zielorganismus wirken, ist meist bekannt. Da einige Fungizide die Atmungskette in Pilzen hemmen, könnte eine ähnliche Wirkungsweise im Insekt zu negativen Effekten führen, weil durch das Stören der Atmungskette die nötige Energie für verschiedene Aktivitäten nicht bereitgestellt werden kann [6].

Die Mischung verschiedener PSM wird während der Zulassung meist nicht untersucht. Allerdings treten im Feld häufig Mischungen von beispielsweise Insektiziden und Fungiziden auf. Die verschiedenen PSM können sowohl in der Blüte als auch im eingelagerten Bienenbrot, mit dem die Larven gefüttert werden, aufeinandertreffen. Über die Gruppe der Sterol-Biosynthese inhibierenden Fungizide (SBI Fungizide) ist bereits bekannt, dass sie zwar gegenüber Honigbienen nur gering toxisch wirken, allerdings können sie in Kombination die Toxizität von Insektiziden um ein Vielfaches erhöhen, da SBI Fungizide den Entgiftungsmechanismus der Honigbienen modulieren können und dadurch der geregelte Abbau des Insektizids gestört wird [4]. Inzwischen ist das kombinierte Ausbringen von Neonikotinoiden und SBI Fungiziden in Deutschland verboten, da bereits derartige synergistische Effekte von Neonikotinoiden und SBI Fungiziden gezeigt wurden [7]. Welche Auswirkungen die Kombination aus Neonikotinoiden und Nicht-SBI Fungiziden auf Bienen hat, ist völlig unbekannt und soll deshalb im Rahmen dieses Projektes untersucht werden.

Die PSM, die in dieser Studie auf mögliche synergistische Effekte auf Honig- und Wildbienen untersucht werden sollen, werden zeitnah in die Rapsblüte gespritzt. Da Raps eine Massentracht für Honig- und Wildbienen darstellt, führt dieser Ansatz zu einer hohen Praxisrelevanz für die Bestäuber [8]. Es wurde das Insektizid Mospilan® (Nisso Chemical Europe GmbH, Düsseldorf, Germany) mit dem PSM-Wirkstoff Acetamiprid gewählt, da es das letzte in Deutschland noch zugelassene Neonikotinoid ist [9]. Als Ersatz für das mittlerweile verbotene Thiacloprid wird Acetamiprid vermutlich in den nächsten Jahren vermehrt verwendet werden. Als Fungizid wurde Cantus® Gold verwendet (ein Nicht-SBI Fungizid) (BASF SE, Ludwigshafen, Germany), da dessen PSM-Wirkstoffe Boscalid und Dimoxystrobin häufig im Bienenbrot nachgewiesen wurden [10]. Zu Projektbeginn gab es noch keine Daten zur kombinierten Wirkung dieser PSM auf Honig- und Wildbienen.

### 3 Aufgabenstellung

#### 3.1 Arbeitspaket 1: Auswirkungen von Insektizid-Fungizid-Mischungen auf die Mortalität und das Verhalten von Honigbienen und Hummeln im Labor und Freiland

In diesem Arbeitspaket wurde der Einfluss einer Insektizid- oder einer Fungizid-Behandlung sowie deren Mischung auf die Mortalität, die Empfindlichkeit für Zuckerwasser, die Kognition und das Flug- und Sammelverhalten von Honig- und Wildbienen untersucht.

Es wurde die Hypothese getestet, dass die Toxizität durch eine Insektizid-Fungizid-Mischung bei Honig- und Wildbienen höher ist als die der einzelnen PSM allein. Zudem wurde untersucht, ob unsere Verhaltensparadigmen, die die Empfindlichkeit für Zuckerwasser und die Kognition testen, auch geringe Effekte von einzelnen PSM oder deren Mischung aufdecken. Dadurch können Standard-Verhaltenstests zur Untersuchung von PSM-Wirkungen auf Bienen etabliert werden. Es wurde getestet, ob durch den kombinierten Stress durch ein Insektizid und ein Fungizid der Geschmack und das Lernverhalten von Honig- und Wildbienen negativ beeinflusst werden. Zudem wurden mögliche synergistische Effekte der Insektizid-Fungizid-Mischung auf das Flugverhalten untersucht.

**Erste Hypothese:** Das Überleben und das Verhalten von Honig- und Wildbienen kann durch synergistische Effekte zugelassener Insektizide und Fungizide beeinflusst werden, auch wenn die einzelnen PSM zu keinen negativen Auswirkungen führen.

**Zweite Hypothese:** Auch minimale negative Folgen von Insektiziden, Fungiziden oder deren Kombination auf das Verhalten von Honig- und Wildbienen können mit Hilfe unserer empfindlichen und realitätsnahen Verhaltensassays aufgedeckt werden, auch wenn die Stoffe bisher als bienenfreundlich eingestuft sind.

**Dritte Hypothese:** Die Sammelaktivität bzw. die Orientierung von Honigbienen und Hummeln wird während ihrer Lebenszeit durch subletale Insektizid- und Fungizid-Konzentrationen negativ beeinflusst.

#### 3.2 Arbeitspaket 2: Auswirkungen von Insektizid-Fungizid-Mischungen auf die Honigbienenentwicklung

Hier wurde untersucht, wie sich die Larvenentwicklung *in vitro* und die Morphologie der adulten Bienen nach Verfütterung von Insektizid, Fungizid und deren Kombination ändert.

**Vierte Hypothese:** Subletale Insektizid- und Fungizid-Konzentrationen führen zu negativen Effekten auf Larven und adulte Honigbienen (erhöhte Mortalität, geringere Körpergröße).

### 3.3 Arbeitspaket 3: Wirkung von Insektizid-Fungizid-Mischungen auf die Volksentwicklung und den Polleneintrag in neun realen Agrarlandschaften Bayerns mit unterschiedlicher Nutzungsin-tensität und Blüten-Ressourcen-Verfügbarkeit

Die Effekte der PSM-Kombinationen wurden auf standardisierte Volkseinheiten in neun realen Agrarlandschaften untersucht. Es wurden Landschaftsräume mit unterschiedlichen Anteilen von Ackerland und halbnatürlichen Habitatalementen ausgewählt, um die PSM-Effekte entlang eines Gradienten in der Nahrungsversorgung (Artenvielfalt von Pollen- und Nektarpflanzen) untersuchen zu können. Damit wurde die Hypothese untersucht, dass die Resilienz von Honigbienen gegenüber PSM durch eine gute Nahrungsversorgung erhöht wird.

**Fünfte Hypothese:** Die Volksvitalität in realen Landschaften wird durch Insektizid-Fungizid-Mischungen subletaler Dosen herabgesetzt.

**Sechste Hypothese:** Die Resilienz von Honigbienen-völkern gegenüber PSM wird durch eine gute Nahrungsversorgung (vielfältige Pollen- und Nektarquellen) erhöht.

## 4 Vorgehensweise

### 4.1 Planung und Ablauf der Arbeiten

Nach anfänglichen Anpassungen konnten wir den aktualisierten Zeitplan unseres Projektes gut einhalten (**Tabelle 1**).

**Tabelle 1:** Aktualisierter zeitlicher Ablauf des Projekts.

| Arbeitspakete (APs)                | Zeitlicher Ablauf |  |  |  |             |  |  |  |             |  |  |  |
|------------------------------------|-------------------|--|--|--|-------------|--|--|--|-------------|--|--|--|
|                                    | 02/20-12/20       |  |  |  | 01/21-12/21 |  |  |  | 01/22-01/23 |  |  |  |
| AP 1 Verhalten                     | 02/20-12/20       |  |  |  | 01/21-12/21 |  |  |  | 01/22-01/23 |  |  |  |
| A1 Mortalität                      |                   |  |  |  |             |  |  |  |             |  |  |  |
| A2 Empfindlichkeit f. Zuckerwasser |                   |  |  |  |             |  |  |  |             |  |  |  |
| A3 Kognition                       |                   |  |  |  |             |  |  |  |             |  |  |  |
| A4 Sammelverhalten                 |                   |  |  |  |             |  |  |  |             |  |  |  |
| AP 2 Larvalentwicklung             | 02/20-12/20       |  |  |  | 01/21-12/21 |  |  |  | 01/22-01/23 |  |  |  |
| A1 Larvenaufzucht <i>in vitro</i>  |                   |  |  |  |             |  |  |  |             |  |  |  |
| AP 3 Volksentwicklung              | 02/20-12/20       |  |  |  | 01/21-12/21 |  |  |  | 01/22-01/23 |  |  |  |
| A1 Volksentwicklung                |                   |  |  |  |             |  |  |  |             |  |  |  |
| A2 Pollenproben                    |                   |  |  |  |             |  |  |  |             |  |  |  |
| A3 Flugzeitenerfassung             |                   |  |  |  |             |  |  |  |             |  |  |  |

Die Mortalitätsstudien wurden nach den ersten Ansätzen 2020 auch im Jahr 2021 weiterfortgeführt, um alle Konzentrationen sowohl mit der Honigbiene als auch mit der Hummel zu testen. Auch die Tests zur Empfindlichkeit für Zuckerwasser wurden 2021 erweitert, da diese mit der Hummel deutlich mehr Zeit beanspruchten als geplant. Die Lernversuche konnten wie geplant ablaufen und auch die Experimente zum Sammelverhalten fanden wie vorgesehen jeden Sommer statt. Der Beginn dieser Versuche mit der Hummel musste jedoch etwas nach hinten verschoben werden, bis ein passendes Setup entwickelt wurde. Die Larvenaufzucht konnte

wie geplant stattfinden, wobei die Auswertung der Daten mehr Zeit beanspruchte als ursprünglich erwartet. Auch der Völkerversuch konnte planmäßig abgeschlossen werden. Um die auf Grund von Lieferengpässen fehlende Flugzeitenerfassung auszugleichen, wurden die Völkerschätzungen engmaschiger und genauer durchgeführt.

## 4.2 Übersicht der Pflanzenschutzmittel und derer Wirkstoffe

PSM werden zum Schutz vor Schädlingen, Unkraut, Pilzen oder anderen Schadorganismen eingesetzt. Man unterscheidet sie daher z.B. in Insektizide (gegen Insekten) oder Fungizide (gegen Pilze). Neben dem aktiven Wirkstoff beinhaltet das formulierte PSM noch weitere Beistoffe zur Optimierung seiner Wirkung. In einem PSM können ein oder mehrere aktive Wirkstoffe enthalten sein [11, 12].

Die in dieser Studie verwendeten PSM Cantus® Gold und Mospilan® wurden in der Regel als Formulierung getestet. Die Larvenaufzucht stellte eine Ausnahme dar. Hier wurden nur die aktiven Wirkstoffe betrachtet. Die Exposition bei Larven erfolgt im Gegensatz zu Versuchsansätzen mit adulten Tieren indirekt, da sie über einen Futtersaft ernährt werden, der von Ammenbienen produziert wird. Bei der Herstellung dieses Futtersaftes ist ein Filterungseffekt der PSM-Beistoffe möglich, wie es z.B. für in Pollen enthaltende sekundäre Pflanzen-Metabolite nachgewiesen wurde [13]. Trotzdem wurden PSM-Wirkstoffe im Futtersaft gefunden [14]. Um unter der Berücksichtigung des potenziellen Vorfilterungseffekts der Beistoffe eine realistische Aussage über den Einfluss auf die Larven tätigen zu können, wurden nur Wirkstoffe in dem für die Larvenaufzucht künstlich hergestellten Futtersaft betrachtet.

Eine Übersicht der verwendeten Substanzen ist in **Tabelle 2** dargestellt.

**Tabelle 2:** Übersicht der Pflanzenschutzmittel und aktiven Wirkstoffe.

| Anwendungsgebiet | Typ        | Pflanzenschutzmittel | Aktiver Wirkstoff          |
|------------------|------------|----------------------|----------------------------|
| Rapsanbau        | Insektizid | Mospilan®            | Acetamiprid                |
| Rapsanbau        | Fungizid   | Cantus® Gold         | Boscalid und Dimoxystrobin |

Die verwendeten Konzentrationen der PSM (bzw. der PSM-Wirkstoffe) wurden basierend auf Rückstandswerten aus dem Feld berechnet und sollten sich feldrealistischen Dosen annähern. Rückstände des Wirkstoffs Acetamiprid wurden bislang in Höhe von 71 µg/kg im Bienenbrot [15], 134 µg/kg im Pollen (USA) [16] und 72,5 µg/kg im Honig [17] nachgewiesen. Für Boscalid wurden Mengen im Bienenbrot von 503 µg/kg [15], im Pollen in der Konzentration 964 µg/kg (USA) [16] und im Honig in Höhe von 5 µg/kg [18] nachgewiesen. Dimoxystrobin wurde im Bienenbrot in der Dosis 487 µg/kg [15] und im Honig in der Konzentration 5 µg/kg [18] detektiert. Die für die entsprechenden Futterlösungen verwendeten Rückstände sind im Anhang

**Tabelle S 1** aufgeführt. Außerdem wurde neben der feldrealistischen Dosis in einigen Experimenten eine weitere Konzentration untersucht, die einer zehnfach höheren Dosis entsprach. Diese kann jedoch aus verschiedenen Gründen trotzdem als relevant und realistisch bezeichnet werden. In einzelnen Bienenbrot-Proben konnten bereits bis zu 25 verschiedene PSM

nachgewiesen werden, was dazu führt, dass Bienen in der Regel mit einer Vielzahl an Substanzen in Kontakt kommen. Diese Kombinationen können als gleichwertig mit den hohen Dosen einzelner PSM aus unseren Versuchen angesehen werden [19, 10, 20]. Zudem können Anwendungsfehler und stark schwankende Rückstandswerte eine höhere Dosis umweltrelevant machen. Auch der Standort der Bienenvölker oder der Hummelkolonien kann die Aufnahmemenge von bestimmten PSM stark beeinflussen, da in der direkten Nähe zu Rapsfeldern besonders Rapspestizide in großen Mengen aufgenommen werden [20, 10]. Zudem kann der Abbau der Wirkstoffe nach dem Ausbringen dazu führen, dass die Konzentration direkt nach dem Ausbringen deutlich höher war als anschließend im Labor nachgewiesen werden konnte [21].

Für eine eindeutige Kennzeichnung der Konzentrationen wird im Folgenden von feldrealistischer (fr) Dosis und zehnfach höherer Konzentration (fr\*10) gesprochen. Beide Dosen eignen sich hervorragend, um unsere Verhaltensassays zu testen.

Die Konzentrationen der verwendeten Futterlösungen wurden immer auf Basis von Rückstandswerten bei Honigbienen berechnet. Zudem stellte sich heraus, dass der Ansatz Rückstandswerte aus Honig anstelle von Pollen zu nutzen als erheblich realistischer für die Bienenexposition von PSM eingestuft werden kann: Nur Larven konsumieren durch den Futtersaft Pollen, weshalb die Aufnahme von PSM über den Nektar bzw. Honig für Verhaltensversuche mit adulten Tieren deutlich aussagekräftiger ist. Für die Larvenaufzucht und den Völkerversuch bleibt die Berechnung auf Basis von Rückstandswerten im Pollen jedoch realitätsnäher. Je nach Versuch wurden der tägliche Honig- bzw. Pollenkonsum einer Biene unter Beachtung der Fütterungsart (akut/chronisch) und geeignete Rückstandswerte in die Berechnungen mit einbezogen (siehe

**Tabelle S 1** im Anhang). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden für Honigbienen und Hummeln in ähnlichen Versuchsaufbauten die gleichen Berechnungen zu Grunde gelegt. Aus praktischen Gründen konnte für die Hummel in den Verhaltensversuchen immer nur die höhere Konzentration getestet werden.

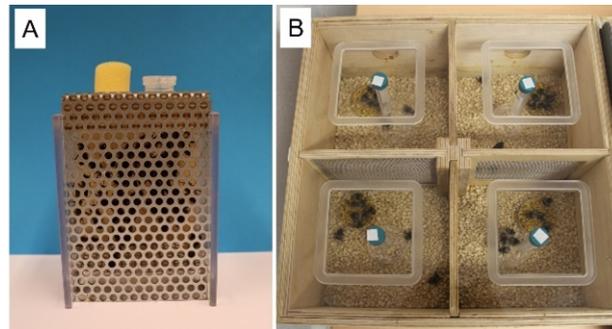
### **4.3 Arbeitspaket 1: Auswirkungen von einer Insektizid-Fungizid-Mischung auf die Mortalität und das Verhalten von Honigbienen und Hummeln im Labor und Freiland**

#### **4.3.1 Aufgabe 1: Mortalität von Honigbienen und Hummeln unter kombiniertem Stress durch Insektizid und Fungizid**

Um die Mortalität der Honigbienen und Hummeln unter kombiniertem Stress durch Insektizid und Fungizid zu untersuchen und um die berechneten Futterlösungen für die folgenden Versuche als geeignet definieren zu können, wurden Mortalitätsstudien durchgeführt. Dabei wurden die Honigbienen und Hummeln in vier Behandlungsgruppen aufgeteilt und in Käfige bzw. Brutboxen überführt (**Abbildung 1**). Die Futterlösungen wurden über präparierte Eppendorfgläser bzw. Zentrifugenröhrchen angeboten und täglich gewechselt. Die Behandlungsdauer betrug sieben Tage. Jeden Tag wurden tote Individuen gezählt und entfernt. Um eine erfolgreiche

Versuchsdurchführung gewährleisten zu können, wurde den Hummeln zusätzlich eine kleine Menge Pollen angeboten.

Die chronischen Behandlungen für die folgenden Verhaltenstests mit der Honigbiene wurden in der Regel auf die gleiche Art und Weise durchgeführt. Die Behandlung einer Hummelkolonie wird unter Punkt 4.3.2 erläutert.



**Abbildung 1:** A. Honigbienen in Käfig und B. Hummeln in Brutbox für Mortalitätsstudien. Über Futtergefäße wurde die entsprechende Futterlösung angeboten.

#### 4.3.2 Aufgabe 2: Empfindlichkeit für Zuckerwasser von Honigbienen und Hummeln unter kombiniertem Stress durch Insektizid und Fungizid

Für die chronische Behandlung einer Hummelkolonie musste zuerst eine geeignete Methode entwickelt werden. Da es bisher keine Untersuchungen mit Hummelkolonien gab, in denen vier verschiedene Behandlungen gleichzeitig stattfanden, war dies eine große Herausforderung. Die Vierteilung einer Kolonie war notwendig, da es zwischen einzelnen Kolonien große Unterschiede geben kann [22, 23]. Nachdem die Stammkolonie eine ausreichende Größe erreicht hatte, wurde die Anzahl der Arbeiterinnen und der Brutraum in vier annähernd gleiche Teile separiert. Diese konnten in einer geviertelten Box untergebracht werden (**Abbildung 2** (blau)). Die Königin wurde regelmäßig umgesetzt, um eine gleichmäßige Weiterentwicklung der Teilkolonien gewährleisten zu können. Jedes Viertel hatte Zugang zu einer Futterkammer, in der die entsprechende Futterlösung angeboten werden konnte (**Abbildung 2** (rot)). Die Fütterungsdauer einzelner Individuen konnte durch Farbmarkierungen auf dem Thorax der Hummeln überwacht werden. Die Brutbox befand sich während der gesamten Fütterungsdauer in Dunkelheit.



**Abbildung 2:** Neue Methode zur Vierteilung einer Hummelkolonie für die chronische Fütterung. Die vier neuen Brutkammern werden in blau gezeigt. Sowohl Arbeiterinnen als auch Brut wurden gleichmäßig auf die Viertel verteilt. In

rot sind die Futterkammern markiert. Jede Teilkolonie hat Zugang zu einer Futterkammer, in der die Futterlösung angeboten werden kann. In den Brutkammern herrscht während der Fütterungsdauer Dunkelheit.

