

Abschlussbericht Teilprojekt Nr. 3

Verunreinigungen in Bienenwachs

Projektverbund BayÖkotox

Ökotoxikologische Bewertung von Stoffen in der Umwelt

Projektnehmende/Bearbeitende

Universität Regensburg
Institut für Zoologie
Projektleiter:
Prof. Dr. Erhard Strohm
Tel. +49-941-943-3072
Mail: erhard.strohm@biologie.uni-regensburg.de

Prof. Dr. Joachim Ruther
Tel. +49-941-943-2151
Mail: joachim.ruther@biologie.uni-regensburg.de

PhD: Kevin Bartl

Berichtszeitraum:

1. Februar 2020 bis 15. Juni 2023

Finanziert durch

Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz
Rosenkavalierplatz 2
81925 München

Kooperationspartner

Biokreis e.V. – Verband für ökologischen Landbau und gesunde Ernährung



finanziert durch
Bayerisches Staatsministerium für
Umwelt und Verbraucherschutz



Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	3
1 Kurzzusammenfassung	4
2 Einleitung	5
3 Aufgabenstellung	5
4 Vorgehensweise	6
4.1 Arbeitspaket 1: Monitoring von Bienenwachskontaminanten	6
4.2 Arbeitspaket 2: Feldversuche zur Verbreitung und Wirkung anthropogener Kontaminanten in Bienenwachs	6
4.3 Arbeitspaket 3: Semi-Feld- und Laborversuche zu den Effekten kontaminierten Bienenwachses	9
4.3.1 Eiablage rate der Königinnen, Entwicklungsdauer und Mortalität der Larven, Bauleistung der Arbeiterinnen	9
4.3.2 Immunkompetenz.....	10
4.3.3 Assoziatives Lernvermögen	13
4.3.4 Flugleistung.....	14
4.3.5 Heimfindevermögen	15
5 Ergebnisse und Diskussion	16
5.1 Arbeitspaket 1: Monitoring von Bienenwachskontaminanten	16
5.2 Arbeitspaket 2: Feldversuche zur Verbreitung und Wirkung anthropogener Kontaminanten in Bienenwachs	18
5.3 Arbeitspaket 3: Semi-Feld- und Laborversuche zu den Effekten kontaminierten Bienenwachses	24
5.3.1 Eiablage rate der Königinnen, Entwicklungsdauer und Mortalität der Larven, Bauleistung der Arbeiterinnen	24
5.3.2 Immunkompetenz.....	24
5.3.3 Assoziatives Lernvermögen	27
5.3.4 Flugleistung.....	29
5.3.5 Heimfindevermögen	29
6 Zusammenfassung	31
7 Ausblick	32
8 Veröffentlichungen	33
Literaturverzeichnis	33
Abbildungsverzeichnis	36
Anhang	38

Abkürzungsverzeichnis

AMPs:	Antimikrobielle Peptide
DDT:	Dichlordiphenyltrichlorethan
ESI:	Elektrospray-Ionisation
g:	Gramm
GC-MS/MS:	gekoppelte Gaschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie
GPS:	Global Positioning System
Hs:	Hauzenstein
K-Wachs:	Konventionelles Wachs, Wachs welches in der konventionellen Imkerei in Deutschland zum Einsatz kommt.
K-Volk:	Bienenvolk, welches mit Mittelwänden aus kontaminiertem Wachs ausgestattet wurde.
Kg:	Kilogramm
Km:	Kilometer
LB-Agar:	Lysogeny Broth-Agar
LC-MS/MS:	gekoppelte Flüssigchromatographie/ Tandem-Massenspektrometrie
LPS:	Lipopolysaccharid
m:	Meter
mm:	Millimeter
MP:	Megapixel
MS:	Massenspektrometrie
N:	Gesamtzahl einer Grundgesamtheit
n:	Größe der Stichprobe
NK-Wachs:	Bio-Wachs, mit nur geringfügigen Rückständen.
NK-Volk:	Bienenvolk, welches mit Mittelwänden aus Bio-Wachs ausgestattet wurde.
PER:	<i>proboscis extension reflex</i> – Rüsselstreckreflex
SD:	Standardabweichung
µg:	Mikrogramm

1 Kurzzusammenfassung

Der seit Jahren zu beobachtende Rückgang von Insekten, insbesondere von Bienen, ist eines der aktuell wichtigsten ökologischen Probleme. Unter anderem gelten Umweltchemikalien als mögliche Ursache für die Populationsrückgänge - auch von Honigbienen. Bisher wenig beachtet wurde die Rolle des Bienenwachses der Waben, mit dem die Honigbienen in ständigem Kontakt sind und in dem sich die Larven entwickeln. Die Belastung der Landschaft mit Umweltchemikalien, aber vor allem auch immerliche Maßnahmen (Behandlung gegen die Varroamilbe und Recycling von altem Wachs), könnten dazu führen, dass sich Schadstoffe im Wachs akkumulieren und die Entwicklung und Leistungsfähigkeit von Bienen beeinflussen.

In diesem Projekt untersuchten wir drei Aspekte der Wachskontamination und Bienengesundheit. Erstens wurden Wachsproben aus konventionell und biologisch arbeitenden Imkereien aus ganz Bayern auf mögliche Rückstände von Umweltchemikalien untersucht. Zweitens sollte die Hypothese getestet werden, dass in überwiegend konventionell bewirtschafteten Arealen mehr Rückstände im Bienenwachs zu finden sind als auf überwiegend ökologisch bewirtschafteten Flächen. Drittens sollte die Hypothese getestet werden, dass sich erhöhte Kontaminationen im Wachs auf die Leistungsfähigkeit und die Gesundheit der Bienenvölker und die Leistungsfähigkeit von einzelnen Arbeiterinnen auswirkt. Um solche Effekte von kontaminiertem Bienenwachs auf Völker und Individuen untersuchen zu können, wurden kombinierte Semi-Feld- und Laborversuche durchgeführt.

Das bayernweite Monitoring der Kontaminationen des Bienenwachses zeigte, dass sich im Wachs von Völkern konventionell bewirtschafteter Imkereien signifikant mehr anthropogene Substanzen finden lassen als im Wachs von Bio-Imkereien. Im dritten Jahr des Projektes zeigte sich erstmals ein signifikanter Unterschied bei den Gehalten von Pflanzenschutzmitteln in Wachs, welches aus überwiegend konventionell bewirtschafteten Arealen stammte. Bei dem Vergleich von Volksentwicklung und Honigertrag zeigten sich zwischen konventionell und biologisch bewirtschafteten Arealen keine signifikanten Unterschiede. Es wurden Labor- und Feldexperimente zum Lernvermögen, Heimfindevermögen, der Immunkompetenz, der Flugleistung und der Eiablage rate der Königin durchgeführt. Die Königinnen legten, sofern sie eine Wahl hatten, signifikant häufiger Eier auf einer Bio-Wabe ab, die Anzahl der gelegten Eier unterschied sich hingegen nicht. Beim Lernvermögen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Bienen aus Bio- und konventionellem Wachs. Das gleiche gilt für das Heimfindevermögen und die Flugleistung der Bienen. Bei der Immunkompetenz zeigte sich, dass bei Bienen, welche in konventionellem Wachs aufwuchsen, die antimikrobielle Aktivität der Hämolymphe signifikant erhöht war. Bei Experimenten zur Immunabwehr gegen Fremdkörper und der Anzahl an Hämocyten wurden hingegen keine Unterschiede gefunden.

2 Einleitung

Derzeit ist weltweit ein Rückgang der Abundanz und Diversität von Insekten zu beobachten. Dies gilt auch für natürliche und landwirtschaftlich genutzte Ökosysteme in Bayern. Neben wildlebenden Insekten sind auch die domestizierten Honigbienen betroffen, bei denen Imker immer wieder Verluste ganzer Völker zu beklagen haben. Die Faktoren, die hierfür verantwortlich gemacht werden, sind vielfältig. Jedoch gilt es als unbestritten, dass der intensive Einsatz von Pflanzenschutzmitteln einen Beitrag zum so genannten „Bienensterben“ leistet. Da auch subletale Dosen schon negative Effekte auf Honigbienen haben können, muss dies zur Erklärung der erhöhten Verluste von Bienenvölkern mitberücksichtigt werden [16], [12], [15], [17], [21].

Bei den bisherigen Forschungsaktivitäten zur Bienenproblematik wurde die Tatsache, dass Honigbienen im Verlauf ihres gesamten Lebens auch über das Bienenwachs mit Pestizidrückständen und anderen von Menschen in die Umwelt gebrachten Chemikalien in Kontakt kommen können, nur wenig beachtet [20], [27].

Teilprojekt 3 des Projektverbundes BayÖkotox widmet sich diesem Aspekt nicht nur, um neue Erkenntnisse zur Verbreitung und zu den Effekten von Verunreinigungen in Bienenwachs in Bayern zu erlangen, sondern auch, um konkrete Handlungsempfehlungen für Imker zu erarbeiten. Diese Handlungsempfehlungen sollen es bayerischen Imkern ermöglichen, negative Effekte aufgrund von Bienenwachskontaminationen zu verringern. Dies ist nicht nur für die Produktion von Honig und Bienenwachs bedeutsam, sondern auch entscheidend für die Bestäubung von Kulturpflanzen und somit ein wichtiger ökonomischer Faktor in der Landwirtschaft [4]. Zudem trägt die Honigbiene neben Wildbienenarten zur Bestäubung von Wildkräutern, Bäumen und Sträuchern bei, was essenziell für die Funktionsfähigkeit und Diversität von Ökosystemen ist.

3 Aufgabenstellung

(1) In einem bayernweiten Monitoring sollte die Belastung von Bienenwachs aus konventioneller und Bio-Imkerei durch Schadstoffe erfasst werden.

(2) Es sollte der Einfluss der Bewirtschaftungsart (konventionell vs. Bio-) auf die Akkumulation von anthropogenen Chemikalien in Bienenwachs untersucht werden.

(3) Parameter der Leistungsfähigkeit von Bienenvölkern sowie von Bienenarbeiterinnen, die sich in mit Umweltchemikalien kontaminiertem Wachs (K-Wachs) oder in nicht kontaminiertem Wachs (NK-Wachs) entwickelt hatten, sollte verglichen werden. Dazu sollten der Parasitenbefall, die Volksgröße und der Honigertrag von Völkern, deren Waben mit entsprechendem Wachs ausgestattet wurden, ermittelt werden. Auf der Ebene der individuellen Honigbienen sollten Heimfinde-, Lern- und Flugvermögen sowie verschiedene Aspekte der Immunkompetenz der Arbeiterinnen verglichen werden.

4 Vorgehensweise

4.1 Arbeitspaket 1: Monitoring von Bienenwachskontaminanten

Es wurden Wachsproben aus konventionell und biologisch arbeitenden Imkereien aus ganz Bayern auf mögliche Rückstände von Umweltchemikalien untersucht. Die Probenahme erfolgte in standardisierter Weise (Probengröße 3x5 cm einer Brutwabe, Probenaufarbeitung von jeweils 1 g). Die Analyse erfolgte durch ein rückstandsanalytisches Labor mit einer akkreditierten Multi-Methode. Die Rückstände anthropogener Kontaminationen (abgedeckt werden durch die Methode ca. 850 Substanzen) wurden aus der Probe durch Zugabe von Acetonitril extrahiert. Nach Abtrennung der Acetonitrilphase erfolgten der Nachweis und die Quantifizierung der anthropogenen Kontaminationen direkt mittels GC-MS/MS. Für die Messung mittels LC-MS/MS wurden die Proben zuvor in Methanol „umgelöst“. Die Detektion erfolgte nach Elektrospray-Ionisation (ESI) mittels Tandem-Massenspektrometrie im MRM-Modus. Beide Verfahren sind in der Lage, Rückstände mit einer Bestimmungsgrenze von 1 µg/kg gesichert nachzuweisen.

4.2 Arbeitspaket 2: Feldversuche zur Verbreitung und Wirkung anthropogener Kontaminanten in Bienenwachs

Es sollte die Hypothese getestet werden, dass sich Kontaminationen in Bienenwachs auf überwiegend konventionell bewirtschafteten Arealen stärker anreichern als auf überwiegend ökologisch bewirtschafteten Flächen und dass sich dies auf die Leistungsfähigkeit und die Gesundheit der Bienenvölker auswirkt. Bio-Imker von zwölf über ganz Bayern verteilten Standorten kooperierten mit uns innerhalb des Projektes (Tabelle 1). Es wurden zu Beginn des Projektes pro Imker vier neue und baugleiche (chemisch unbelastete) Bienenbeuten aufgestellt, und zwar je zwei in (a) einem überwiegend biologisch bewirtschafteten und (b) einem überwiegend konventionell bewirtschafteten Areal innerhalb des Standorts (Abbildung 1). Die Mittelwände je einer Beute pro Paar in einem Areal wurden aus nicht kontaminiertem (im Folgenden „NK“) Bio-Wachs hergestellt, die Mittelwände der anderen aus kontaminiertem (im Folgenden „K“), mehrfach recyceltem Bienenwachs aus konventioneller Produktion (chemische Analyse siehe Tabelle 2). Die an dem Projekt beteiligten Imker wurden mittels detaillierter Standardarbeitsanweisungen dahingehend instruiert, dass bezüglich der Datenaufnahme eine maximale Vergleichbarkeit der verschiedenen Standorte gegeben war. Da aber andere Faktoren zwischen den Standorten variieren können, wurden grundsätzlich gepaarte Untersuchungsdesigns gewählt, bei denen sich eine erhöhte Varianz zwischen den Standorten/Paaren nicht auf die Teststärke auswirkt.

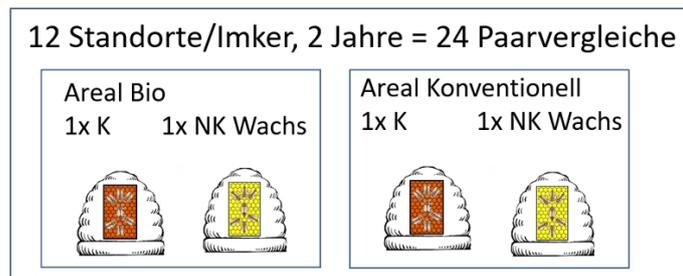


Abbildung 1: Schema des Versuchsdesigns der Feldversuche für Arbeitspaket 2 und zum Teil für Arbeitspaket 3

Tabelle 1: Standorte der Versuchsbeuten bei den Kooperationsimkern. Aufgelistet sind Bezeichnung des Imkers/Standorts, GPS-Koordinaten, Arealinordnung sowie die durch die Imker geschätzte Arealabdeckung (bezogen auf einen Radius von ca. 3 km um die jeweiligen Völker, Bio/Kon: biologisch/konventionell bewirtschaftet; bei den restlichen Flächen keine genauere Zuordnung möglich).

Imker	GPS	Areal	Areal in %
16	49.0814901, 12.0171312	Bio	80 Wald, 20 Agrar
2	49.421301, 11.123809	Bio	50 Wald, 50 Bebauung und Garten
23	49.073906, 11.472230	Bio	50 Wald, 50 Agrar (30 Bio/20 Kon)
25	49.765572, 10.760089	Bio	35 Wald, 40 Agrar, 25 Wiese
3	49.658138, 11.208645	Bio	40 Wald, 10 Obst, 30 Agrar, 20 Wiese
4	49.575491, 11.638372	Bio	30 Wald, 40 Grünland, 30 Acker
5	48.9974394, 12.0199734	Bio	50 Agrar, 50 Wald
6	49.2017032, 12.2016578	Bio	70 Agrar, 15 Wald, 15 Streuobst
7	48.2666047, 12.6649088	Bio	60 Wald, 20 Wiese, 20 Agrar
8	49.079211, 12.024928	Bio	40 Wald, 20 Brache, 40 Agrar (20 Bio/20 Kon)
9	48.9728248, 11.8822986	Bio	3 Wiese, 97 Wald, vereinzelt Obst (Bio)
24	49.3039654, 12.1574600	Bio	50 Wiese (Klee), 10 Wald, 40 Agrar
16	49.108173, 11.972739	Kon	50 Wald, 30 Agrar, 20 Garten
2	49.469477, 11.115706	Kon	40 Park, 30 Kleingarten, 30 Garten
23	49.190802, 11.327783	Kon	80 Agrar, 20 Wald
24	49.2231324, 12.3951276	Kon	90 Wald, 10 Wiese
25	49.759239, 10.748061	Kon	35 Wald, 50 Agrar, 15 Wiese
3	49.637030, 11.313229	Kon	80 Agrar, 5 Wiese, 15 Wald
4	49.688312, 11.128488	Kon	15 Obst, 15 Wald, 20 Wiese, 50 Agrar
5	49.0051968, 11.9308573	Kon	66 Agrar, 34 Wald
6	49.2268962, 12.2085977	Kon	50 Agrar, 50 Wald
7	48.3039858, 12.5655957	Kon	30 Wald, 20 Wiese, 50 Agrar (5 Bio/45 K)
8	49.1075409, 11.9249179	Kon	50 Wald, 20 Wiese, 30 Agrar
9	48.9823116, 11.7876354	Kon	60 Agrar (10 Bio), 40 Wald

Es wurden jeweils zum Ende der Saison Bienenwachsproben der ursprünglich mit NK-Wachs bestückten Beuten genommen, chemisch analysiert und verglichen. Die Ergebnisse wurden mit den Analysen des NK-Wachses vor Versuchsbeginn verglichen, und es wurde auf mögliche Unterschiede in der Anreicherung anthropogener Kontaminationen zwischen konventionell und ökologisch bewirtschafteten Arealen getestet. Diese Vergleiche wurden einmal für die Gesamtmenge anthropogener Einträge und einmal für in der Landwirtschaft genutzte Pestizide (Insektizide, Fungizide, Herbizide) durchgeführt.

