



UNIVERSITÄT
BAYREUTH



Projektverbund –
Ökotoxikologie in Bayern

Abschlussbericht Teilprojekt 4

Einfluss von Feinstaub auf Insekten

Projektverbund BayÖkotox

Ökotoxikologische Bewertung von Stoffen in der Umwelt

Projektnehmende/Bearbeitende

Universität Bayreuth

Tierökologie I

Prof. Dr. Heike Feldhaar, Prof. Dr. Christian Laforsch, Dr. Oliver Otti, Dr. Matthias Schott, Dimitri Seidenath, Frederic Hüftlein

Technische Thermodynamik und Transportprozesse

Prof. Dr.-Ing. Dieter Brüggemann, Thomas Hillenbrand, Andreas Mittereder

Projektleiterin: Prof. Dr. Heike Feldhaar

Telefonnummer: 0921552645

E-Mail: feldhaar@uni-bayreuth.de

Berichtszeitraum:

1. Februar 2020 bis 15. Juni 2023

Finanziert durch

Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz

Rosenkavalierplatz 2

81925 München



finanziert durch
Bayerisches Staatsministerium für
Umwelt und Verbraucherschutz



Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Kurzzusammenfassung	6
2 Einleitung	7
3 Aufgabenstellung und Vorgehensweise	8
3.1 Arbeitspaket 1: Erzeugung, Sammlung und Charakterisierung der Feinstaubpartikel.....	9
3.1.1 Erzeugung von Partikeln unter verschiedenen Motorbetriebsszenarien	9
3.1.2 Analyse der Partikelgrößenverteilung.....	9
3.1.3 Thermogravimetrische Analyse.....	9
3.1.4 Analyse der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe	10
3.1.5 Vorgehensweise zur Analyse der Nanostruktur.....	11
3.1.6 Vergleich mit Umweltproben	11
3.1.7 Entwicklung eines Windkanals zur Exposition der Hummeln im Luftstrom	11
3.2 Arbeitspaket 2: ökotoxikologische Untersuchungen zu Effekten von LSV auf <i>B. terrestris</i>	11
3.2.1 Erfassung der akuten Toxizität von LSV bei oraler Aufnahme.....	12
3.2.2 Erfassung der chronischen Toxizität von LSV bei oraler Aufnahme	12
3.2.3 Erfassung der akuten Toxizität von LSV bei Exposition im Luftstrom ..	13
3.2.4 Histologische Untersuchungen zur Aufnahme von LSV bei <i>B. terrestris</i>	13
3.2.5 Einfluss von Bremsabrieb auf die Reizwahrnehmung und das Verhalten von <i>B. terrestris</i>	14
3.3 Arbeitspaket 3: Untersuchungen zu Effekten von LSV auf Physiologie-, Genexpressions- und Kolonieebene.....	15
3.3.1 Etablierung der Apparatur für Exposition der Hummeln im Luftstrom ..	15
3.3.2 Charakterisierung der Wirkmechanismen von LSV über physiologische Stress- und Immunparameter.....	15
3.3.3 Untersuchung der Effekte von LSV auf die Genexpression von Hummeln	16
3.3.4 Entwicklung LSV-exponierter <i>B. terrestris</i> Kolonien im Labor.....	16
3.3.5 Untersuchung der Effekte von LSV auf Hummelkolonien unter natürlichen Bedingungen: Kolonieentwicklung und Pathogenprävalenz	17

4	Ergebnisse und Diskussion	18
4.1	Arbeitspaket 1: Erzeugung und Charakterisierung von Dieselrußpartikeln	18
4.1.1	Analyse der Partikelgrößenverteilung.....	18
4.1.2	Analyse der chemischen Eigenschaften.....	18
4.1.3	Analyse der Nanostruktur.....	19
4.1.4	Vergleich mit Umweltproben	21
4.2	Arbeitspaket 2: Ökotoxikologische Untersuchungen zu Effekten von LSV auf <i>B. terrestris</i>	22
4.2.1	Akute Toxizität von LSV bei oraler Aufnahme	22
4.2.2	Chronische Toxizität.....	22
4.2.3	Akute Toxizität von LSV bei Exposition im Luftstrom.....	23
4.2.4	Histologische Untersuchungen zur Aufnahme von LSV bei <i>B. terrestris</i>	24
4.2.5	Einfluss von Bremsabrieb auf die Reizwahrnehmung und das Verhalten von <i>B. terrestris</i>	26
4.3	Arbeitspaket 3: Untersuchungen zu Effekten von LSV auf Physiologie-, Genexpressions- und Kolonieebene.....	28
4.3.1	Entwicklung eines Windkanals zur Exposition der Hummeln im Luftstrom	28
4.3.2	Charakterisierung der Wirkmechanismen von LSV über physiologische Stress- und Immunparameter.....	28
4.3.3	Untersuchung der Effekte von LSV auf die Genexpression von Hummeln	29
4.3.4	Untersuchung der Effekte von LSV auf das Darmmikrobiom von <i>B. terrestris</i>	30
4.3.5	Entwicklung LSV-exponierter <i>B. terrestris</i> Kolonien im Labor.....	32
4.3.6	Untersuchung der Effekte von LSV auf Hummelkolonien unter natürlichen Bedingungen: Kolonieentwicklung und Pathogenprävalenz	33
5	Zusammenfassung	35
5.1	Arbeitspaket 1: Erzeugung, Sammlung und Charakterisierung der Feinstaubpartikel.....	35
5.2	Arbeitspaket 2: ökotoxikologische Untersuchungen zu Effekten von LSV auf <i>B. terrestris</i>	36
5.3	Arbeitspaket 3: Untersuchungen zu Effekten von LSV auf Physiologie-, Genexpressions- und Kolonieebene.....	36
6	Ausblick.....	38
7	Veröffentlichungen	39

Literaturverzeichnis.....	39
Abbildungsverzeichnis.....	48

Abkürzungsverzeichnis

AP: Arbeitspaket

BayCEER: Bayreuther Zentrum für Ökologie und Umweltforschung

CUBIC: Clear, Unobstructed Brain Imaging Cocktails

DMSD: Differentialmobilitäts-Partikelspektrometer

DRP: Dieselrußpartikel

EPA-Liste: Von der amerikanischen Bundesumweltbehörde (U.S. -Environmental Protection Agency) zusammengestellte Liste mit 16 PAK, die als prioritäre Umweltschadstoffe eingestuft sind und häufig stellvertretend für die Gruppe der PAK in Umweltproben untersucht werden