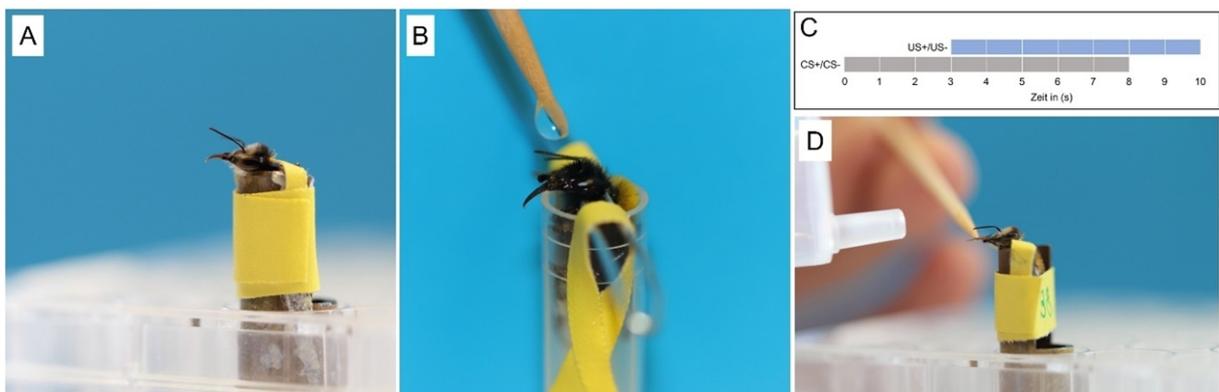
Nach der chronischen Behandlung mit den entsprechenden Futterlösungen (Kontrolle, Insektizid, Fungizid, Mischung) wurden die Honigbienen und Hummeln in geeignete Halterungen eingespannt (**Abbildung 3A und B**). Anschließend wurde der Test zur Empfindlichkeit für Zuckerwasser durchgeführt. Die Antennen der Tiere wurden mit einer aufsteigenden Reihe von Zuckerwasser-Konzentration berührt. Es wurde notiert, ob die Tiere auf die Stimulation mit der Lösung mit einer Rüsselstreckantwort (PER) reagierten.

### 4.3.3 Aufgabe 3: Kognitive Fähigkeiten von Honigbienen und Hummeln unter kombiniertem Stress durch Insektizid und Fungizid

#### 4.3.3.1 Laborlernen Honigbiene

Für die Lernversuche mit der Honigbiene im Labor wurden die Tiere chronisch im Käfig gefüttert (Kontrolle, Insektizid, Fungizid, Mischung) und anschließend in Halterungen eingespannt (siehe 4.3.2). Für die differentielle Konditionierung wurde ein mit Zuckerwasser belohnter und ein mit Chinin bestrafter Duft verwendet. Die Düfte wurden dem immer gleichen Schema folgend im Wechsel angeboten (**Abbildung 3C und D**).

Zuerst wurde der Duft allein für drei Sekunden an den Antennen angeboten. Anschließend fand die gleichzeitige Stimulation mit Duft und Belohnung/Bestrafung für fünf Sekunden statt. Falls die Honigbiene in diesem Zeitraum eine PER zeigte, durfte sie im Anschluss weitere zwei Sekunden von der entsprechenden Lösung trinken. Jeder Duft wurde fünfmal präsentiert, bevor die Duftstimuli für das Umlernen getauscht wurden. Das Umlernen wurde nach dem gleichen Protokoll wie der Lerndurchgang durchgeführt.



**Abbildung 3:** Fixierte **A.** Honigbiene und **B.** Hummel, die auf die Stimulation der Antennen mit Zuckerwasser eine Rüsselantwort (PER) zeigen. **C.** Zeitlicher Ablauf der differentiellen Konditionierung. Konditionierter Stimulus (CS+ (belohnter Duft)/CS- (bestrafter Duft)) und unkonditionierter Stimulus (US+ (Belohnung)/US- (Bestrafung)) wurden nach einem genauen Protokoll präsentiert. **D.** Die fixierte Biene erfährt die gleichzeitige Stimulation mit dem konditionierten Stimulus (Duft) und dem unkonditionierten Stimulus (Lösung) und antwortet mit einer PER.

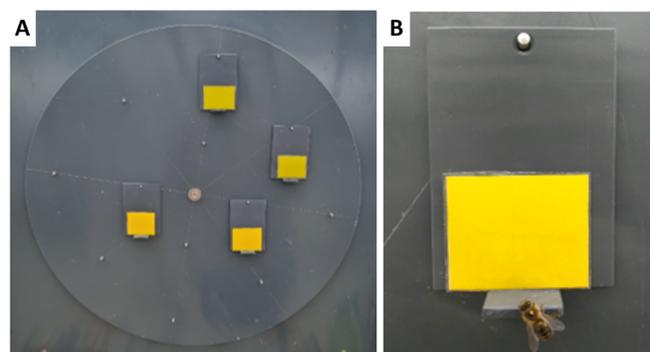
#### 4.3.3.2 Freifluglernen Honigbiene

Das Lernvermögen der Bienen unter PSM-Einfluss wurde auch bei frei fliegenden Tieren getestet. Hierfür wurden die Bienen akut mit der täglichen Aufnahmemenge der PSM (Kontrolle, Insektizid, Fungizid, Mischung) mit einer fr\*10 Konzentration gefüttert. Diese kann in

**Tabelle S 1** im Anhang eingesehen werden. Alle Bienen stammten aus einem Volk, daher war eine chronische Fütterung nicht möglich. Der Versuch war sehr zeitaufwändig, da die Trainingszeit pro Biene mehrere Stunden betrug. Somit konnten maximal zwei Bienen pro Tag getestet werden. Die Behandlung wurde in Zuckerwasser gelöst verabreicht und die markierten Bienen für 20 Minuten gekäfigt, damit die Wirkstoffe verdaut und nicht bei der Rückkehr ins Volk an die anderen Bienen weitergegeben wurden. Als die Bienen freigelassen wurden, flogen sie ins Volk zurück. Nach Rückkehr der Bienen zum Trainingsort begann das Lernparadigma.

Die Bienen wurden mit Hilfe eines Rotating Screens (**Abbildung 4A**) differentiell auf zwei sehr ähnliche Gelbtöne konditioniert. Hierbei wurde ein Gelbton mit Zuckerwasser belohnt und der andere mit einer bitteren Chininlösung bestraft. Diese wurden auf der Landeplattform der Hänger angeboten (**Abbildung 4B**). Die Honigbiene wurde nach dem Probieren der Chininlösung (taucht nur kurz die Zunge in den Tropfen) oder Aufnahme der Zuckerlösung mit einem weiteren Zuckertropfen auf einen Löffel gelockt und vom Screen weggehoben. Während sie auf dem Löffel saß, wurde der Zuckertropfenhänger wieder aufgefüllt und der Rotating Screen gedreht. Die Hänger haben somit ihre Position vollständig verändert und richten sich immer automatisch mit der Landeplattform senkrecht nach unten aus. Das Erlernen einer bestimmten Position wurde somit ausgeschlossen. Dann wurde die Biene vom Löffel abgeschüttelt und durfte einen neuen Anflug auf den Screen vornehmen. Wenn sie genug Zuckerwasser aufgenommen und zum Bienenvolk zurückgekehrt war, wurden alle Hänger mit Ethanol von möglichen Duftmarkierungen gereinigt und mit neuen Chinin- und Zuckerwassertropfen bestückt.

Nach 30 Entscheidungen der Biene wurde der Lerntest durchgeführt. Hierbei wurden die Hänger mit den gleichen Farben angeboten, dieses Mal jedoch ohne Zuckerwasser und Chininlösung. Es wurden 20 angeflogene Farben aufgenommen. Danach startete die Umlernphase: Die belohnte und unbelohnte Farbe wurde getauscht und die Bienen mussten innerhalb von weiteren 30 Entscheidungen umlernen [24]. Danach wurde ebenfalls ein Test mit 20 Anflügen durchgeführt.



**Abbildung 4:** Differenzielle Konditionierung von Honigbienen und Umlernen unter PSM-Einfluss. **A.** Rotating Screen mit sehr ähnlichen Gelbtönen (obere zwei Hänger hellgelb, untere zwei Hänger dunkelgelb). Die Position der Hänger

kann durch die verschiedenen Aufhängungen und Drehen des Screens beliebig verändert werden. Hierbei richteten sich die Landeplattformen automatisch zum Boden aus. **B.** Auf den Landeplattformen wurde jeweils ein Gelbtön entweder belohnt (Zuckerlösung) oder bestraft (bittere Chininlösung). Die Biene sollte lernen, die Gelbtöne zu unterscheiden.

#### 4.3.3.3 Freifluglernen Hummel

Das Lernverhalten der Hummeln wurde in einer Flugarena untersucht. Für die chronische Behandlung vor Versuchsstart wurde die Hummelkolonie in vier Teile geteilt (siehe 4.3.2) und mit der jeweiligen Lösung (Kontrolle, Insektizid, Fungizid, Mischung) gefüttert.

Anschließend wurden die Hummeln in einer Arena differentiell auf zwei Blautöne (türkis und blau) trainiert. Zunächst wurde die Farbpräferenz der Hummeln bestimmt und anschließend die nicht-präferierte Farbe mit Zuckerwasser belohnt, während die präferierte Farbe mit Wasser bestraft wurde. Sobald die erste belohnte Farbe angefliegen wurde, wurden die folgenden 30 Anflüge notiert. Die Hummeln sollten lernen, die beiden Farbtöne voneinander zu unterscheiden.

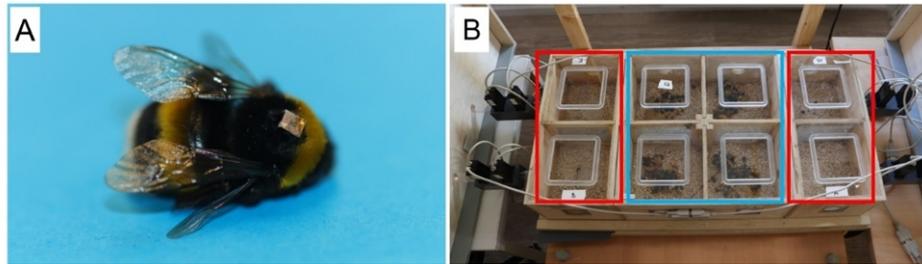
#### 4.3.4 Aufgabe 4: Sammelverhalten von Honigbienen und Hummeln unter kombiniertem Stress durch Insektizid und Fungizid

Auswirkungen der PSM-Behandlung auf das Sammelverhalten der Bienen, wurden mit Hilfe der RFID (radio frequency identification)-Technologie untersucht. Auf dem Thorax frisch geschlüpfter Bienen wurde dazu ein kleiner RFID-Tag befestigt (**Abbildung 5A**). Anschließend wurden die Bienen in Käfige überführt, sodass die Fütterung im Volk stattfand (**Abbildung 5B**). Nach einer Woche wurden die Bienen in das Volk entlassen. Die Flugaktivität der Honigbienen wurde durch zwei Scanner am Stockeingang aufgenommen (**Abbildung 5C**).



**Abbildung 5:** **A.** Junge Biene mit RFID-Tag. **B.** Käfige wurden für die Fütterungsdauer im Volk platziert, um die Akzeptanzrate zu steigern. **C.** Scanner-Paare zur Aufnahme der Flugaktivität der Honigbienen am Stockeingang.

Das Sammelverhalten der Hummeln wurde ebenfalls mit RFID untersucht. Die Versuche fanden in einer Flugarena statt. Zunächst wurde die Hummelkolonie geteilt (siehe 4.3.2), um die vier Behandlungsgruppen zu ermöglichen. Dann wurden Sammlerinnen abgefangen und mit einem RFID-Tag beklebt (**Abbildung 6A**). Vor dem Eingang zur Flugarena wurden die Scanner installiert. Jede Teilkolonie hatte über die Futterkammer unbegrenzt Zugang zur Flugarena, in der die Futterlösungen dauerhaft angeboten wurden (**Abbildung 6B**).



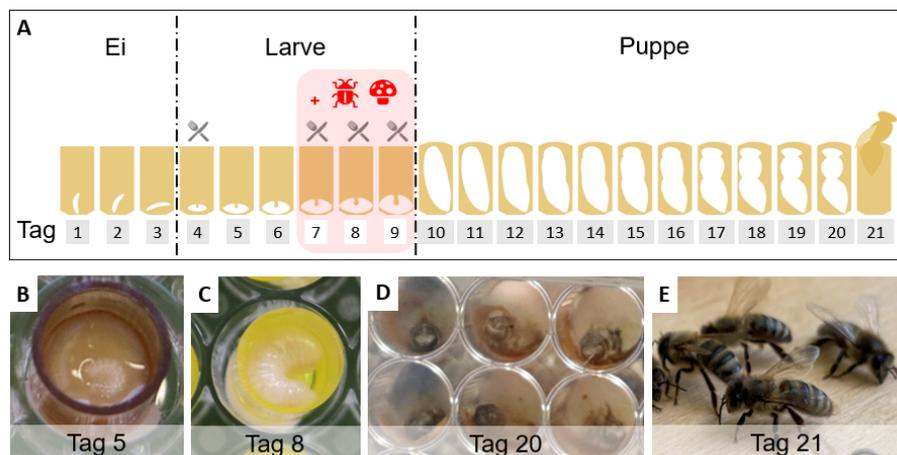
**Abbildung 6:** **A.** Mit einem RFID-Tag beklebte Hummel. **B.** Aufbau des RFID-Versuchs: Die Stammkolonie wurde auf die vier Brutkammern (blau) aufgeteilt. Jede Teilkolonie hatte über die Futterkammern (rot) Zugang zur Flugarena, in der die Futterlösungen angeboten wurden. Am Zugang zur Flugarena wurden die Scanner-Paare angebracht, um die Hummeln zu erfassen.

#### 4.4 Arbeitspaket 2: Auswirkungen von Insektizid-Fungizid-Mischungen auf die Honigbienenentwicklung

Es wurden Honigbienen kontrolliert *in-vitro* per Hand im Labor aufgezogen. Hierbei erhielten sie PSM-Wirkstoffe mit der Zielsetzung deren potenzielle Einflüsse auf die Entwicklung, sowie Gewicht und Größe der Tiere zu untersuchen.

##### *In-vitro* Larvenaufzucht

Die Methode der *in-vitro* Larvenaufzucht ist leicht abgewandelt von Schmehl et al. [25] in unserem Labor gut etabliert. Eine Übersicht über die Honigbienenentwicklung, sowie Fotos in den verschiedenen Stadien sind in **Abbildung 7A - E** dargestellt.



**Abbildung 7:** **A.** Entwicklung einer Honigbiene in der *in-vitro* Larvenaufzucht. An Tag 1-3 waren die Eier auf dem Jenter-Zuchtsystem. Die Larven wurden an Tag 4 in Nicot-Näpchen auf Larvenplatten (48-Well-Plates) mit vier Futter-Events (Tag 4, 7, 8 und 9) umgesetzt, wobei die letzten drei PSM-Wirkstoffe enthielten. Als Streckmade (Tag 10) wurden die Larven in Puppenplatten zur weiteren Entwicklung umgesetzt. Der Schlupf erfolgte an Tag 21. **B.** Larve kurz nach dem Umsetzen an Tag 5, **C.** Larve kurz vor der Streckung an Tag 8, **D.** Bienen kurz vor dem Schlupf an Tag 20 und **E.** Geschlüpfte Bienen an Tag 21.

Bienenköniginnen aus gesunden Völkern wurden auf das Jenter-Zuchtsystem gekäfigt. Dies ist ein Käfig, welcher in Bienenwaben integriert werden kann und herausnehmbare Einsteckzellen enthält. Auf diese wurden die Eier gelegt und konnten entnommen werden. Die Einsteckzellen wurden entnommen und bis zum Schlupf in einer Klimakammer unter konstanten Bedingungen (35°C) gehalten. Die an Tag 4 geschlüpften Larven wurden individuell in Nicot-Weiselnapfchen umgesetzt und auf 48-Well-Plates („Larvenplatten“) angeordnet. Das Umsetzen erfolgte in die bereits in die Weiselnapfchen eingefüllte erste Futterlösung (20 µl Futtermischung A, siehe **Tabelle 3**). Die nächsten Futterevents fanden an Tag 7-9 (30-50 µl Futtermischung C1-C3 mit PSM-Wirkstoffzusatz, siehe **Tabelle 3**) statt. Die Entwicklung der Larven erfolgte im Brutschrank bei konstanter Luftfeuchte von 94%.

Nach Aufnahme der letzten Futtermischung und Streckung der Larven im Alter von 9 Tagen wurden diese in frische Nicot-Weiselnapfchen auf neue 48-Well-Plates („Puppenplatten“) umgesetzt. Dies entspricht dem Alter, ab dem die Zellen der Larven in einem Honigbienenvolk verdeckelt und nicht weiter gefüttert werden. Die Larven verblieben während ihrer Verpuppung (**Abbildung 7D**) bis zum Schlupf auf den Puppenplatten. Die Verpuppungsperiode erfolgte in einem Brutschrank bei 75% Luftfeuchte. Die Honigbienen schlüpften an Entwicklungstag 21 (**Abbildung 7E**) und wurden anschließend in Käfige gemeinsam mit Tieren aus der gleichen Behandlungsgruppe umgesetzt. Die Tiere erhielten von diesem Zeitpunkt an 50%iges Zuckerwasser *ad libitum*. Nachdem 80% der adulten Tiere in einem Käfig verstorben waren, wurde der entsprechende Versuchsdurchlauf beendet.

### Datenerhebung

Die Tiere wurden engmaschig begleitet und tote Individuen während der Entwicklung und im adulten Stadium täglich notiert und entfernt. Zudem wurden die Bienen direkt nach dem Schlupf gewogen. Nach Beendigung des Versuchs wurde zusätzlich der Intertegularabstand (Flügelabstand) vermessen. Visuelle Anomalien konnten nicht festgestellt werden.

### Behandlungsgruppen und Fütterungsmanagement

Es wurden fünf Behandlungen in mehrfachen Replikaten durchgeführt. Die Behandlungen enthielten den isolierten PSM-Wirkstoff und wurden folgendermaßen durchgeführt:

- Insektizid (Acetamiprid als alleiniger Wirkstoff)
- Fungizid (Boscalid und Dimoxystrobin als alleinige Wirkstoffe)
- Mischung (Boscalid, Dimoxystrobin, Acetamiprid als alleinige Wirkstoffe)
- Wasserkontrolle
- Acetonkontrolle

Die alleinigen PSM-Wirkstoffe sind schlecht wasserlöslich und mussten somit in Aceton vorgelöst werden. Die Kontrollgruppe für die Wirkstoffbehandlungen wurde mit der gleichen Menge Aceton versetzt. Zudem gab es eine Wasserkontrolle, um potenzielle negative Effekte durch das zugesetzte Aceton ausschließen zu können.

Die Larven wurden im Alter von vier bis neun Tagen mit einer auf ihren Entwicklungszustand angepassten Futterlösung (A, B und C) mit ansteigender Menge gefüttert (leicht abgewandelt nach Schmehl et al. [25]). Die Wirkstoffe waren ab dem zweiten Fütterungstag enthalten (siehe

**Tabelle 3, Abbildung 7A).** Die jeweilige Konzentration orientiert sich an einer 10-fach höheren Dosis als feldrealistisch und ist in

**Tabelle S 1** im Anhang dargestellt. Dies simuliert das Eintreten von Anwendungsfehlern. Zudem können die in diesem Versuch verwendeten Wirkstoffe eine ähnliche Wirkweise wie weitere Wirkstoffe besitzen, welche durch Bienen in das Volk eingetragen, in diesem Versuch jedoch nicht berücksichtigt wurden. Die Ergebnisse einer 10-fach höheren Dosierung besitzen somit eine hohe Praxisrelevanz.