Tabelle 2: Ausgangsgehalte (März 2020) der zur Herstellung der Mittelwände verwendeten stark (K-Wachs) bzw. geringfügig (NK-Wachs) kontaminierten Bienenwachse. Angegeben sind die Wirkstoffkonzentrationen ($\mu\text{g}/\text{kg}$, die Bestimmungsgrenze aller Verbindungen lag bei $1 \mu\text{g}/\text{kg}$). Leere Felder bedeuten Gehalte unterhalb der Bestimmungsgrenze.

Name des Wirkstoffs	Stoffklasse	K-Wachs	NK-Wachs
2-n-Octyl-4-isothiazolin-3-on	F	2	
4-Chlor-3-methylphenol (Chlorkresol)	D	2	
Anthrachinon	M	8	5
Azoxystrobin	F	9	
Boscalid	F	8	
Brompropylat	V	81	5
Chlorbenzilat	V	13	
Chlorpyrifos	I	7	
Chlothalonil	F	3	
Coumaphos	V	410	4
Cyprodinil	F	6	
DDT-p,p	I	7	
Dichlobenil	H	2	
Dichlofluanid	F	6	
Dicofol, o,p-	A	13	
Dimoxystrobin	F	7	
Diphenylamin	M	3	
Fenpyroximat	I/A	8	
Fluazifop (freie Säure)	H	2	
Fluopyram	F	6	
HCH-gamma (Lindan)	I	12	
Isopyrazam	F	2	
N,N-Diethyl-m-toluamid (DEET)	R	66	3
ortho-Phenylphenol	M	8	4
Pentachlorphenol	F	8	
Permethrin (cis-/trans-)	I	60	4
Piperonylbutoxid (PBO)	I	170	
Pirimiphos-methyl	I	3	
Propiconazol	F	3	
Prothioconazol (Prothioconazol-desthio)	F	7	
Tau-Fluvalinat	V	240	10
Tebuconazol	F	8	

Name des Wirkstoffs	Stoffklasse	K-Wachs	NK-Wachs
Tetramethrin	I	76	
Thymol	V	240000	1400
Tolyfluamid	F	3	
Gesamt (ohne Thymol)		1269	35

Volkgröße, Honigertrag und Varroabefall wurden quantifiziert. Die Bestimmung der Volkgröße erfolgte gravimetrisch durch sogenanntes „Abschlagen“ der Waben. Daneben wurden die Test- und Kontrollvölker auf typische Bienenparasiten und Krankheiten hin untersucht. Der Varroabefall wurde nach Akarizidbehandlung (Thymol) durch Auszählen der toten Milben quantifiziert [9]. Auf Nosemose, eine Darmerkrankung durch parasitäre, einzellige Pilze, wurde durch Quantifizierung der Sporenzahl (Zählkammer) unter dem Phasenkontrastmikroskop getestet [13]. Je nach Beschaffenheit dieser Daten wurden sie mittels Vorzeichentest oder Wilcoxon-Test für Paardifferenzen analysiert.

4.3 Arbeitspaket 3: Semi-Feld- und Laborversuche zu den Effekten kontaminierten Bienenwachses

Um mögliche Effekte von kontaminiertem Bienenwachs auf Honigbienen unter kontrollierten Bedingungen untersuchen zu können, wurden kombinierte Semi-Feld- und Laborversuche durchgeführt. Hierzu wurden jeweils sechs Paare von Bienenbeuten mit NK-Wachs und K-Wachs in einem ökologisch bewirtschafteten Areal aufgestellt. Die jeweiligen Paare wurden aus einem Ursprungsvolk gebildet und enthielten Schwestern gleichen Alters als Königinnen. Das Verhalten und einige generelle biologische Parameter wurden untersucht. Das Schwärmen der Bienen würde zu einer erhöhten Varianz in verschiedenen Parametern führen. Um dies zu verhindern, wurden Königinnenbrutzellen in den Beuten vor dem Schlupf entfernt [8]. Es wurden zudem das verwendete Wachs, Larven und daraus geschlüpfte Bienen chemisch analysiert, um zu überprüfen ob Wirkstoffe in detektierbaren Mengen auf die Bienen übergehen.

4.3.1 Eiablage rate der Königinnen, Entwicklungsdauer und Mortalität der Larven, Bauleistung der Arbeiterinnen

Die Messungen erfolgten auf der Basis der Angaben von Delaplane et al. [8]. Zur Quantifizierung der Eiablage rate wurde die Königin für 48 Stunden in eine Bannwabe mit zwei frisch ausgebauten, unbestifteten Waben gesperrt und wieder ins Volk gebracht (Abbildung 3). In Teilversuch A war die Wabe ausschließlich mit NK- oder K-Wachs bestückt (*no-choice*), in Teilversuch B konnte die Königin zwischen einer Wabe aus NK und K-Wachs wählen (*choice*). Anschließend wurden alle gelegten Eier auf den Waben ausgezählt. Hierzu wurde eine transparente Folie aufgelegt und jedes Ei mit einem Punkt markiert (Abbildung 2). Die Folien wurden anschließend mit Hilfe der Software Image J ausgezählt. Des Weiteren wurden hochauflösende Digitalfotos von markierten Waben gemacht. Die weitere Entwicklung und eventuelle Mortalität sollte im Anschluss in einem vorher definierten Bereich (100cm³) ermittelt werden. Alle 2 Tage bis zum Zeitpunkt der Verdeckung wurde die Larvenentwicklung dokumentiert (Abbildung 3).



Abbildung 2: Links: Brutwabe mit der ersten Brut, Mittelwand hier aus K-Wachs. Rechts: Larvenentwicklung. Markierungen auf Folie (Kreis = 100 cm²) zur Bestimmung der Larvenentwicklung. Unterschieden wurden fünf Larvenstadien, hier zu sehen Ei (blau), kleine Larve nach dem Schlupf (rot).



Abbildung 3: Bannwabe zur Separierung der Königin (links). Beute mit Bannwabe zur Bestimmung der Eiablage rate und Entwicklungsgeschwindigkeit (Mitte). Brutzellen mit frisch gelegten Eiern (rechts).

4.3.2 Immunkompetenz

Das Immunsystem von Honigbienen ist von zentraler Bedeutung für das Überleben der Kolonie. Anfälligkeit für Krankheiten und Parasiten können die individuelle Lebensdauer der Arbeiterinnen reduzieren, was letztlich zu einer Schwächung der gesamten Kolonie führen kann. Zudem können sich durch das enge Zusammenleben von nahe verwandten Individuen Krankheiten sehr schnell ausbreiten [18], [7], [11].

Umweltchemikalien, wie z.B. Neonicotinoide, können die Immunkompetenz von Arbeiterinnen beeinträchtigen [3]. Es wurden im Laufe des Projektes drei Parameter des Immunsystems nach Brandt et al. [3] jeweils im Doppelblindversuch und mittels Paarvergleich (K vs. NK an denselben Tagen) untersucht.

Erstens wurde ein Einkapselungstest (Implantierung eines Nylonfadens und Analyse des Grades der Einkapselungsreaktion mittels mikroskopischer Digitalbilder) durchgeführt. Ein transparenter Nylonfaden (Durchmesser 0,15 mm) wurde mit einem Skalpell in 2 mm lange Stücke

geschnitten und in Ethanol ($\geq 99,8\%$) desinfiziert. Das Nylonfadenstück wurde einer Biene auf der rechten Seite des Abdomens durch die Intersegmentalhäut zwischen dem 4. und 5. Tergit 1 mm weit implantiert. Je 7-9 behandelte Bienen wurden dann in einem Gefäß mit ausreichend Zuckerlösung für 4 Stunden im Dunkeln bei 27°C gehalten. Fäden von Bienen, die nach der Inkubationszeit gestorben waren (4 von insgesamt 404 Bienen), wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Nach der Inkubationszeit wurden die Bienen durch Einfrieren bei -21°C getötet, und der Nylonfaden wurde mit einer Pinzette aus der Biene gezogen, in Ethanol gewaschen und jeweils zusammen mit einem nicht implantierten, 2 mm langen Kontrollfaden auf einem Objektträger eingebettet. Dann wurden digitale Mikroskop-Aufnahmen der Fäden angefertigt. Die Auswertung der Fotos erfolgte mit Hilfe von Image J. Der Grad der Melanisierung (Beispiele in Abbildung 5) wurde anhand des Grauwertes des Fadens bestimmt und sowohl als Mittelwert als auch als Median ausgewertet. Dazu wurde jeweils der implantierte Bereich abzüglich 0,05 mm von jeder Seite und mit einer festen Breite von 0,13 mm gemessen (Abbildung 4, Abbildung 5). Dadurch wurde gewährleistet, dass keine Reaktion an den uneinheitlichen Kanten des Fadens oder am Wundverschluss am Übergang zur Körperaußenseite gemessen wurde. Befanden sich Fremdkörper (z.B. Tracheolen, Haare, Gewebe) auf dem Faden, so wurden diese Bereiche aus dem auszuwertenden Bereich ausgeschnitten.



Abbildung 4: Schematische Darstellung zur Auswertung der Fäden. Der Grauwert des Fadens wurde innerhalb einer rechteckigen Fläche im implantierten Bereich bestimmt.

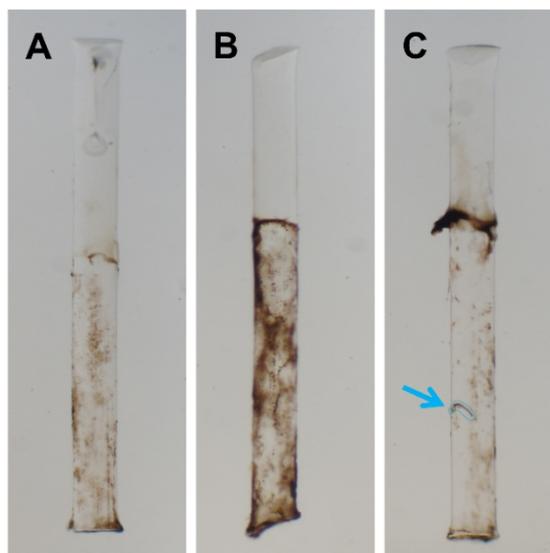


Abbildung 5: Beispiele für unterschiedlich starke Melanisierung (A) Schwache bis mittelstarke Melanisierung. (B) Starke Melanisierung (C) Schwache Melanisierung mit Organfragment (blaue Markierung), das von der Auswertung ausgeschlossen wurde.

Zweitens wurde nach einer Immunaktivierung (Injektion inaktiverter *Escherichia coli*-Bakterien) durch Hemmhoftests die Aktivität der Hämolymphe gegen ein gram-positives (*Micrococcus luteus*) Testbakterium ermittelt. Zur Stimulierung des Immunsystems der Honigbienen wurde in Insekten-Ringer gelöstes Lipopolysaccharid (LPS) von *Escherichia coli* eingesetzt. Für den *Inhibition-Zone-Assay* wurde gefriergetrockneter *M. lysodeikticus* Cohn und Lysogeny-Broth-Agar (LB-Agar) verwendet.

Die Biene wurde mit einer Pinzette festgehalten, und es wurde eine Injektion von 2 µl LPS in das Hämocoel, über das Abdomen zwischen dem vierten und fünften Tergit, vorgenommen. Durch diese Injektion wird dem Immunsystem eine Infektion vorgetäuscht, und es wird aktiviert. Vortests zeigten, dass ohne das vorherige Anregen des Immunsystems keine auswertbaren Hemmhöfe ausgebildet wurden. In einem Plastikgefäß wurden die Bienen für etwa 20 Stunden gehalten und danach die Hämolymphe abgenommen (Abbildung 6). Konnte am Abdomen nicht genügend Hämolymphe abgenommen werden, wurde diese dorsal am punktierten Hals abgenommen. Es wurde darauf geachtet, dass die entnommene Flüssigkeit durchsichtig bis klar-gelblich war und keine direkt ersichtliche Trübung aufwies.



Abbildung 6: Entnahme von Hämolymphe über das Abdomen. (A) Die Biene wurde mit einer Pinzette fixiert und mit einer Insulinspritze zwischen dem zweiten und dritten Tergit punktiert. (B) Hämolymphe war in Form eines austretenden Tropfens sichtbar. (C) Die Hämolymphe wurde mit einer Pasteurpipette aufgenommen (klar und leicht gelblich).

Die *M. lysodeikticus*-Suspension wurde auf einer Agarplatte (Ø 9 cm) ausplattiert (200 µl mit einer Verdünnung von 1:4 der ursprünglichen Bakteriensuspension), und es wurden 2 Löcher in den Agar gestanzt. In eines der Löcher wurde die abgenommene Hämolymphe von jeweils 2 Bienen aus einem NK- und in das andere die abgenommene Hämolymphe von 2 Bienen eines K-Volks gegeben (das Volumen an gewonnener Hämolymphe betrug zwischen 6 und 14 µl pro Biene). Somit war auf einer Agarplatte ein direkter Paarvergleich möglich (Abbildung 7).

Drittens wurde die Zahl der Hämozyten mikroskopisch bestimmt. An jedem Versuchstag wurden 6-15 Bienen von 2 gepaarten K- und NK-Völkern (je N=6 Völker für K/NK) getestet. Für

die Versuche wurden die Bienen aus dem Brutraum entnommen und in einem Käfig in das Labor an die Universität Regensburg gebracht. Die Bienen wurden noch am selben oder darauffolgenden Tag getestet. Am Versuchstag wurde, wie in Abbildung 6 gezeigt und zuvor beschrieben, die Hämolymphe abgenommen. Zum Auszählen der Hämozyten wurde die unverdünnte Hämolymphe in eine Zählkammer pipettiert. War zu wenig Hämolymphe einer Biene vorhanden, um die Zählkammer komplett zu füllen (i.d.R. $\leq 6\mu\text{l}$), so wurde diese Probe von der Auswertung ausgeschlossen. Die Auszählung der Hämozyten erfolgte bei 400-facher Vergrößerung unter einem Interferenzkontrast-Mikroskop, wobei 5 Gruppenquadrate in der Diagonale ausgezählt wurden und so ein Mittelwert der Hämozytenzahl pro μl für jede Biene berechnet wurde (Abbildung 7). Insgesamt wurden 272 Hämolympfproben mit ausreichender Hämolympfmenge ausgezählt und gewertet ($n= 20\text{-}30$ pro Volk).

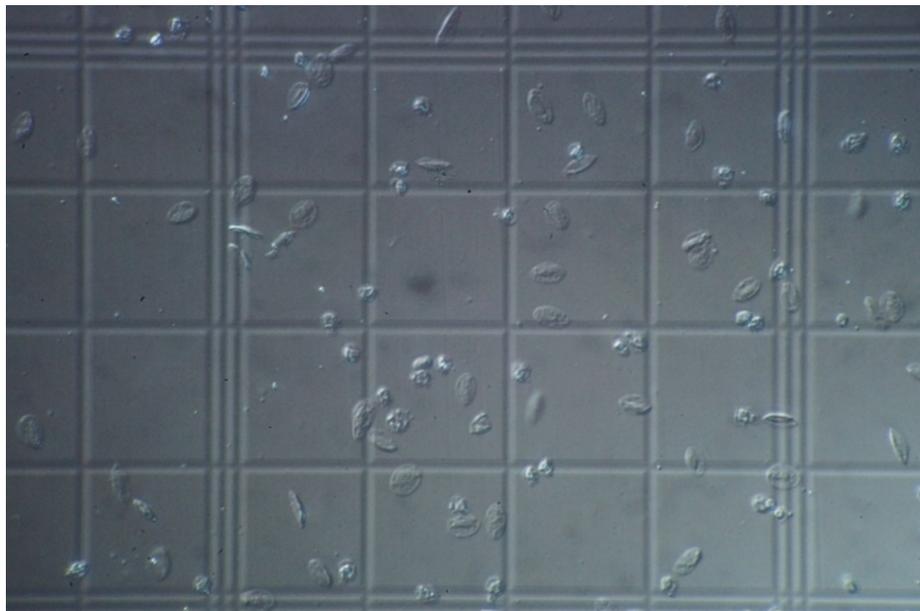


Abbildung 7: Abschnitt einer Zählkammer. Großes Quadrat (Dreifachlinien) entspricht dem Volumen $1/25\ \mu\text{l}$. Zu sehen sind zahlreiche Hämozyten

4.3.3 Assoziatives Lernvermögen

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass Umweltchemikalien (z.B. Chlothianidin, Imidacloprid) das Lernvermögen und die Gedächtnisleistung von Honigbienen herabsetzen können [24]. Daher wurde das assoziative Lernvermögen und die Gedächtnisleistung sowohl in der Saison 2021 als auch in der Saison 2022 an allen Völkern mittels Rüsselstreckreflex (*proboscis extension reflex* = PER) nach Piiroinen und Goulson [24] im Doppelblindversuch untersucht. Es wurde getestet, ob Bienen, welche aus NK-Völkern stammten, sich in ihrer Lern- und Gedächtnisleistung signifikant von Bienen, welche aus K-Völkern stammten, unterschieden. Bienen, welche im Vortest keine PER-Reaktion auf die Gabe von Zuckerwasser zeigten, wurden nicht getestet. Es wurden 5 Lernrunden, in denen die Bienen im Abstand von 10 Minuten auf den Geruchsstoff Hexanal konditioniert wurden, durchgeführt. Als Belohnung wurde eine Saccharoselösung (50%) gegeben. Anschließend wurden die Bienen nach 1, 3, 6 und 24 Stunden erneut daraufhin getestet, ob sie weiterhin einen PER auf den konditionierten Reiz Hexanal zeigten.