GLM: General Linear Model

GO: Gene Ontology

ICP-OES: Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma

L-DOPA: L-3,4-Dihydroxyphenylalanin

LSV: Luftgetragene Schadstoffe aus dem Verkehr

LTTT: Lehrstuhl für Technische Thermodynamik und Transportprozesse

NEFZ: Neuer Europäischer Fahrzyklus

Nd:YAG: Neodym-dotiert: Yttrium-Aluminium-Granat

PAK: Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

PFA: Paraformaldehyd

PM_{2,5}: Partikelproben, bei denen 50 % einen Durchmesser < 2,5 µm aufweisen

PM₁₀: Partikelproben, bei denen 50 % einen Durchmesser < 10 µm aufweisen

ROI: Region of Interest

StMUV: Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz

TEM: Transmissionselektronenmikroskop

TGA: Thermogravimetrische Analyse

UBA: Umweltbundesamt

1 Kurzzusammenfassung

Feinstaubpartikel, die beispielsweise aus motorischen Verbrennungsprozessen oder durch Bremsabrieb entstehen, sogenannte luftgetragene Schadstoffe aus dem Verkehr (LSV), könnten aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften negative Effekte auf Insekten haben und damit relevant für den massiven Rückgang der Biomasse und Artenvielfalt dieser Tiergruppe sein. In diesem Projekt wurden daher erstmals die Auswirkungen von LSV auf Insekten untersucht, da diese sowohl mit der Nahrung aufgenommen werden, aber auch über das Tracheensystem in den Körper gelangen können. Die Dunkle Erdhummel *Bombus terrestris* wurde als Modellorganismus für ökotoxikologische Untersuchungen weiterentwickelt und als Bioindikator etabliert, mit dem die Effekte von LSV charakterisiert werden können. Unsere Experimente zeigen, dass akute Effekte nach oraler Exposition auch bei sehr hohen Dosen von LSV in unserem Versuchsdesign nicht aufgetreten sind. Die Mortalität war allerdings bei chronischer Exposition mit Dosen von mehr als 1g DRP pro Liter Zuckerwasser signifikant erhöht. Solche hohen Dosen sind bisher in der Umwelt nicht berichtet worden. Allerdings fanden wir bei chronischer Exposition weitere subletale Effekte wie deutliche Veränderungen des Darmmikrobioms sowie eine Akkumulation von DRP im Darm. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass auch geringere Konzentrationen an DRP langfristige Auswirkungen haben könnten. Beispielsweise könnte die Anfälligkeit der Hummeln gegenüber Pathogenen erhöht oder generell die Widerstandsfähigkeit gegenüber multiplen Stressoren, mit denen die Tiere normalerweise in der Umwelt konfrontiert sind, beeinträchtigt werden.

2 Einleitung

Der Verlust der biologischen Vielfalt ist eine der Hauptfolgen des menschlichen Einflusses auf die Umwelt im 21. Jahrhundert (Dirzo et al., 2014). Ohne ein Verständnis der Ursachen können wir aber nicht gegensteuern und riskieren damit einen exponentiellen Anstieg des Verlusts der biologischen Vielfalt bis zum Ende dieses Jahrhunderts (IPCC, 2022; Pimm & Raven, 2000). Nicht nur Wirbeltiere, sondern auch wirbellose Taxa, insbesondere Insekten, sind stark gefährdet und haben bereits drastische Rückgänge erlitten, sowohl in der Abundanz als auch in der Vielfalt (Dirzo et al., 2014; Hallmann et al., 2017; Wagner, 2020). Die Ursachen für den Rückgang der Insektenarten sind vielfältig. Anthropogen bedingte Ursachen, wie intensive Landwirtschaft, Urbanisierung und damit verbundene Lebensraumfragmentierung und -verlust sowie Verschmutzung werden dabei als hauptsächlich treibende Faktoren diskutiert (Goulson et al., 2015; Sánchez-Bayo & Wyckhuys, 2019; Wagner, 2020). Die Verschmutzung umfasst diverse Schadstoffe wie Pestizide, Düngemittel, Industriechemikalien und Feinstaub aus verschiedenen Quellen (Sánchez-Bayo & Wyckhuys, 2019). Schadstoffe wie Feinstaub aus der Industrialisierung und dem zunehmenden Autoverkehr, haben nachweislich negative Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit, aber ihre potenziellen Auswirkungen auf Insekten wurden bisher kaum untersucht (Feldhaar & Otti, 2020). In Westeuropa stammen 20 % des Feinstaubes in der Luft aus dem Verkehr (Hopke et al., 2020). Die wichtigsten Quellen für Abgaspartikel sind dieselbetriebene LKW und PKW (Statistisches Bundesamt, 2022; Wichmann, 2007). DRP entstehen hauptsächlich bei unvollständiger Verbrennung des Treibstoffs und bestehen aus einem elementaren Kohlenstoffkern mit adsorbierten organischen Verbindungen wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Metallen und Spurenelementen (Greim, 2019; Wichmann, 2007). Je nach Fahrzyklus (Darstellung verschiedener Geschwindigkeiten eines Fahrzeugs in Abhängigkeit von der Zeit, z. B. innerstädtischer Zyklus, Autobahn etc.) kann die organische Fraktion der Abgaspartikel bis zu 36 % der Gesamtpartikelmasse ausmachen und ist möglicherweise der vorherrschende Faktor für potenzielle schädliche Auswirkungen (Abbas et al., 2018). Es gibt nur wenige Belege dafür, wie sich DRP und die damit verbundenen organischen Substanzen auf wirbellose Tiere, wie z. B. Insekten mit ihren wichtigen Ökosystemfunktionen, auswirken können. Dieselabgase können die Lernfähigkeit von Bestäubern wie Honigbienen verringern und auch ihre Toleranz gegenüber zusätzlichen Stressoren (Reitmayer et al., 2019). Darüber hinaus führen Dieselabgase zum Abbau von flüchtigen Stoffen in der Blüte, wodurch die chemische Kommunikation zwischen Bestäuber und Blüte gestört wird, was es den Insekten erschwert, geeignete Nahrungsquellen zu finden (Girling et al., 2013; Lusebrink et al., 2015). Bei Bestäubern, die stark auf Düfte und weniger auf visuelle Reize angewiesen sind, wie z. B. Hummeln, kann sich eine Beeinträchtigung des Blütenduftes negativ auf den Erfolg der Nahrungssuche auswirken (Ne'eman & Ne'eman, 2017). Hummeln oder Wildbienen im Allgemeinen reagieren vermutlich empfindlicher auf Stressoren als domestizierte Honigbienen, da letztere mit ihrer hohen Anzahl an Individuen pro Bienenstock in der Lage sind, toxische Auswirkungen der Stressoren abzufedern (Schott et al., 2021). Die primitiv eusoziale Dunkle Erdhummel (*Bombus terrestris*) ist einerseits ein wichtiger Bestäuber aber auch zunehmend ein bewährtes Modell in der ökotoxikologischen Forschung (Cameron & Sadd, 2020; Goulson, 2003; OECD, 2017). Die Auswirkungen von DRP auf bestäubende Insekten wie die Wildbiene *B. terrestris* wurden bisher jedoch noch nicht untersucht.

3 Aufgabenstellung und Vorgehensweise

Das Teilprojekt 4 untersuchte einerseits die Entstehung von Feinstaubemissionen am Verbrennungsmotor und andererseits die Effekte dieser Feinstaubpartikel auf *B. terrestris* in unterschiedlichen Expositions-Szenarien (siehe Arbeitsprogramm in Abbildung 1). Grundlage der Untersuchungen waren Partikelproben, die in kontrollierten, realitätsnahen Betriebsszenarien an einem Dieselmotor gesammelt wurden. Diese Partikelproben wurden hinsichtlich ihrer Größe und Zusammensetzung charakterisiert und für weitergehende Expositionsexperimente verwendet. In enger Zusammenarbeit mit dem Teilprojekt 5 wurden auch Partikelproben aus Bremsprozessen für die Untersuchungen herangezogen.