**Tabelle 3:** Fütterungsplan, abgeleitet von Schmehl et al. [25]; sowie Inhalt der verwendeten Futtermischungen (A, B und C).

| Larvenalter [Tag] | Futtermischung | Menge | Inhalt                           |
|-------------------|----------------|-------|----------------------------------|
| 4                 | A              | 20 µl | Futterlösung A                   |
| 6                 | B              | 20 µl | Futterlösung B und PSM-Wirkstoff |
| 7                 | C1             | 30 µl | Futterlösung C und PSM-Wirkstoff |
| 8                 | C2             | 40 µl | Futterlösung C und PSM-Wirkstoff |
| 9                 | C3             | 50 µl | Futterlösung C und PSM-Wirkstoff |

#### 4.5 Arbeitspaket 3: Wirkung von Insektizid-Fungizid-Mischungen auf die Volkentwicklung und den Polleneintrag in 9 realen Agrarlandschaften Bayerns mit unterschiedlicher Nutzungsintensität und Blüten-Ressourcen-Verfügbarkeit

Mitte Juni 2021 wurden 36 Bienenvölker in Zanderbeuten etabliert, jeweils vier Völker an insgesamt neun Standorten. Bis 2022 wurde die Wirkung der PSM auf die Völker untersucht.

##### Auswahl der Landschaften

Die Umgebung im Umkreis von 100 km um Würzburg wurde im Programm QGis systematisch auf Landschaftskategorien untersucht: Ausgeräumte, mittlere und eingeräumte Standorte. In jeder Kategorie befanden sich drei unabhängige Standorte. Hierbei wurde der Radius von zwei Kilometern um einen potenziellen Standort ausgewertet. In einer vorhergehenden Studie wurden mehr als 96% der Sammelflüge für diesen Radius dekodiert [26].

Die Standorte wurden mit sinkenden Agrarflächenanteilen und steigenden Blühflächenanteilen selektiert. Ausgeräumte Landschaften wurden mit dem Fokus auf große Agrarflächen ausgewählt (**Abbildung 8**). Somit ergab sich eine hohe Habitathomogenität. Eingeräumte Landschaften sind hingegen durch viele kleinstrukturierte Flächen mit deutlich weniger Agraranteilen charakterisiert. Diese Standorte hatten eine hohe Habitatheterogenität. Die mittlere Kategorie lag zwischen der ausgeräumten und eingeräumten Landschaftskategorie.

Dies ermöglichte uns die Untersuchung von PSM Effekten in verschiedenen Landschaftskategorien mit unterschiedlichem Qualitätsgradienten bezüglich der Nahrungsversorgung (Artenvielfalt von Pollen- und Nektarpflanzen). Wir wollten hiermit die Hypothese testen, ob eine gute Nahrungsmittelversorgung die Resilienz von Honigbienen gegenüber PSM erhöht [27].



**Abbildung 8:** Beispiele der Landschaftsprofile im Völkerversuch. In weiß sind Agrarflächen dargestellt. Einteilung in Landschaftskategorien: „ausgeräumt“ (viele große Agrarflächen), „mittel“ und „ingeräumt“ (wenig Agrarflächen, viele kleine andere Flächenanteile)

### Behandlung mit PSM

An jedem der neun Standorte wurden Mitte Juni 2021 jeweils vier Völker durch 2 kg schwere Kunstschwärme etabliert. Die Königinnen waren alle Schwestern (Carnica Reinzucht) aus dem Jahr 2020. Ab Juli wurden die Bienenvölker für sechs Wochen mit PSM behandelt.

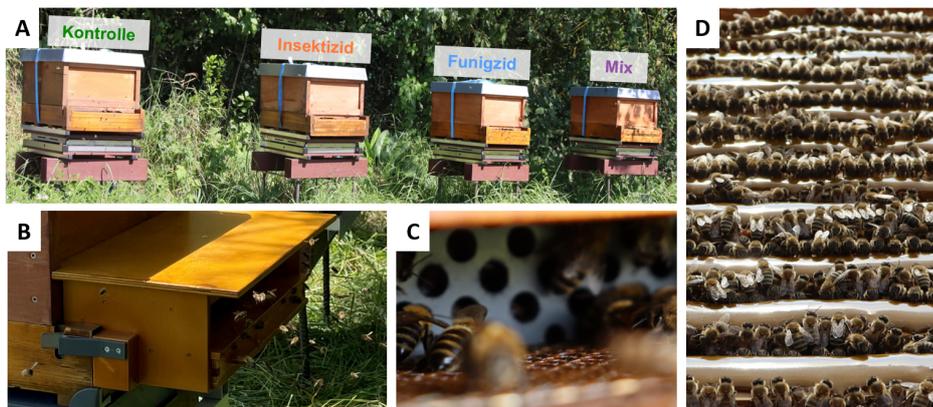
Die PSM wurden über eine individuelle Fütterung der Völker den Bienen zugeführt: Kontrolle (keine PSM-Zusätze), Insektizid (PSM Mospilan mit dem aktiven Wirkstoff Acetamiprid), Fungizid (PSM Cantus Gold mit den aktiven Wirkstoffen Boscalid und Dimoxystrobin) und der Mischung (PSM Mospilan und Cantus Gold). Die Zuteilung der Behandlungsart erfolgte zufällig für jeden Standort (Beispiel in **Abbildung 9A**). Als Grundlage für die feldrealistisch konzentrierte Fütterung wurden gefundene Rückstände im Pollen verwendet (siehe

**Tabelle S 1** im Anhang).

Für maximal realistische Bedingungen wurde unsere Behandlung mit dem jeweiligen Eigenpollen der Völker verabreicht. Hierbei wurde ein Pollenbrei angesetzt und auf die nachgewiesene Konzentration angereichert. Er enthielt 40% Eigenpollen, 25% Puderzucker und 35% Zuckerlösung (Apiinvert), wobei die Zielkonzentration durch die in der Zuckerlösung gelösten

PSM erreicht wurde. Der Pollen wurde mit Pollenfallen gesammelt (**Abbildung 9B**), wobei das Flugloch des Bienenvolkes mit einem Lochgitter (**Abbildung 9C**) versehen und die Pollenhörschen beim Durchschreiten abgestreift wurden. Diese fielen durch ein Bodengitter in eine Schublade und konnten entnommen werden. Nach Ansetzen des Behandlungs-Pollenbreis wurde dieser auf die Oberträger der Rähmchen in den Völkern aufgetragen (**Abbildung 9D**). Nach drei Tagen war die Fütterung von den Bienen vollständig aufgenommen worden.

Die Völker erhielten somit, angepasst an die eigene Volksstärke sowie die Pollenverfügbarkeit am Standort, passende totale Mengen an PSM, während die Grundbelastung (Konzentration der PSM im Pollenbrei) für alle identisch war. Es war uns somit möglich, mit unserem Versuchsdesign maximal auf die individuellen Völker und die jeweiligen Standorte einzugehen.



**Abbildung 9:** **A.** Beispielhafte Aufteilung der Behandlungsarten (Kontrolle, Insektizid, Fungizid und Mischung) an einem Standort. **B.** Pollenfall vor einem Volk mit **C.** Lochgitter, damit die Pollenhörschen beim Durchschreiten abgestreift werden und in die darunter befindliche Schublade fallen. **D.** Fütterung der Pflanzenschutzmittel in einem mit PSM angereicherten Pollenbrei aus dem volkeigenen Pollen durch Auftragen auf die Oberträger der Rähmchen.

### Datenerhebung und Völkerführung

Für die Bestimmung der Pollenressourcen per Pollenmetabarcoding und der PSM-Rückstände der jeweiligen Standorte wurden Pollenproben verwendet. Diese wurden während der PSM-Fütterungszeit jeden dritten Tag über einen Zeitraum von sechs Wochen (Mitte Juli bis Ende August 2021) von jedem Volk genommen und bei -20°C gelagert.

Zu Beginn und während der PSM Fütterung fanden vier Völkerschätzungen in zweiwöchentlichem Abstand statt. Nach der Behandlungsphase wurden weitere drei Völkerschätzungen im gleichen Intervall vorgenommen. Hierbei wurde jedes Rähmchen gezogen und der Inhalt anhand der Liebefelderschätzmethode erhoben: Die Wabe wurde durch Auflegen eines Gitters (leeres Hilfsrähmchen mit Schnüren) in acht gleichgroße Einheiten geteilt, was eine konsistente Orientierung bei der Schätzung von verdeckelter Brut, Honig und Nektar ermöglichte.

Jedes Volk stand auf einer eigenen Stockwaage (Apigraph 4.0 von Wolfwaagen). Diese erfasste das Gewicht laufend in fünf-Minutenintervallen und sendete die Gewichte gemeinsam

mit Luftfeuchte- und Temperaturdaten an das dazugehörige Onlineportal. Hier standen die Daten immer aktuell zum Download bereit.

Die Völker wurden im September für den Winter aufgefüttert, sowie mit Ameisensäure per Nassenheider Verdunster gegen die Varroamilbe behandelt. Eine Restentmilbung mit Oxal-säure, sowie die Erfassung der Volksstärke fand im Dezember statt.

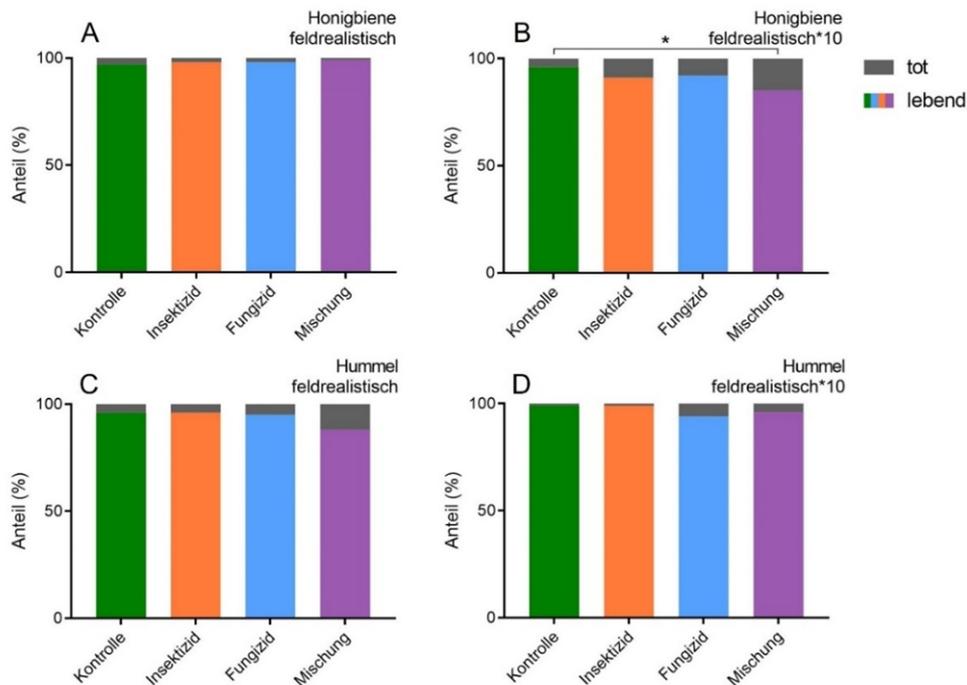
## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Arbeitspaket 1: Auswirkungen von einer Insektizid-Fungizid-Mischung auf die Mortalität und das Verhalten von Honigbienen und Hummeln im Labor und Freiland

#### 5.1.1 Aufgabe 1: Mortalität von Honigbienen und Hummeln unter kombiniertem Stress durch Insektizid und Fungizid

Die Mortalitätsdaten der Honigbienen und Hummeln werden in **Abbildung 10A-D** dargestellt. Die Überlebensrate der Hummeln war für beide in den Verhaltenstests untersuchten Konzentrationen sehr hoch. Es wurden keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrolle festgestellt. Bei den Mortalitätsstudien mit der Honigbiene wurde ein synergistischer Effekt durch die höhere Konzentration deutlich, da im Vergleich zur Kontrolle mehr Mix-Tiere starben. Die Überlebensraten waren dennoch recht hoch, weshalb sich die hier verwendeten Konzentrationen hervorragend für weitere Experimente zur Untersuchung subletaler Effekte eigneten.

Die weitere Untersuchung dieser Konzentrationen ist zudem notwendig und auch Ziel dieser Studie, da während der Zulassung meist nur Mortalitätsdaten beachtet werden. Sollten jedoch keine Unterschiede in der Mortalität auftreten, aber subletale Effekte sichtbar werden, könnte die Anwendung bestimmter zugelassener PSM zu weitreichenden negativen Auswirkungen auf Bestäuber führen.



**Abbildung 10:** Überlebensraten der **A, B.** Honigbienen ( $n_{fr} = 100/\text{Behandlung}$ ;  $n_{fr*10} = 100/\text{Behandlung}$ ) und **C, D.** Hummeln ( $n_{fr} = 80/\text{Behandlung}$ ;  $n_{fr*10} = 80/\text{Behandlung}$ ). Die Überlebensrate der Bienen war sowohl bei der Behandlung mit der feldrealistischen Konzentration als auch bei der Fütterung mit der zehnfach höheren Dosis hoch. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrolle konnten nur bei der höheren Konzentration im Versuch mit der Honigbiene festgestellt werden (Fisher's Exact Test für paarweise Vergleiche, Honigbiene: fr:  $p_{\text{Kontrolle vs Insektizid}} > 0,017$ ;  $p_{\text{Kontrolle vs Fungizid}} > 0,017$ ;  $p_{\text{Kontrolle vs Mischung}} > 0,017$ ; fr\*10:  $p_{\text{Kontrolle vs Insektizid}} > 0,017$ ;  $p_{\text{Kontrolle vs Fungizid}} > 0,017$ ;  $p_{\text{Kontrolle vs Mischung}} < 0,017$  (\*) (angepasste p-Werte auf Grund Mehrfachvergleiche:  $p < 0,017$  (\*),  $p < 0,003$  (\*\*),  $p < 0,0003$  (\*\*\*)); Hummel: fr:  $p_{\text{Kontrolle vs Insektizid}} > 0,017$ ;  $p_{\text{Kontrolle vs Fungizid}} > 0,017$ ;  $p_{\text{Kontrolle vs Mischung}} > 0,017$ ; fr\*10:  $p_{\text{Kontrolle vs Insektizid}} > 0,017$ ;  $p_{\text{Kontrolle vs Fungizid}} > 0,017$ ;  $p_{\text{Kontrolle vs Mischung}} > 0,017$ ).

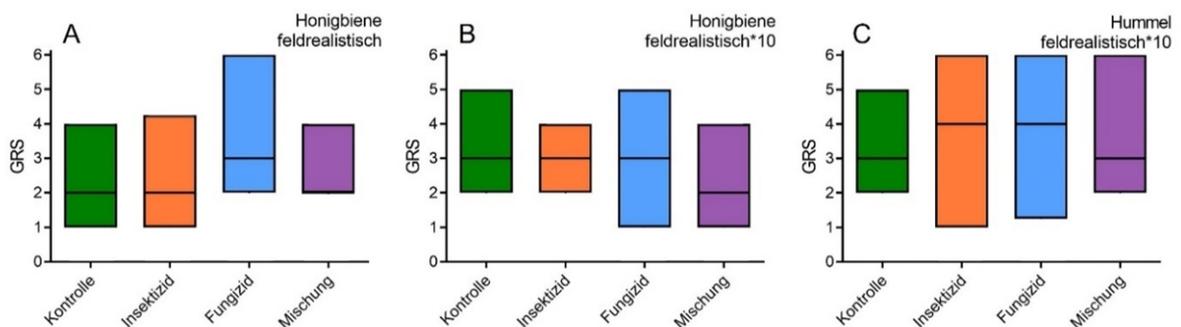
Informationen zur Veröffentlichung der Daten aus Kapitel 5.1.1 sind unter 8. Veröffentlichungen zu finden.

### 5.1.2 Aufgabe 2: Empfindlichkeit für Zuckerwasser von Honigbienen und Hummeln unter kombiniertem Stress durch Insektizid und Fungizid

Die Reaktionsbereitschaft gegenüber Zuckerwasser wies sowohl bei den Honigbienen (**Abbildung 11A, B**) als auch bei den Hummeln (**Abbildung 11C**) keine Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Zur Analyse wurde der gustatory response score (GRS) ausgewertet, der die Summe aller Reaktionen auf die verschiedenen Zuckerwasser-Konzentrationen darstellt. Aus praktischen Gründen wurden bei den Honigbienen nur Individuen betrachtet, die anschließend

konditioniert wurden. Bei den Hummeln wurden alle Tiere eingeschlossen, die auf ihre Reaktionsbereitschaft gegenüber Zuckerwasser getestet wurden.

Da die Empfindlichkeit für Zuckerwasser eine große Rolle bei der Bewertung von Nektarquellen spielt, ist sie eine bedeutende Eigenschaft der Bienen [28, 29]. Ein negativer Effekt der PSM auf diese Fähigkeit könnte zu direkten Folgen für Individuen führen, da pro Sammelflug weniger aufgenommen wird. Es könnte aber auch Auswirkungen auf das gesamte Volk bzw. die Kolonie nach sich ziehen, da die Sammeleffektivität und damit der Eintrag durch die Arbeiterinnen deutlich sinken würde. Die Versuche dieser Studie zeigten keine negativen Effekte auf die Empfindlichkeit für Zuckerwasser, jedoch können Effekte im Feld aufgrund weiterer Stressoren und abweichender Konzentrationen nicht gänzlich ausgeschlossen werden.



**Abbildung 11: A, B.** Gustatory response scores (GRS) der Honigbienen nach chronischer Behandlung mit der feldrealistischen oder der zehnfach höheren Konzentration. Es wurde kein Behandlungs-Effekt sichtbar (Kruskal-Wallis Test, Honigbiene:  $p_{fr} > 0,05$ ;  $p_{fr*10} > 0,05$ ) (fr:  $n_{Kontrolle}$ : 44,  $n_{Insektizid}$ : 46,  $n_{Fungizid}$ : 41,  $n_{Mischung}$ : 39; fr\*10:  $n_{Kontrolle}$ : 52,  $n_{Insektizid}$ : 48,  $n_{Fungizid}$ : 43,  $n_{Mischung}$ : 45). **C.** GRS der Hummeln nach chronischer Behandlung. Es wurde kein Effekt der Behandlung sichtbar (Kruskal-Wallis Test, Hummel:  $p_{fr*10} > 0,05$ ) ( $n_{Kontrolle}$ : 104,  $n_{Insektizid}$ : 104,  $n_{Fungizid}$ : 112,  $n_{Mischung}$ : 103).

Informationen zur Veröffentlichung der Daten aus Kapitel 5.1.2 sind unter 8. Veröffentlichungen zu finden.