4.3.4 Flugleistung

Umweltchemikalien können auch die Flugleistung von Honigbienen herabsetzen (z.B. Imidacloprid [2]). Daher wurde diese in der Saison 2021 an jeweils 50 Arbeiterinnen aus K- und NK-Völkern mittels einer "Flugmühle" bestimmt (Abbildung 9). Dazu wurden Sammelbienen am Stock abgefangen und ins Labor gebracht. Sie wurden durch Kühlen immobilisiert und anschließend fixiert. Dann wurde ihnen ein kleines Metallplättchen auf den Thorax geklebt (\varnothing 2mm, Abbildung 8).



Abbildung 8: Bienen mit einem auf dem Thorax angeklebten Metallplättchen (\varnothing 2 mm) zum Fixieren an der Flugmühle.



Abbildung 9: Biene am Auslegerarm einer Flugmühle (links). Flugmühle (magnetgelagert) von oben, eine Umdrehung beträgt einen Meter (rechts).

Am folgenden Tage wurde das Flugexperiment durchgeführt. Den Bienen wurde direkt vor dem Flug eine Zuckerwasserlösung (50%) angeboten, um gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen. Anschließend wurden sie durch Herunterkühlen immobilisiert und dann mithilfe eines Magneten an einem Auslegearm der Flugmühle befestigt. Die Bienen bekamen nach dem Aufwärmen ein Zeitfenster von 20 Minuten, um mit dem Fliegen zu beginnen. Die Anzahl der

geflogenen Runden wurde mittels einer Lichtschranke gemessen und aufgezeichnet. So konnten die geflogene Strecke und die Geschwindigkeit ermittelt werden. Dieser Versuch wurde ebenfalls als Doppelblindversuch durchgeführt.

4.3.5 Heimfindevermögen

Das Heimfindevermögen (*homing*) von Honigbienen ist eine Komplexleistung, an der Lernen, Gedächtnis und Flugleistung beteiligt sind. Durch einfache Versetzungsexperimente [22] kann das Heimfindevermögen von Honigbienen getestet werden. Dazu wurden jeweils 15 zurückkehrende Sammlerinnen abgefangen und ohne Betäubung markiert. In kleinen Käfigen (mit etwas Honig) wurden die Bienen anschließend 500 bzw. 1000 m von ihrem Stock entfernt ausgesetzt. Dieses Experiment wurde immer im Paarvergleich mit einem NK und einem K Volk durchgeführt, da sich die äußeren Umstände wie Sonnenstand, Wetter usw. von Tag zu Tag unterscheiden konnten. Insgesamt wurden 300 Bienen markiert und ausgesetzt. Durch Videoüberwachung des Nesteingangs konnte im Anschluss die Dauer bis zur Rückkehr ermittelt werden (Abbildung 10). Es wurden jeweils die Mediane eines Versuchstages (Anzahl der heimkehrenden Bienen und die Zeit bis zur Heimkehr) paarweise sowohl für 500 als auch für 1000 Meter verglichen (Wilcoxon-Test).



Abbildung 10: Versuch zum Heimfindevermögen: (A) Bienen werden mit einem Lackstift auf dem Thorax markiert; (B) Markierte Bienen werden auf der Videoaufnahme identifiziert.

5 Ergebnisse und Diskussion

Im Laufe des Projektzeitraums 2020 bis 2023 wurden Versuche zum Heimfindevermögen, dem Lernvermögen (PER), der Flugleistung, der Immunabwehrreaktion, der Eiablage rate sowie der Larvenentwicklung durchgeführt. Des Weiteren wurden sowohl bei den eigenen Versuchsvölkern als auch bei den Völkern der Kooperationsimker Wachsproben genommen, der Honigertrag und die Bienenmasse bestimmt sowie der Schädlingsbefall überprüft.

Kam es in der Saison 2020 noch zu Corona-bedingten Problemen und Verzögerungen, sorgte in der Saison 2021 das Wetter für zahlreiche Probleme und Verzögerungen. Im Winter 2021/22 gingen zudem elf der zwölf eigenen Versuchsvölker ein. Diese mussten dann am Anfang der Saison 2022 wieder mit neuen Kunstschwärmen sowie neuen Königinnen zu vollwertigen Völkern aufgebaut werden. Auch eingegangene Völker der Kooperationsimker wurden im Frühjahr ersetzt. Des Weiteren wurden alle Völker mit neuen, jungen Geschwisterköniginnen ausgestattet. Damit verzögerte sich der Start der Experimente. Auch die anhaltende Trockenheit im Sommer 2022 machte den Bienenvölkern zu schaffen und erschwerte die Experimente. Es wurden Methoden von Saison zu Saison verfeinert und optimiert. Trotz der zahlreichen Probleme konnte eine Vielzahl von Labor- sowie Freilandexperimenten durchgeführt werden.

5.1 Arbeitspaket 1: Monitoring von Bienenwachskontaminanten

Im Projektzeitraum wurden insgesamt 20 Proben bei Bio-Imkern und 19 bei konventionellen Imkern genommen und vom Labor Friedle GmbH (Tegernheim) analysiert. Die Analysendaten des Monitorings (Tabelle 4 sowie Abbildung 19 und Tabelle 7 im Anhang) zeigen generell eine erhöhte Kontamination in konventionellem Wachs. Insgesamt wurden 73 anthropogene Substanzen in den Proben in Gehalten $\geq 1 \mu\text{g}/\text{kg}$ nachgewiesen. Darunter befanden sich 29 Fungizide, 26 Insektizide/Akarizide, 4 Herbizide, 1 Desinfektionsmittel, 8 derzeit oder früher in der Imkerei als Varroazide oder Repellentien eingesetzte Substanzen und 5 Verbindungen, die aus verschiedenen Quellen stammen können (*multiple source compounds*). In den konventionellen Wachsproben fanden sich signifikant mehr Kontaminanten (70 Verbindungen, 4-32 Wirkstoffe pro Probe, Median: 18) als in Wachsproben aus Bio-Imkereien (39 Verbindungen, 2-25 Wirkstoffe pro Probe, Median: 8,5; Mann-Whitney U-Test: $p < 0.001$). Auffallend waren in allen Proben die hohen Gehalte an Thymol, welches sowohl in der konventionellen als auch in der Bio-Imkerei zur Bekämpfung der Varroa-Milbe eingesetzt wird, wobei die Gehalte bei konventioneller Imkerei ($41\text{-}52.000 \mu\text{g}/\text{kg}$, Median: $10.000 \mu\text{g}/\text{kg}$) signifikant höher waren als bei Bio-Imkern ($8\text{-}150 \mu\text{g}/\text{kg}$, Median: $100 \mu\text{g}/\text{kg}$; Mann-Whitney U-Test: $p < 0,001$). Derzeit sind in der Bio-Imkerei Thymol (auch in Kombination mit Menthol, Eukalyptusöl und Campher) sowie die organischen Säuren Ameisen-, Milch-, und Oxalsäure zugelassen [10], in der konventionellen Imkerei zusätzlich noch Flumethrin (nicht in unserem Parameterumfang enthalten) und Amitraz. Alle anderen Varroazide (Brompropylat, Chlorbenzilat, Coumaphos und Tau-Fluvalinat), die zusammen mit Thymol in konventionellem Wachs $88,2 \pm 13,5\%$ und in Bio-wachs $75,5 \pm 19,7\%$ (Mann-Whitney-U-test: $p = 0,0363$) der gefundenen Wirkstoffmengen ausmachten, sind daher als „Altlasten“ aus dem Wachskreislauf zu betrachten. Auch die Gesamtmenge der Wirkstoffe ohne Einbeziehung von Thymol war bei den Proben aus konventioneller Imkerei ($23\text{-}2.378 \mu\text{g}/\text{kg}$, Median: $304 \mu\text{g}/\text{kg}$) signifikant höher als bei den Bio-Proben ($6\text{-}511 \mu\text{g}/\text{kg}$, Median: $37 \mu\text{g}/\text{kg}$; Mann-Whitney U-Test: $p < 0.001$). Betrachtet man nur die aus der Landwirtschaft stammenden Pestizide (konventionell: $0\text{-}480 \mu\text{g}/\text{kg}$, Median: 88; Bio: $0\text{-}99$

µg/kg, Median: 11,5 µg/kg), so waren auch hier die Proben aus konventioneller Imkerei stärker belastet (Mann-Whitney-U-Test: $p < 0,001$). Hierbei dominierten Insektizide (konventionell: 0-395 µg/kg, Median: 28 µg/kg; Bio: 0-53 µg/kg, Median: 2 µg/kg; Mann-Whitney-U-Test: $p < 0,001$) und -gerade nicht mehr signifikant- Fungizide (konventionell: 0-109 µg/kg, Median: 20; Bio: 0-49 µg/kg, Median: 6 µg/kg; Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,052$), während Herbizide (konventionell: 0-15 µg/kg, Median: 0 µg/kg; Bio: 0-3 µg/kg, Median: 0 µg/kg, Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,25$) nur in geringer Zahl und Menge gefunden wurden. Ein Vergleich der Daten aus dem Monitoring mit Literaturwerten ist nicht unproblematisch, da Nachweisgrenzen und Parameterumfang meist stark variieren (Tabelle 3). Die in diesem Projekt zur Verfügung stehende Parameterumfang von über 850 Wirkstoffen bei einer einheitlichen Bestimmungsgrenze von 1 µg/kg ist beispiellos. Insofern deutet ein Nachweis von 73 Wirkstoffen im Wachsmonitoring nicht unbedingt darauf hin, dass bayerisches Bienenwachs besonders belastet ist, sondern dass viele Spurenkomponenten durch unsere empfindlichen Analysenbedingungen überhaupt erst nachgewiesen werden konnten. Eine kürzlich erschienene Vergleichsstudie in der deutschlandweit 25 Wachsproben analysiert wurden, berichtet von 38 Wirkstoffen (16-20 pro Probe), wobei auch hier die von den Imkern selbst eingebrachten Varroazide klar dominierten [28]. Eine Studie aus Belgien [29] fand nur 18 Pestizide (3-13 pro Probe), auch hier gehörten die Hauptkontaminanten zu den Varroaziden. Eine umfangreiche Studie aus den USA [30] erbrachte den Nachweis von 89 Wirkstoffen in Proben aus Nordamerika mit z.T. extremen Gehalten von nicht naturstoffbasierten Varroaziden wie z.B. Fluvalinat (7470 ± 970 µg/kg, Mittelwert \pm SD), Coumaphos (3300 ± 500 µg/kg) und Amitraz (2200 ± 570 µg/kg). Jedoch fanden sich in den untersuchten Proben auch aus der Landwirtschaft stammende Pestizide wie z.B. Chlorothalonil (1070 ± 450 µg/kg), Aldicarb (306 ± 48 µg/kg) oder Boscalid (110 ± 21 µg/kg) in Gehalten deutlich über den in unserer Studie selbst in konventionellem Wachs gefundenen Gehalten.

Sieben der konventionellen Wachsproben aus dem Wachsmonitoring stammten aus der Halbertau, einem intensiv bewirtschafteten Hopfenanbaugebiet. Interessant ist, dass diese Proben generell fast doppelt so viele Kontaminanten ($26,4 \pm 2,5$) enthielten als die restlichen Proben aus konventioneller Imkerei ($13,6 \pm 1,7$). Zudem fanden sich ausschließlich in diesen Proben Wirkstoffe wie das Insektizid Imidacloprid (10 ± 2 µg/kg) sowie die Fungizide Dimethomorph (5 ± 1 µg/kg) und Metrafenon (14 ± 5 µg/kg), die im Hopfenanbau eingesetzt werden oder wurden (Imidacloprid). Dies deutet darauf hin, dass sich lokale Praktiken im Pflanzenschutz im Bienenwachs widerspiegeln.

Tabelle 3: Literaturangaben zu analytischen Parametern bei der Rückstandsanalytik von Bienenwachsproben

Land	Anzahl Parameter	LOQ (µg/kg)	n	Detektierte Wirkstoffe	Wirkstoffe pro Probe	Referenz
Deutschland	850	1	39	73	2-32	diese Studie
Deutschland	147	?	25	38	16-20	[28]
Belgien	293	10-70	10	18	3-13	[29]
Frankreich	13	1-50	83	6	0-3	[30]
Mexico	75-93	0,2-1	52	20	1-7	[31]
Nord-Amerika	200	0,1-50	238	87	1-39	[32]

Tabelle 4: Ergebnisse der chemischen Analysen der Wachsproben aus dem Monitoring (in µg/kg ohne Thymol). Es wurden >850 Stoffe mit einer Bestimmungsgrenze von jeweils 1 µg/kg erfasst. Die Auswertung wurde einmal für alle anthropogenen Substanzen und einmal nur für Pestizide (Insektizide, Fungizide und Herbizide) durchgeführt.

Probe	Anthropogene Substanzen gesamt				Pestizide			
	Gesamtgehalte (µg/kg)		Anzahl		Gesamtgehalte (µg/kg)		Anzahl	
	konventionell	Bio	konventionell	Bio	konventionell	Bio	konventionell	Bio
1	635	511	31	25	480	80	19	17
2	151	103	24	11	71	18	15	6
3	122	21	14	5	38	4	8	2
4	319	40	32	8	122	2	23	2
5	270	43	29	10	88	27	20	6
6	212	8	23	2	101	0	16	0
7	304	13	32	4	123	1	23	1
8	134	19	9	7	32	6	4	5
9	341	27	21	4	50	14	11	4
10	101	72	11	13	35	67	5	11
11	23	106	5	10	0	21	0	6
12	40	29	4	6	38	9	2	4
13	478	34	17	8	150	4	12	4
14	1265	61	17	12	69	43	11	9
15	477	6	10	2	11	0	5	1
16	2378	69	19	13	61	50	12	10
17	1008	12	18	4	103	8	12	3
18	616	32	21	9	408	8	16	6
19	272	66	11	10	19	15	7	7
20		116		15		99		12
Median	304	37	18	8,5	69	11,5	12	5,5
p-Wert (Mann-Whitney U-Test)	<0.001		<0.001		<0.001		0.006	

5.2 Arbeitspaket 2: Feldversuche zur Verbreitung und Wirkung anthropogener Kontaminanten in Bienenwachs

Am Ende jeder Bienen Saison wurden in den Jahren 2020-2022 Wachsproben der mit ursprünglich nur geringfügig kontaminiertem Bienenwachs (NK-Wachs) bestückten Bienenbeuten, die an überwiegend konventionell oder überwiegend ökologisch bewirtschafteten Arealen (Tabelle 1) positioniert waren, genommen und chemisch analysiert. Da wir die Bienenvölker in der Saison 2020 Corona-bedingt erst sehr spät aufstellen konnten, kam es in diesem Jahr kaum zu Schadstoffeinträgen durch die Bienen (Ergebnisse nicht dargestellt). In den Jahren 2021 und 2022 standen die Bienenvölker jeweils die gesamte Saison an den ausgewählten Standorten, sodass es hier zu merklichen Einträgen von anthropogenen Chemikalien kam.

Die Ergebnisse der chemischen Analysen des letzten Jahres (2022) sind in Tabelle 5 und Tabelle 6 zusammengefasst. Die entsprechenden Ergebnisse der Analysen aus dem Jahr 2021 befinden im Anhang (Tabelle 9 und Tabelle 10 im Anhang).

In der Saison 2021 wurden 37 anthropogene Kontaminanten in Konzentrationen ≥ 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ detektiert. Darunter befanden sich 13 Fungizide, 9 Insektizide/Akarizide, 4 Herbizide, 1 Desinfektionsmittel, 6 derzeit oder früher in der Imkerei als Varroazide oder Repellentien eingesetzte Substanzen und 4 Verbindungen, die aus verschiedenen Quellen stammen können (*multiple source compounds*). In der Saison 2022 erhöhte sich die Anzahl der Kontaminationen auf 63 (≥ 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Es handelte sich um 23 Fungizide, 16 Insektizide, 9 Herbizide, 1 Desinfektionsmittel, 7 Varroazide, 1 Nematizid sowie 3 *multiple source compounds* (Tabelle 6).