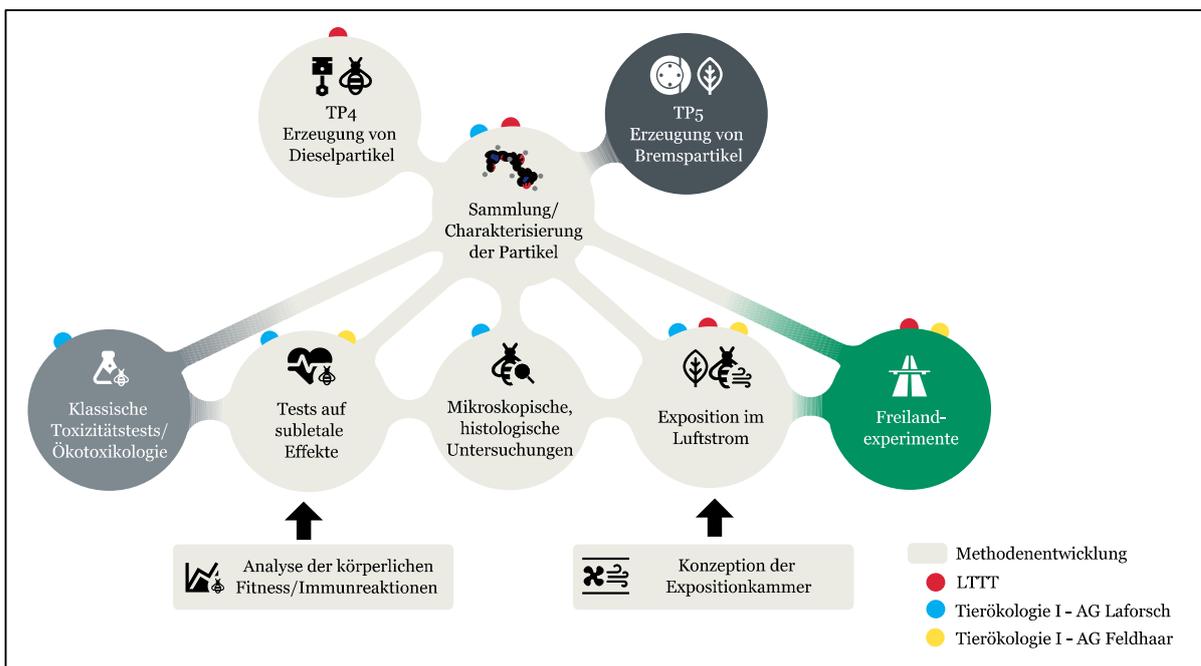


Abbildung 1: Arbeitspakete des Teilprojekts 4 des Projektverbunds BayÖkotox. LTTT = Lehrstuhl für Technische Thermodynamik und Transportprozesse.

Mit diesen Proben wurden die ökotoxikologischen Effekte der LSV auf Arbeiterinnen der Dunklen Erdhummel (*Bombus terrestris*) als Modellorganismus charakterisiert. Zudem wurden über histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen potenzielle Gewebeschäden untersucht. Darüber hinaus wurden in kontrollierten Laborexperimenten die Wirkmechanismen der LSV in Verhaltens- und Genexpressionsstudien (v.a. hinsichtlich einer Stress- oder Immunantwort) auf Individuenebene charakterisiert. Um natürliche Stressoren, wie beispielsweise Pathogene oder Schwankungen in der Nahrungsverfügbarkeit, in die Untersuchungen mit einzubeziehen, wurden zudem neben Laborexperimenten auch Freilandexperimente durchgeführt, bei denen Effekte auf Kolonieebene untersucht wurden.

3.1 Arbeitspaket 1: Erzeugung, Sammlung und Charakterisierung der Feinstaubpartikel

3.1.1 Erzeugung von Partikeln unter verschiedenen Motorbetriebsszenarien

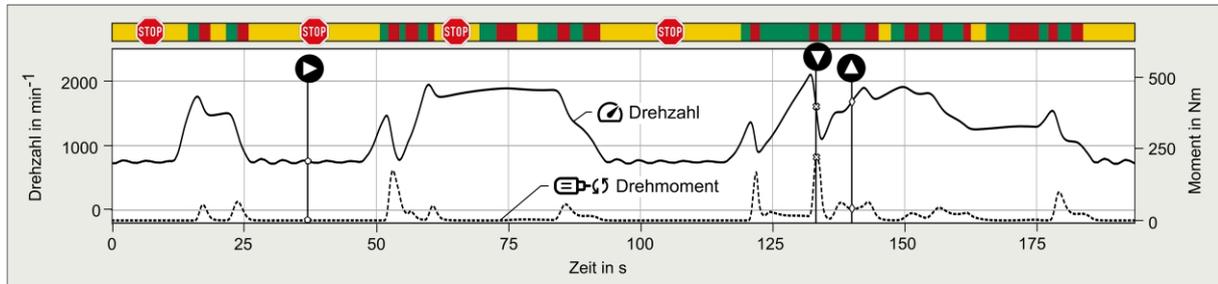


Abbildung 2: Drehzahl-Drehmomentkennlinie des innerstädtischen Referenzzyklus.

Im Projekt wurde ein Vierzylinder-Dieselmotor (OM 651) eingesetzt, der im KFZ- und Nutzfahrzeugsegment Verwendung findet. An einem Prüfstand mit wassergekühlter Wirbelstrombremse wurde ein Referenzzyklus etabliert, der jeweils Teil- und Volllastszenarien des innerstädtischen Stop-and-Go-Betriebsverhaltens nachbildet. Die Lastverhalten orientieren sich an dem Neuen Europäischen Fahrzyklus (NEFZ). Abbildung 2 zeigt die Drehmoment- und Drehzahlkennlinien. Dabei werden in den folgenden Kapiteln Phasen der Beschleunigung („▲“ / grün) der Verzögerung („▼“ / rot) sowie des stationären Betriebs („►“ / gelb) konkret unterschieden. Zur Entnahme größerer Mengen an Rußproben wurden Dieselpartikelfilter und Oxidationskatalysator ausgebaut und durch ein elektrostatisches Filtersystem (OekoTube Inside, Mels-Plons, Schweiz) ersetzt. Mittels einer Hochspannungselektrode (30 kV) wurden Feinstaubpartikel innerhalb des Abgasstrangs ionisiert und an der Rohraußenwand gesammelt.

3.1.2 Analyse der Partikelgrößenverteilung

Die Partikelgrößenverteilungen der Rußemissionen wurden im Submikrometerbereich durch ein Differentialmobilitäts-Partikelspektrometer DMS500 gemessen. Hierfür wurde der innerstädtische Zyklus (Abbildung 2) mindestens 15 Mal am Tag innerhalb von drei Tagen wiederholt, um den Einfluss von Motoren- und Umgebungsbedingungen auszugleichen. Während des Betriebs wurden kontinuierlich 8,0 l/min Abgasproben aus dem Abgasstrang entnommen und über zwei Stufen mit Druckluft verdünnt. Die Primärverdünnung mit 1,6 l/min Druckluft dient zur Absenkung des Taupunktes und einer Vermeidung von Kondensationseffekten bei der Analyse. Grobe Partikel wurden im Vorfeld durch einen beheizten Zyklon entfernt. Um Agglomerationen bei der Klassifizierung zu vermeiden, wurde das Abgas in einer sekundären Verdünnungsstufe über einem Rotationsscheibenverdünner im Verhältnis 1:150 verdünnt und der Messzelle zugeführt.

3.1.3 Thermogravimetrische Analyse

Die Zusammensetzung der Rußpartikel wurde durch Thermogravimetrische Analyse (TGA) charakterisiert. Hierfür wurden $42,9 \pm 0,2$ mg Rußproben des gesamten innerstädtischen Zyklus

lus in 85 µl Aluminiumoxid-Tiegel mit drei Wiederholungen in einem zweiteiligen Temperaturprogramm untersucht. Der Messablauf sowie die Massenbilanz der Rußproben im gesamten innerstädtischen Zyklus sind in Abbildung 3 dargestellt. Dabei können drei Phasen unterschieden werden:

- *Desorption der organischen Bestandteile:* Die Probe wird bei einer Heizrate von 10 K/min unter Stickstoffatmosphäre auf 750 °C erhitzt. Der Gewichtsverlust bis ca. 200°C ist auf das Verdampfen der Wasseranteile zurückzuführen, zwischen 200 °C und 400°C auf Kraftstoff- bzw. Kohlenwasserstoffdesorption oder die Zersetzung labiler funktioneller Gruppen, bis ca. 450 °C auf die Zersetzung von Ölfraktionen (Arnal et al. 2013, Fiebig et al. 2011).
- *Oxidation des elementaren Kohlenstoffs:* In der zweiten Phase des Temperaturprogramms wird die Messzelle auf 150 °C abgekühlt und eine oxidative Atmosphäre angelegt. Die Atmosphäre beinhaltet eine Sauerstoffkonzentration, die auch im realen dieselmotorischen Abgas auftreten (5 % O₂, 95 % N₂). Im Aufheizvorgang bei 5 K/min auf 900 °C oxidiert der Elementar-Kohlenstoffanteil der Rußprobe.
- *Anorganische Restkomponenten:* Aus dem Massenverlust am Ende der inerten und oxidativen Atmosphäre lässt sich der Anteil an anorganischen Komponenten bestimmen. Um diesen letzten Anteil genauer aufzulösen, wurden die Rußproben mittels optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) analysiert.