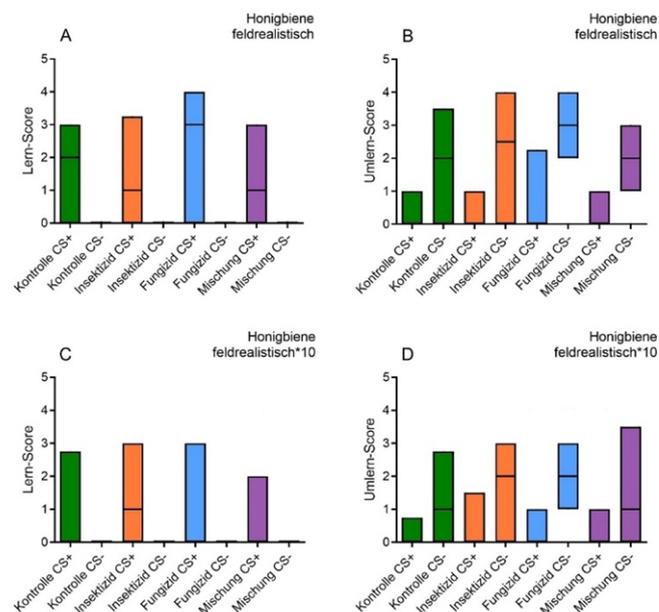
### 5.1.3 Aufgabe 3: Kognitive Fähigkeiten von Honigbienen und Hummeln unter kombiniertem Stress durch Insektizid und Fungizid

#### 5.1.3.1 Laborlernen Honigbiene

Um in einem komplexen Labor-Experiment die kognitiven Fähigkeiten der Honigbienen zu testen, wurde ein Lernversuch mit anschließendem Umlernen genutzt. Es wurde deutlich, dass die Tiere in der Lage waren die Verknüpfung zwischen einem Duft und einer Zuckerwasser-Belohnung zu erlernen, was an den Lern-Scores zu erkennen ist. Die Honigbienen reagierten häufiger auf den belohnten Duft (CS+) als auf den bestrafte Duft (CS-). Ein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen beider Konzentrationen und der Kontrolle konnte dabei nicht festgestellt werden (**Abbildung 12A und C**). Die Honigbienen waren auch in der Lage nach der Konditionierung umzulernen, selbst wenn die Umlern-Scores keine komplette Umkehr der Antworten auf die Düfte zeigten. Es ist jedoch zu erkennen, dass die Anzahl der Antworten auf

den neu belohnten Duft (jetzt CS+, zuvor CS-) anstiegen. Auch beim Umlernen wurden keine Effekte der Behandlungen deutlich (**Abbildung 12B und D**).

Im Feld ist eine gute Lernleistung der Bienen enorm wichtig, da dadurch die Sammelleistung bzw. der Sammelerfolg gesteigert werden kann. Bienen sind in der Lage sich Eigenschaften von verschiedenen Blüten, wie die Farbe oder den Duft, zu merken und die Informationen über geeignete Futterquellen auch an Artgenossen weiterzugeben [30]. Da diese Lernprozesse durchaus komplex sein können, testete unser Lernversuch, der mit Umlernen kombiniert wurde, ein realistisches Szenario. Das Ausbleiben von Behandlungseffekten in beiden Konzentrationen zeigte, dass in unseren Versuchen die Lernleistung nicht beeinträchtigt wurde, jedoch können daraus nicht allgemein jegliche Effekte ausgeschlossen werden. Bei abweichenden Konzentrationen und veränderten Mischungen können durchaus andere Ergebnisse resultieren.



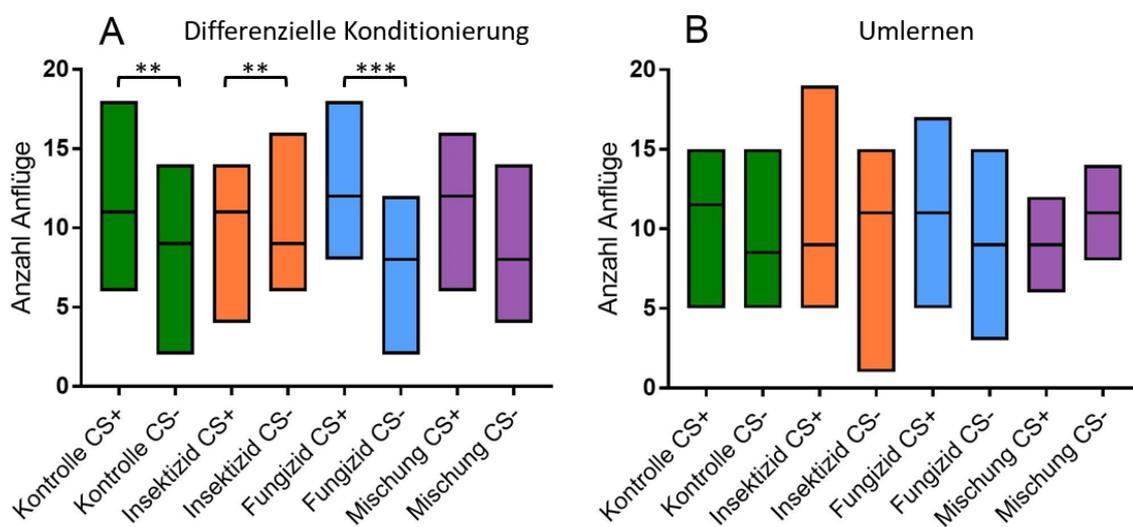
**Abbildung 12:** **A.** Lern-Scores der Honigbienen nach feldrealistischer Behandlung. Die Anzahl an Reaktionen auf den CS+ war höher als die Anzahl der Reaktionen auf den CS-. Ein Behandlungseffekt wurde nicht sichtbar (Kruskal-Wallis Test:  $p_{CS+} > 0,05$ ;  $p_{CS-} > 0,05$ ) ( $n_{Kontrolle}$ : 44,  $n_{Insektizid}$ : 46,  $n_{Fungizid}$ : 41,  $n_{Mischung}$ : 39). **B.** Umlern-Scores der Honigbienen nach feldrealistischer Behandlung. Die Anzahl der Reaktionen auf den zuvor bestrafte und jetzt belohnte Duft nahm zu. Ein Behandlungseffekt wurde nicht sichtbar (Kruskal-Wallis Test:  $p_{CS+} > 0,05$ ;  $p_{CS-} > 0,05$ ) ( $n_{Kontrolle}$ : 29,  $n_{Insektizid}$ : 22,  $n_{Fungizid}$ : 26,  $n_{Mischung}$ : 19). **C.** Lern-Scores der Honigbienen nach zehnfach höherer Behandlung. Die Anzahl an Reaktionen auf den CS+ war höher als die Anzahl der Reaktionen auf den CS-. Ein Behandlungseffekt wurde nicht sichtbar (Kruskal-Wallis Test:  $p_{CS+} > 0,05$ ;  $p_{CS-} > 0,05$ ) ( $n_{Kontrolle}$ : 52,  $n_{Insektizid}$ : 48,  $n_{Fungizid}$ : 43,  $n_{Mischung}$ : 45). **D.** Umlern-Scores der Honigbienen nach zehnfach höherer Behandlung. Die Anzahl der Reaktionen auf den zuvor bestrafte und jetzt belohnte Duft nahm zu. Ein Behandlungseffekt wurde nicht sichtbar (Kruskal-Wallis Test:  $p_{CS+} > 0,05$ ;  $p_{CS-} > 0,05$ ) ( $n_{Kontrolle}$ : 24,  $n_{Insektizid}$ : 25,  $n_{Fungizid}$ : 19,  $n_{Mischung}$ : 17).

Informationen zur Veröffentlichung der Daten aus Kapitel 5.1.3 sind unter 8. Veröffentlichungen zu finden.

### 5.1.3.2 Freifluglernen Honigbiene

Wir haben die Bienen unter akuter PSM-Fütterung ( $fr*10$ ) freifliegend am Rotating Screen trainiert, zwei sehr ähnliche Gelbtöne zu unterscheiden. Fast alle Behandlungsgruppen (Kontrolle, Insektizid und Fungizid) lernten erfolgreich in der ersten Lernphase (Differenzielle Konditionierung), belohntes von unbelohntem Gelb zu unterscheiden (**Abbildung 13A**). Nur Bienen, welche die Mischung verabreicht bekommen hatten, lernten nicht.

Es konnte jedoch keine der Behandlungsgruppen umlernen, als die Gelbtöne für belohnt und unbelohnt getauscht wurden.



**Abbildung 13:** Freifluglernen mit Honigbienen am Rotating Screen unter Einfluss von Pflanzenschutzmitteln (PSM, feldrealistisch\*10). Die Bienen ( $n$  pro Gruppe = 20) sollten lernen zwei sehr ähnliche Gelbtöne zu unterscheiden und wurden nach der Lernphase bzw. Umlernphase mit 20 Anflügen getestet (CS+ (Conditioned Stimulus, belohnte Farbe angefliegen), CS- (bestraftete Farbe angefliegen) **A**. Differenzielle Konditionierung: alle bis auf die Bienen, welche die PSM Mischung erhalten hatten, lernten die belohnte Farbe zu erkennen (Wilcoxon matched-pairs signed rank test, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ) **B**. Nach der Umlernphase mit dem Tausch der Farben auf belohnt bzw. unbelohnt lernte keine Behandlungsgruppe um (Wilcoxon matched-pairs signed rank test,  $p > 0.05$ ).

Unsere Bienen konnten differentiell konditioniert werden und haben gelernt zwei sehr ähnliche Farbtöne zu unterscheiden. Dass Bienen differentiell konditionierbar sind, wurde in ähnlichen freifliegenden Experimenten bereits untersucht [31, 32]. Hierbei ist besonders interessant, dass alle unsere Behandlungsgruppen (Kontrolle, Insektizid und Fungizid) die Diskriminierung zwischen Farben erlernen konnten, lediglich Bienen, welche die Mischung erhalten hatten, konnten dies nicht. Da die Einzelbehandlungen der PSM keinen Einfluss auf die Lernleistung hatten, können wir hierbei von einem synergistischen Effekt der beiden PSM ausgehen. Eine

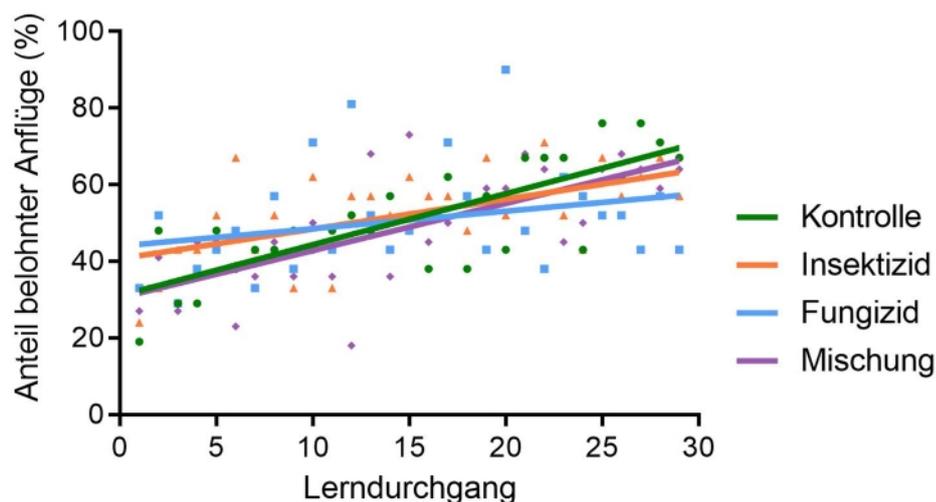
Beeinträchtigung in der Natur Farben zu unterscheiden könnte Probleme bei der Sammelleistung und somit auch für den Nektar- und Polleneintrag in dem Volk zur Folge haben und ist demnach von großer Bedeutung.

Keine Behandlungsgruppe schaffte es umzulernen. Es ist jedoch möglich, dass Bienen die vorerst unbelohnte Farbe nun als belohnt erlernen [24]. Die Lern- und Testphasen pro Bienen dauern jedoch sehr lange. Es ist möglich, dass die Lichtverhältnisse sich zum Nachteil der Biene entwickelt haben und die Unterscheidung der sehr ähnlichen Gelbtöne somit erheblich erschwert wurde. Ein erfolgreiches Umlernen konnten wir in keiner Behandlungsgruppe zeigen, demnach können wir auch keine Rückschlüsse auf eine mögliche Beeinträchtigung durch PSM-Einflüsse ziehen.

### 5.1.3.3 Freifluglernen Hummel

Das Lernverhalten der Hummeln wurde in einer Flugarena untersucht. Vor der Konditionierung zeigten alle Behandlungsgruppen und die Kontrolle eine Farbpräferenz für türkis, weshalb die blauen Blüten während der Konditionierung belohnt wurden (Wilcoxon Test,  $p_{\text{Kontrolle}} < 0,0001$ ;  $p_{\text{Insektizid}} < 0,0001$ ;  $p_{\text{Fungizid}} = 0,0001$ ;  $p_{\text{Mischung}} < 0,01$ ). Während des Lernversuchs wurde deutlich, dass die Anzahl an belohnten Blütenbesuchen mit steigendem Lerndurchgang in allen Gruppen zunahm (GLM: Durchgangseffekt:  $p = 0,000$ ). Ein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrolle konnte hierbei nicht festgestellt werden (**Abbildung 14**).

In der Natur besitzen viele Bienen eine angeborene Farbpräferenz [33]. Dies bringt einige Vorteile, da sie so gezielt Blüten anfliegen können, die sich für ihre Nahrungssuche eignen. Auch in unserem Test vor der Konditionierung konnte eine Farbpräferenz festgestellt werden. Dass aber auch das Erlernen einer neuen Farbe möglich ist, zeigte unser Lernversuch, in dem die nicht-präferierte Farbe belohnt und von den Hummeln erlernt wurde.

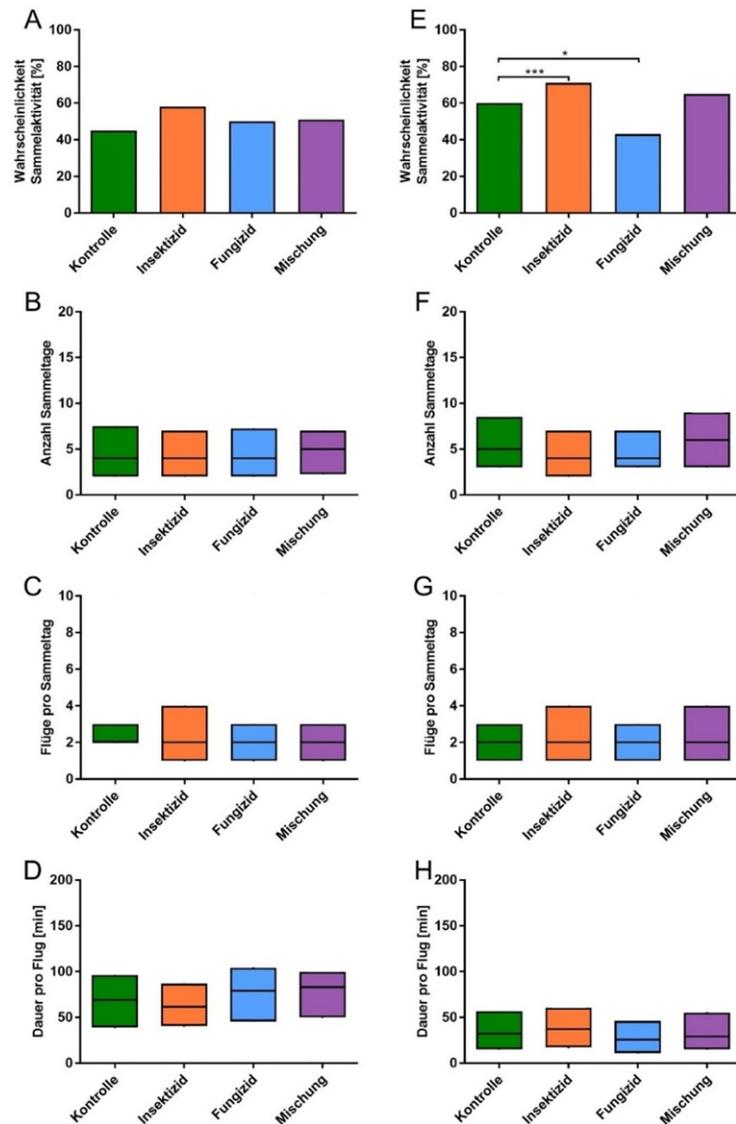


**Abbildung 14:** Anteil der Anflüge auf belohnte Blüten während der Konditionierung. Mit steigendem Lerndurchgang nahm der Anteil der Anflüge auf belohnte Blüten zu. Die Behandlungsgruppen unterschieden sich nicht von der Kontrolle (GLM,  $p > 0,05$ ) ( $n_{\text{Kontrolle}}: 21$ ,  $n_{\text{Insektizid}}: 21$ ,  $n_{\text{Fungizid}}: 21$ ,  $n_{\text{Mischung}}: 22$ ).

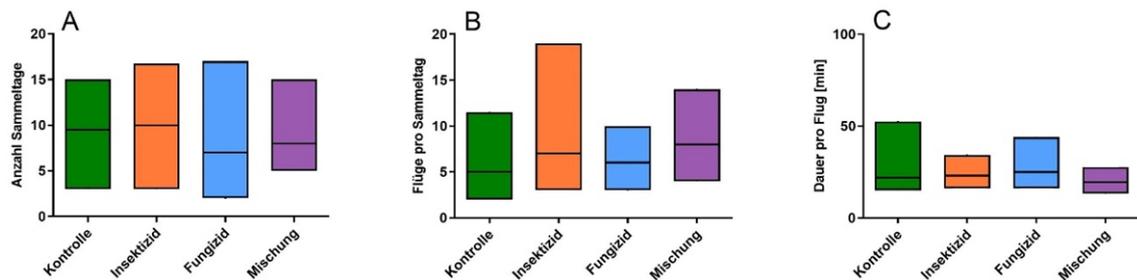
#### 5.1.4 Aufgabe 4: Sammelverhalten von Honigbienen und Hummeln unter kombiniertem Stress durch Insektizid und Fungizid

Um das Sammelverhalten von Honigbienen und Hummeln zu untersuchen, wurden die Tiere mit den entsprechenden Lösungen behandelt und die Flugaktivität über einen längeren Zeitraum hinweg aufgenommen. Die Anzahl der Tage an denen gesammelt wurde, die Anzahl der Flüge pro Sammeltag und die Dauer der Sammelflüge unterschied sich dabei weder bei der Honigbiene noch bei der Hummel zwischen den Behandlungen (**Abbildung 15B, C, D und F, G, H** und **Abbildung 16A-C**). Für die Honigbiene konnte zudem noch die Wahrscheinlichkeit bestimmt werden, mit der die Bienen zu sammeln begannen (**Abbildung 15A und E**). Dies war bei der Hummel nicht möglich, da aus praktischen Gründen bereits Sammlerinnen abgefangen wurden, die mit dem Tag beklebt wurden. Bei der Honigbiene konnte man allerdings feststellen, dass sich die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Biene eine Sammlerin wurde, zwischen der Kontrolle und der Insektizid- bzw. Fungizid-Gruppe unterschied, nachdem die Tiere mit der zehnfach höheren Dosis gefüttert wurden. Bei der Fungizid-Gruppe war die Wahrscheinlichkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe geringer. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass durch die Aufnahme des Fungizids das Oberflächen-Mikrobiom der Bienen derart verändert wurde, dass die behandelten Tiere durch die Artgenossen im Volk nicht mehr erkannt und damit ausgestoßen wurden. Zudem wäre es möglich, dass durch die Fungizid-Aufnahme Prozesse in der Biene beeinflusst wurden, weshalb die behandelten Tiere nicht mehr der Aufgabe des Sammelns nachgingen, sondern nur Aktivitäten im Volk verfolgten. Die Wahrscheinlichkeit des Sammelstarts bei der Insektizid-Gruppe war im Vergleich zur Kontrolle höher. Man könnte vermuten, dass durch die Gabe des Insektizids eine Art von Hyperaktivität ausgelöst wurde (was schon bei anderen Insektiziden beobachtet werden konnte [34]), weshalb die behandelten Tiere vermehrt der Aufgabe des Sammelns nachgingen. Des Weiteren könnten interne Prozesse, die die Arbeitsteilung der Honigbienen steuern, beeinflusst worden sein, weshalb mehr behandelte Tiere zu Sammlerinnen wurden.