Ein Großteil der ursprünglich in dem NK-Wachs unvermeidbar in geringfügigen Mengen vorhandenen Substanzen wurden durch den Ausbau der Waben mit neu produziertem Bienenwachs „verdünnt“, sodass sich deren Gehalte verringerten oder sie gar nicht mehr detektierbar waren. Das Varroazid Thymol nahm hingegen signifikant zu (die Versuchsvölker wurden auch mit diesem behandelt). Dies betraf sowohl die konventionellen als auch die Bio-Standorte. An einzelnen Standorten fanden sich im Bienenwachs relativ hohe Gehalte von >10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ von derzeit zugelassenen Pflanzenschutzmitteln, vor allem Fungizide wie Azoxystrobin, Boscalid, Cyprodinil, Dimoxystrobin, Fluopyram oder Trifloxystrobin, sodass die jeweiligen Wachsproben vermutlich den aktuellen Status eines Standortes bezüglich des Pestizideinsatzes sehr gut widerspiegeln. Jedoch fanden sich vereinzelt auch Wirkstoffe, die in der Landwirtschaft nicht mehr zugelassen sind wie das Fungizid Carbendazim oder das schon lange verbotene DDT. Carbendazim wird auch als Biozid in Holzschutzmitteln verwendet. Das Bio-Areal, in dem der Wirkstoff nachgewiesen wurde, grenzt an ein historisches Anwesen mit alten Holzbauten, was den Eintrag erklären könnte. Das Wachs mit DDT-Rückständen stammte aus dem Stadtgebiet von Nürnberg, umgeben von zahlreichen Privatgärten, wo z.B. die Nutzung von Altbeständen durch Anwohner nicht ausgeschlossen werden kann.

Die in das Bienenwachs neu eingetragenen Mengen an anthropogenen Kontaminanten (ohne Thymol berechnet) lagen innerhalb von drei Jahren (Ende der Saison 2022) zwischen 10 und 425 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Tabelle 5). Im Jahr 2021 ließen sich bei den paarweisen Vergleichen weder bei der Gesamtmenge noch bei der Zahl der eingetragenen Wirkstoffe signifikante Unterschiede zwischen überwiegend konventionell und ökologisch bewirtschafteten Arealen feststellen. In der Saison 2022 gab es hingegen signifikante Unterschiede zwischen konventionellen und Bio-Arealen, wenn nur die Gehalte der eingetragenen Pflanzenschutzmittel (Insektizide/Akarizide, Herbizide und Fungizide) betrachtet wurden (Kon: 7-233 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Median: 42 $\mu\text{g}/\text{kg}$; Bio: 4-80 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Median: 15,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Wilcoxon-Test: $p=0,0408$, Tabelle 5). Bei der Anzahl eingetragener Pflanzenschutzmittel sowie der Gesamtmenge an anthropogenen Substanzen im Wachs gab es hingegen auch 2022 keine signifikanten Unterschiede. Die insgesamt eher geringen Unterschiede zwischen konventionellen und Bio-Arealen beim Eintrag anthropogener Substanzen sind vermutlich durch den großen Flugradius der Bienen zu erklären (Sammelflüge regelmäßig 2-3 km, vereinzelt sogar bis zu 6 km [6]), sodass sich deren Sammelaktivität oftmals kaum auf die ökologisch bewirtschafteten Areale beschränken lässt. Gemäß EU-VO 2018/848 [10] sind „[...] Bienenstöcke [...] so aufzustellen, dass im Umkreis von drei Kilometern um den Standort Nektar- und Pollentrachten im Wesentlichen aus ökologischen/biologischen Kulturen oder Wildpflanzen oder Kulturen bestehen, die nach Methoden mit geringer Umweltauswirkung behandelt werden.“ „Im Wesentlichen“ impliziert, dass dies in der Praxis kaum zu 100% umsetzbar ist, sodass sich die Unterschiede zwischen konventioneller und Bio-Imkerei insbesondere

durch das imkerliche Handeln manifestieren. Details hierzu finden sich in den Richtlinien der Verbände, in denen sich Bio-Imker zusammengeschlossen haben (z.B. [1]).

Die Ergebnisse zum Eintrag von Kontaminanten unter Freilandbedingungen scheinen auf den ersten Blick den Ergebnissen des Monitorings zu widersprechen, bei denen die konventionellen Wachsproben in Bezug auf alle Vergleiche deutlich stärker belastet waren als die Biowachsproben. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass bei den Feldversuchen der Eintrag nur während der Projektlaufzeit untersucht wurde. Beim Monitoring hingegen macht sich der Einfluss des imkerlichen Handelns über Jahre hinweg viel stärker bemerkbar. Hier ist es in der konventionellen Imkerei üblich, einen geschlossenen Wachskreislauf zu betreiben, d.h., Wachs aus dem Vorjahr wird eingeschmolzen und zur Herstellung neuer Mittelwände verwendet. Dadurch kommt es über Jahre hinweg zu einer Anreicherung von Kontaminanten. Bei der Bio-Imkerei hingegen werden Mittelwände ausschließlich aus so genanntem Verdeckelungswachs (Wachs, das von den Bienen zum Verdeckeln der Honigwaben neu produziert und vom Imker bei der Honiggewinnung gesammelt wird) und Wachs aus Naturwabenbau (Wachs aus Waben, die von den Bienen ohne Verwendung von Mittelwänden neu angelegt wurden) gewonnen [1]. Somit ist hier der Anreicherungsseffekt sehr viel geringer.

Tabelle 5: Gesamtgehalte und Anzahl neu hinzugekommener oder in erhöhter Menge (ohne Berücksichtigung des Varroazids Thymol) im Vergleich zum Ausgangswachs vorkommender Kontaminanten im NK-Wachs der Kooperationsimker an überwiegend konventionell oder ökologisch bewirtschafteten (Bio) Standorten (Saison 2022). Die Auswertung wurde einmal für alle anthropogenen Substanzen und einmal nur für Pestizide (Insektizide/Akarizide, Fungizide und Herbizide) durchgeführt.

Imker-Kürzel	Anthropogene Substanzen gesamt				Pestizide			
	Gesamtgehalte (µg/kg)		Anzahl		Gesamtgehalte (µg/kg)		Anzahl	
	konventionell	Bio	konventionell	Bio	konventionell	Bio	konventionell	Bio
2	43	55	12	11	31	8	4	4
3	425	67	24	11	233	32	16	7
4	119	22	21	9	110	12	16	5
5	68	41	25	16	44	27	17	10
6	15	22	9	8	8	13	5	5
7	52	24	9	12	40	10	4	7
8	12	46	5	13	7	39	2	9
9	37	10	14	8	21	4	8	4
16	86	87	13	12	80	80	9	9
23	18	31	9	22	11	18	6	13
24	133	32	13	11	119	11	8	5
25	211	34	14	13	204	20	9	7
Median	60	33	13	11,5	42	15,5	8	7
p-Wert (Wilcoxon-Test)	0,0994		0,2875		0,0408		0,3411	

Tabelle 6: Ergebnisse der chemischen Analysen des NK-Wachses aus den Feldversuchen bei den Kooperationsimkern. Angegeben sind die Wirkstoffkonzentrationen ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in dem für die Herstellung der Mittelwände verwendeten, nur geringfügig kontaminierten Wachs (NK-Wachs, März 2020) sowie die Konzentrationen der Stoffe in den ausgebauten Waben am Saisonende (Herbst 2022); Bio: überwiegend ökologisch bewirtschaftetes Areal, Kon: überwiegend konventionell bewirtschaftetes Areal (Mittelwert der Gehalte oberhalb der Bestimmungsgrenze \pm SD, $\mu\text{g}/\text{kg}$). Grün: Konzentrationen dieser Substanzen blieben unverändert oder nahmen ab; hellblau: Konzentrationen dieser Substanzen nahmen zu; rot: Substanzen wurden neu detektiert. Die Spalten „n/12“ geben die Zahl positiver Proben von 12 gemessenen Proben an. Es wurden >850 Stoffe mit einer Bestimmungsgrenze von jeweils 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ erfasst. Leere Felder bedeuten Gehalte unterhalb der Bestimmungsgrenze.

Verbindung	Wirkstoffklasse	NK-Wachs März 2020	Herbst 2022			
			Bio	n/12	Kon	n/12
4-Chlor-3-methylphenol	D		1,3 \pm 0,5	7	1,3 \pm 0,4	8
6-Chlornicotinsäure *	I		2,0	2	2,0	2
Amitraz Metabolit I	V		26,0	1		
Amitraz Metabolit II	V		6,5 \pm 9,0	4	38,3 \pm 64,5	4
Anthrachinon	M	5	1,4 \pm 0,5	8	2,1 \pm 1,7	9
Azoxystrobin	F		4,0 \pm 1,2	4	19,7 \pm 16,9	3
Bixafen	F				1,0	1
Boscalid	F		6,0 \pm 6,0	5	32,7 \pm 48,7	7
Brompropylat	V	5	1,0	1	1,7 \pm 0,9	3
Carbendazim	F		1,0	1		
Chlorbenzilat	V		1,0	1	2,0	1
Chlorpyrifos	I		2,0	1	2,0	1
Chlorthalonil	F		2,0	1		
Clopyralid	H		4,0	1	4,0	1
Coumaphos	V	4	1,3 \pm 0,4	4	2,0 \pm 0,6	6
Cyantraniliprol	I				2,0	1
Cypermethrin	I		2,0	1	1,5 \pm 0,5	2
Cyprodinil	F		1,0	1	25,7 \pm 21,0	3
DDD-p,p	I		1,0	1	1,0	1
DDE-o,p	I				1,0	1
DDE-p,p	I		1,0	1	2,0	1
DDT-o,p	I				2,0	1
DDT-p,p	I				3,0	1
DEET	R	3	1,0	2		
Difenoconazol	F		1,0	2	7,0 \pm 4,1	3
Dimoxystrobin	F		2,6 \pm 1,4	7	12,3 \pm 26,0	8
Diphenylamin	F		1,8 \pm 0,9	10	5,4 \pm 10,5	9
Diuron	H				3,0	1
Fenamiphos	N				2,0	1
Fenhexamid	F		1,0	1	8,0 \pm 1,0	2
Fenpyroximat	I/A				4,0	1
Fluazifop (freie Säure)	H		1,0	2	7,2 \pm 7,0	6
Fludioxonil	F		15,5 \pm 14,5	2	8,5 \pm 6,7	4
Fluopyram	F		3,3 \pm 3,5	6	7,0 \pm 5,5	7

Verbindung	Wirkstoffklasse	NK-Wachs März 2020	Herbst 2022			
			Bio	n/12	Kon	n/12
HCH-gamma (Lindan)	I		3,0	1	5,0	1
Indoxacarb	I				12,0	1
Isofetamid	F		1,0	1		
Isopyrazam	F		2,3 ± 0,9	3	1,0	1
Isoxaben	H		3,0	1	1,0	1
Mecoprop (MCP)	H		2,0	1		
Myclobutanil	F				1,0	1
ortho-Phenylphenol	M	4	1,1 ± 0,3	9	1,8 ± 1,0	9
Paclobutrazol	F				3,0	1
Pentachlorphenol	F		1,0	2	8,0	1
Permethrin (cis-/trans-)	I	4	1,4 ± 0,5	9	1,9 ± 1,0	7
Piperonylbutoxid	I		2,0	1	7,0 ± 5,0	2
Pirimiphos-methyl	I	3	1,0	2	2,0	1
Prothioconazol	F		4,8 ± 4,5	5	4,0 ± 1,2	4
Pyraclostrobin	F		1,0	1	6,0 ± 3,0	2
Spiroxamin	F				1,0	1
Tau-Fluvalinat	V	10	8,8 ± 4,0	12	7,8 ± 6,3	12
Tebuconazol	F		6,8 ± 9,6	6	6,7 ± 9,1	6
Tebufenozid	I				18,0 ± 10,0	2
Terbuthylazin	H				1,0	1
Thymol	V	1400	12901 ± 15793	12	12964 ± 19368	12
Triadimenol	F		9,0	1		
Trifloxystrobin	F		4,0 ± 2,0	2	11,0 ± 6,4	3

Wirkstoffklassen: A = Akarizid, D = Desinfektionsmittel, F = Fungoid, H = Herbizid, I = Insektizid, V = Varroazid, M = *multiple source compound*, N = Nematizid, R = Repellent

Honigertrag, Bienenmasse und Schädlingsbefall

Honigertrag und Bienenmasse der Völker mit K- bzw. NK-Wachs sowie an konventionell und biologisch bewirtschafteten Arealen sind für die Saison 2021 sowie 2022 in Tabelle 7 zusammengefasst. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Daten weisen eine sehr hohe Streuung auf. So variiert der Honigertrag zwischen 0 und 47,1 kg pro Volk und die Bienenmasse zwischen 1,4 und 6,9 kg pro Volk. Dass die Ergebnisse knapp nicht signifikant sind, liegt unter anderem an der relativen großen Varianz innerhalb der Stichproben. Diese war in den schlechten Bienenjahren vermutlich vornehmlich auf das Wetter zurückzuführen, so dass sich trotz des gepaarten Designs zufällige Unterschiede im Erfolg der Stöcke stark auswirkten. In der Saison 2022 kam es durch die lange anhaltende Dürre im Sommer dazu, dass die Bienen einen Großteil der eingetragenen Honigreserven bis zum Ende der Saison wieder selbst verbraucht hatten und bei zahlreichen Völkern gar kein Honigertrag erwirtschaftet werden konnte. Mit einer größeren Stichprobe über mehrere Jahre könnten sich validere Aussagen treffen lassen.

Die Varroabelastung der eigenen Völker (Hauzenstein) zeigte einen Trend (geringere Varroabelastung bei NK-Völkern), auch wenn die Werte keinen signifikanten Unterschied zeigten (Wilcoxon-Test $p=0,0625$, $n = 6$). Die Belastung mit *Nosema* (einem typischen Darmparasiten) war zu gering, um sie statistisch auswerten zu können. Lediglich vier Völker waren betroffen, davon drei mit einem starken und eines mit einem leichten Befall.

Tabelle 7: Honigertrag und Bienenmasse (jeweils in kg) für den Vergleich zwischen K und NK-Wachs (unabhängig vom Areal), sowie zwischen biologisch (Bio) und konventionell bewirtschafteten (Kon) Arealen (unabhängig vom Wachs). Für die Standorte steht „Imker“ für die beteiligten Kooperationsimker und „Hs“ für Hauzenstein (eigene Versuchsvölker). Angegeben sind jeweils die Stichprobengröße (n), Median und Quartile, sowie das exakte p für den Paarvergleich mittels Wilcoxon-Tests.

Saison 2022

Vergleich	Standort	n	Median NK	Quartile NK	Median K	Quartile K	p
Honigertrag	Imker	20	4,3	0 - 15	3,4	0 - 17,5	0,99
	Hs	6	2,8	0,8 - 4,5	1,5	0 - 4,5	0,38
	alle	26	3,8	0 - 7,1	2,3	0 - 14,9	0,75
Bienenmasse	Imker	20	2,5	2,1 - 3,0	2,7	2 - 3,2	0,70
	Hs	6	3,1	2,6 - 3,6	2,2	1,3 - 3,1	0,06
	alle	26	2,8	2,1 - 3,3	2,6	2 - 3,1	0,39

Vergleich	Areal	n	Median Bio	Quartile Bio	Median Kon	Quartile Kon	p
Honigertrag	Bio/Konv	20	4,8	0 - 15,8	2,8	0 - 17,8	0,79
Bienenmasse	Bio/Konv	20	2,6	2,1 - 3,5	2,8	2,1 - 3,1	0,44

Saison 2021

Vergleich	Standort	n	Median NK	Quartile NK	Median K	Quartile K	p
Honigertrag	Imker	10	11,1	4,8 - 16	6,4	0 - 12,3	0,1
	Hs	5	19	5,5 - 24	11,5	6,5 - 12	0,31
	alle	15	12,4	5 - 20,7	7,9	5 - 12	0,07
Bienenmasse	Imker	19	2,3	2,1 - 2,9	2,3	1,6 - 2,7	0,24
	Hs	5	5,8	4,1 - 6,8	4,7	3,1 - 4,7	0,12
	alle	24	2,5	2,1 - 4,4	2,6	1,7 - 3,2	0,052

Vergleich	Areal	n	Median Bio	Quartile Bio	Median Kon	Quartile Kon	p
Honigertrag	Bio/Konv	9	5	0 - 13,9	11,2	4,7 - 15	0,16
Bienenmasse	Bio/Konv	18	2,3	2 - 2,7	2,2	1,8 - 2,9	0,87

5.3 Arbeitspaket 3: Semi-Feld- und Laborversuche zu den Effekten kontaminierten Bienenwachses

5.3.1 Eiablagerrate der Königinnen, Entwicklungsdauer und Mortalität der Larven, Bauleistung der Arbeiterinnen

Die Königinnen entschieden sich in allen Fällen nur für eine Wabe, welche sie bestifteten. Sie legten zwischen 255 bis 2925 Eiern in zwei Tagen. Königinnen aus K- und NK- Völkern zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der gelegten Eier ($n=8$, $p=0,078$, exakter Wilcoxon-Test, Abbildung 11), wobei zumindest ein Trend zu erkennen ist, dass Königinnen aus K Völkern mehr Eier legen. Bei der Wahl des Wachses zeigte sich jedoch, dass 12 von 16 Königinnen das NK-Wachs bevorzugten ($p=0,0384$, Binomial-Test). Dies deutet darauf hin, dass die Königinnen Schadstoffe im Wachs detektieren können und diese meiden, wenn sie eine Wahl haben.