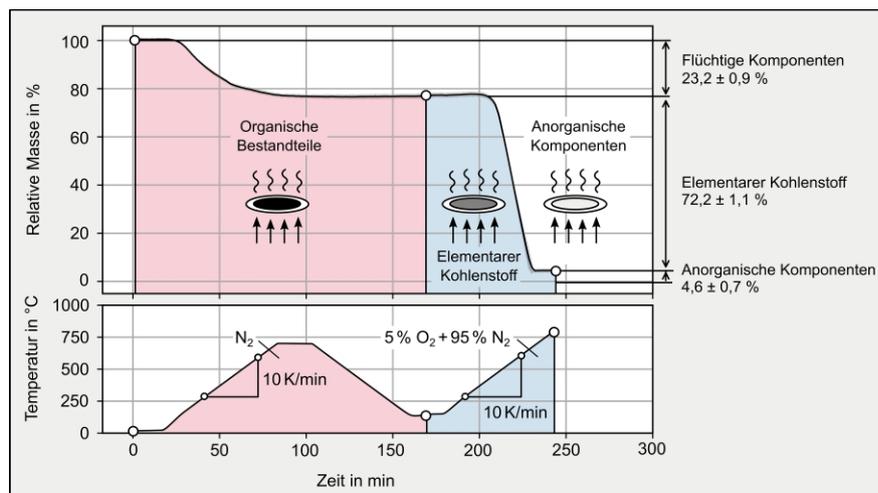


Abbildung 3: Temperaturprogramm zur Thermogravimetrische Analyse der Rußproben

3.1.4 Analyse der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe

Sieben polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) von der EPA-Liste der hochprioritären PAK (Keith, 2015) wurden analysiert: Naphthalin, 1-Methylnaphthalin, Acenaphthen, Fluoren, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren. Zur Validierung der Methode wurde ein deuteriertes PAK-Gemisch als externer und interner Standard verwendet. Zur Extraktion wurden die DRP in 1:1 Cyclohexan:Toluol (als Keeper) mit einer Konzentration von 1 µg DRP/µl Lösungsmittel gelöst und für 20 min bei 14 000 Umdrehungen/min zentrifugiert (Zentrifuge 5415 C, Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde in ein konisches 1-ml-Glasfläschchen überführt und mit Stickstoff auf 100 µl eingengt. 1 µl wurde in einem Single Quad GCMS im Einzelionenmodus auf einer Rtx-5MS Fused Silica (30m* 0.25mm* 0.25µm) Säule

analysiert (GC: 80°C für 5 Minuten, 20°C pro Minute auf 280°C, 280°C für 5 min). Insgesamt wurden sechs Replikate pro Fahrzyklus analysiert.

3.1.5 Vorgehensweise zur Analyse der Nanostruktur

Für Raman-spektroskopische Untersuchungen wurden Rußproben des gesamten Motorzyklus auf beheizten Quarzfiltern abgeschieden. Als Vergleichsgrundlage dienten Rußproben eines hoch-kontrollierten Verbrennungsstandards (miniCAST 6204C, Jiing, Schweiz), dessen strukturelle Ordnung über das C/O-Verhältnis der Propanverbrennung eingestellt werden kann. Als Anregungsquelle der Raman-Spektroskopie diente ein diodengepumpter Nd:YAG Festkörperlaser mit 532 nm Wellenlänge und 10 mW Laserintensität, um den Wärmeeintrag auf die Rußprobe zu reduzieren und ungewollte Oxidationsprozesse zu verhindern. Diese Messwerte sind mit einer bildgebenden Vergleichsgrundlage verifiziert worden. Dafür sind einzelne Rußpartikel auf mit Kohlefilm beschichteten Kupfer-Netzchen abgeschieden mit einem Feldemissions-Transmissionselektronenmikroskop (JEOL JEM-2200FS, Jeol Ltd., Akishima, Japan) untersucht worden.

3.1.6 Vergleich mit Umweltproben

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Atmosphärische Chemie (Prof. Anke Nölscher) und dem Bayreuther Zentrum für Ökologie und Umweltforschung (BayCEER) der Universität Bayreuth wurde die Feinstaubbelastung in Freilandmessungen großklassifiziert detektiert. Dadurch können die Partikelgrößenverteilungen der Rußemissionen während des Motorzyklus im Abgasstrang und der Exposition im Luftkanal (Kapitel 4.3.1) ins Verhältnis gebracht werden. Für die Messung wurden zwei Standorte unterschieden:

- 🌿 Ländliche Messstation: 32 m hoher Messturm in einem Nadelwald (nördliches Fichtelgebirge, Koordinaten: 50° 08' 31" N, 11° 52' 01" E). Messung ab 19.11.21, 00:00 Uhr
- 🏙️ Innerstädtische Messstation: (BayCEER an der Autobahnausfahrt Bayreuth-Nord der A9, Koordinaten: 49° 57' 37" N, 11° 35' 44" E). Messung ab 02.11.21, 00:00 Uhr

3.1.7 Entwicklung eines Windkanals zur Exposition der Hummeln im Luftstrom

In enger Zusammenarbeit mit den tierökologischen Lehrstühlen AG Laforsch und AG Feldhaar und dem LS für Pflanzenphysiologie aus TP5 wurde ein Windkanal zur Exposition der Hummeln entworfen (detaillierte Beschreibung in Methoden und Ergebnissen von AP3) um die Tauglichkeit zur Exposition von Hummeln und Pflanzen zu garantieren. Die generelle Konzeption des Aufbaus und die Umsetzung fußte auf dem Wissen der Mitarbeiter des LTTT.

3.2 Arbeitspaket 2: ökotoxikologische Untersuchungen zu Effekten von LSV auf *B. terrestris*

Arbeitspaket 2 umfasste ökotoxikologische Studien zu Effekten von LSV auf die Dunkle Erdhummel *B. terrestris*, sowie histologische Untersuchungen zur Aufnahme von LSV. Dies sollte durch folgende Teilpakete erreicht werden:

3.2.1 Erfassung der akuten Toxizität von LSV bei oraler Aufnahme

Für die Bewertung der akuten Toxizität verwendeten wir fünf Konzentrationen (1, 2, 4, 8 und 16 g DRP /l Invertzuckerlösung), welche aus dem in 3.1 beschriebenen Dieselmotor stammen. Da in den Vorversuchen mit 10 und 20 g DRP/l keine Mortalität auftrat, wählten wir diese fünf Konzentrationen für ein Dosis-Wirkungs-Experiment, bei dem die Konzentrationen um den Faktor zwei bis zur Löslichkeitsgrenze erhöht wurden. Solch hohe Konzentrationen sollten in der Umwelt nicht zu finden sein, aber für eine erste Bewertung der Toxizität von Dieselruß ist es wichtig mit hohen Konzentrationen zu arbeiten, um potenzielle Effekte aufdecken zu können. Um die Partikel an die Hummeln zu verfüttern, suspendierten wir die DRP in Zuckerwasser mit 2% (v/v) Tween20. Wir verwendeten 16 g/l Standard-Rußpartikel PRINTEX 30 Furnace Black als Negativkontrolle (Kontrolle der Toxizität reiner Kohlenstoffpartikel, ohne adsorbierte organische Fraktion). Im Gegensatz zum motorisch hergestellten DRP, das 23 % organische Verbindungen enthielt (siehe 4.1.2), bestehen die Rußpartikel zu mehr als 97 % aus elementarem Kohlenstoff und nur zu <1 % aus organischen Verbindungen. Als Kontrolle fütterten wir reines Zuckerwasser. Die Lösungsmittelkontrolle bestand aus Zuckerwasser mit 2% (v/v) Tween20. Als Positivkontrolle verwendeten wir Dimethoat (10 µg Wirkstoff pro Hummel) in Zuckerwasser gemäß der OECD-Richtlinie 247 (OECD, 2017). Dimethoat ist ein Organophosphat-Insektizid, das Acetylcholinesterase hemmt und für Bienen hochgiftig ist (Sørensen et al., 1995; Uhl et al., 2016). Von jeder der acht Hummelkolonien sammelten wir Hummelarbeiterinnen und wiesen jeder Behandlung nach dem Zufallsprinzip sieben Individuen zu (56 Replikate pro Behandlung). Für die Dimethoat-Behandlung ordneten wir vier Arbeiterinnen pro Kolonie zufällig zu (32 Replikate), da die OECD-Richtlinie 247 eine geringere Anzahl von Replikaten für toxische Referenzsubstanzen empfiehlt (OECD, 2017). Jeder Arbeiterin wurden zu Beginn des Experiments einmalig 40 µl der jeweiligen Lösung/Suspension über die Spitze einer 10 ml-Spritze (B. Braun SE, Melsungen, Deutschland) verabreicht und dann über den 48-stündigen Verlauf des Experiments kein weiteres Futter angeboten. Jede Arbeiterin verzehrte das gesamte angebotene Futter. Die Spritzen passten genau in einen Nicot®-Queen-Käfig, in dem wir die Arbeiterinnen während der 48-stündigen Versuchsdauer hielten. Die Überlebensrate wurde 4, 24 und 48 Stunden nach dem Trinken der Behandlungslösung ermittelt.

3.2.2 Erfassung der chronischen Toxizität von LSV bei oraler Aufnahme

Es konnte bis zu einer Konzentration von 16 g DRP/l keine akute orale Toxizität auf *B. terrestris* festgestellt werden (siehe 4.2.1). Es ist jedoch möglich, dass sich toxische Effekte erst bei andauernder Aufnahme des Dieselrußes zeigen. Deshalb führten wir ein Experiment durch, mit welchem wir Effekte einer chronischen 10-tägigen Exposition von niedrigeren Konzentrationen Dieselruß auf *B. terrestris* überprüften. Dafür haben wir das gleiche Versuchsdesign wie in 3.2.1 mit 56 Replikaten (je sieben Hummeln aus acht Kolonien) pro Behandlungsgruppe verwendet. Die Behandlungsgruppen bestanden wieder aus einer Negativkontrolle, einer Lösungsmittelkontrolle, Dimethoat als Positivkontrolle und drei niedrigeren Rußkonzentrationen (0,5, 1 und 2 g/l). Die aufgenommene Futtermenge war je nach Behandlung unterschiedlich. In diesem Versuch bekamen die Individuen *ad libitum* Futterlösung/-suspension über 2 ml alle zwei Tage zur Verfügung gestellt. Die Futterlösung/-suspension wurde in 10 ml-Spritzen aufgezogen, welchen im Vorfeld die Spitzen abgeschnitten wurden, um den Hummeln das Trinken zu erleichtern. Um die aufgenommene Futtermenge überprüfen zu können, wurden die

vollen Spritzen vor der Exposition und nach Ablauf der zwei Tage gewogen. Dies wurde bis Ablauf der 10 Tage insgesamt 5-mal wiederholt.

3.2.3 Erfassung der akuten Toxizität von LSV bei Exposition im Luftstrom

Zuerst wurden Parameter getestet, die das Fliegen bei *B. terrestris* Arbeiterinnen induzieren sollten, um auf Basis dieser den Windkanal zu planen. Dazu entwarfen wir eine einfache Apparatur, welche aus einer geschlossenen Plastikbox (L:10 cm; B:7,5 cm; H:4,5 cm) die über einen Silikonschlauch mit einer Wasserpumpe zur Erzeugung eines Luftstroms verbunden war. Neben die beiden Längsseiten der durchsichtigen Plastikschaale wurden zwei horizontal rotierende „*barber poles*“ (Rollen beklebt mit im 45° Winkel angeordneten schwarz-weißen Streifen) platziert um die Hummel zum Fliegen zu animieren (Dudley & Ellington, 1990). Hummeln fliegen eher, wenn sich die Umgebung „bewegt“, was durch die sich drehenden Rollen mit schwarz-weiß Mustern suggeriert wird. In diesem Versuch wurden jeweils 30 Individuen aus 6 Kolonien (5 Hummeln pro Kolonie) einzeln für 30 Minuten in einer Versuchsschale platziert, zum Fliegen angeregt und dort einer Spatelspitze DRP exponiert (ca. 0,5 mg). Die Spatelspitze DRP am Boden des Schälchens wurde nach Einsetzen der Hummel durch ihre Flugbewegungen in der Luftsäule verteilt. Für die Kontrollen wurden keine DRP hinzugefügt. Das Verhalten wurde währenddessen mit einer HD Webcam gefilmt. Anhand der Videosequenzen haben wir die Parameter Flugaktivität und Putzzeit mittels BORIS (**B**ehavioral **O**bservation **R**esearch **I**nteractive **S**oftware) analysiert (Friard & Gamba, 2016). Nach Ablauf der 30 Minuten wurden die Hummeln in eine Petrischale umgesetzt und die Überlebensdauer ohne Futter mittels Videoaufnahmen in der Klimakammer (26°C, 70 % Luftfeuchtigkeit, 12h:12h Tag/Nacht- Zyklus) festgehalten und analysiert. Um Unterschiede zwischen Kontrollen und Ruß-exponierten Tieren festzustellen, wurde ein Wilcoxon-Test durchgeführt. Um die mögliche Korrelation zwischen der Flugaktivität der Hummel, gemessen als Anteil der Flugzeit während eines 30-minütigen Beobachtungszeitraums, und ihrer Überlebensdauer festzustellen, wurde der Pearson-Rangkorrelationskoeffizient berechnet.

3.2.4 Histologische Untersuchungen zur Aufnahme von LSV bei *B. terrestris*

Das sogenannte *tissue clearing* ist eine in der Biomedizin häufig genutzte Methode, um Organe oder gar ganze Organismen durchsichtig zu machen (Ariel, 2017; Richardson & Lichtman, 2015; Ueda et al. 2020). Ein Verfahren des *tissue clearings*, das CUBIC Protokoll (Clear, Unobstructed Brain/Body Imaging Cocktails and Computational analysis), wurde für die Hummel adaptiert. In diesem Protokoll werden den Tieren Pigmente und Lipide entzogen, wodurch sie transparent werden. Diese Methode ermöglicht Akkumulationszonen und Adhäsion an das Darmgewebe zu erkennen, ohne das Gewebe zu zerstören. Für die Exposition mit DRP wurden jeweils 10 Hummeln mit 0.5 g DRP/l und mit oben beschriebener Zuckerlösung gefüttert (siehe 3.2.1), welche zusätzlich mit Bio-Blütenpollen als Kontrollpartikel versetzt wurde. Vorab wurden die Blütenpollen mit Hilfe einer Gewürz Kaffee Mühle feingemahlen. Im Anschluss an die Dieselruß- und Pollen-Exposition wurden Hummeln mit normaler (gefärbter) Zuckerlösung gefüttert. Das Medium wurde nach drei Tagen durch 4 ml Zuckerlösung ersetzt um mögliche verbliebene Partikel zu identifizieren. Danach wurden die Hummeln mit CO₂ betäubt und bei -80 °C tiefgefroren. Die Tiere wurden anschließend in 15 ml einer vierprozentigen Formaldehyd-Lösung (FA) und 98 % Ethanol, bei 4 °C fixiert. Nach sieben Tagen in FA wurden die Tiere in 98% Ethanol gewaschen und mit einem digitalem Bildanalysesystem dokumentiert.