Eine geregelte Sammelaktivität spielt für das gesamte Volk eine wichtige Rolle, da dadurch der Nahrungseintrag und somit das Überleben des Volkes sichergestellt wird [30, 35, 36]. Sollten die Dauer oder die Anzahl der Sammelflüge durch die Aufnahme von PSM negativ beeinflusst werden, könnte dies zu einer niedrigeren Sammeleffektivität führen. Neben der Dauer oder der Anzahl der Flüge konnte jedoch auch die Wahrscheinlichkeit betrachtet werden wie viele Bienen überhaupt zu Sammlerinnen wurden. Die Unterschiede, die wir nach der Gabe der zehnfach höheren Dosis des Fungizids beobachten konnten, könnten dazu führen, dass zu wenig Tiere mit der Sammelaktivität beginnen und somit der Ertrag für das Volk zu gering wäre. Die Effekte, die nach der Insektizid-Gabe sichtbar wurden, könnten ebenfalls zu einem Mangel an Sammlerinnen führen. Wenn ein Großteil der Bienen das Insektizid aufnimmt (z.B. unmittelbar nach dem Spitzen auf ein Rapsfeld) und die Bienen vermehrt anfangen zu sammeln, könnte dies in einem nachfolgenden Fehlen von Sammlerinnen bzw. in einer verminderten Anzahl an Arbeiterinnen im Volk resultieren, da die natürliche Entwicklung der Arbeiterinnen gestört wurde.



**Abbildung 15:** **A.** Wahrscheinlichkeit der Sammelaktivität, **B.** Anzahl an aktiven Sammeltagen, **C.** Anzahl der Sammelflüge pro Sammeltag und **D.** Dauer pro Sammelflug der Honigbienen, die mit einer feldrealistischen Konzentration der PSM gefüttert wurden. Es wurden keine Behandlungs-Effekte festgestellt (GLMM,  $p_{\text{Wahrscheinlichkeit}} > 0,05$ ;  $p_{\text{Anzahl Tage}} > 0,05$ ;  $p_{\text{Flüge pro Tag}} > 0,05$ ;  $p_{\text{Dauer pro Flug}} > 0,05$ ) ( $n_{\text{Kontrolle}}$ : 77,  $n_{\text{Insektizid}}$ : 100,  $n_{\text{Fungizid}}$ : 86,  $n_{\text{Mischung}}$ : 88). **E.** Wahrscheinlichkeit der Sammelaktivität, **F.** Anzahl an aktiven Sammeltagen, **G.** Anzahl der Sammelflüge pro Sammeltag und **H.** Dauer pro Sammelflug der Honigbienen, die mit einer zehnfach höheren Konzentration der PSM gefüttert wurden. Die Behandlung hatte keinen Effekt auf die Anzahl an aktiven Sammeltagen, die Anzahl der Sammelflüge pro Sammeltag und die Dauer pro Sammelflug (GLMM,  $p_{\text{Anzahl Tage}} > 0,05$ ;  $p_{\text{Flüge pro Tag}} > 0,05$ ;  $p_{\text{Dauer pro Flug}} > 0,05$ ). Die Wahrscheinlichkeit der Sammelaktivität war bei den Fungizid-Tieren niedriger und bei den Insektizid-Tieren höher als bei der Kontrolle (GLMM, Kontrolle/Insektizid  $p_{\text{Wahrscheinlichkeit}} < 0,05$ ; Kontrolle/Fungizid:  $p_{\text{Wahrscheinlichkeit}} < 0,001$ ) ( $n_{\text{Kontrolle}}$ : 165,  $n_{\text{Insektizid}}$ : 164,  $n_{\text{Fungizid}}$ : 172,  $n_{\text{Mischung}}$ : 176).



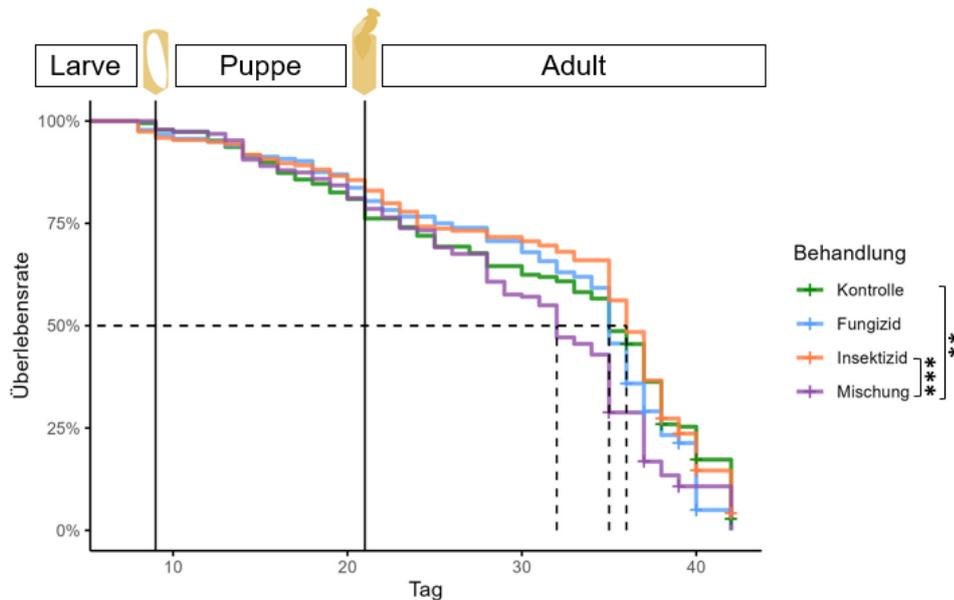
**Abbildung 16:** A. Anzahl an aktiven Sammeltagen, B. Anzahl der Sammelflüge pro Sammeltag und C. Dauer pro Sammelflug der Hummeln, die mit einer zehnfach höheren Konzentration der PSM gefüttert wurden. Es wurden keine Behandlungseffekte festgestellt (GLMM,  $p_{\text{Anzahl Tage}} > 0,05$ ;  $p_{\text{Flüge pro Tag}} > 0,05$ ;  $p_{\text{Dauer pro Flug}} > 0,05$ ) ( $n_{\text{Kontrolle}}: 76$ ,  $n_{\text{Insektizid}}: 90$ ,  $n_{\text{Fungizid}}: 75$ ,  $n_{\text{Mischung}}: 92$ ).

## 5.2 Arbeitspaket 2: Auswirkungen von Insektizid-Fungizid-Mischungen auf die Honigbienenentwicklung

Honigbienenlarven wurden *in-vitro* aufgezogen. Bei drei Fütterungsevents während des Larvenstadiums erhielten die Tiere ihre jeweilige Behandlung: Insektizid (Acetamiprid), Fungizid (aktive PSM-Wirkstoffe Boscalid und Dimoxystrobin), die Kombination als Mischung in zehnfach höherer Konzentration als feldrealistisch. Da die aktiven Wirkstoffe in Aceton gelöst wurden, gab es zwei Kontrollgruppen: Aceton-Kontrolle mit gleicher Menge Aceton wie die Wirkstoffgruppen und eine Wasser-Kontrolle mit gleicher Menge Wasser.

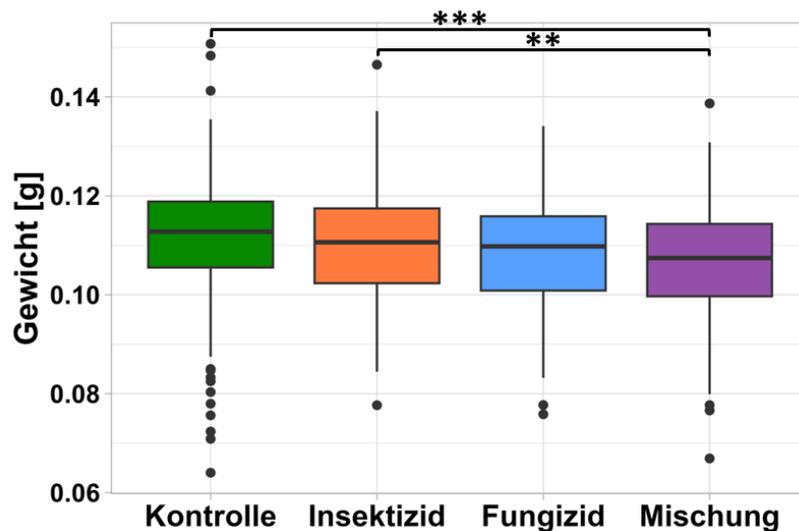
Bei der **Überlebensrate** zeigten die Kontrollgruppen keine Unterschiede. Somit kann angenommen werden, dass die verabreichte Menge Aceton keine Auswirkung auf das Überleben hatte. Die Überlebensrate während der Larven- (bis Tag 9) und Puppenentwicklung (bis Tag 21), sowie als adultes Tier ist in **Abbildung 17** als Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Ein paarweiser Vergleich ergab eine signifikant reduzierte Lebensspanne von Mix-Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Mix-Tiere zeigten ebenfalls eine erhöhte Mortalität im Vergleich zur Insektizid-Gruppe.

Die Einzelbehandlungen mit Wirkstoffen zeigten keinen Unterschied zur Kontrollgruppe. Daher gehen wir von einem negativen synergistischen Effekt der gemeinsamen Behandlung mit unseren fungiziden Wirkstoffen Boscalid und Dimoxystrobin mit dem insektiziden Wirkstoff Acetamiprid aus.



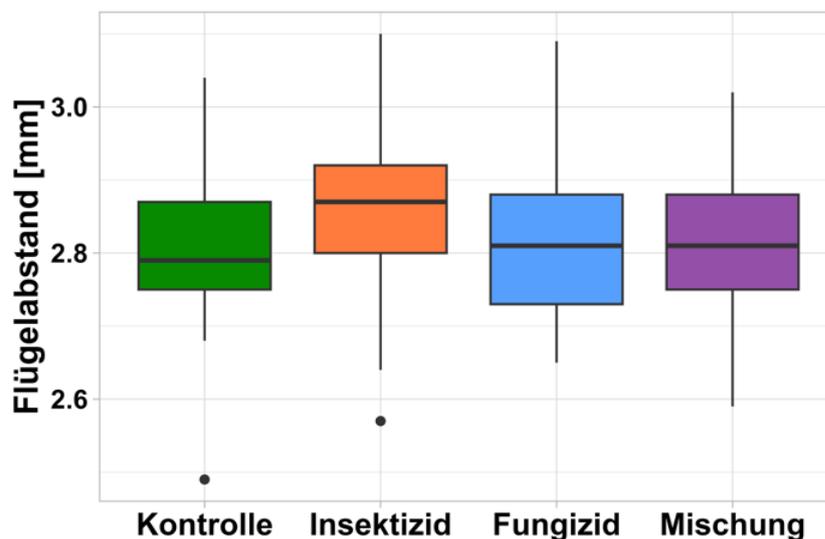
**Abbildung 17:** Überlebensrate von Honigbienen unter Pflanzenschutzmitteleinfluss während der Larvenentwicklung. Als Fungizid wurden die aktiven Wirkstoffe Boscalid und Dimoxystrobin ( $n = 184$ ), als Insektizid Acetamiprid ( $n = 194$ ) und in Kombination als Mischung ( $n = 191$ ) verabreicht. Die Kontrolle ( $n = 189$ ) erhielt die gleiche Menge Aceton, in welche die PSM-Wirkstoffe gelöst wurden. Die Gruppen unterschieden sich signifikant voneinander (GLMM,  $p < 0,001$ ). Mischungstiere überlebten signifikant schlechter als die Kontrollgruppe (GLHT,  $** p < 0,01$ ) und im Vergleich zur Insektizidgruppe (GLHT,  $*** p < 0,0001$ ).

Die frisch geschlüpften Honigbienen (Tag 21) wurden direkt nach ihrem Schlupf gewogen (**Abbildung 18**). Die Gruppen unterschieden sich signifikant voneinander, wobei ein paarweiser Vergleich signifikant leichtere Mischungstiere im Vergleich zur Kontrolle, sowie zum Insektizid ergab. Auch bei der Analyse des Schlupfgewichtes zeigten die Einzelbehandlungen keinen Unterschied zur Kontrolle, während Tiere, welche die Mischung erhalten hatten, signifikant leichter waren. Somit zeichnet sich auch hier ein synergistischer Effekt von der gemeinsamen Wirkung von Insektizid und Fungizid ab.



**Abbildung 18:** Die Behandlung zeigte einen Effekt auf das Gewicht der adulten Bienen (GLMM,  $p < 0,001$ ). Das Gewicht der Mischungstiere war im Vergleich zur Kontrolle niedriger (GLHT, \*\*\*  $p < 0,001$ ) während die Einzelbehandlungen keinen Effekt im Vergleich zur Kontrolle zeigten. Die Mischungstiere waren ebenfalls leichter als die Insektizid-Tiere (GLHT, \*\*  $p < 0,01$ ). ( $n_{\text{Kontrolle}}$ : 181,  $n_{\text{Fungizid}}$ : 164,  $n_{\text{Insektizid}}$ : 196,  $n_{\text{Mix}}$ : 195).

Die **Größe** der Bienen wurde mit Hilfe einer zufälligen Stichprobe ( $n = 25$  pro Behandlung) untersucht. Es wurde der Flügelabstand gemessen (Abbildung 19). Hierbei zeigte die Behandlung keinen Effekt auf die Größe.



**Abbildung 19:** Die Flügelabstände einer zufälligen Stichprobe der Honigbienen wurde vermessen ( $n = 25$  pro Behandlung). Diese unterschieden sich nicht zwischen den Behandlungsgruppen (GLMM,  $p > 0,05$ ).

In unserem Versuch waren Honigbienen, welche das Fungizid und Insektizid in Mischung erhielten, leichter und starben früher als Kontrolltiere. Wir gehen von einem negativen synergistischen Langzeiteffekt der Wirkstoffe Acetamiprid (Neonikotinoid) und Boscalid mit Dimoxystrobin (Nicht-SBI Fungizid) während der Entwicklung aus.

Synergistische Effekte verschiedener PSM-Kombinationen wurde bereits bei adulten Honigbienen nachgewiesen [37, 38]. Ebenso zeigten Bienen, welche einzelne PSM während der Larvenentwicklung erhalten hatten, eine reduzierte Lebenserwartung als adultes Tier [38–40].

Die kürzere Lebenserwartung könnte mit den Gründen des geringeren Gewichts zusammenhängen: Eine mögliche Ursache ist die Veränderung von Entgiftungs- und antioxidativen Enzymen. Diese sind für die Regulierung physiologischer Prozesse, wie den Stoffwechsel und oxidativen Stress zuständig und wurden bereits für die Östliche Honigbiene (*Apis cerana*) unter kombinierten Insektiziden und Fungiziden gezeigt. Zudem benötigen Honigbienenlarven mehr Energie, um PSM zu entgiften, was ein Grund für das geringere Schlupfgewicht sein könnte [41, 42].

Des Weiteren zeigten Studien, dass das Darmmikrobiom, der Proteinmetabolismus, sowie die Genexpression von Honigbienen unter PSM-Einfluss verändert sind. Der unterschiedliche Stoffwechsel sowie der erhöhte Stress könnte eine weitere Erklärung für die leichteren Tiere und die Reduktion der Lebensspanne sein [43–45].

Die Kombination von Insektizid und Fungizid in unserem Versuch zeigte einen negativen subletalen Langzeiteffekt auf die Honigbiene. Eine gesunde neue Generation ist eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung eines Bienenvolkes. Die Mischung der Wirkstoffe Acetamiprid (Neonikotinoid) und Boscalid mit Dimoxystrobin (Nicht-SBI Fungizid), beide als B4 (bienenfreundlich) klassifiziert, hat demnach das Potential, Bienenvölker langfristig zu schädigen.

### **5.3 Arbeitspaket 3: Wirkung von Insektizid-Fungizid-Mischungen auf die Volksentwicklung und den Polleneintrag in 9 realen Agrarlandschaften Bayerns mit unterschiedlicher Nutzungsintensität und Blüten-Ressourcen-Verfügbarkeit**

Es wurden vier Bienenvölker an jeweils neun Standorten aufgestellt. Hierbei erhielt jedes Volk ihre Behandlung in feldrealistischer Konzentration über den eigenen Pollen: Kontrolle, Insektizid, Fungizid und Mischung.

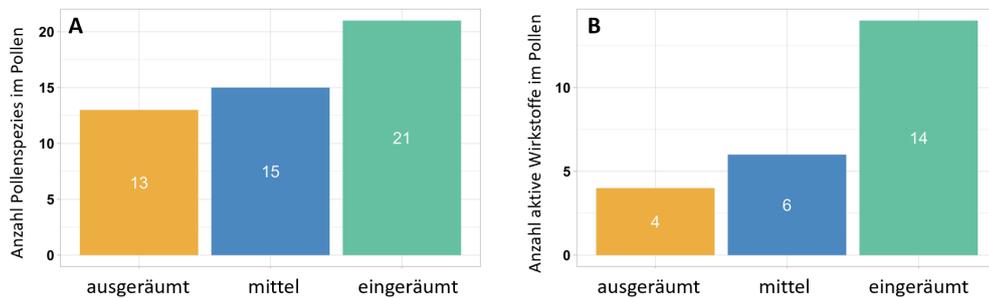
Über den Behandlungszeitraum (sechs Wochen) wurde der Pollen gesammelt, gewogen und mit PSM angereichert ins Volk zurückgegeben. Hierbei wurden Proben für die Analyse der Pollenzusammensetzung durch Pollenmetabarcoding und PSM-Rückständen genommen. Des Weiteren wurde kontinuierlich die Gewichtsentwicklung jedes Volkes erfasst und die Entwicklung durch Volksschätzungen dokumentiert.

#### **5.3.1 Ressourcenangebot der verschiedenen Standorte**

Die Pollenzusammensetzung unterschied sich zwischen den verschiedenen Standorten.

**Abbildung 20** zeigt exemplarisch Pollenproben von jeweils einem Standort aus der Kategorie ausgeräumte, mittlere und eingeräumte Landschaften hinsichtlich Pollenspezies und PSM-Rückständen. Hierbei zeigte sich, dass die Bienen am Agrarstandort in der Kategorie „ausgeräumt“ auch weniger verschiedene Pollenspezies ( $n = 13$ ) sammelten. Im Vergleich mit den

anderen Landschaftskategorien wurden hierbei auch am wenigsten verschiedenen PSM-Wirkstoffe ( $n = 4$ ) detektiert. An einem „eingräumten“ Standort wurden die meisten Pollenspezies ( $n = 21$ ) jedoch auch die meisten verschiedenen PSM-Wirkstoffe ( $n = 14$ ) gefunden.



**Abbildung 20:** **A.** Steigende Anzahl von Pollenspezies entlang der Landschaftskategorien an jeweils einem der Standorte für ausgeräumt ( $n = 13$ ), mittel ( $n = 15$ ) und eingräumte ( $n = 21$ ) Landschaften. **B.** Die Anzahl der PSM-Rückstände in den gleichen Pollenproben stieg von der Kategorie ausgeräumt ( $n = 4$ ), mittel ( $n = 6$ ) bis eingräumt ( $n = 14$ ) an.

Während der PSM-Behandlung wurde jeden dritten Tag (15 x pro Volk), der Pollen gesammelt und gewogen (**Abbildung 21 A**). Der durchschnittliche Polleintrag betrug über alle Völker gemittelt 36,3 Gramm pro Tag.

Die Pollengewichte unterschieden sich nicht zwischen den Landschaftskategorien eingräumt, mittel und ausgeräumt (**Abbildung 21B**). In der mittleren Kategorie hatte die PSM-Behandlung einen Einfluss auf die Pollensammelleistung. Fungizidbienen sammelten mehr Pollen als Insektizid- und Mix-Bienen (**Abbildung 21C**).

Während der PSM Behandlung (sechs Wochen) und darüber hinaus (vier Wochen) wurde die Völkerentwicklung durch regelmäßige Schätzungen des Wabeninhalts aufgenommen. Hierbei wurden auch die Honig- und Nektarflächen erhoben (**Abbildung 21D**). Durchschnittlich besaßen die Völker während einer Schätzung 1,5 volle Rähmchen mit Honig und Nektar.