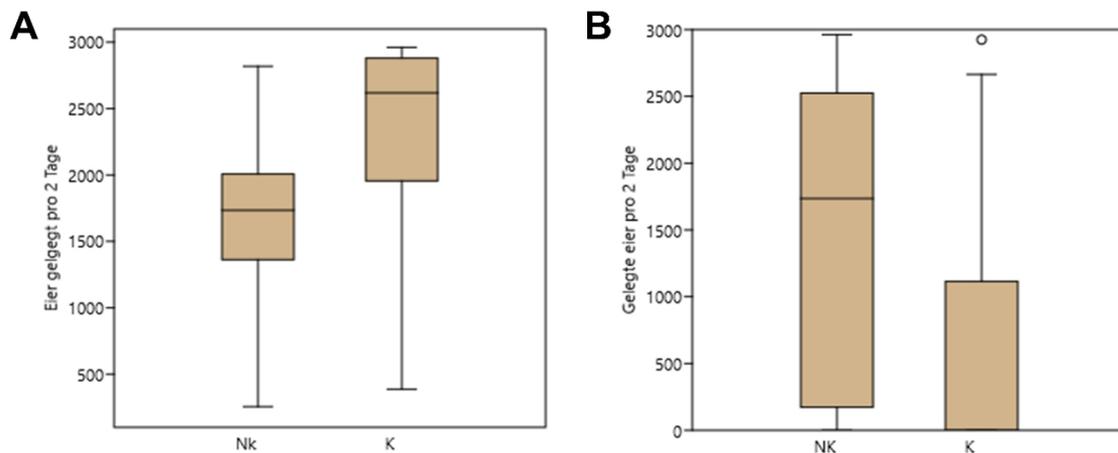


Abbildung 11: (A) Anzahl gelegter Eier von Königinnen aus NK- und K-Völkern und (B) Anzahl der Eier, die auf NK- und K-Wachs gelegt wurden ($n = 16$). Box-and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und Maximalwerte (Whisker) sowie Ausreißer (°: $>1,5$ x Boxhöhe).

Bei der anschließenden Beobachtung der Larvenentwicklung wurden die Eier und teils auch Larven von den Arbeiterbienen aus den Waben ausgeräumt. Somit war eine Auswertung über die Entwicklungsdauer der Larven nicht möglich. Die Ursachen für das Ausräumen der Larven sind unklar. Da die Experimente im späten Sommer durchgeführt wurden, liegt es jedoch nahe, dass die Bienen bereits die Volksgröße für die Überwinterung reduzierten.

5.3.2 Immunkompetenz

5.3.2.1 Melanisierung von Fremdkörpern

Eine wichtige Frage war, ob sich die Immunkompetenz von Bienen aus Völkern mit K- und NK-Wachs unterscheidet. Da zu erwarten war, dass die Immunkompetenz im Verlauf der Saison

variiert, wurde ein gepaartes Design verwendet und die Werte der Versuchspaare eines Tages (Mediane der K- bzw. NK-Bienen eines Versuchstages) mittels eines Wilcoxon-Tests für Paarvergleiche analysiert. Zudem wurde getestet, ob sich die Immunkompetenz der Völker insgesamt unterschied und ob es Unterschiede in der Immunkompetenz zwischen den einzelnen Tagen gab. Hierzu wurden Kruskal-Wallis-Tests durchgeführt.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Grauwerten, also dem Grad der Melanisierung, zwischen Bienen aus den Völkern mit K- und NK-Wachs (Wilcoxon-Test: $N=13$, $p=0,21$, Abbildung 12). Es zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede sowohl zwischen den Tagen (Kruskal-Wallis Test, $N=13$, $p=0,010$) als auch zwischen den Völkern (Kruskal-Wallis Test, $N=11$, $p=0,018$). Das deutet darauf hin, dass Faktoren wie Wetter, Witterung, Standort oder die genetischen Eigenschaften eines Volkes einen Einfluss auf die Immunabwehr in Bezug auf die Melanisierungsreaktion haben und dass die Methode prinzipiell geeignet war, Unterschiede zu erkennen. Es war aber kein signifikanter Unterschied zwischen Bienen, die auf K- bzw. NK-Wachs aufwuchsen, feststellbar.

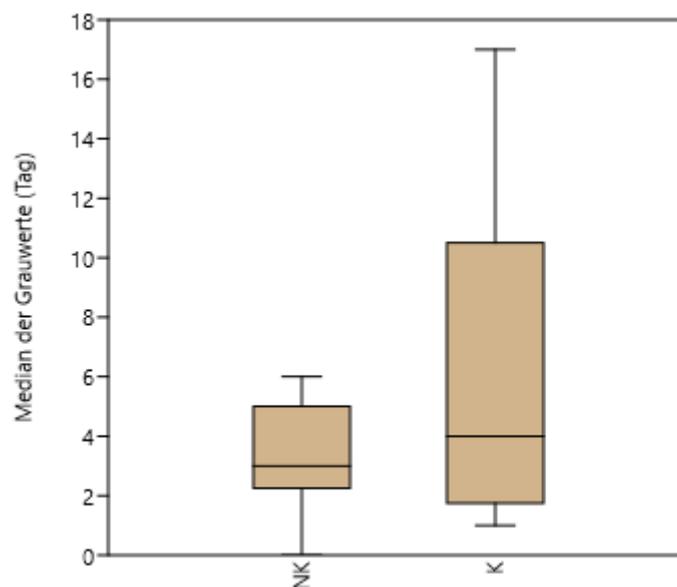


Abbildung 12: Grauwerte (Mediane eines jeden Versuchstages, $n=13$) für NK- und K-Völker. Box-and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und Maximalwerte (Whisker).

5.3.2.2 Antimikrobielle Aktivität der Hämolymphe (Hemmhoftest)

Die Experimente zur antimikrobiellen Aktivität der Hämolymphe wurden im Sommer 2022 im Rahmen einer Bachelorarbeit (Sandra Herrnberger) durchgeführt. Dazu wurde getestet, ob sich die Größen der gebildeten Hemmhöfe (*inhibition zone assay*) zwischen Bienen, die auf K- bzw. NK-Wachs aufgewachsen waren, unterschieden.

Im Vorfeld wurde getestet, ob die Bienen von K- und NK-Wachs nach Gabe von LPS eine unterschiedliche Mortalität aufwiesen. Dies war nicht der Fall. Weiter wurde untersucht, ob

sich das Volumen der abnehmbaren Hämolymphe zwischen den Gruppen unterschied. Auch hier wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden.

Die Immunproteine der Hämolymphe inhibieren das Wachstum der Bakterien in einem Bereich um das Loch auf der Agarplatte. Dabei bildet sich ein Hemmhof, eine klare, nicht von Bakterien bewachsene Zone, um das Loch mit der Hämolymphe herum aus. Der Durchmesser bzw. die Fläche des Hemmhofs ist ein Maß für die Stärke der Hemmung des bakteriellen Wachstums (Abbildung 13, [19]).

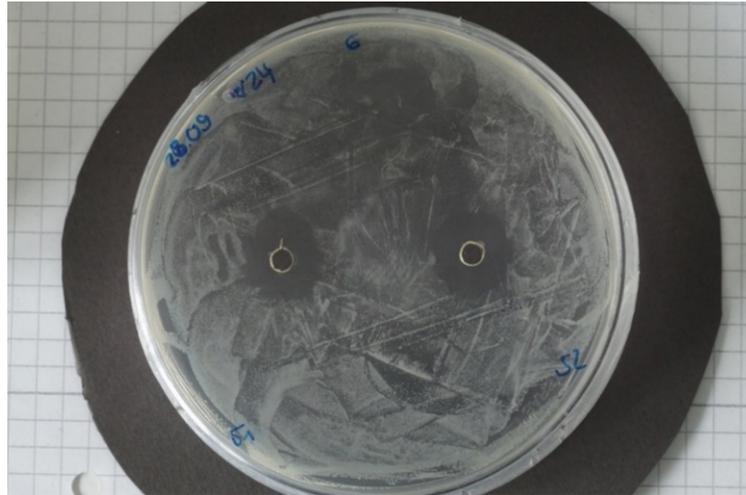


Abbildung 13: In LB-Agar wurden zwei Löcher nebeneinander gestanzt, in die Hämolymphe von Bienen aus K- (links) und NK-Wachs (rechts) pipettiert wurde. Um die Löcher waren klare Hemmhöfe erkennbar.

Für jeden Versuchstag wurden Paare aus den Mittelwerten der gemessenen Hemmhofgrößen auf den einzelnen Agarplatten (9-12 Paare von Hämolymphe aus K- bzw. NK-Wachs-Bienen pro Tag) gebildet. Der Mittelwert der Hemmhofgrößen von Bienen aus NK-Wachs war signifikant kleiner als von Bienen aus K-Wachs (Abbildung 14, Wilcoxon-Test, $p=0,0129$; $n = 17$).

Es ist interessant, dass entgegen der Annahme, dass die Immunantwort von in K-Wachs aufgewachsenen Bienen beeinträchtigt sein könnte, dieses Experiment das Gegenteil zeigte. Eine mögliche Erklärung ist eine, durch die Kontaminationen im K-Wachs verursachte, veränderte Genexpression von antimikrobiellen Peptiden (AMPs). Es wurde schon gezeigt, dass Akarizide die AMP-Genexpression beeinflussen können [14], [26]. Da die Völker am selben Standort standen und es sich um Geschwisterköniginnen handelte, sind standortbezogene und genetische Unterschiede unwahrscheinlich. Zwischen den sechs NK-Völkern zeigten sich keine Unterschiede in der Hemmhofgröße (Kruskal-Wallis-Test, $p=0,66$, $n = 167$). Zwischen den sechs K-Völkern gab es hingegen einen signifikanten Unterschied der Hemmhofgrößen (Kruskal-Wallis-Test, $p=0,0067$, $n = 167$), welcher auf einen signifikanten Unterschied zwischen Bienen aus Volk 6 und 10 zurückzuführen ist (Volk 10 zeigte in der Gruppe der K-Völker deutlich die kleinsten Hemmhöfe). Eine weitere Erklärung für die stärkere Immunantwort bei K-Bienen wäre, dass durch die im K-Wachs wirkenden Kontaminanten eine soziale Immunantwort ausgelöst wird [5], [25]. Die erhöhte Immunreaktion hat allerdings nicht nur Vorteile sondern auch Kosten. So kann z.B. eine erhöhte Immunantwort mit einer geringeren Larvenproduktion sowie einer geringeren Produktivität und Lebenserwartung adulter Tiere einhergehen

[11]. Weitere Forschung ist in diesem Bereich erforderlich, um die genauen Hintergründe des von uns gezeigten Effektes zu verstehen.

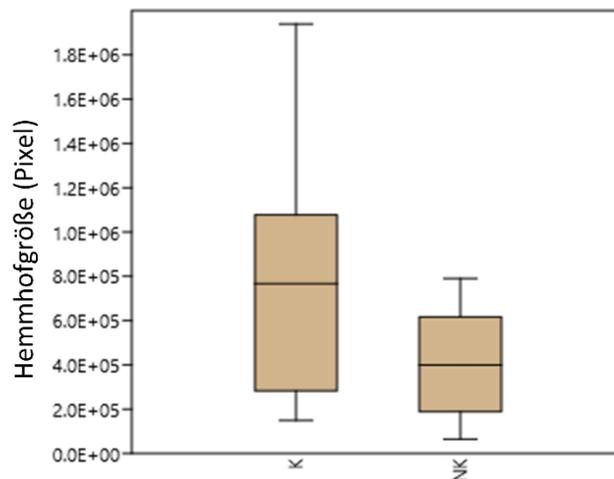


Abbildung 14: Größe der Hemmhöfe (gemessen in Pixel) bewirkt durch die Hämolymphe von Bienen aus K- und NK-Wachs. Box-and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und Maximalwerte (Whisker); $n = 17$, Wilcoxon-Test: $p=0,0129$).

5.3.2.3 Anzahl der Hämozyten

In diesem Versuch wurde der Einfluss unterschiedlich kontaminierten Wachses auf einen weiteren Parameter der Immunkompetenz von Honigbienen getestet, nämlich auf die Konzentration der Hämozyten in der Hämolymphe, die ein Maß für zelluläre Immunabwehr darstellt [23].

Zur Auswertung wurden die Mediane (Zellen/ μ l) der Proben von K- und NK-Völkern des jeweiligen Versuchstages paarweise verglichen. Hierbei zeigten sich, anders als im Hemmhofversuch, keine signifikanten Unterschiede ($n = 15$, $p=0,815$ Wilcoxon-Test, Abbildung 15). Das Experiment zeigt, dass die erhöhte Abwehrleistung der Hämolymphe nicht auf die Anzahl der Hämozyten zurückzuführen ist, sondern vermutlich auf die Konzentration antimikrobieller Peptide.

5.3.3 Assoziatives Lernvermögen

Die Daten aus einem Vorversuch (2020) zeigten keine signifikanten Unterschiede im Lernvermögen zwischen Bienen, die sich in K- oder NK- Wachs entwickelt hatten (Chi-Quadrat-Test für Häufigkeit erfolgreiches vs. nicht erfolgreiches Lernen: $\text{Chi}^2 = 0.78$, $p=0.38$).

Im Jahr 2021 wurde im Spätsommer eine weitere Versuchsreihe im Rahmen einer Masterarbeit (Nathalie Ingerl) durchgeführt. Die Nummer der Durchgänge, ab der die Bienen PER zeigten, unterschied sich weder signifikant zwischen den Völkern (Kruskal Wallis Test: $H = 5,8$; $p=0,75$) noch zwischen den Versuchstagen (Kruskal Wallis Test: $H = 9,9$; $p=0,41$). Insbesondere war kein Unterschied zwischen Bienen, die sich in K- bzw. NK-Wachs entwickelten, festzustellen (Mann Whitney Test: N (NK-Wachs) = 37, N (K-Wachs) = 39; $p=0,91$; Abbildung 16).

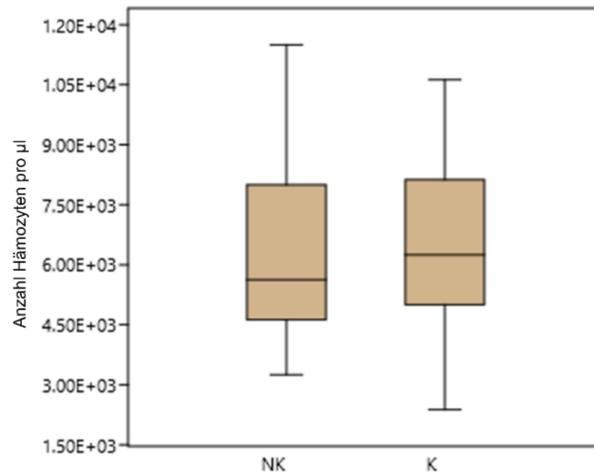


Abbildung 15: Unterschied in der Hämozytenzahl pro μl Hämolymphe zwischen Bienen aus K- und NK-Wachs (Mediane eines jeden Versuchstages, $n=15$, $p=0,815$ Wilcoxon-Test). Box-and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und Maximalwerte (Whisker); $n = 15$, $p=0,815$ Wilcoxon-Test.

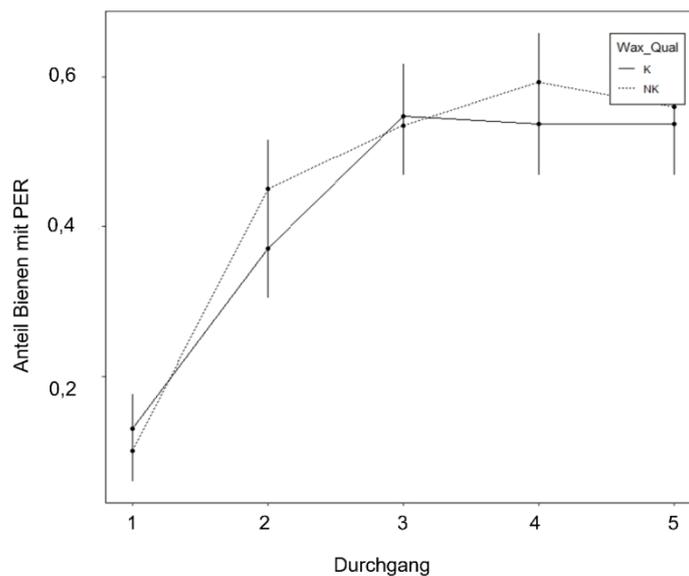


Abbildung 16: Ergebnisse der Lernversuche mittels PER für Bienen, die sich in K- bzw. NK-Wachs entwickelten. Dargestellt sind die Anteile der Bienen, die in den Versuchsdurchgängen 1-5 einen PER zeigten (Mittelwerte und Standardabweichungen der Versuchstage).

Außerdem sollte die Gedächtnisleistung bestimmt werden. Hierzu wurde 1 Stunde, 6 Stunden und 24 Stunden nach den Lernversuchen erneut getestet, ob die Bienen einen Rüsselstreckreflex auf den Geruch von Hexanal zeigten (hier ohne anschließende Belohnung). Die Zeit, bis zu der die Bienen den PER zeigten, unterschied sich nicht signifikant zwischen den Völkern (Kruskal Wallis Test: $H = 5,7$; $p=0,76$), ebenso nicht zwischen den Versuchstagen (Kruskal-Wallis-Test: $H = 11,8$; $p=0,25$) und auch nicht zwischen Bienen, die sich in K- bzw. NK-Wachs

entwickelt hatten (Mann Whitney Test: N (NK-Wachs) = 41, N (K-Wachs) = 41; $p=0,94$; Abbildung 17).