Anschließend wurden die Hummeln so lange H_2O_2 inkubiert bis die Cuticula komplett gebleicht war. Die Proben wurden bei 37 °C auf einem Kompaktschüttlers innerhalb eines Brutschranks inkubiert. Alle weiteren Inkubationsschritte bei 37 °C wurden ebenfalls in diesem Inkubationsschrank ausgeführt. Die Lösungen wurden alle drei bis vier Tage erneuert. Anschließend wurde die Transparenz der Tiere schrittweise durch die Behandlung mit 0,5 CUBIC-1 (24 h bzw. 40 h) und CUBIC-1 (4 Tage) bei 37 °C, 0,5 CUBIC-R (24 h) und CUBIC R (4 Tage) bei Raumtemperatur induziert und anschließend die transparenten Tiere fotografisch dokumentiert.

3.2.5 Einfluss von Bremsabrieb auf die Reizwahrnehmung und das Verhalten von *B. terrestris*

Der Aufbau der Bremsanlage und die Art der Exposition sind analog zu Teilprojekt 5 zu übernehmen. Der Abrieb von Bremsen ist sehr heterogen, besteht aber zu großem Teil aus Metallen wie Kupfer und Eisen (siehe Teilprojekt 5). Vor Beginn der Exposition wurden die Versuchstiere mit einer Halskrause ausgestattet, um zu verhindern, dass diese ihre Antennen nach der Exposition mit ihren Vorderbeinen putzen können. Für die Untersuchungen zum Verschmutzungsgrad und der Responsivität wurde das Flagellum der rechten Antenne abgetrennt. Die Flagellen der Antennen wurden in Plastik-Petrischalen für die REM-Untersuchung aufbewahrt und luftgetrocknet. Anschließend wurden sie auf Aluminium-Probenhaltern befestigt. Die Proben wurden mit 2 nm Platin beschichtet und anschließend an einem JEOL JSM-IT500 Elektronenmikroskop untersucht. Zur Quantifizierung wurden von Flagellomer 3, 6 und 10 je ein Übersichtsbild mit 300-facher Vergrößerung und fünf Detailbilder mit 3000-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Detailbilder umfassten dabei die Mitte und jede der vier Eckbereiche der Oberseite des Flagellomers (Abb. 4).

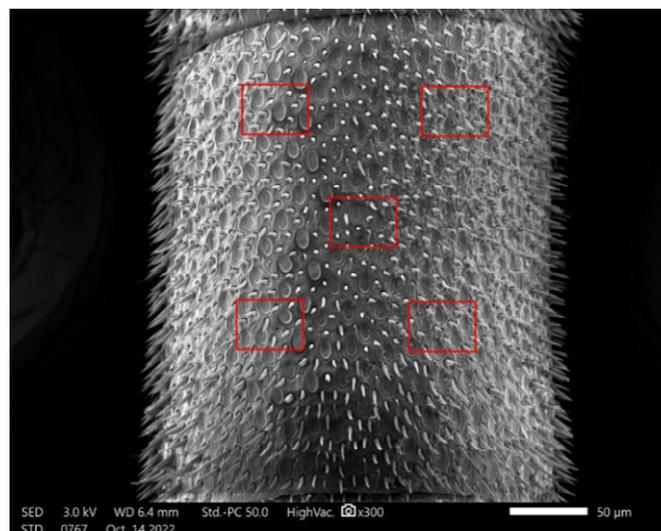


Abbildung 4: Übersichtsbild des 6. Flagellomers der rechten Antenne von *B. terrestris*. Rote Rahmen wurden hinzugefügt, um die Positionen für Detailaufnahmen anzuzeigen.

Für die Ermittlung des Anteils der Partikelfläche an der Gesamtfläche wurde in dem Programm Fiji (Schindelin et al., 2012) das jeweilige Segment in dem Bild markiert und als binäres schwarz-weiß Bild konvertiert. Dazu wurde ein Schwellenwert festgelegt, der alle Partikel weiß

zuordnet und den gesamten Hintergrund schwarz. Im Anschluss kann man dann die automatische Partikelanalyse durchführen und sich die Anzahl, die bedeckende Fläche und den relativen Anteil der Partikel an der Gesamtfläche ausgeben lassen.

Nach der Exposition wurde den Hummeln die rechte Antenne abgenommen und ein Elektroantennogramm (EAG) durchgeführt. Die Elektroantennographie misst das Gesamtpolarisationen der Geruchsrezeptorneuronen der Antenne nach der Präsentation des Geruchs (Aufbau im Anhang). Die Elektroantennographie wurde noch am selben Tag wie die Exposition durchgeführt. Die Antenne wurde zwischen zwei Glaskapillaren, die mit Insekten-Ringerlösung nach Schott et al. (2013) befüllt sind, eingespannt. Als Stimulus diente ein Filterpapier in einer Pasteurpipette, das mit 1 µl einer 100 µg/ml Eukalyptol-Hexanlösung (Alarmpheromon von *B. terrestris*, Granero et al., 2005) versetzt war. Über dieses wurde zunächst fünfmal mit je 10 s Pause für 0,1 s ein Luftstoß gegeben, um das Hexan zu verflüchtigen. Anschließend wurden erneut fünf Luftstöße - nun mit der Pasteurpipette in das Mischrohr eingeführt - gegeben und die EAG-Antwort mittels EagPro Version 2.1.0 aufgenommen. Nach 5 min wurde die Messung am gleichen Flagellum wiederholt um eine Verringerung der Responsivität feststellen zu können. Aus den EAG-Aufnahmen werden der durchschnittliche und der maximale Ausschlag bestimmt und anschließend die Verhältnisse zwischen den beiden Aufnahmen pro Flagellum gebildet.

3.3 Arbeitspaket 3: Untersuchungen zu Effekten von LSV auf Physiologie-, Genexpressions- und Kolonieebene

Das Arbeitspaket 3 umfasste die Untersuchung physiologischer Wirkmechanismen von LSV auf *B. terrestris* im Labor, sowie unter natürlichen Bedingungen im Freiland. Dieses Ziel sollte mithilfe der folgenden Teilpakete erreicht werden:

3.3.1 Etablierung der Apparatur für Exposition der Hummeln im Luftstrom

Im Rahmen des Projekts wurde der Messaufbau konzipiert und gebaut (siehe 3.1.7), um definierte Mengen an Rußpartikelproben im Luftstrom zu zerstäuben und für die Exposition zu dosieren. Über ein Laserpherometer können dosierte Mengen hinsichtlich Größenfraktion und Massenkonzentration eingestellt und nachgeregelt werden. Dabei werden definierte Mengen an Rußproben in die Unterdruckkammer eingebracht und über kontrollierte Dosierströme verwirbelt. Die einstündige Messzeit ist unterteilt in unterschiedliche Ein- und Nachdosierphasen, die eine annähernd konstante Partikelkonzentration innerhalb der Messkammer erzeugen und Partikelverluste kompensieren.