Hierbei gab es Unterschiede zwischen den Landschaftskategorien ausgeräumt, mittel und eingräumt (**Abbildung 21E**). Bienen in eingräumten Landschaften hatten im Durchschnitt mehr Vorräte als in Mittleren und Ausgeräumten. Der Stressor PSM konnte in allen Landschaftskategorien kompensiert werden und hatte keinen Einfluss auf die eingelagerten Honig- und Nektarmengen (**Abbildung 21F**).

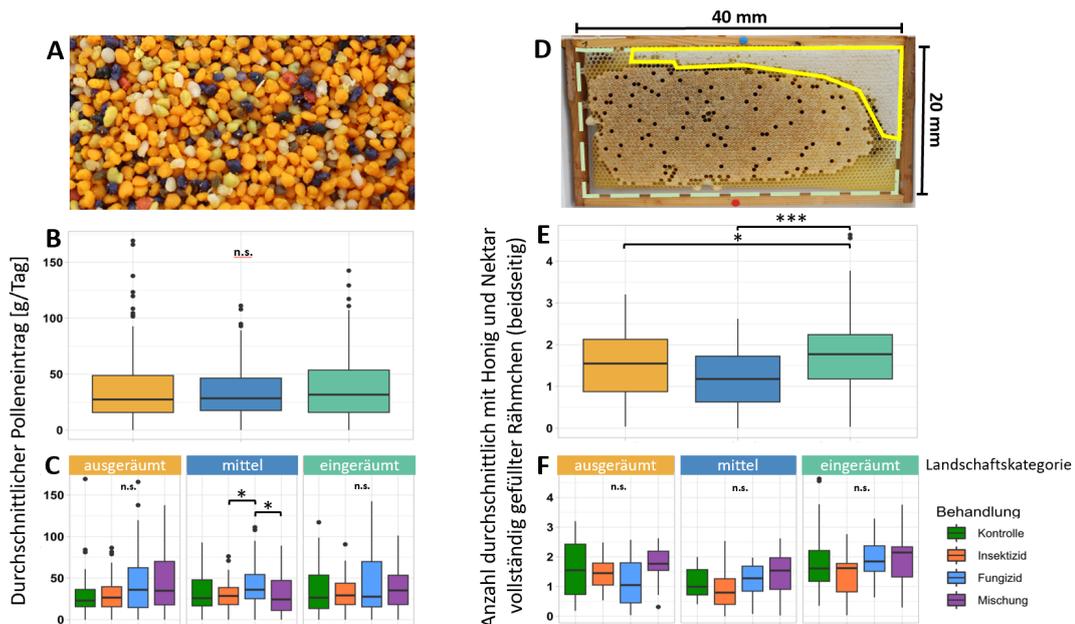
### 5.3.2 Volksentwicklung

Die Brutflächen wurden zeitgleich mit den Honig- und Nektarressourcen in zweiwöchentlichen Intervallen über zehn Wochen (sechs Wochen während der PSM Behandlung und die vier Folgewochen) erhoben (**Abbildung 22A**). Im Durchschnitt hatten die Völker (gemittelt über zehn Wochen) während einer Schätzung 1,2 volle Brutwaben.

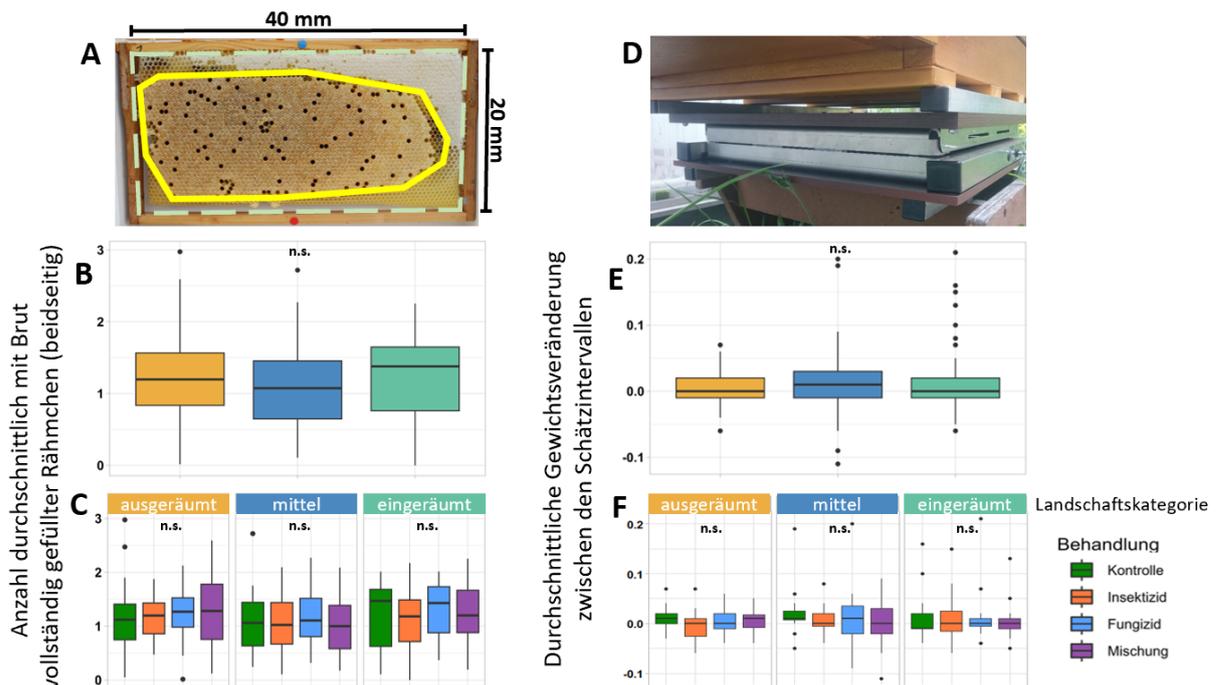
Anders als bei den Honig- und Nektarflächen hatten die Landschaftskategorien ausgeräumt, mittel und eingräumt keinen Einfluss auf die Größe des durchschnittlichen Brutnests pro

Schätzung (**Abbildung 22B**). Der Stressor PSM konnte ebenfalls in allen Landschaftskategorien von den Bienen kompensiert werden (**Abbildung 22C**)

Während der PSM-Behandlung wurde die Gewichtsveränderung eines jeden einzelnen Volkes mit der Hilfe von Stockwaagen alle fünf Minuten aufgezeichnet. **Abbildung 22E** zeigt eine Übersicht über die durchschnittliche Gewichtsveränderung innerhalb der zweiwöchentlichen Schätzintervallen. Die Gewichtsentwicklung war weder durch die Landschaftskategorie noch durch die PSM-Behandlung innerhalb der Kategorien (**Abbildung 22F**) beeinflusst.



**Abbildung 21:** Übersicht über die für die Bienen gesammelten Ressourcen: Pollen, Nektar und Honig. **A.** Pollenhöschchen verschiedener Blütenherkunft. **B.** Der durchschnittliche Polleneintrag [g/Tag] war nicht unterschiedlich zwischen den Landschaftskategorien ausgeräumt, mittel und eingeräumt (Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ,  $n = 179$  pro Kategorie). **C.** In der mittleren Landschaftskategorie hatte die PSM Behandlung einen Einfluss auf den Polleneintrag (Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ,  $n = 45$  pro Behandlungsgruppe). Hierbei trug die Fungizidgruppe mehr Pollen ein als die Insektizid- und Mischungsgruppe (Paarweiser Wilcoxon-Test, jeweils  $* p < 0.05$ ). **D.** Der Inhalt einer Wabenkarte umfasst eine Oberfläche von  $800 \text{ cm}^2$  (gestrichelter Kasten, mintfarben). Ein Bienenvolk enthält 20 Wabenkarten. Honigflächen sind weiß verdeckelt (gelber Kasten) **E.** Honig- und Nektarflächen wurden zusammenaddiert und werden als vollständig gefüllte Rähmchen angegeben. Dargestellt ist die Anzahl der durchschnittlich vollständig gefüllten Rähmchen gemittelt über alle Schätzungen. Die Menge an Honig und Nektar unterschied sich zwischen den Landschaftskategorien (ANOVA,  $p < 0.001$ ,  $n = 72$  pro Landschaftskategorie). Bienen in eingeräumten Landschaften hatten mehr Honig und Nektar im Vergleich zur mittleren Kategorie (Tukey-hsd,  $*** p < 0.001$ ) und ausgeräumten Landschaften (Tukey-hsd,  $* p < 0.05$ ). **F.** Die Behandlung mit PSM hatte jedoch keinen Einfluss auf die Menge des gesammelten Honigs und Nektars (ANOVA,  $p > 0.05$ ). **n.s.** = nicht signifikant



**Abbildung 22:** Übersicht über die Entwicklung der Bienenvölker: Brutflächen und Gewichtsveränderung **A**. Der Inhalt einer Wabenseite umfasst eine Oberfläche von 800 cm<sup>2</sup> (gestrichelter Kasten, mintfarben). Ein Bienenvolk enthält 20 Wabenseiten. Brutflächen sind bräunlich verdeckelt (gelber Kasten). **B**. Brutflächen wurden zusammenaddiert und werden als vollständig gefüllte Rähmchen angegeben. Dargestellt ist die Anzahl der durchschnittlich vollständig gefüllten Bruträhmchen gemittelt über alle Schätzungen. Diese wurden durch die Landschaftskategorien nicht beeinflusst (ANOVA,  $p > 0.05$ ,  $n = 72$  pro Landschaftskategorie). **C**. Die Behandlung mit PSM hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die angelegten Brutflächen in den verschiedenen Landschaften (ANOVA,  $p > 0.05$ ,  $n = 18$  pro Behandlung in jeder Landschaftskategorie). **D**. Stockwaage (Apigraph 4.0 von Wolfwaagen), welche die Gewichtsveränderung eines Bienenvolkes aufnimmt. **E**. Dargestellt ist die durchschnittliche Gewichtsveränderung zwischen den Schätzintervallen. Hierbei hatte die Landschaftskategorie keinen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung (ANOVA,  $p > 0.05$ ,  $n = 58$  pro Landschaftskategorie). **F**. Die Behandlung mit PSM hatte ebenfalls keinen Effekt auf die Gewichte der Völker (ANOVA,  $n = 15$  pro Behandlungsgruppe in jeder Landschaftskategorie). **n.s.** = nicht signifikant

### 5.3.3 Diskussion Völkerversuch

Wir haben durch unseren großangelegten Völkerversuch die Wirkung von Insektizid-Fungizid-Mischungen auf Volkentwicklung und Polleneintrag in verschiedenen Landschaftskategorien (ausgeräumt, mittel und ingeräumt) mit verschiedenen Agraranteilen sowie Blühangebot untersucht.

Hierbei zeigte sich, dass an verschiedenen Standorten unterschiedlich viele **Pollenspezies** eingetragen wurden. Demnach unterschied sich, wie von uns beabsichtigt, das Blühangebot

und somit auch die Nährstoffzusammensetzung des verfügbaren Pollens an den verschiedenen Standorten. Studien zeigten, dass die Bienengesundheit durch einen höheren Nährwert des Pollens beeinflusst wird. So ist die Mortalität von mit einer Pollensorte mangelernährten Bienen höher als die der Vergleichsgruppe mit gemischtem Pollen [21]. Anhand des Pollenmetabarcodings konnten wir die Annahme unterschiedlicher Pollenressourcen validieren.

Mit zunehmender Anzahl der Pollenspezies stieg auch die Anzahl der gefundenen **PSM-Wirkstoffe aus der Umgebung**. Der gezeigte Standort in einer ausgeräumten Landschaft hatte im Vergleich zur eingerräumten Landschaft innerhalb des Flugradius der Honigbienen deutlich größere und weniger Ackerflächen. Hierbei ist ein großflächiger Einsatz mit den gleichen PSM-Wirkstoffen möglich. Bei einer höheren Anzahl verschiedener Ackerflächen steigt die Möglichkeit des Einsatzes einer Vielzahl unterschiedlicher PSM. Des Weiteren war der Stadt-Anteil in der eingerräumten Landschaftskategorie höher. Der Einsatz von PSM in Hausgärten durch Privatpersonen könnte ebenfalls zum Eintrag der höheren Anzahl verschiedener PSM-Wirkstoffe beigetragen haben.

Trotz unterschiedlicher Blühressourcen trugen die Bienen unabhängig von der Landschaftskategorie (eingerräumt, mittel und ausgeräumt) vergleichbare **Pollenmengen pro Tag** ein. Der Polleneintrag wurde nur in der mittleren Landschaftskategorie durch die PSM-Behandlung beeinflusst: Bienen, welche Fungizid verabreicht bekamen, sammelten mehr Pollen als Völker unter Einfluss von Insektizid oder der Mischung.

Pollen wird bedarfsgerecht für Brut und junge Bienen gesammelt [47]. Die größeren Pollenmengen der mit Fungizid gefütterten Bienen in der mittleren Diversität lässt sich jedoch nicht durch eine größere Brutfläche erklären. Die **Brutflächen** unterschieden sich nicht zwischen den Landschaftskategorien. Die Bienen konnten in den verschiedenen Landschaftstypen durchschnittlich die gleiche Brutmenge großziehen, für welche sie vergleichbar viel Pollen benötigten. Der Stressor PSM hatte keinen Einfluss auf die durchschnittlichen Brutflächen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus unserem Larvenversuch: die Larven- und Puppensterblichkeit schien unter PSM-Einfluss nicht erhöht zu sein, adulte Tiere, welche die Mischung während ihrer Entwicklung erhalten hatten, starben jedoch früher.

Bienen in eingerräumten Landschaften besaßen durchschnittlich mehr **Honig- und Nektarflächen** als in mittleren und ausgeräumten Landschaften. Hierbei wurde ihre Sammelleistung jedoch nicht durch zugefütterte PSM reduziert. Bei anhaltend besseren Blühangeboten in der nahen Umgebung wäre von einer größeren Gewichtszunahme der Völker auszugehen. Die durchschnittliche **Gewichtsveränderung** zwischen den Schätzintervallen der Wabeninhalte unterschied sich jedoch nicht zwischen den Landschaftskategorien. Alle Völker hielten ihr Gewicht, ohne durchschnittlich zwischen den Schätzintervallen über einen Zeitraum von zehn Wochen zu- oder abzunehmen. Dies spricht dafür, dass Völker in eingerräumten Landschaften in der Etablierung vor der Datenerhebung weniger von ihren Startressourcen verbraucht haben als die anderen Völker.

Eingerräumte Standorte schienen die Bienen in ihrer sehr energieintensiven und anfälligen Aufbauphase (neuer Wabenbau, Pollen- und Nektareintrag, erste große Brutpflege, ...) unterstützt zu haben. Möglicherweise bestand in eingerräumten Landschaften zu diesem Zeitpunkt mehr

Blühangebot im näheren Umkreis um die Bienenvölker im Vergleich zu ausgeräumten Landschaften. Dies würde sich mit den Blühzeitpunkten der Massentrachten decken: der Raps in ausgeräumten Landschaften war bereits verblüht und die Blüte der Sonnenblume hatte noch nicht begonnen. Der kürzere Sammelweg in eingeräumten Landschaften und das potenziell größere Blühangebot könnte den Bienen in dieser Zeit geholfen haben, mehr Vorräte anzulegen, bzw. könnten lange Sammelwege in ausgeräumten Landschaften die Bienen mehr Energie und somit Startressourcen gekostet haben. Eingeräumte Blühflächen haben in unserem Versuch somit die Bienen unterstützt.

Zusammenfassend wurden die zugefütterten PSM überwiegend in allen Landschaftskategorien kompensiert. Die von uns verabreichte Konzentration orientierte sich an real gefundenen Rückständen im Bienenbrot [10]. Im Allgemeinen ist dies eine sehr niedrige Konzentration. Es ist möglich, dass vor allem kurz nach der Ausbringung der PSM im Feld deutlich höhere Konzentrationen in großen Mengen eingetragen werden und unsere Referenzkonzentration durch eine längere Lagerung und Durchmischung mit weiterem Pollen bereits reduziert wurde. Die von uns untersuchten PSM werden beim Rapsanbau genutzt und dieser ist eine stark beflogene Massentracht für die Biene. Demnach wären weitere Studien sinnvoll, welche Kontakt-szenarien mit höheren Dosen auf die Völkervitalität untersuchen.

## 6 Zusammenfassung

### 6.1 Arbeitspaket 1: Auswirkungen von Insektizid-Fungizid-Mischungen auf die Mortalität und das Verhalten von Honigbienen und Hummeln im Labor und Freiland

Die **Mortalitätsstudien**, in denen die feldrealistische Konzentration der PSM auf das Überleben von Honigbienen und Hummeln getestet wurde, zeigten keine negativen Effekte. Die Untersuchungen mit der höheren Konzentration wiesen bei der Hummel ebenfalls keine Effekte auf. Diese Konzentration führte jedoch bei der Honigbiene zu einem synergistischen Effekt, da im Vergleich zur Kontrolle mehr mit der PSM-Mischung behandelte Tiere starben. Dennoch war die Überlebensrate in allen Ansätzen sehr hoch, weshalb die weitere Untersuchung mit der gewählten Konzentration richtig war, um subletale Effekte zu erforschen.

Die Untersuchungen zur **Empfindlichkeit für Zuckerwasser** zeigten keine negativen Effekte der PSM auf Honigbienen und Hummeln. Tiere aller Behandlungsgruppen zeigten mit steigender Zuckerwasserkonzentration vermehrt Rüsselreaktionen. Effekte auf die Empfindlichkeit im Feld können aufgrund von unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen dennoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

In den **Laborlernversuchen** mit der Honigbiene wurden keine negativen PSM-Effekte deutlich, jedoch zeigten die **Freifluglernversuche** mit der Honigbiene eine schlechtere Lernleistung der mit PSM-Mischung behandelten Tiere. Die **Konditionierung** mit der Hummel zeigte keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppen.

Die RFID-Versuche mit der Honigbiene und der Hummel lieferten gute Daten zum **Orientierungs- und Sammelflugverhalten** der Tiere. Die Anzahl der Sammeltage, die Anzahl der Flüge pro Sammeltag und die Dauer pro Flug unterschieden sich weder bei der Honigbiene noch bei der Hummel zwischen den verschiedenen Gruppen. Jedoch konnte bei der Honigbiene eine veränderte Wahrscheinlichkeit der Sammelaktivität zwischen der Kontroll-, der Insektizid- und der Fungizid-Gruppe festgestellt werden, was zu Auswirkungen auf das komplette Volk führen kann.

Die **erste Hypothese**, dass das Überleben und das Verhalten von Honig- und Wildbienen durch synergistische Effekte zugelassener Fungizide und Insektizide beeinflusst werden kann, auch wenn die einzelnen PSM zu keinen negativen Auswirkungen führen, konnte durch unsere Mortalitäts- und Verhaltensstudien teilweise bestätigt werden. Effekte von PSM auf diese Verhaltensweisen können nicht ausgeschlossen werden.

Die **zweite Hypothese**, dass auch minimale negative Folgen von Insektiziden, Fungiziden oder deren Kombination auf das Verhalten von Honig- und Wildbienen mit Hilfe unserer empfindlichen und realitätsnahen Verhaltensassays aufgedeckt werden können, wurde bestätigt. Auch wenn wir in den meisten Verhaltenstests keine PSM-Effekte nachweisen konnten, wurde deutlich, dass sich die gewählten Assays sehr gut eignen, um mögliche Auswirkungen von PSM auf Bestäuber zu untersuchen.

Die **dritte Hypothese**, dass die Sammelaktivität bzw. die Orientierung von Honigbienen und Hummeln während ihrer Lebenszeit durch subletale Insektizid- und Fungizid-Konzentrationen negativ beeinflusst wird, konnte durch diese Studie nicht bestätigt werden. Lediglich die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Arbeiterin eine Sammlerin wurde, unterschied sich in einem Teilversuch. Effekte von PSM auf die Sammelaktivität und die Orientierung können jedoch durch andere im Feld vorkommende Konzentrationen und Mischungen nicht ausgeschlossen werden.