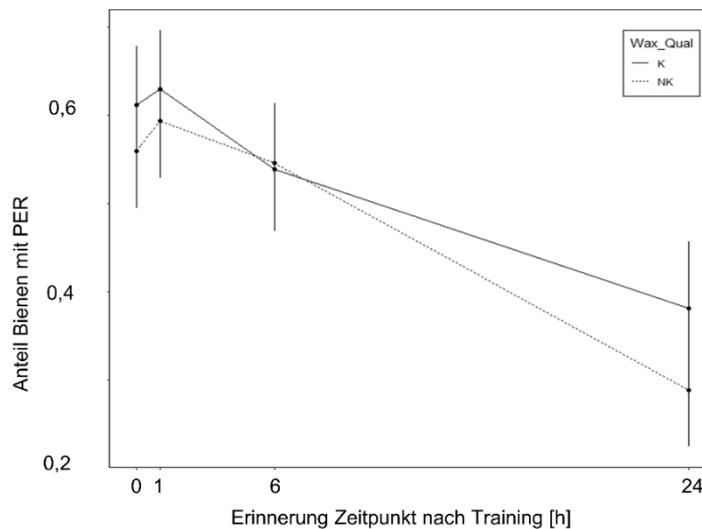


Abbildung 17: Ergebnisse der Lernversuche mittels PER für Bienen, die sich in K- bzw. NK-Wachs entwickelten. Dargestellt sind die Anteile der Bienen, die in den Versuchsdurchgängen 1-5 einen PER zeigten (Mittelwerte und Standardabweichungen der Versuchstage).

Wegen des schlechten Bienenjahres 2021 wurde dieses Experiment im Sommer 2022 noch einmal wiederholt. Auch hier wurde doppelblind getestet. Es wurden insgesamt 309 Bienen untersucht. Auswertbar waren hiervon 280 Bienen (138 K- und 142 NK-Bienen). Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wachsgruppen K und NK (Lernen $\chi^2 = 0,11$, $p=0,74$). Die Gedächtnisleistung wurde hier in Zeitabschnitten von 1, 3 und 24 Stunden nach dem Training untersucht ($\chi^2 = 0,09$, $p=0,75$). Es deutet somit nichts auf einen Unterschied im Lernvermögen zwischen Bienen hin, die sich in K- oder NK-Wachs entwickelt haben.

5.3.4 Flugleistung

Dieser Versuch wurde Sommer 2021 durchgeführt. Insgesamt wurden 100 Bienen an 10 Versuchstagen getestet. Von den 100 getesteten Bienen flogen lediglich 6 aus der Gruppe NK und 10 aus der Gruppe K für mindestens 10 Minuten. Es zeigten sich weder bei der Flugdistanz ($p=0,6984$ Mann-Whitney U-Test), Flugdauer ($p=0,6256$ Mann-Whitney U-Test), der durchschnittlichen Geschwindigkeit ($p=0,1813$ Mann-Whitney U-Test) noch bei der Anzahl an Pausen ($p=0,6511$ Mann-Whitney U-Test) signifikante Unterschiede. Aufgrund der geringen Anzahl an geflogenen Bienen sind die Ergebnisse hier jedoch nur wenig aussagekräftig.

5.3.5 Heimfindervermögen

Bei der Auswertung der Videos wurde notiert, wann markierte Bienen zum Stock zurückkehrten, aber nur bis eine markierte Biene den Stock wieder verließ, da hier meist keine genaue Zuordnung möglich war und die herausfliegende Biene ansonsten, wenn sie zurückkehrte, fälschlicherweise als Heimkehrerin gewertet werden könnte. Falls eine ausfliegende Biene

aber eindeutig individuell identifizierbar war, wurde die Zählung fortgesetzt. Da anzunehmen war, dass das Heimfindervermögen vom Wetter und dem Zeitpunkt in der Saison abhing, wurde wiederum ein Paarvergleichstest (N vs. NK an einem Tag) zur statistischen Analyse verwendet. Es zeigten sich weder für 500 m noch für 1000 m Entfernung signifikante Unterschiede (Abbildung 18).

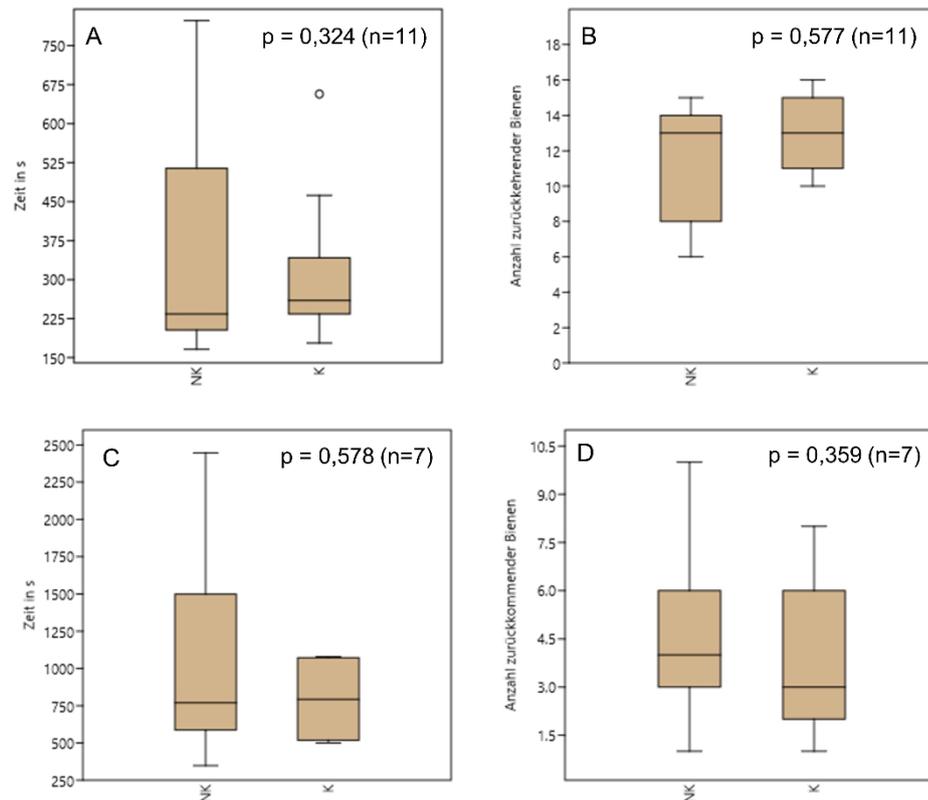


Abbildung 18: Ergebnisse der Heimfindungsversuche für Bienen, die sich entweder in K- oder in NK-Wachs entwickelten: A, C: Zeit in Sekunden, welche die Bienen benötigten, um nach dem Aussetzen in 500 m (A) bzw. 1000 m (C) Entfernung zur Beute zurückzukommen. B, D: Anzahl der Bienen, die nach dem Aussetzen in 500 (B) bzw. 1000 m (D) zurückkehrten, bevor eine markierte Biene die Beute wieder verließ. Es sind die Ergebnisse von Paarvergleichen mittels Wilcoxon-Tests angegeben (jeweils Vergleiche der Mediane von Versuchspaaren, die am gleichen Tag getestet wurden; bei 500 m Versetzung: 11 Versuchstage mit insgesamt 330 Bienen, bei 1000 m Versetzung: 7 Versuchstage mit insgesamt 210 Bienen). Box-and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und Maximalwerte (Whisker).

6 Zusammenfassung

Ziele des Projektes waren (1) in einem bayernweiten Monitoring die Belastung von Bienenwachs durch Schadstoffe zu erfassen, (2) den Eintrag anthropogener Substanzen in kaum belastetes Bienenwachs in konventionell und ökologisch bewirtschafteten Arealen zu vergleichen, wobei gleichzeitig Volksentwicklung und Honigertrag an diesen Standorten ermittelt wurden und (3) die Leistungsfähigkeit von Bienenarbeiterinnen, die sich in kontaminiertem Wachs (K-Wachs) bzw. nicht kontaminiertem Wachs (NK-Wachs) entwickelten, zu vergleichen. Auf der Basis der Ergebnisse wurden **Handlungsempfehlungen** für Imkerinnen und Imker zur Vermeidung chemischer Belastungen von Bienenwachs erarbeitet (Anhang).

(1) Durch das bayernweite Monitoring der Kontaminationen des Bienenwachses konnte gezeigt werden, dass Wachse von Völkern konventionell bewirtschafteter Imkereien signifikant mehr anthropogene Substanzen enthalten als Wachse von Bio-Imkereien.

(2) Die Wachsproben wurden am Ende jeder Saison bei 12 Kooperationsimkern genommen und auf Umweltchemikalien untersucht. Hierbei zeigte sich anfänglich eine Verdünnung der ursprünglich vorhandenen geringen Schadstoffkonzentrationen durch den Ausbau der Mittelwände mit von den Bienen neu produziertem, unbelastetem Wachs. In der Saison 2022 zeigten sich jedoch erstmals signifikant höhere Konzentrationen von Pflanzenschutzmitteln in den Wachsen der konventionellen Standorte. Beim Vergleich von Volksentwicklung und Honigertrag an den konventionell und biologisch bewirtschafteten Standorten ergaben sich hingegen keine signifikanten Unterschiede.

(3) Es wurden das Lern- und Heimfindevermögen, die Immunkompetenz und die Flugleistung der Bienenarbeiterinnen untersucht. Beim Lernvermögen und bei der Gedächtnisleistung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Bienen, die sich in K- bzw. NK-Wachs entwickelt hatten. Das gleiche gilt für das Heimfindevermögen und die Flugleistung. Bei der Immunkompetenz zeigte sich, dass die antimikrobielle Aktivität der Hämolymphe bei Bienen, welche in K-Wachs aufwuchsen, signifikant erhöht war. Bei Experimenten zur Immunabwehr gegen Fremdkörper und der Anzahl an Hämozyten wurden hingegen keine Unterschiede festgestellt.

Unsere Experimente haben somit nur wenige Evidenzen zu der Hypothese geliefert, dass Verunreinigungen in konventionellem Bienenwachs Honigbienen beeinträchtigen. Sowohl auf Ebene der Völker als auch auf individueller Ebene der Arbeiterinnen zeigten sich nur bei zwei der untersuchten Parameter signifikante Unterschiede.

7 Ausblick

Die in diesem Projekt erzielten Ergebnisse zeigen, dass es einen Eintrag von Pflanzenschutzmitteln aus der Landwirtschaft und anderen anthropogenen Kontaminationen ins Bienenwachs gibt. Der größte Anteil der Verunreinigungen stammt vor allem aus Rückständen vergangener Jahre oder ist auf imkerliche Maßnahmen insbesondere aus der Varroabehandlung zurückzuführen. Die Verwendung von kontaminiertem Wachs bewirkte bei den von uns untersuchten Parametern jedoch kaum signifikante negative Effekte. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer kürzlich veröffentlichten Studie [26], die ebenfalls keine signifikanten Effekte auf die Reproduktion und die Volksentwicklung fand, wenn den Völkern mit Umweltchemikalien und Varroaziden belastete Mittelwände angeboten wurden. Die Verfälschung von Wachs durch den Zusatz von Stearin führte hingegen zu negativen Effekten. Eine aus den USA stammende Studie [32] fand hingegen negative Effekte verunreinigter Mittelwände auf die Larvalentwicklung (Verlangsamung) und die Lebensdauer adulter Arbeiterinnen (Verkürzung). Das in dieser Studie verwendete Wachs war jedoch noch weitaus stärker mit Pestiziden belastet als das von uns verwendete (u.a. 50x höherer Gehalt an dem Varroazid Coumaphos, welches auch insektizid wirkt). Somit könnte der Grad der Verunreinigung des hier verwendeten Wachses nicht hoch genug gewesen sein, um stärkere Effekte zu bewirken. Diese Schlussfolgerung wird durch chemische Analyse von Larven und adulten Bienen unterstützt, bei denen keine aus dem Wachs stammenden Rückstände nachgewiesen werden konnten. Bei Betrachtung der Ergebnisse des Wachsmonitorings stellt das in dieser Studie verwendete K-Wachs ein typisches Beispiel für ein in Bayern bei der konventionellen Imkerei verwendetes Wachs dar. Jedoch muss festgestellt werden, dass bei gleichen Gesamtmengen die relative Zusammensetzung der Verunreinigungen unterschiedliche Wirkungen haben kann. Somit wären trotz der geringen Effekte, die in diesem Projekt gefunden wurden, weitere Versuche unter kontrollierten Bedingungen sinnvoll, bei denen sauberes Wachs mit definierten, feldrealistischen Mengen bestimmter Wirkstoffe experimentell kontaminiert wird. Hintergrund solcher Versuche sind mögliche additive oder sogar synergistische Effekte, die Wirkstoffe verschiedener Klassen (z.B. Insektizide und Fungizide) auf Honigbienen haben können [33]. So könnten Substanzen, die allein keine Effekte auslösen, zusammen sehr wohl welche besitzen.

Der in diesem Projekt verwendete hohe Parameterumfang (>850 Wirkstoffe) bei einer einheitlichen Bestimmungsgrenze von 1 µg/kg ermöglichte den Nachweis von zahlreichen Wirkstoffen, die bei Routinemessungen mit höheren Bestimmungsgrenzen nicht erfasst worden wären. Daher sollten in regelmäßigen Abständen stichprobenartig chemische Analysen mit diesen Parametern durchgeführt werden, um mögliche Kontaminationen, insbesondere auch durch neu zugelassene Pflanzenschutzmittel frühzeitig zu erkennen.

Auch muss erwähnt werden, dass die Honigbiene gerne als Modellorganismus verwendet wird. Beim Heranziehen von wenigen typischen Modellorganismen ist jedoch zu beachten, dass diese nur einen geringen Anteil an der heimischen Insektendiversität ausmachen. Der Rückgang von Insekten betrifft jedoch vor allem andere Insekten, welche auf Pflanzenschutzmittel empfindlicher reagieren könnten. Es besteht somit weiterhin Forschungsbedarf. Um unsere Umwelt zu erhalten ist eine gute Zusammenarbeit zwischen Chemischer Industrie, Landwirtschaft, Umweltschützenden, Zulassungs- und Regulierungsbehörden sowie den Forschenden auf breiter Front wichtig.

8 Veröffentlichungen

Bartl, K., Strohm, E., Ruther, J. (2022): Pollution in beeswax. 37th Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology, Kuala Lumpur, Malaysia, 08.-12.08. 2022, Posterpräsentation

Literaturverzeichnis

- [1] Biokreis (2021) Richtlinien Imkerei. Biokreis Verband für ökologischen Landbau und gesunde Ernährung e.V., 03/2021, <https://www.biokreis.de/wp-content/uploads/2021/10/Richtlinien-Imkerei-2021-AUSDRUCK.pdf>
- [2] Blanken, L.J., Van Langevelde, F., & Van Dooremalen, C. (2015). Interaction between *Varroa destructor* and imidacloprid reduces flight capacity of honeybees. Proc. R. Soc. B-Biol. Sci. 282
- [3] Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M., & Buchler, R. (2016). The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honeybees (*Apis mellifera* L.). J. Insect Physiol. 86, 40-47
- [4] Breeze, T.D., Gallai, N., Garibaldi, L.A., & Li, X.S. (2016). Economic measures of pollination services: shortcomings and future directions. Trends Ecol. Evol. 31, 927939
- [5] Chmiel, J. A., Daisley, B. A., Pitek, A. P., Thompson, G. J., & Reid, G. (2020). Understanding the effects of sublethal pesticide exposure on honey bees: A role for probiotics as mediators of environmental stress. Front. Ecol. Evol., 8 (22)
- [6] Couvillon, M. J., Pearce, F. C. R., Accleton, C., Fensome, K. A., Quah, S. K., Taylor, E. L., & Ratnieks, F. L. (2015). Honey bee foraging distance depends on month and forage type. Apidologie, 46(1), 61-70
- [7] DeGrandi-Hoffman, G. & Chen, Y. (2015). Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. Curr. Opin. Insect Sci. 10, 170-176
- [8] Delaplane, K.S., Van Der Steen, J., & Guzman-Novoa, E. (2013). Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. J. Apicult. Res. 52, 1-12
- [9] Dietemann, V., Nazzi, F., Martin, S.J., Anderson, D.L., Locke, B., Delaplane, K.S., et al. (2013). Standard methods for varroa research. J. Apicult. Res. 52: 1-52
- [10] EU-VO 2018/848, vom 30. Mai 2018 über die ökologische/biologische Produktion und die Kennzeichnung von ökologischen/biologischen Erzeugnissen sowie zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 834/2007 des Rates, Abl. L 150 vom 14.06.2018, S.1
- [11] Evans, J. D. & Pettis, J.S. (2005). Colony-Level impacts of immune responsiveness in honey bees, *Apis mellifera*. Evolution 59, 2270-2274