3.3.2 Charakterisierung der Wirkmechanismen von LSV über physiologische Stress- und Immunparameter

Da bei Menschen bereits gezeigt werden konnte, dass Feinstaub im Lungengewebe zu Immunreaktionen führt (Wei & Tang 2018), ist es vorstellbar, dass LSV auch das Immunsystem von Hummeln beeinflussen könnten. Ein wichtiger Mechanismus des Immunsystems von Insekten ist die Melanisierung, welche notwendig für den Wundverschluss sowie die Einkapselung und Phagozytose von Fremdkörpern ist. Ein essenzieller Bestandteil der Melaninsynthese ist das Enzym Phenoloxidase. Mithilfe eines Assays zur Bestimmung der Phenoloxidase-Aktivität (Haine et al. 2007) lässt sich die Melanisierung quantifizieren. Hierbei wird den Hummeln

Hämolymphe entnommen und mit L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) versetzt. Die Phenoloxidase wandelt L-DOPA in Dopachrom um, was zu einer quantifizierbaren Absorptionsänderung führt, die sich im Spektralphotometer (bei 490 nm) bestimmen lässt. Um den Effekt von Dieselruß auf die Phenoloxidase-Aktivität zu testen, wurde ein Versuch durchgeführt, in dem Hummeln über den gesamten Versuchszeitraum *ad libitum* mit in Zuckerwasser emulgierten DRP (0,2 – 0,8 g/l) gefüttert wurden. Nach 7 Tagen wurde den Hummeln Hämolymphe entnommen (Methode nach Borsuk et al. 2017) und die Phenoloxidase-Aktivität gemessen.

Der Körperfettgehalt wurde im Anschluss an das Experiment zur Untersuchung des Effekts von Dieselruß auf die Phenoloxidase-Aktivität bei Arbeiterinnen aus demselben Versuch gemessen. Die Messung des Körperfettgehaltes ist wichtig, da es eine schnelle und einfache Methode ist, um den Gesundheitszustand und die Energiereserven von Hummeln zu bestimmen. Dabei wurden die Abdomen der zuvor getöteten Hummeln mithilfe einer Schere abgetrennt und ventral mit einem Längsschnitt geöffnet. Anschließend wurden die Abdomen für vier Tage bei 70°C im Ofen getrocknet und das Trockengewicht bestimmt. Danach wurden die Abdomen für 72 Stunden in Chloroform gegeben, um das Körperfett zu lösen. Dabei wurde das Chloroform alle 24 Stunden erneuert. Nach abermaligem Trocknen (4 Tage, 70°C) wurden die Abdomen gewogen und durch die Differenz zum Trockengewicht der Körperfettgehalt berechnet (Bazazi et al. 2016). Um den Körperfettgehalt in Relation zur jeweiligen Hummelgröße zu setzen, wurde der Körperfettgehalt durch die Länge der Radialzelle des rechten Vorderflügels (ein verlässliches Maß für die Körpergröße (Medler 1962)) der Hummel geteilt, um den relativen Körperfettgehalt zu erhalten.

3.3.3 Untersuchung der Effekte von LSV auf die Genexpression von Hummeln

Subletale Stress-, Immun- und Entgiftungsreaktionen nach LSV-Exposition (oral oder im Luftstrom) könnten sich in einer veränderten Genexpression bzw. dem Transkriptom zeigen (Gupta et al. 2015). Um die Effekte von LSV-Exposition auf das Transkriptom zu untersuchen, wurden Hummeln über einen Zeitraum von sieben Tagen *ad libitum* mit Zuckerwasser (50 % Apiinvert) gefüttert. Dieses war entweder unbehandelt (Kontrolle), eine Lösungsmittelkontrolle (50% Apiinvert und 0,02 % Tween20) oder mit DRP versetzt (50 % Apiinvert, 0,02 % Tween20, um die DRP in Emulsion zu bringen, und 0,4 g DRP/l). Nach sieben Tagen wurden die Tiere zunächst bei -20°C eingefroren. Nach Sezierung der Hummeln wurden die Gewebeproben in Zusammenarbeit mit dem Keylab DNA Analytik der Universität Bayreuth prozessiert und RNA aus dem Abdomen der Hummeln isoliert (je drei Arbeiterinnen aus zwei Behandlungsgruppen aus vier Kolonien) und nachfolgend sequenziert (RNAseq). Die Transkripte wurden mit Hilfe der OmicsBox Bioinformatik-Plattform hinsichtlich potentieller Unterschiede in den Genexpressionsmustern je nach Behandlung genauer analysiert. Nach der Qualitätskontrolle wurden die Transkripte auf das Genom von *Bombus terrestris* gemappt, differentiell exprimierte Gene identifiziert und wenn möglich funktionell annotiert (nach ihrer Gene Ontology (GO)).

3.3.4 Entwicklung LSV-exponierter *B. terrestris* Kolonien im Labor

Da Hummeln primitiv eusoziale Insekten sind, könnten Effekte auf Kolonieebene von besonderer Bedeutung sein. Dabei stellt die Koloniegründung eine besonders vulnerable Phase dar, in der LSV-Exposition die langfristige Entwicklung von Kolonien beeinflussen könnte (Goulson 2003). Die Koloniegründung im Labor erwies sich als besonders herausfordernd. Aufgrund

hoher Mortalität waren Versuche mit wildgefangenen Hummelköniginnen nicht erfolgreich. Wir nutzten deshalb Hummelkolonien aus kommerzieller Zucht (Biobest Group NV) für die Untersuchung der Effekte von LSV-Exposition auf die Koloniegründung bzw. kleine Kolonien mit nur wenigen Arbeiterinnen. Hierfür wurden aus 20 Hummelkolonien jeweils die Königin und 10 Arbeiterinnen entnommen und in eine Kulturbox überführt, um eine einheitliche Koloniegröße zu Beginn der Versuche zu erhalten und Kolonien kleiner Größe zu simulieren, die anfälliger gegenüber Umweltstress sind. Nach dem Zufallsprinzip wurden die 20 Kolonien in eine Kontroll- und eine Dieselrußgruppe (je n=10) aufgeteilt. Beide Gruppen erhielten Zuckerwasser *ad libitum* sowie ein 1,5 g schweres Pellet aus Pollen. Bei der mit Dieselruß gefütterten Gruppe enthielt dieses Pollen-Pellet 0.2 % DRP. Die Hummeln erhielten zwei Mal wöchentlich neue Nahrung. An den Tagen 35, 43 und 63 wurden jeweils in allen Kolonien 20 % der lebenden Arbeiterinnen entnommen, um die unter Freilandbedingungen deutlich höhere Mortalität zu simulieren. Die Entwicklung der Kolonien wurde insgesamt über einen Zeitraum von 65 Tagen beobachtet und dann die Anzahl lebender Arbeiterinnen, die Anzahl Brut (Larven und Puppen), der relative Körperfettgehalt (von fünf Arbeiterinnen pro Kolonie) sowie die Größe der Radialzelle als Maß für die Körpergröße (ebenfalls von fünf Arbeiterinnen) bestimmt (siehe 3.3.2).

3.3.5 Untersuchung der Effekte von LSV auf Hummelkolonien unter natürlichen Bedingungen: Kolonieentwicklung und Pathogenprävalenz

Für die Untersuchung der Effekte von LSV auf Hummeln im Freiland führten wir 2022 ein Freilandexperiment durch, bei dem wir testen wollten, ob Hummelkolonien unter natürlichen Bedingungen potentiell stärker unter einer Exposition mit DRP leiden als im Labor. Im Freiland haben die Hummeln einen deutlich höheren Energieverbrauch als unter Laborbedingungen, da sie ausfliegen müssen, um Nahrung zu suchen und sie sind potentiell viel stärker von Pathogenen beeinflusst, wie beispielsweise dem häufig auftretenden Darmparasit *Crithidia bombi* (Näpflin & Schmid-Hempel 2018). Hierfür haben wir zunächst 2021 ein neues System zur automatisierten Beobachtung von Hummelverhalten entwickelt. Mithilfe von Papier-Tags, Kameras und Raspberry-Pi Computern lässt sich damit das Sammelverhalten individueller Hummeln verfolgen, d. h. der Zeitraum, den eine Hummel außerhalb der Kolonie verbringt. Zunächst wurde untersucht, ob und wie die Exposition im Luftstrom mit Dieselruß das Heimfindungsvermögen der Hummeln beeinflusst.