## 6.2 Arbeitspaket 2: Auswirkungen von Insektizid-Fungizid-Mischungen auf die Honigbienenentwicklung

Es wurden Honigbienen *in-vitro* per Hand im Labor aufgezogen. Die **Larven** bekamen unterschiedliche PSM Behandlungen, wobei unsere **vierte Hypothese**, dass subletale Effekte der Insektizid-Fungizid-Mischung auftreten, bestätigt werden konnte. Honigbienen unter diesem Einfluss waren leichter und starben früher. Es ist möglich, dass ebenso der Beitrag dieser Bienen zur Volksstärke (Pflege, Sammelleistung, ...) beeinträchtigt ist und diese subletalen Effekte eine Auswirkung auf das ganze Volk haben.

## 6.3 Arbeitspaket 3: Wirkung von Insektizid-Fungizid-Mischungen auf die Volksentwicklung und den Polleneintrag in 9 realen Agrarlandschaften Bayerns mit unterschiedlicher Nutzungsintensität und Blüten-Ressourcen-Verfügbarkeit

Wir haben die Auswirkung der PSM-Behandlungen auf Vollvölker in 9 verschiedenen Landschaften untersucht. Hierbei haben wir verschiedene Daten erhoben, wie **Volksentwicklung** durch Wabenschätzungen, **Gewichtsentwicklung**, **Polleneintrag**, sowie **Diversität** und **PSM-Rückstände** im Pollen in den unterschiedlichen Umgebungen.

Die **fünfte Hypothese**, dass die Volksvitalität in realen Landschaften durch unsere Insektizid-Fungizid-Mischung herabgesetzt wird, konnte nicht bestätigt werden. Die Bienenvölker konnten den Stressor PSM kompensieren und zeigten keinen Vitalitätsverlust in der untersuchten Zeitspanne.

Die **sechste Hypothese**, dass die Resilienz von Honigbienenvölkern gegenüber PSM durch eine gute Nahrungsversorgung (vielfältige Pollen- und Nektarquellen) erhöht wird, konnten wir aufgrund der Kompensation der Pflanzenschutzmitteleffekte nicht bestätigen. Dennoch hatten Völker in eingeräumten Landschaften mit einem heterogenen Habitat eine höhere Pollendiversität zur Verfügung und hatten einen effizienteren Energieverbrauch.

Die Versuche mit den PSM Mospilan® und Cantus® Gold sowie deren Kombination zur Mortalität und zu den verschiedenen Verhaltensweisen wie der Empfindlichkeit für Zuckerwasser, den kognitiven Fähigkeiten und dem Orientierungs- und Sammelflugverhalten wurden erfolgreich abgeschlossen. Auch die Effekte auf die Larven- und Völkerentwicklung konnten abschließend untersucht werden.

## 7 Ausblick

Die Berechnungen der im Projekt verwendeten Konzentrationen basieren auf Rückstandswerten aus dem Feld. Da es hierbei oft zu starken Schwankungen kommt, sollten in Zukunft weitere realistische Dosen berechnet und getestet werden [10, 21]. Zudem stellen die PSM-Anwendungen ein dynamisches Feld dar, da sich Zulassungen häufig ändern oder Notfallzulassungen in Kraft treten. Außerdem gibt es zwischen verschiedenen Ländern, innerhalb aber auch außerhalb der EU, große Unterschiede was Zulassungen verschiedener PSM betrifft. Aus diesen Gründen ist es sinnvoll auch andere Kombinationen, als die hier getestete Mischung aus Neonikotinoid und Nicht-SBI Fungizid zu untersuchen. Es gibt eine Vielzahl an PSM und eine enorme Menge an Kombinationsmöglichkeiten. Auch das Einbeziehen von mehr als zwei PSM oder das Kombinieren weiterer Stressoren sollte in Zukunft weiter untersucht werden, um die Sicherheit für Nicht-Zielorganismen zu optimieren. Um diese Komplexität bewältigen zu können, könnte u.a. maschinelles Lernen mit einbezogen werden.

Ein weiterer Punkt, der zukünftig verfolgt werden sollte, ist die Erforschung möglicher Effekte auf Wildbienen. In dieser Studie konnten schon einige Versuche mit der Hummel als Vertreter der Wildbienen durchgeführt werden. Nichtsdestotrotz sollten in Zukunft diese Versuche noch weiter optimiert werden, sodass sie beispielsweise im Freiland und mit mehreren Konzentrationen durchgeführt werden können. Zudem sollten dringend auch andere, vor allem solitäre Wildbienen untersucht werden, da diese wichtige Unterschiede in der Ökologie im Vergleich zu Honigbienen oder sozialen Wildbienen aufweisen und dadurch stärker von PSM-Effekten betroffen sein könnten [48].

Mit dem Abschluss der Daten-Auswertung sollen die Ergebnisse in wissenschaftlichen Journalen veröffentlicht werden.

## 8 Veröffentlichungen

Ein Teil der im Bericht gezeigten Daten wurde in wissenschaftlichen Journals unter einer Creative Commons Lizenz (Link zu [Creative Commons Lizenz](#)) veröffentlicht (angepasste Statistik und Abbildungen).

Für Daten aus Kapitel 5.1.2 siehe:

Schuhmann, A., Schmid, A. P., Manzer, S., Schulte, J., Scheiner, R. (2022). Interaction of Insecticides and Fungicides in Bees. *Front. Insect Sci.* 1, 1–14. doi: 10.3389/finsec.2021.808335.

Für Daten aus Kapitel 5.1.1, 5.1.2 und 5.1.3 siehe:

Schuhmann, A., Scheiner, R. (2023). A combination of the frequent fungicides boscalid and dimoxystrobin with the neonicotinoid acetamiprid in field-realistic concentrations does not affect sucrose responsiveness and learning behavior of honeybees. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 256, 114850. doi: 10.1016/j.ecoenv.2023.114850.

## Literaturverzeichnis

- [1] Hallmann CA, Sorg M, Jongejans E et al. (2017) More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. PLOS ONE 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185809>
- [2] Goulson D, Nicholls E, Botías C et al. (2015) Bee declines driven by combined Stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. Science 347:1255957. <https://doi.org/10.1126/science.1255957>
- [3] Stanley DA, Smith KE, Raine NE (2015) Bumblebee learning and memory is impaired by chronic exposure to a neonicotinoid pesticide. Scientific Reports 5. <https://doi.org/10.1038/srep16508>
- [4] Schuhmann A, Schmid AP, Manzer S et al. (2022) Interaction of Insecticides and Fungicides in Bees. Frontiers in Insect Science 1. <https://doi.org/10.3389/finsc.2021.808335>
- [5] DeGrandi-Hoffman G, Chen Y, Watkins Dejong E et al. (2015) Effects of Oral Exposure to Fungicides on Honey Bee Nutrition and Virus Levels. Journal of Economic Entomology 108:2518–2528. <https://doi.org/10.1093/jee/tov251>
- [6] Börner H, Schlüter K, Aumann J (2009) Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 8th edn. Springer-Lehrbuch. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- [7] Iverson A, Hale C, Richardson L et al. (2019) Synergistic effects of three sterol biosynthesis inhibiting fungicides on the toxicity of a pyrethroid and neonicotinoid insecticide to bumble bees. Apidologie 50:733–744. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00681-0>
- [8] Stanley DA, Gunning D, Stout JC (2013) Pollinators and pollination of oilseed rape crops (*Brassica napus* L.) in Ireland: Ecological and economic incentives for pollinator conservation. Journal of Insect Conservation 17:1181–1189. <https://doi.org/10.1007/s10841-013-9599-z>
- [9] European Commission (2022) EU Pesticides Database - Active substances, safeners and synergists. <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/active-substances>. Accessed 13 Dec 2022
- [10] Rosenkranz P, Ohe W von der, Schäfer M et al. (2019) Deutsches Bienenmonitoring - DeBiMo
- [11] Cox C, Surgan M (2006) Unidentified inert ingredients in pesticides: Implications for human and environmental health. Environmental Health Perspectives 114:1803–1806. <https://doi.org/10.1289/ehp.9374>
- [12] Sharma A, Kumar V, Shahzad B et al. (2019) Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. SN Applied Sciences 1. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1485-1>
- [13] Lucchetti MA, Kilchenmann V, Glauser G et al. (2018) Nursing protects honeybee larvae from secondary metabolites of pollen. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 285. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2849>
- [14] Dively GP, Embrey MS, Kamel A et al. (2015) Assessment of Chronic Sublethal Effects of Imidacloprid on Honey Bee Colony Health. 19326203 10:e0118748. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118748>
- [15] Rosenkranz P, Ohe W von der, Schäfer M et al. (2016) Deutsches Bienenmonitoring - DeBiMo
- [16] Johnson RM (2015) Honey bee toxicology. 00664170 60

- [17] El-Nahhal Y (2020) Pesticide residues in honey and their potential reproductive toxicity. *Science of the Total Environment* 741:139953. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139953>
- [18] Luken DJ, von der Ohe W (2018) A research about different residues in pollen and honey samples. In: *Hazards of Pesticides to Bees*, pp 198–202
- [19] Rosenkranz P, Ohe W von der, Moritz R et al. (2013) Deutsches Bienenmonitoring - De-BiMo
- [20] Rortais A, Arnold G, Dorne JL et al. (2017) Risk assessment of pesticides and other stressors in bees: Principles, data gaps and perspectives from the European Food Safety Authority. *Science of the Total Environment*:524–537. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.127>
- [21] Castle D, Alkassab AT, Bischoff G et al. (2022) High nutritional status promotes vitality of honey bees and mitigates negative effects of pesticides. *Science of the Total Environment* 806:151280. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151280>
- [22] Raine NE, Ings TC, Ramos-Rodriguez O et al. (2006) Intercolony variation in learning performance of a wild british bumblebee population (Hymenoptera: Apidae: *Bombus terrestris audax*). *Entomologia Generalis* 28:241–256. <https://doi.org/10.1127/entom.gen/28/2006/241>
- [23] Raine NE, Chittka L (2008) The correlation of learning speed and natural foraging success in bumble-bees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275:803–808. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1652>
- [24] Dyer AG, Dorin A, Reinhardt V et al. (2014) Bee reverse-learning behavior and intra-colony differences: Simulations based on behavioral experiments reveal benefits of diversity. *Ecological Modelling* 277:119–131. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2014.01.009>
- [25] Schmehl DR, Tomé HVV, Mortensen AN et al. (2016) Protocol for the in vitro rearing of honey bee (*Apis mellifera* L.) workers. *Journal of Apicultural Research* 55:113–129. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1203530>
- [26] Danner N, Härtel S, Steffan-Dewenter I (2014) Maize pollen foraging by honey bees in relation to crop area and landscape context. *Basic and Applied Ecology* 15:677–684. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2014.08.010>
- [27] Park MG, Blitzer EJ, Gibbs J et al. (2015) Negative effects of pesticides on wild bee communities can be buffered by landscape context. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282:20150299. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0299>
- [28] Seeley TD (1995) *The Wisdom of the Hive*. Harvard University Press
- [29] von Frisch K (1965) *Tanzsprache und Orientierung der Bienen*. Springer, Berlin/Heidelberg/New York
- [30] Menzel R (1993) Associative learning in honey bees. *Apidologie* 24:157–168. <https://doi.org/10.1051/apido:19930301>
- [31] Aurorès-Weber A, Brito Sanchez MG de, Giurfa M et al. (2010) Aversive reinforcement improves visual discrimination learning in free-flying honeybees. *PLOS ONE* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015370>
- [32] Giurfa M (2004) Conditioning procedure and color discrimination in the honeybee *Apis mellifera*. *Naturwissenschaften* 91:228–231. <https://doi.org/10.1007/s00114-004-0530-z>
- [33] Menzel R (1967) Untersuchungen zum Erlernen von Spektralfarben durch die Honigbiene (*Apis mellifica*). *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 56. <https://doi.org/10.1007/BF00333562>

- [34] Tosi S, Nieh JC (2017) A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, alters honey bee activity, motor functions, and movement to light. *Scientific Reports* 7:15132. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15308-6>
- [35] Menzel R, Marco RJ de, Greggers U (2006) Spatial memory, navigation and dance behaviour in *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 192
- [36] Seeley TD (1986) Social foraging by honeybees: how colonies allocate foragers among patches of flowers. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 19:343–354. <https://doi.org/10.1007/BF00295707>
- [37] Vidau C, Diogon M, Aufauvre J et al. (2011) Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *nosema ceranae*. *PLOS ONE* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021550>
- [38] Tsvetkov N, Samson-Robert O, Sood K et al. (2017) Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. *Science* 356:1395–1397. <https://doi.org/10.1126/science.aam7470>
- [39] Yang Y, Ma S, Liu F et al. (2020) Acute and chronic toxicity of acetamiprid, carbaryl, cypermethrin and deltamethrin to *Apis mellifera* larvae reared in vitro. *Pest Management Science* 76:978–985. <https://doi.org/10.1002/ps.5606>
- [40] Wu JY, Anelli CM, Sheppard WS (2011) Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PLOS ONE* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014720>
- [41] Du Rand EE, Smit S, Beukes M et al. (2015) Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. *Sci Rep* 5:11779. <https://doi.org/10.1038/srep11779>
- [42] Han W, Yang Y, Gao J et al. (2019) Chronic toxicity and biochemical response of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) exposed to acetamiprid and propiconazole alone or combined. *Ecotoxicology* 28:399–411. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02030-4>
- [43] Wu T, Han B, Wang X et al. (2022) Chlorothalonil alters the gut microbiota and reduces the survival of immature honey bees reared in vitro. *Pest Management Science* 78:1976–1981. <https://doi.org/10.1002/ps.6816>
- [44] Kablau A, Erler S, Eckert JH et al. (2023) Effects of Flupyradifurone and Two Reference Insecticides Commonly Used in Toxicological Studies on the Larval Proteome of the Honey bee *Apis mellifera*. *Insects* 14:77. <https://doi.org/10.3390/insects14010077>
- [45] Schmehl DR, Teal PEA, Frazier JL et al. (2014) Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* 71:177–190. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.10.002>
- [46] Danner N, Keller A, Härtel S et al. (2017) Honey bee foraging ecology: Season but not landscape diversity shapes the amount and diversity of collected pollen. *19326203* 12:e0183716. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183716>
- [47] Dreller C, Page Jr. RE, Fondrk MK (1999) Regulation of pollen foraging in honeybee colonies: effects of young brood, stored pollen, and empty space. *Behav Ecol Sociobiol* 45:227–233. <https://doi.org/10.1007/s002650050557>
- [48] Wood TJ, Michez D, Paxton RJ et al. (2020) Managed honey bees as a radar for wild bee decline? *Apidologie* 51

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: A. Honigbienen in Käfig und B. Hummeln in Brutbox für Mortalitätsstudien. Über Futtergefäße wurde die entsprechende Futterlösung angeboten..... 11
- Abbildung 2: Neue Methode zur Vierteilung einer Hummelkolonie für die chronische Fütterung. Die vier neuen Brutkammern werden in blau gezeigt. Sowohl Arbeiterinnen als auch Brut wurden gleichmäßig auf die Viertel verteilt. In rot sind die Futterkammern markiert. Jede Teilkolonie hat Zugang zu einer Futterkammer, in der die Futterlösung angeboten werden kann. In den Brutkammern herrscht während der Fütterungsdauer Dunkelheit. .... 11
- Abbildung 3: Fixierte A. Honigbiene und B. Hummel, die auf die Stimulation der Antennen mit Zuckerwasser eine Rüsselantwort (PER) zeigen. C. Zeitlicher Ablauf der differentiellen Konditionierung. Konditionierter Stimulus (CS+ (belohnter Duft)/CS- (bestrafter Duft)) und unkonditionierter Stimulus (US+ (Belohnung)/US- (Bestrafung)) wurden nach einem genauen Protokoll präsentiert. D. Die fixierte Biene erfährt die gleichzeitige Stimulation mit dem konditionierten Stimulus (Duft) und dem unkonditionierten Stimulus (Lösung) und antwortet mit einer PER. .... 12
- Abbildung 4: Differentielle Konditionierung von Honigbienen und Umlernen unter PSM-Einfluss. A. Rotating Screen mit sehr ähnlichen Gelbtönen (obere zwei Hänger hellgelb, untere zwei Hänger dunkelgelb). Die Position der Hänger kann durch die verschiedenen Aufhängungen und Drehen des Screens beliebig verändert werden. Hierbei richteten sich die Landeplattformen automatisch zum Boden aus. B. Auf den Landeplattformen wurde jeweils ein Gelbton entweder belohnt (Zuckerlösung) oder bestraft (bittere Chininlösung). Die Biene sollte lernen, die Gelbtöne zu unterscheiden..... 13
- Abbildung 5: A. Junge Biene mit RFID-Tag. B. Käfige wurden für die Fütterungsdauer im Volk platziert, um die Akzeptanzrate zu steigern. C. Scanner-Paare zur Aufnahme der Flugaktivität der Honigbienen am Stockeingang. .... 14
- Abbildung 6: A. Mit einem RFID-Tag beklebte Hummel. B. Aufbau des RFID-Versuchs: Die Stammkolonie wurde auf die vier Brutkammern (blau) aufgeteilt. Jede Teilkolonie hatte über die Futterkammern (rot) Zugang zur Flugarena, in der die Futterlösungen angeboten wurden. Am Zugang zur Flugarena wurden die Scanner-Paare angebracht, um die Hummeln zu erfassen. .... 15
- Abbildung 7: A. Entwicklung einer Honigbiene in der *in-vitro* Larvenaufzucht. An Tag 1-3 waren die Eier auf dem Jenter-Zuchtsystem. Die Larven wurden an Tag 4 in Nicot-Näpfchen auf Larvenplatten (48-Well-Plates) mit vier Futter-Events (Tag 4, 7, 8 und 9) umgesetzt, wobei die letzten drei PSM-Wirkstoffe enthielten. Als Streckmade (Tag 10) wurden die Larven in Puppenplatten zur weiteren Entwicklung umgesetzt. Der Schlupf erfolgte an Tag 21. B. Larve kurz nach dem Umsetzen an Tag 5, C. Larve kurz vor der Streckung an Tag 8, D. Bienen kurz vor dem Schlupf an Tag 20 und E. Geschlüpfte Bienen an Tag 21. .... 15