- [12] Fischer, J., Muller, T., Spatz, A.K., Greggers, U., Grunewald, B., & Menzel, R. (2014). Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. *Plos One* 9, 10
- [13] Fries, I., Chauzat, M.P., Chen, Y.P., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., et al. (2013). Standard methods for *Nosema* research. *J. Apicult. Res.* 52, 1-28
- [14] Garrido, P. M., Antúnez, K., Martín, M., Porrini, M. P., Zunino, P.; Eguaras, & M. J. (2013). Immune-related gene expression in nurse honey bees (*Apis mellifera*) exposed to synthetic acaricides. *J. Insect Physiol.* 59, 113-119.
- [15] Goulson, D., Nicholls, E., Botias, C., & Rotheray, E.L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347, 1255957
- [16] Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.F., Aupinel, P., et al. (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336, 348-350
- [17] Holder, P.J., Jones, A., Tyler, C.R., & Cresswell, J.E. (2018). Fipronil pesticide as a suspect in historical mass mortalities of honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, 13033-13038
- [18] Laomettachit, T., Liangruksa, M., Termsaithong, T., Tangthanawatsakul, A., & Duangphakdee, O. (2021). A model of infection in honeybee colonies with social immunity. *Plos One* 16
- [19] Mallon, E. B., Brockmann, A., & Schmid-Hempel, P. (2003). Immune response inhibits associative learning in insects. *Proc. R. Soc B: Biol. Sci.* 270, 2471-2473.
- [20] Medici, S.K., Castro, A., Sarlo, E.G., Marioli, J.M., & Eguaras, M.J. (2012). The concentration effect of selected acaricides present in beeswax foundation on the survival of *Apis mellifera* colonies. *J. Apicult. Res.* 51, 164-168
- [21] Müller, C. (2018). Impacts of sublethal insecticide exposure on insects - Facts and knowledge gaps. *Basic Appl. Ecol.* 30, 1-10
- [22] Nahar, N., and Ohtani, T. (2015). Imidacloprid and Fipronil induced abnormal behavior and disturbed homing of forager honey bees *Apis mellifera*. *J. Entomol. Zool Stud.* 3, 65-72
- [23] Negri, P., Maggi, M., Ramirez, L., Szawarski, N., De Feudis, L., Lamattina, L., & Eguaras, M. (2016). Cellular immunity in *Apis mellifera*: studying hemocytes brings light about bees skills to confront threats. *Apidologie*, 47, 379-388.
- [24] Piironen, S., & Goulson, D. (2016). Chronic neonicotinoid pesticide exposure and parasite stress differentially affects learning in honeybees and bumblebees. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* 283, 20160246
- [25] Reeves, A. M., O'Neal, S. T., Fell, R. D., Brewster, C. C., & Anderson, T. D. (2018). In-hive acaricides alter biochemical and morphological indicators of honey bee nutrition, immunity, and development. *J. Insect Sci.* 18, 1-6

- [26] Sabová, L., Maruščáková, I. C., Koleničová, S.; Mudroňová, D., Holečková, B., Sabo, R., Sobeková, A., Majchrák, T., & Ratvaj, M. (2022). The adverse effects of synthetic acaricide tau-fluvalinate (tech.) on winter adult honey bees. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 92, 103861
- [27] Wu, J.Y., Anelli, C.M., and Sheppard, W.S. (2011). Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *Plos One* 6, e14720
- [28] Alkassab, A.T., Thorbah, n D., Frommberger, M., Bischoff, G. & Pistorius, J. (2020) Effect of contamination and adulteration of wax foundations on the brood development of honeybees. *Apidologie* 51, 642-651
- [29] Ravoet, J., Reybroeck, W., & de Graaf DC (2015) Pesticides for apicultural and/or agricultural application found in Belgian honey bee wax combs. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 94, 543-548
- [30] Daniele, G., Giroud, B., Jabot, C. & Vulliet, E. (2018) Exposure assessment of honeybees through study of hive matrices: analysis of selected pesticide residues in honeybees, beebread, and beeswax from French beehives by LC-MS/MS. *Environ. Sci. Poll. Res.* 25, 6145-6153
- [31] Valdovinos-Flores, C., Alcantar-Rosales, V.M., Gaspar-Ramírez, O., Saldaña-Loza, L.M. & Dorantes-Ugalde, J.A. (2017) Agricultural pesticide residues in honey and wax combs from Southeastern, Central and Northeastern Mexico. *J. Apicult. Res.* 56, 667-679
- [32] Mullin, C.A., Frazier, M., Frazier, J.L., Ashcraft, S., Simonds, R., van Engelsdorp, D. & Pettis, J.S. (2010) High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: Implications for honey bee health. *PLoS ONE* 5: e9754
- [33] Wade, A., Lin, C.-H., Kurkul, C., Regan, E.R. & Johnson RM (2019) Combined toxicity of insecticides and fungicides applied to California almond orchards to honey bee larvae and adults. *Insects* 10: 20

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schema des Versuchsdesigns der Feldversuche für Arbeitspaket 2 und zum Teil für Arbeitspaket 3	7
Abbildung 2:	Links: Brutwabe mit der ersten Brut, Mittelwand hier aus K-Wachs. Rechts: Larvenentwicklung. Markierungen auf Folie (Kreis = 100 cm ²) zur Bestimmung der Larvenentwicklung. Unterschieden wurden fünf Larvenstadien, hier zu sehen Ei (blau), kleine Larve nach dem Schlupf (rot).....	10
Abbildung 3:	Bannwabe zur Separierung der Königin (links). Beute mit Bannwabe zur Bestimmung der Eiablagerrate und Entwicklungsgeschwindigkeit (Mitte). Brutzellen mit frisch gelegten Eiern (rechts).....	10
Abbildung 4:	Schematische Darstellung zur Auswertung der Fäden. Der Grauwert des Fadens wurde innerhalb einer rechteckigen Fläche im implantierten Bereich bestimmt.....	11
Abbildung 5:	Beispiele für unterschiedlich starke Melanisierung (A) Schwache bis mittelstarke Melanisierung. (B) Starke Melanisierung (C) Schwache Melanisierung mit Organfragment (blaue Markierung), das von der Auswertung ausgeschlossen wurde.....	11
Abbildung 6:	Entnahme von Hämolymphe über das Abdomen. (A) Die Biene wurde mit einer Pinzette fixiert und mit einer Insulinspritze zwischen dem zweiten und dritten Tergit punktiert. (B) Hämolymphe war in Form eines austretenden Tropfens sichtbar. (C) Die Hämolymphe wurde mit einer Pasteurpipette aufgenommen (klar und leicht gelblich).....	12
Abbildung 7:	Abschnitt einer Zählkammer. Großes Quadrat (Dreifachlinien) entspricht dem Volumen 1/25 µl. Zu sehen sind zahlreiche Hämocyten.....	13
Abbildung 8:	Bienen mit einem auf dem Thorax angeklebten Metallplättchen (Ø 2 mm) zum Fixieren an der Flugmühle.....	14
Abbildung 9:	Biene am Auslegerarm einer Flugmühle (links). Flugmühle (magnetgelagert) von oben, eine Umdrehung beträgt einen Meter (rechts). 14	
Abbildung 10:	Versuch zum Heimfindervermögen: (A) Bienen werden mit einem Lackstift auf dem Thorax markiert; (B) Markierte Bienen werden auf der Videoaufnahme identifiziert.....	15
Abbildung 11:	(A) Anzahl gelegter Eier von Königinnen aus NK- und K-Völkern und (B) Anzahl der Eier, die auf NK- und K-Wachs gelegt wurden (n = 16). Box- and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und Maximalwerte (Whisker) sowie Ausreißer (°: >1,5 x Boxhöhe).....	24

Abbildung 12:	Grauwerte (Mediane eines jeden Versuchstages, n=13) für NK- und K-Völker. Box-and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und Maximalwerte (Whisker).....	25
Abbildung 13:	In LB-Agar wurden zwei Löcher nebeneinander gestanzt, in die Hämolymphe von Bienen aus K- (links) und NK-Wachs (rechts) pipettiert wurde. Um die Löcher waren klare Hemmhöfe erkennbar.....	26
Abbildung 14:	Größe der Hemmhöfe (gemessen in Pixel) bewirkt durch die Hämolymphe von Bienen aus K- und NK-Wachs. Box-and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und Maximalwerte (Whisker); n = 17, Wilcoxon-Test: p=0,0129).	27
Abbildung 15:	Unterschied in der Hämozytenzahl pro μl Hämolymphe zwischen Bienen aus K- und NK-Wachs (Mediane eines jeden Versuchstages, n=15, p=0,815 Wilcoxon-Test). Box-and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und Maximalwerte (Whisker); n = 15, p=0,815 Wilcoxon-Test.	28
Abbildung 16:	Ergebnisse der Lernversuche mittels PER für Bienen, die sich in K- bzw. NK-Wachs entwickelten. Dargestellt sind die Anteile der Bienen, die in den Versuchsdurchgängen 1-5 einen PER zeigten (Mittelwerte und Standardabweichungen der Versuchstage).	28
Abbildung 17:	Ergebnisse der Lernversuche mittels PER für Bienen, die sich in K- bzw. NK-Wachs entwickelten. Dargestellt sind die Anteile der Bienen, die in den Versuchsdurchgängen 1-5 einen PER zeigten (Mittelwerte und Standardabweichungen der Versuchstage).	29
Abbildung 18:	Ergebnisse der Heimfindungsversuche für Bienen, die sich entweder in K- oder in NK-Wachs entwickelten: A, C: Zeit in Sekunden, welche die Bienen benötigten, um nach dem Aussetzen in 500 m (A) bzw. 1000 m (C) Entfernung zur Beute zurückzukommen. B, D: Anzahl der Bienen, die nach dem Aussetzen in 500 (B) bzw. 1000 m (D) zurückkehrten, bevor eine markierte Biene die Beute wieder verließ. Es sind die Ergebnisse von Paarvergleichen mittels Wilcoxon-Tests angegeben (jeweils Vergleiche der Mediane von Versuchspaaren, die am gleichen Tag getestet wurden; bei 500 m Versetzung: 11 Versuchstage mit insgesamt 330 Bienen, bei 1000 m Versetzung: 7 Versuchstage mit insgesamt 210 Bienen. Box-and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und Maximalwerte (Whisker).....	30
Abbildung 19:	Häufigkeitsverteilung detektierter Wirkstoffe in Bienenwachsproben aus konventioneller (n=19) und Bio-Imkerei im Rahmen des Bienenwachsmonitorings.	38

Anhang

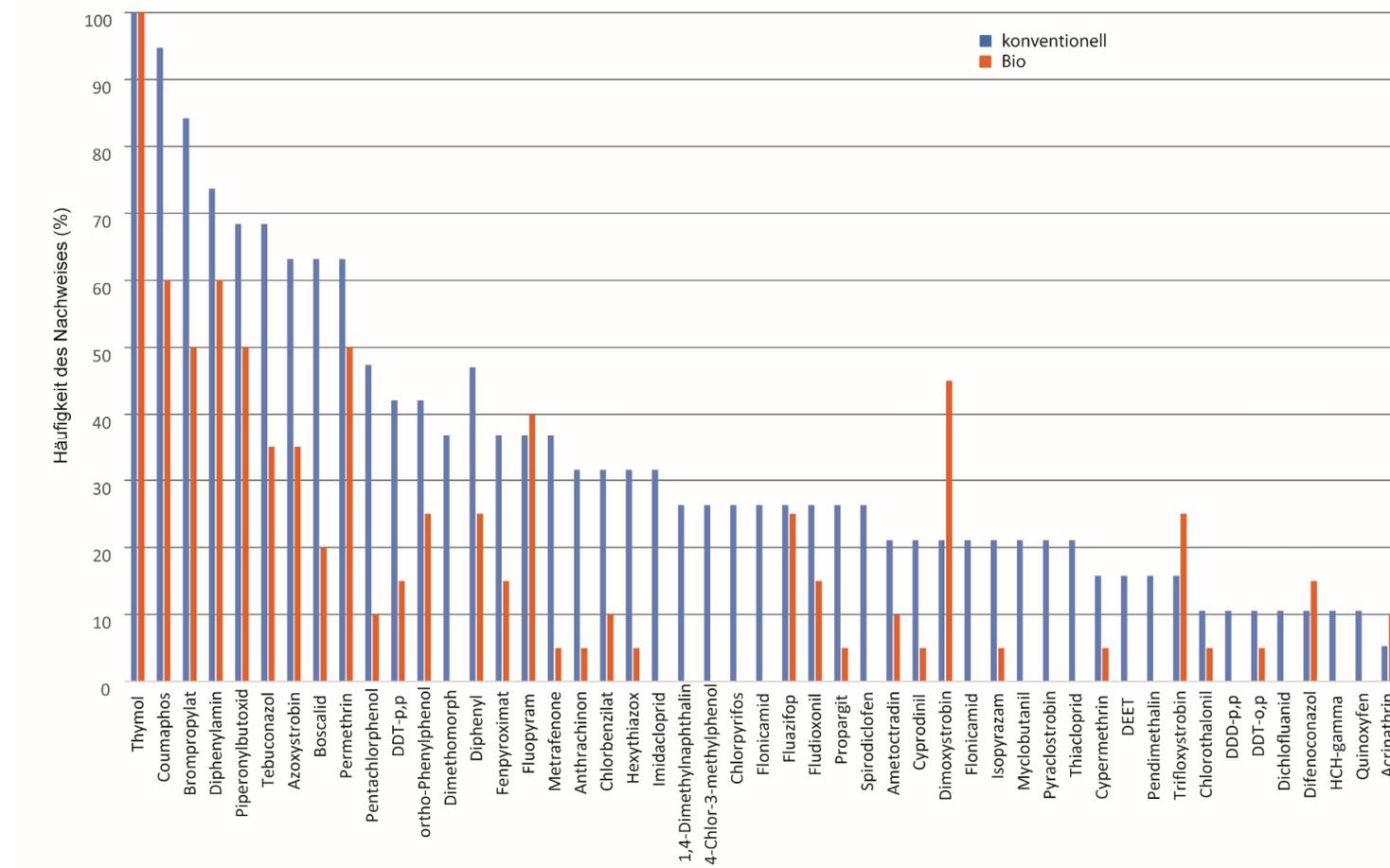


Abbildung 19: Häufigkeitsverteilung detektierter Wirkstoffe in Bienenwachsproben aus konventioneller (n=19) und Bio-Imkerei im Rahmen des Bienenwachsmonitorings.

Tabelle 8: Ergebniszusammenfassung der Rückstandsanalysen von bayerischem Bienenwachs aus konventionellen und Bio-Imkereien im Rahmen des Wachsmonitorings. Es wurden >850 Stoffe mit einer Bestimmungsgrenze von jeweils 1 µg/kg erfasst. Leere Felder bedeuten Gehalte unterhalb der Bestimmungsgrenze.