- Abbildung 8: Beispiele der Landschaftsprofile im Völkerversuch. In weiß sind Agrarflächen dargestellt. Einteilung in Landschaftskategorien: „ausgeräumt“ (viele große Agrarflächen), „mittel“ und „eingeräumt“ (wenig Agrarflächen, viele kleine andere Flächenanteile)..... 18
- Abbildung 9: A. Beispielhafte Aufteilung der Behandlungsarten (Kontrolle, Insektizid, Fungizid und Mischung) an einem Standort. B. Pollenfalle vor einem Volk mit C. Lochgitter, damit die Pollenhöschen beim Durschreiten abgestreift werden und in die darunter befindliche Schublade fallen. D. Fütterung der Pflanzenschutzmittel in einem mit PSM angereicherten Pollenbrei aus dem volkeigenen Pollen durch Auftragen auf die Oberträger der Rähmchen..... 19
- Abbildung 10: Überlebensraten der A, B. Honigbienen ( $n_{fr} = 100/\text{Behandlung}$ ;  $n_{fr*10} = 100/\text{Behandlung}$ ) und C, D. Hummeln ( $n_{fr} = 80/\text{Behandlung}$ ;  $n_{fr*10} = 80/\text{Behandlung}$ ). Die Überlebensrate der Bienen war sowohl bei der Behandlung mit der feldrealistischen Konzentration als auch bei der Fütterung mit der zehnfach höheren Dosis hoch. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrolle konnten nur bei der höheren Konzentration im Versuch mit der Honigbiene festgestellt werden (Fisher's Exact Test für paarweise Vergleiche, Honigbiene: fr:  $p_{\text{Kontrolle vs Insektizid}} > 0,017$ ;  $p_{\text{Kontrolle vs Fungizid}} > 0,017$ ;  $p_{\text{Kontrolle vs Mischung}} > 0,017$ ; fr\*10:  $p_{\text{Kontrolle vs Insektizid}} > 0,017$ ;  $p_{\text{Kontrolle vs Fungizid}} > 0,017$ ;  $p_{\text{Kontrolle vs Mischung}} < 0,017$  (\*) (angepasste p-Werte auf Grund Mehrfachvergleiche:  $p < 0,017$  (\*),  $p < 0,003$  (\*\*),  $p < 0,0003$  (\*\*\*)); Hummel: fr:  $p_{\text{Kontrolle vs Insektizid}} > 0,017$ ;  $p_{\text{Kontrolle vs Fungizid}} > 0,017$ ;  $p_{\text{Kontrolle vs Mischung}} > 0,017$ ; fr\*10:  $p_{\text{Kontrolle vs Insektizid}} > 0,017$ ;  $p_{\text{Kontrolle vs Fungizid}} > 0,017$ ;  $p_{\text{Kontrolle vs Mischung}} > 0,017$ )..... 22
- Abbildung 11: A, B. Gustatory response scores (GRS) der Honigbienen nach chronischer Behandlung mit der feldrealistischen oder der zehnfach höheren Konzentration. Es wurde kein Behandlungs-Effekt sichtbar (Kruskal-Wallis Test, Honigbiene:  $p_{fr} > 0,05$ ;  $p_{fr*10} > 0,05$ ) (fr:  $n_{\text{Kontrolle}}: 44$ ,  $n_{\text{Insektizid}}: 46$ ,  $n_{\text{Fungizid}}: 41$ ,  $n_{\text{Mischung}}: 39$ ; fr\*10:  $n_{\text{Kontrolle}}: 52$ ,  $n_{\text{Insektizid}}: 48$ ,  $n_{\text{Fungizid}}: 43$ ,  $n_{\text{Mischung}}: 45$ ). C. GRS der Hummeln nach chronischer Behandlung. Es wurde kein Effekt der Behandlung sichtbar (Kruskal-Wallis Test, Hummel:  $p_{fr*10} > 0,05$ ) ( $n_{\text{Kontrolle}}: 104$ ,  $n_{\text{Insektizid}}: 104$ ,  $n_{\text{Fungizid}}: 112$ ,  $n_{\text{Mischung}}: 103$ ). ..... 23
- Abbildung 12: A. Lern-Scores der Honigbienen nach feldrealistischer Behandlung. Die Anzahl an Reaktionen auf den CS+ war höher als die Anzahl der Reaktionen auf den CS-. Ein Behandlungs-Effekt wurde nicht sichtbar (Kruskal-Wallis Test:  $p_{\text{CS+}} > 0,05$ ;  $p_{\text{CS-}} > 0,05$ ) ( $n_{\text{Kontrolle}}: 44$ ,  $n_{\text{Insektizid}}: 46$ ,  $n_{\text{Fungizid}}: 41$ ,  $n_{\text{Mischung}}: 39$ ). B. Umlern-Scores der Honigbienen nach feldrealistischer Behandlung. Die Anzahl der Reaktionen auf den zuvor bestrafte und jetzt belohnte Duft nahm zu. Ein Behandlungs-Effekt wurde nicht sichtbar (Kruskal-Wallis Test:  $p_{\text{CS+}} > 0,05$ ;  $p_{\text{CS-}} > 0,05$ ) ( $n_{\text{Kontrolle}}: 29$ ,  $n_{\text{Insektizid}}: 22$ ,  $n_{\text{Fungizid}}: 26$ ,  $n_{\text{Mischung}}: 19$ ). C. Lern-Scores der Honigbienen nach zehnfach höherer Behandlung. Die Anzahl an Reaktionen auf den

- CS+ war höher als die Anzahl der Reaktionen auf den CS-. Ein Behandlungs-Effekt wurde nicht sichtbar (Kruskal-Wallis Test:  $p_{CS+} > 0,05$ ;  $p_{CS-} > 0,05$ ) ( $n_{Kontrolle}$ : 52,  $n_{Insektizid}$ : 48,  $n_{Fungizid}$ : 43,  $n_{Mischung}$ : 45). D. Umlern-Scores der Honigbienen nach zehnfach höherer Behandlung. Die Anzahl der Reaktionen auf den zuvor bestrafte und jetzt belohnten Duft nahm zu. Ein Behandlungs-Effekt wurde nicht sichtbar (Kruskal-Wallis Test:  $p_{CS+} > 0,05$ ;  $p_{CS-} > 0,05$ ) ( $n_{Kontrolle}$ : 24,  $n_{Insektizid}$ : 25,  $n_{Fungizid}$ : 19,  $n_{Mischung}$ : 17).  
..... 24
- Abbildung 13: Freifluglernen mit Honigbienen am Rotating Screen unter Einfluss von Pflanzenschutzmitteln (PSM, feldrealistisch\*10). Die Bienen (n pro Gruppe = 20) sollten lernen zwei sehr ähnliche Gelbtöne zu unterscheiden und wurden nach der Lernphase bzw. Umlernphase mit 20 Anflügen getestet (CS+ (Conditioned Stimulus, belohnte Farbe angefliegen), CS- (bestrafte Farbe angefliegen) A. Differentielle Konditionierung: alle bis auf die Bienen, welche die PSM Mischung erhalten hatten, lernten die belohnte Farbe zu erkennen (Wilcoxon matched-pairs signed rank test, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ) B. Nach der Umlernphase mit dem Tausch der Farben auf belohnt bzw. unbelohnt lernte keine Behandlungsgruppe um (Wilcoxon matched-pairs signed rank test,  $p > 0.05$ )..... 25
- Abbildung 14: Anteil der Anflüge auf belohnte Blüten während der Konditionierung. Mit steigendem Lerndurchgang nahm der Anteil der Anflüge auf belohnte Blüten zu. Die Behandlungsgruppen unterschieden sich nicht von der Kontrolle (GLM,  $p > 0,05$ ) ( $n_{Kontrolle}$ : 21,  $n_{Insektizid}$ : 21,  $n_{Fungizid}$ : 21,  $n_{Mischung}$ : 22). ..... 26
- Abbildung 15: A. Wahrscheinlichkeit der Sammelaktivität, B. Anzahl an aktiven Sammeltagen, C. Anzahl der Sammelflüge pro Sammeltag und D. Dauer pro Sammelflug der Honigbienen, die mit einer feldrealistischen Konzentration der PSM gefüttert wurden. Es wurden keine Behandlungseffekte festgestellt (GLMM,  $p_{Wahrscheinlichkeit} > 0,05$ ;  $p_{Anzahl\ Tage} > 0,05$ ;  $p_{Flüge\ pro\ Tag} > 0,05$ ;  $p_{Dauer\ pro\ Flug} > 0,05$ ) ( $n_{Kontrolle}$ : 77,  $n_{Insektizid}$ : 100,  $n_{Fungizid}$ : 86,  $n_{Mischung}$ : 88). E. Wahrscheinlichkeit der Sammelaktivität, F. Anzahl an aktiven Sammeltagen, G. Anzahl der Sammelflüge pro Sammeltag und H. Dauer pro Sammelflug der Honigbienen, die mit einer zehnfach höheren Konzentration der PSM gefüttert wurden. Die Behandlung hatte keinen Effekt auf die Anzahl an aktiven Sammeltagen, die Anzahl der Sammelflüge pro Sammeltag und die Dauer pro Sammelflug (GLMM,  $p_{Anzahl\ Tage} > 0,05$ ;  $p_{Flüge\ pro\ Tag} > 0,05$ ;  $p_{Dauer\ pro\ Flug} > 0,05$ ). Die Wahrscheinlichkeit der Sammelaktivität war bei den Fungizid-Tieren niedriger und bei den Insektizid-Tieren höher als bei der Kontrolle (GLMM, Kontrolle/Insektizid  $p_{Wahrscheinlichkeit} < 0,05$ ; Kontrolle/Fungizid:  $p_{Wahrscheinlichkeit} < 0,001$ ) ( $n_{Kontrolle}$ : 165,  $n_{Insektizid}$ : 164,  $n_{Fungizid}$ : 172,  $n_{Mischung}$ : 176)..... 28
- Abbildung 16: A. Anzahl an aktiven Sammeltagen, B. Anzahl der Sammelflüge pro Sammeltag und C. Dauer pro Sammelflug der Hummeln, die mit einer zehnfach höheren Konzentration der PSM gefüttert wurden. Es wurden

|               |  |    |
|---------------|--|----|
|               | keine Behandlungs-Effekte festgestellt (GLMM, $p_{\text{Anzahl Tage}} > 0,05$ ; $p_{\text{Flüge pro Tag}} > 0,05$ ; $p_{\text{Dauer pro Flug}} > 0,05$ ) ( $n_{\text{Kontrolle}}: 76$ , $n_{\text{Insektizid}}: 90$ , $n_{\text{Fungizid}}: 75$ , $n_{\text{Mischung}}: 92$ ). .....   | 29 |
| Abbildung 17: | Überlebensrate von Honigbienen unter Pflanzenschutzmitteleinfluss während der Larvenentwicklung. Als Fungizid wurden die aktiven Wirkstoffe Boscalid und Dimoxystrobin ( $n = 184$ ), als Insektizid Acetamiprid ( $n = 194$ ) und in Kombination als Mischung ( $n = 191$ ) verabreicht. Die Kontrolle ( $n = 189$ ) erhielt die gleiche Menge Aceton, in welche die PSM-Wirkstoffe gelöst wurden. Die Gruppen unterschieden sich signifikant voneinander (GLMM, $p < 0,001$ ). Mischungstiere überlebten signifikant schlechter als die Kontrollgruppe (GLHT, $** p < 0,01$ ) und im Vergleich zur Insektizidgruppe (GLHT, $*** p < 0,0001$ ). .....   | 30 |
| Abbildung 18: | Die Behandlung zeigte einen Effekt auf das Gewicht der adulten Bienen (GLMM, $p < 0,001$ ). Das Gewicht der Mischungstiere war im Vergleich zur Kontrolle niedriger (GLHT, $*** p < 0,001$ ) während die Einzelbehandlungen keinen Effekt im Vergleich zur Kontrolle zeigten. Die Mischungstiere waren ebenfalls leichter als die Insektizid-Tiere (GLHT, $** p < 0,01$ ). ( $n_{\text{Kontrolle}}: 181$ , $n_{\text{Fungizid}}: 164$ , $n_{\text{Insektizid}}: 196$ , $n_{\text{Mix}}: 195$ ). .....  | 31 |
| Abbildung 19: | Die Flügelabstände einer zufälligen Stichprobe der Honigbienen wurde vermessen ( $n = 25$ pro Behandlung). Diese unterschieden sich nicht zwischen den Behandlungsgruppen (GLMM, $p > 0,05$ ). .....   | 31 |
| Abbildung 20: | A. Steigende Anzahl von Pollenspezies entlang der Landschaftskategorien an jeweils einem der Standorte für ausgeräumt ( $n = 13$ ), mittel ( $n = 15$ ) und eingeräumte ( $n = 21$ ) Landschaften. B. Die Anzahl der PSM-Rückstände in den gleichen Pollenproben stieg von der Kategorie ausgeräumt ( $n = 4$ ), mittel ( $n = 6$ ) bis eingeräumt ( $n = 14$ ) an. ....   | 33 |
| Abbildung 21: | Übersicht über die für die Bienen gesammelten Ressourcen: Pollen, Nektar und Honig. A. Pollenhöschchen verschiedener Blütenherkunft. B. Der durchschnittliche Polleneintrag [g/Tag] war nicht unterschiedlich zwischen den Landschaftskategorien ausgeräumt, mittel und eingeräumt (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$ , $n = 179$ pro Kategorie). C. In der mittleren Landschaftskategorie hatte die PSM Behandlung einen Einfluss auf den Polleneintrag (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$ , $n = 45$ pro Behandlungsgruppe). Hierbei trug die Fungizidgruppe mehr Pollen ein als die Insektizid- und Mischungsgruppe (Paarweiser Wilcox-Test, jeweils $* p < 0.05$ ). D. Der Inhalt einer Wabenseite umfasst eine Oberfläche von $800 \text{ cm}^2$ (gestrichelter Kasten, mintfarben). Ein Bienenvolk enthält 20 Wabenseiten. Honigflächen sind weiß verdeckelt (gelber Kasten) E. Honig- und Nektarflächen wurden zusammenaddiert und werden als vollständig gefüllte Rähmchen angegeben. Dargestellt ist die Anzahl der durchschnittlich vollständig gefüllten Rähmchen gemittelt über alle Schätzungen. Die Menge an Honig und Nektar unterschied sich zwischen den Landschaftskategorien (ANOVA, $p < 0.001$ , $n = 72$ pro Landschaftskategorie). Bienen in eingeräumten Landschaften hatten |    |

mehr Honig und Nektar im Vergleich zur mittleren Kategorie (Tukey-hsd, \*\*\*  $p < 0.001$ ) und ausgeräumten Landschaften (Tukey-hsd, \*  $p < 0.05$ ). F. Die Behandlung mit PSM hatte jedoch keinen Einfluss auf die Menge des gesammelten Honigs und Nektars (ANOVA,  $p > 0.05$ ). n.s. = nicht signifikant..... 34

Abbildung 22: Übersicht über die Entwicklung der Bienenvölker: Brutflächen und Gewichtsveränderung A. Der Inhalt einer Wabenseite umfasst eine Oberfläche von  $800 \text{ cm}^2$  (gestrichelter Kasten, mintfarben). Ein Bienenvolk enthält 20 Wabenseiten. Brutflächen sind bräunlich verdeckelt (gelber Kasten). B. Brutflächen wurden zusammenaddiert und werden als vollständig gefüllte Rähmchen angegeben. Dargestellt ist die Anzahl der durchschnittlich vollständig gefüllten Bruträhmchen gemittelt über alle Schätzungen. Diese wurden durch die Landschaftskategorien nicht beeinflusst (ANOVA,  $p > 0.05$ ,  $n = 72$  pro Landschaftskategorie). C. Die Behandlung mit PSM hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die angelegten Brutflächen in den verschiedenen Landschaften (ANOVA,  $p > 0.05$ ,  $n = 18$  pro Behandlung in jeder Landschaftskategorie). D. Stockwaage (Apigraph 4.0 von Wolfwaagen), welche die Gewichtsveränderung eines Bienenvolkes aufnimmt. E. Dargestellt ist die durchschnittliche Gewichtsveränderung zwischen den Schätzintervallen. Hierbei hatte die Landschaftskategorie keinen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung (ANOVA,  $p > 0.05$ ,  $n = 58$  pro Landschaftskategorie). F. Die Behandlung mit PSM hatte ebenfalls keinen Effekt auf die Gewichte der Völker (ANOVA,  $n = 15$  pro Behandlungsgruppe in jeder Landschaftskategorie). n.s. = nicht signifikant ..... 35

## Anhang

Die Tabellen S 1 bis S 3 zeigen eine Übersicht über die in unseren Versuchen verwendeten Konzentrationen und ihre Berechnungsgrundlage für die Wirkstoffe der verwendeten PSM. Das Runden einiger Ergebnisse war nötig, um geeignete Futter-Konzentrationen zu erhalten.

**Tabelle S 1:** Konzentrationen und ihre Berechnungen auf Basis des Honigkonsums (Mortalität, Empfindlichkeit f. Zuckerwasser, Lernen, Sammelverhalten)

|                        | Rückstands-<br>werte                    |                                      |  | Chronische Fütterung<br>( <i>ad libitum</i> gefüttert) | Akute Fütterung<br>(10µl gefüttert)    |
|------------------------|---|--------------------------------------|--|--|--|
| Aktiver Wirk-<br>stoff | Aktiver Wirk-<br>stoff in 1kg<br>Honig  | Realitätsbezug                       | Verbreichter<br>Wirkstoff/<br>Biene/Tag [µg] | Konzentration Zucker-<br>wasser [µg/l]                 | Konzentration Zucker-<br>wasser [µg/l] |
| Acetamidrid            | 72,5µg<br>(El-Nahhal,<br>2020)          | Feldrealistisch                      | 0,01   | 200  | 820                                    |
|                        |   | Zehnerpotenz über<br>feldrealistisch | 0,1  | 2000   | 8200                                   |
| Boscalid               | 5µg<br>(Luken und von<br>der Ohe, 2018) | Feldrealistisch                      | 0,0006                                       | 10   | 60                                     |
|                        |   | Zehnerpotenz über<br>feldrealistisch | 0,006  | 100  | 600                                    |
| Dimoxystrobin          | 5µg<br>(Luken und von<br>der Ohe, 2018) | Feldrealistisch                      | 0,0006                                       | 10   | 60                                     |
|                        |   | Zehnerpotenz über<br>feldrealistisch | 0,006  | 100  | 600                                    |

**Tabelle S 2:** Konzentrationen und ihre Berechnungen auf Basis des Pollenkonsums (Larvenaufzucht)

|                        | Rückstands-<br>werte                     |                                      |  | Chronische Fütterung<br>( <i>ad libitum</i> gefüttert) | Akute Fütterung |
|------------------------|--|--------------------------------------|--|--|-----------------|
| Aktiver Wirk-<br>stoff | Aktiver Wirk-<br>stoff in 1kg<br>Pollen  | Realitätsbezug                       | Verbreichter<br>Wirkstoff/<br>Biene/Tag [µg] | Konzentration Futterlö-<br>sung [µg/l]                 |                 |
| Acetamidrid            | ~ 70 µg<br>(Rosenkranz et<br>al., 2019)  | Feldrealistisch                      | 0,001  | 20   | nicht angewandt |
|                        |  | Zehnerpotenz über<br>feldrealistisch | 0,01   | 200  | nicht angewandt |
| Boscalid               | ~ 500 µg<br>(Rosenkranz et<br>al., 2019) | Feldrealistisch                      | 0,006  | 100  | nicht angewandt |
|                        |  | Zehnerpotenz über<br>feldrealistisch | 0,06   | 1000   | nicht angewandt |
| Dimoxystrobin          | ~ 500 µg<br>(Rosenkranz et<br>al., 2019) | Feldrealistisch                      | 0,006  | 100  | nicht angewandt |
|                        |  | Zehnerpotenz über<br>feldrealistisch | 0,06   | 1000   | nicht angewandt |

**Tabelle S 3:** Konzentrationen und ihre Berechnungen auf Basis des Pollenkonsums (Völkerversuch)

|                        | Rückstands-<br>werte                     |                 |  | Chronische Fütterung<br>( <i>ad libitum</i> gefüttert) | Akute Fütterung |
|------------------------|--|-----------------|--|--|-----------------|
| Aktiver Wirk-<br>stoff | Aktiver Wirk-<br>stoff in 1kg<br>Pollen  | Realitätsbezug  | Verbreichter<br>Wirkstoff/<br>Biene/Tag [µg] | Konzentration Futterlö-<br>sung [µg/kg]                |                 |
| Acetamidrid            | ~ 70 µg<br>(Rosenkranz et<br>al., 2019)  | Feldrealistisch | nicht berechnet                              | 70   | nicht angewandt |
| Boscalid               | ~ 500 µg<br>(Rosenkranz et<br>al., 2019) | Feldrealistisch | nicht berechnet                              | 500  | nicht angewandt |
| Dimoxystrobin          | ~ 500 µg<br>(Rosenkranz et<br>al., 2019) | Feldrealistisch | nicht berechnet                              | 500  | nicht angewandt |