Wirkstoff	Gruppe	konventionell			Bio		
		Nachweise (n=19)	Bereich (µg/kg)	Median (µg/kg)	Nachweise (n=20)	Bereich (µg/kg)	Median (µg/kg)
1,4-Dimethylnaphthalin	M	5	14-42	19			
4-Chlor-3-methylphenol	D	5	2-4	3			
Acrinathrin	I/A	1		9	2	2-19	10,5
Ametoctradin	F	4	1-6	1,5	2	3-5	4
Amitraz Metabolit	V	1		220	1		24
Anthrachinon	M	6	3-12	6	1		19
Azoxystrobin	F	12	1-48	5	7	2-29	5
Bixafen	F	1		5			
Boscalid	F	12	1-83	2	4	2-6	4,5
Brompropylat	V	16	3-390	21,5	10	1-17	4
Carbendazim	F	1		2			
Chlorbenzilat	V	6	3-30	9	2	6-7	6,5
Chlorfenson	A	1		15			
Chlorpyrifos	I	5	2-16	4			
Chlorothalonil	F	2	1-3	2	1		1
Coumaphos	V	18	1-530	23	12	1-41	7
Cypermethrin	I	4	2-21	9	2	5	4-6
Cyprodinil	F	4	1-6	1,5	1		5
DDD-p,p	I	2	2	2			
DDE-p,p	I	1		2	1		1
DDT-o,p	I	2	2-4	3	1		1
DDT-p,p	I	8	1-12	2,5	3	1-7	3
DEET	R	3	2	2			
Deltamethrin	I				2	8	8
Desethylterbutylazin	H	1		1			
Dichlofluanid	F	2	2-14	8			
Dicofol, o,p-	F	1		5			
Difenoconazol	F	2	1-2	1,5	3	1-2	2
Dimethomorph	F	7	2-12	3			
Dimoxystrobin	F	4	2-3	3	9	1-11	2
Diphenyl	M	9	10-50	31	5	8-15	12
Diphenylamin	M	14	2-160	6,5	12	4-6	4
Fenhexamid	F	1		1			
Fenpyroximat	I/A	7	1-77	2	3	3-5	4
Flonicamid-Metabolit TFNA	I	4	3-5	4			
Flonicamid-Metabolit TFNG	I	5	1-7	2			
Fluazifop	H	5	1-13	8	5	1-3	2
Fludioxonil	F	5	1-6	1	3	1-5	3
Fluopyram	F	7	1-13	5	8	1-7	3
HCH-alpha	I	1		3			
HCH-gamma	I	2	2-6	4			
Hexythiazox	A	6	1-21	4,5	1		1
Icaridin	R				1		2

Wirkstoff	Gruppe	konventionell			Bio		
		Nachweise (n=19)	Bereich (µg/kg)	Median (µg/kg)	Nachweise (n=20)	Bereich (µg/kg)	Median (µg/kg)
Imazethapyr	H	1		3			
Imidacloprid	I	6	9-14	12,5			
Indoxacarb	I				1		4
Iprodion	F	1		7			
Isopyrazam	F	4	2-5	2,5	1		2
Mandipropamid	F	1		2			
Matrine	I/A	1		6			
Metalaxyl	F	1		2			
Metrafenone	F	7	3-40	8	1		3
Myclobutanil	F	4	1-5	2,5			
ortho-Phenylphenol	M	8	2-8	3	5	1-3	2
Oxymatrine	I/A	1		2			
Parathion (E605)	I	1		2			
Pendimethalin	H	3	1-2	2			
Pentachlorphenol	F	9	2-14	3	2		2
Permethrin (cis-/trans-)	I	12	3-160	13	10	1-17	2
Piperonylbutoxid	I	13	2-120	10	10	1-31	10,5
Propargit	A	5	5-76	24	1		21
Propamocarb	F	1		3			
Propoxur	I/A	1		3			
Prothioconazol	F	1		10	2	1-2	1,5
Pyraclostrobin	F	4	2-9	2,5			
Quinoxifen	F	2	2-3	2,5			
Spirodiclofen	I/A	5	1-5	2			
Tau-Fluvalinat	V	12	4-2000	28	11	2-390	11
Tebuconazol	F	13	1-12	2	7	1-4	2
Thiacloprid	I	4	1-3	2			
Thymol	V	19	27-52000	260	20	8-13000	76,5
Tolylfluanid	F	1		24			
Trifloxystrobin	F	3	1-3	1	5	1-21	3

Wirkstoffklassen: A = Akarizid, D = Desinfektionsmittel, F = Fungizid, H = Herbizid, I = Insektizid, V = Varroazid, M = *multiple source compound*, R = Repellent

Tabelle 9: Ergebnisse der chemischen Analysen des NK-Waxes aus den Feldversuchen bei den Kooperationsimkern. Angegeben sind die Wirkstoffkonzentrationen ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in dem für die Herstellung der Mittelwände verwendeten, nur geringfügig kontaminierten Waxes (NK-Wachs, März 2020) sowie die Konzentrationen der Stoffe in den ausgebauten Waben am Saisonende (Herbst 2021); Bio: überwiegend ökologisch bewirtschaftetes Areal, Kon: überwiegend konventionell bewirtschaftetes Areal (Mittelwert der Gehalte oberhalb der Bestimmungsgrenze \pm SD, $\mu\text{g}/\text{kg}$). Grün: Konzentrationen dieser Substanzen blieben unverändert oder nahmen ab; hellblau: Konzentrationen dieser Substanzen nahmen zu; rot: Substanzen wurden neu detektiert. Die Spalten „n/...“ geben die Zahl positiver Proben/Zahl gemessener Proben an. Es wurden >850 Stoffe mit einer Bestimmungsgrenze von jeweils 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ erfasst. Leere Felder bedeuten Gehalte unterhalb der Bestimmungsgrenze.

Verbindung	Wirkstoff- klasse	NK-Wachs März 20	Herbst 2021			
			Bio	n/11	Kon	n/12
4-Chlor-3-methylphenol	D		2,5 \pm 0,5	2	4,0 \pm 1,6	3
6-Chlornicotinsäure	I				3	1
Azoxystrobin	F		8,3 \pm 2,4	3	20,8 \pm 33,9	5
Anthrachinon	M	5	5,5 \pm 1,5	4	5,0 \pm 0,9	5
Biphenyl	M		12	1	28	1
Boscalid	F		1,4 \pm 0,5	5	18,0 \pm 21,3	3
Brompropylat	V	5	1,5 \pm 0,5	2		
Carbendazim	F		64	1	3	1
Coumaphos	V	4	5,5 \pm 0,5	2	1	1
Cyantraniliprol	I		1	1	1	1
Cyprodinil	F		4	1	10,0 \pm 5,4	3
DDT-o,p	I				2	1
DDT-p,p	I				31	1
DEET (N,N-Diethyl-m-toluamid)	R	3	1,7 \pm 0,5	3	2,3 \pm 1,2	3
Difenoconazol	F		2	1		
Dimoxystrobin	F		1,5 \pm 0,5	4	18,4 \pm 30,4	5
Diphenylamin	M		38,0 \pm 68,1	6	11,4 \pm 11,5	9
Fluazifop (freie Säure)	H		15	1	3,0 \pm 0,0	2
Fludioxonil	F		2,5 \pm 0,5	2	10,0 \pm 5,7	3
Fluopyram	F		1,7 \pm 0,5	3	12,3 \pm 11,1	4
HCH-gamma (Lindan)	I		3	1	4	1
Icaridin	R		1	2	1,0 \pm 0,0	2
Isofetamid	F				3,0 \pm 1,0	2
Isopyrazam	F		3,5 \pm 0,5	2	2	1
MCPA	H		3	1		
ortho-Phenylphenol	M	4	26,6 \pm 35,9	5	31,0 \pm 23,2	6
Pendimethalin	H		1	1		
Permethrin (cis-/trans-)	I	4	8,0 \pm 9,9	3	1	1
Piperonylbutoxid (PBO)	I		8,7 \pm 5,2	3	2	1
Prosulfocarb	H		1	1		
Pirimiphos-methyl	I	3	1	1		
Propargit	A		2	1		
Prothioconazol (-desthio)	F		9,5 \pm 7,5	2	2	2
Pyraclostrobin	F				3	1
Tau-Fluvalinat	V	10	5,0 \pm 2,2	7	4,7 \pm 4,3	7

Verbindung	Wirkstoff- klasse	NK-Wachs März 20	Herbst 2021			
			Bio	n/11	Kon	n/12
Tebuconazol	F		4,0 ± 3,0	2	1,3 ± 0,4	4
Tebufenozid	I					
Thymol	V	1400	23000 ± 31200	11	23300 ± 20600	12
Trifloxystrobin	F		3	1	23,8 ± 34,2	4

Wirkstoffklassen: A = Akarizid, D = Desinfektionsmittel, F = Fungizid, H = Herbizid, I = Insektizid, V = Varroazid, M = *multiple source compound*, R = Repellent

Tabelle 10: Gesamtgehalte und Anzahl neu hinzugekommener oder in erhöhter Menge (ohne Berücksichtigung des Varroazids Thymol) im Vergleich zum Ausgangswachs vorkommender Kontaminanten im NK-Wachs der Kooperationsimker an überwiegend konventionell oder ökologisch bewirtschafteten (Bio) Standorten (Saison 2021). Die Auswertung wurde einmal für alle anthropogenen Substanzen (ohne Thymol) und einmal nur für Pestizide (Insektizide, Fungizide und Herbizide) durchgeführt.

Imker-Kür- zel	Anthropogene Substanzen gesamt				Pestizide			
	Gesamtgehalte (µg/kg)		Anzahl		Gesamtgehalte (µg/kg)		Anzahl	
	konven- tionell	Bio	konven- tionell	Bio	konven- tionell	Bio	konven- tionell	Bio
02	105	29	8	5	71	5	6	2
03	32	20	7	6	32	14	7	5
04	17	82	4	12	11	70	3	10
05	18	20	9	5	17	12	4	7
06	0	0	0	0	0	0	0	0
07	281	-*	13	-*	136	-*	7	-*
08	15	117	2	4	0	2	0	1
09	40	82	5	6	4	70	2	4
16	190	49	9	9	105	25	5	6
23	15	0	3	0	3	0	1	0
24	151	5	8	2	139	2	6	1
25	30	217	6	6	17	19	5	4
Median**	30	29	6	5	17	12	4	4
p-Wert (Wil- coxon-Test)	0,9594		0,4401		0,2616		1,0000	

*Wachsprobe aus Bio-Areal konnte nicht genommen werden

**Ohne Imker 7

Handlungsempfehlungen zur Vermeidung chemischer Belastungen von Bienenwachs

Die Ergebnisse des Wachsmonitorings in Teilprojekt 3 des Projektverbundes BayÖkotox haben gezeigt, dass vor allem Bienenwachs aus konventioneller Imkerei mit einer Vielzahl von anthropogenen Kontaminanten belastet ist. Hierbei fanden sich selbst Rückstände von Wirkstoffen, die in Deutschland seit Jahrzehnten nicht mehr zugelassen sind. Da Bienen im Laufe ihrer Entwicklung und als fertig entwickelte Insekten ständig mit diesem Wachs in Kontakt sind, sollte die Zahl der Kontaminanten und deren Mengen durch imkerliches Handeln so gering wie möglich gehalten werden. Imker und Imkerinnen sollten Bienenwachs, welches zur Herstellung von neuen Mittelwänden verwendet wird, nicht als ein „Betriebsmittel“, sondern als „Teil des Biens“, also als integralen Bestandteil ihrer Bienenvölker betrachten. Dieses Wachs sollte dementsprechend von höchster Qualität sein, um negative Effekte zu vermeiden. Somit sollten bei der Imkerarbeit alle Quellen von möglichen Kontaminationen minimiert werden. Auch wenn negative Effekte von kontaminiertem Bienenwachs auf die Volksentwicklung und den Honigertrag in dieser Studie nicht gefunden wurden, so zeigte sich, dass Königinnen wenig kontaminiertes Wachs bei der Eiablage bevorzugen. Es kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass bestimmte Kombinationen von Wirkstoffen, die in der vorliegenden Studie nicht getestet wurden, sich stärker auf das Wohlbefinden, die Entwicklung und die Leistung von Bienenvolkern auswirken. Ein geschlossener Wachskreislauf, also das in der konventionellen Imkerei übliche, mehrmalige Recycling alten Bienenwachses zur Herstellung neuer Mittelwände, birgt die Gefahr, dass sich eingetragene Verunreinigungen über die Jahre hinweg immer stärker anreichern, da die meisten Industriechemikalien den Einschmelzprozess unverändert überstehen. Dies spiegelt sich in der signifikant stärkeren Belastung von Wachs konventioneller Imkereien wider. Daher wird hier beim Wachsmangement die Verwendung einer **offene Wachsschleife** empfohlen, bei der stärker belastetes Brutwabenwachs z.B. als Kerzenwachs verwendet wird und zur Herstellung neuer Mittelwände ausschließlich das deutlich weniger belastete **Entdeckelungs-, Naturwaben- und Drohnenrahmenwachs** verwendet wird. Sollten ausreichende Mengen dieser Wachse zur Produktion von neuen Mittelwänden nicht zur Verfügung stehen, kann dieses ggf. mit Honigraumwachs ergänzt werden, da auch dieses in der Regel weniger belastet ist als Brutraumwachs. Möglicherweise ist es sogar ausreichend, bei neuen Rähmchen nur einen Anfangsstreifen zu setzen, der Rest der Wabe wird dann von den Bienen mit frischem, unbelastetem Wachs ausgebaut. Durch diese Maßnahmen verdünnen sich vorhandene Kontaminationen im Bienenwachs und können so über die Zeit „aus-schleichen“.

Die im Bienenwachs vorkommenden Kontaminationen lassen sich in vier Gruppen unterteilen, deren Rückstände im Bienenwachs sich durch das imkerliche Handeln in unterschiedlichem Maße beeinflussen lassen:

- a) Aktuell oder in der Vergangenheit genutzte Akarizide zur Bekämpfung der Varroamilbe *Varroa destructor* (Varroazide), wie z.B. Thymol, Brompropylat, Coumaphos, Amitraz oder Tau-Fluvalinat

Derzeit sind zur Varroabehandlung in Deutschland nur organische Säuren wie Oxal-, Ameisen- und Milchsäure, das naturidentische Terpenoid Thymol sowie die synthetischen Wirkstoffe Flumethrin (Pyrethroid) und Amitraz (Amidin-Derivat) zugelassen. Imkerei ohne eine regelmäßige Varroabehandlung ist aufgrund der weiten Verbreitung und der drastischen Effekte der parasitischen Varroamilben derzeit nicht denkbar. Jedoch machten Varroazide

in konventionellem Bienenwachs **fast 90%** und in Bio-Wachs **mehr als 75%** der gefundenen Kontaminationen aus. Aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften reichern sich Thymol, Flumethrin und Amitraz in Bienenwachs an, während die organischen Säuren aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit dort nicht gefunden werden. Die synthetischen Wirkstoffe Flumethrin und Amitraz bergen zudem das Risiko von Resistenzbildungen bei Varroamilben. Der Einsatz von Varroaziden, dies gilt auch für Thymol und Ameisensäure, die von einigen Organismen sogar als Abwehrsubstanzen gegen Insekten verwendet werden, stellt in jedem Fall einen **tiefgreifenden Eingriff** in das Bienenvolk dar. Insgesamt sollte die Varroabekämpfung daher mit Augenmaß und gemäß den Anwendungshinweisen der jeweiligen Produkte erfolgen. Aufgrund der Anreicherungsproblematik wird der Einsatz organischer Säuren, insbesondere von Oxalsäure, empfohlen. Alternativ können verschiedene biotechnische Verfahren wie z.B. eine „totale Brutentnahme“ in Erwägung gezogen werden, die ganz ohne chemische Bekämpfungsmittel auskommt. Ein weiterer positiver Effekt ist hierbei, dass die Bienen neue Rähmchen zum Ausbauen erhalten und altes, potenziell kontaminiertes Wachs aus dem Volk entfernt wird.

b) In der Landwirtschaft genutzte Pestizide (Insektizide, Fungizide, Herbizide und Akarizide)

Durch die Sammeltätigkeit der Arbeiterinnen gelangen mit Pestiziden verunreinigter Nektar und Pollen in den Bienenstock. Diese Wirkstoffe diffundieren aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften in das hydrophobe (wasserabweisende) Bienenwachs. Die Freilandexpositionsversuche, die im Rahmen von Teilprojekt 3 des Projektverbundes BayÖkotox durchgeführt wurden, zeigten, dass sich der Einsatz von Pestiziden im Einzugsgebiet eines Bienenvolkes (ca. 27 km²) in dessen Bienenwachs widerspiegelt. Jedoch zeigte sich auch, dass sich aufgrund des großen Einzugsbereiches eines Bienenvolkes der Eintrag von Pestiziden selbst auf überwiegend biologisch bewirtschafteten Flächen nicht völlig verhindern lässt. Trotzdem sollten bei der Auswahl der Standorte für Bienenvölker, wenn irgend möglich, solche bevorzugt werden, an denen mit einem möglichst geringen Einsatz von Pestiziden gerechnet werden kann. Auch der Kontakt zu Landwirten im Flugradius der Bienen kann hilfreich sein, um ggf. auf anstehende Spritzungen rechtzeitig reagieren zu können.

(c) Repellentien

Vereinzelte Nachweise der Wirkstoffe Icaridin und DEET (N,N-Diethyl-m-toluamid) deuten darauf hin, dass in manchen Imkereien Insektenrepellentien wie z.B. Autan[®] verwendet werden. Dies ist überflüssig und sollte daher vermieden werden.

(d) *Multiple Source Compounds* (Stoffe aus verschiedenen Quellen)

Hierbei handelt es sich um chemische Substanzen, die aus unterschiedlichen Gründen bei der Herstellung von Industrieprodukten wie Farben, Desinfektions-, Schmiermitteln oder Kunststoffen verwendet werden. Bei Verwendung dieser Produkte in Imkereien können diese Substanzen in das Bienenwachs gelangen. Vertreter dieser Chemikaliengruppe wie z.B. ortho-Phenylphenol, Chlorkresol, Diphenyl, Diphenylamin wurden in zahlreichen Proben des Bienenwachsmonitorings nachgewiesen. Um den Eintrag dieser Stoffe in das Wachs zu minimieren, empfiehlt sich

- der Einsatz von (regelmäßig gereinigten!) Edelstahlgefäßen oder lebensmittelechten Kunststoffgefäßen für die Lagerung und den Transport von Bienenwachs
- der Verzicht auf konventionelle, biozidhaltige Farben bei der Behandlung von Bienenbeuten (insbesondere auf der Innenseite); alternativ sollten Naturholzbeuten verwendet werden, oder es sollte auf biozidfreie Produkte/Wachs zur Konservierung des Holzes zurückgegriffen werden
- der Verzicht auf Handcremes und andere kosmetische Mittel beim Umgang mit dem Wachs
- Regelmäßige Handreinigung mit geruchsneutraler Kernseife oder die Verwendung von (zusatzstofffreien) Einmalhandschuhen
- der Verzicht auf mit Chemikalien belastete Materialien innerhalb der Bienenbeute (z.B. Schwammtücher bei der Varroazid-Behandlung)

Die im Rahmen des Projektes durchgeführten chemischen Analysen haben gezeigt, dass einzelne, aus Bio-Imkereien stammende Wachsproben kaum Kontaminationen aufwiesen. Dies deutet darauf hin, dass ein sorgfältiger Umgang mit dem Bienenwachs sowohl die Anzahl als auch die Gehalte anthropogener Verunreinigungen auf ein Minimum reduzieren kann.