Der Dieselrußgruppe wurden über einen Zeitraum von 29 Tagen (von Ende Juli bis Ende August) zweimal wöchentlich abends bei Dunkelheit unter Rotlicht 2,0 mg DRP verabreicht. Die DRP wurden mit einem mit feinmaschigem Nylonnetzstoff verschlossenen Schnappdeckelglas gleichmäßig über die kurz geöffnete Kolonie gesprenkelt, also direkt über die anwesenden Arbeiterinnen und Brutzellen. Bei der Kontrollgruppe wurde lediglich die Außenbox und die Kolonie geöffnet, um Effekte dieser Störung nachzuahmen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Arbeitspaket 1: Erzeugung und Charakterisierung von Dieselpartikeln

4.1.1 Analyse der Partikelgrößenverteilung

Je nach Lastverhalten des Verbrennungsmotors im Motorzyklus unterscheiden sich Partikelkonzentrationen und Partikelgröße. Hierfür wurden drei charakteristische Punkte des Motorzyklus aus Abbildung 2 ausgewählt und stellvertretend in Abbildung 5 dargestellt. Die Konzentrationsangaben beziehen sich dabei auf unverdünnte Partikelkonzentrationen im Abgasrohr.

Während den transienten Beschleunigungsphasen („▲“) dominieren annähernd monomodale Verteilungen im feinen Agglomerationsbereich. Diese Partikel liegen vorwiegend als Festkörper vor und weisen einen Median-Durchmesser zwischen $52,1 \pm 1,8$ nm und $101,9 \pm 1,7$ nm im Motorzyklus auf. Die Konzentrationen variieren in Abhängigkeit des Lastverhaltens und der Motorparameter.

Während lastfreier Leerlaufzeiten („▶“) oder Verzögerungsvorgänge („▼“) bilden sich die für Dieselprozesse typischen bimodalen Verteilungen aus. Dabei werden weniger feste Partikel des Agglomerationsmodus ausgestoßen. Hingegen konnten überwiegend volatile Aerosole der Nukleationsphase mit einem deutlich geringeren Median-Durchmesser zwischen $7,4 \pm 1,6$ nm und $22,7 \pm 1,6$ nm gemessen werden. Durch Filtersysteme werden lediglich feste Partikel des Agglomerationsmodus gesammelt.

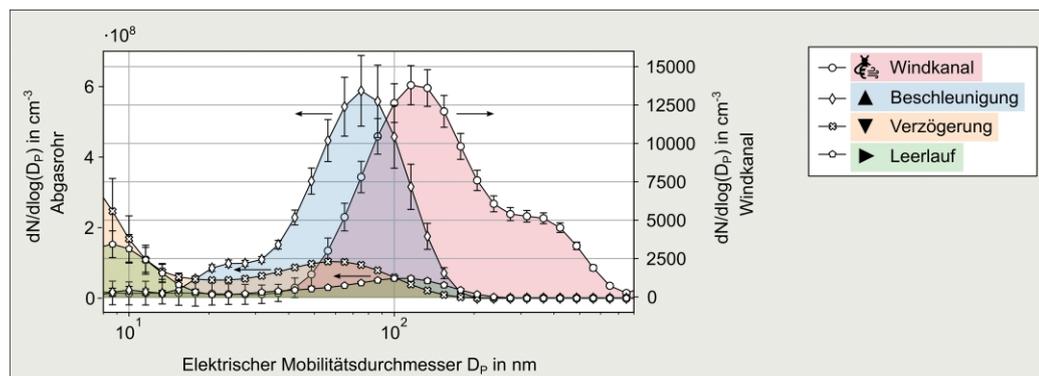


Abbildung 5: Partikelgrößenverteilung während ausgewählter Phasen des innerstädtischen Motorzyklus und bei Exposition der Hummeln im Windkanal

4.1.2 Analyse der chemischen Eigenschaften

Die Rußpartikel des gesamten innerstädtischen Zyklus wurden über das Filtersystem gesammelt und hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften weitergehend untersucht. Die elementare Zusammensetzung ist in Abbildung 6 dargestellt. Durch thermogravimetrische Analysen konnte $72,2 \pm 1,1$ % der Gesamtpartikelmasse auf elementarem Kohlenstoff, $23,2 \pm 0,9$ % auf organische Anteile und $4,6 \pm 0,7$ % auf anorganischen Komponenten zurück-

geführt werden. Die elementare Zusammensetzung wurde mittels Zöllner et al. (2019) interpretiert und in Abbildung 6 rechts dargestellt. Dabei tragen Komponenten des motorischen Abriebs zu den anorganischen Fraktionen der Rußpartikel bei. Kupfer (1,03 %), Aluminium (0,02 %) und Eisen (0,02 %) können dabei jeweils auf das Material von Kolbenringen, Zylinderkopf und Motorblock zurückgeführt werden. Calcium (1,62 %), Zink (0,53 %), Phosphor (0,50 %) und Schwefel (0,17 %) können zum anderen auf Verbrennungsrückstände von Kraftstoff oder Schmieröl zurückgeführt werden. Außerdem wurden geringe Mengen Bor (0,13 %), Magnesium (0,10 %), Molybdän (0,03 %) und Natrium (0,02 %) gefunden.

Von den sieben analysierten PAK lag nur Pyren über der Bestimmungsgrenze mit einer Konzentration von 444,05 µg/g (+/- 75,18 SE) in Dieselrußpartikeln, was 444 ppm entspricht. Die Konzentrationen von Fluoranthren und Phenanthren lagen über der Nachweisgrenze (10 µg/g), aber unter der Bestimmungsgrenze (~100µg/g).

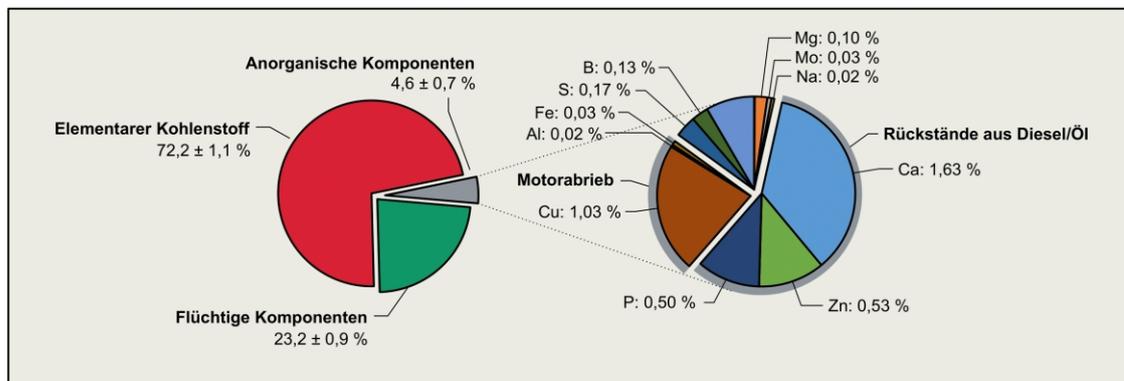


Abbildung 6: Elementare Analyse der Rußpartikel mittels Thermogravimetrischer Analyse (links) und ICP-OES (rechts).

4.1.3 Analyse der Nanostruktur

Die Nanostruktur der Rußpartikel beeinflusst sowohl die Reaktivität als auch die Möglichkeit, flüchtige organische Komponenten in der Rußmatrix zu binden. Für morphologische Untersuchungen der Rußproben wurde auf spektroskopische und bildgebende Verfahren zurückgegriffen.

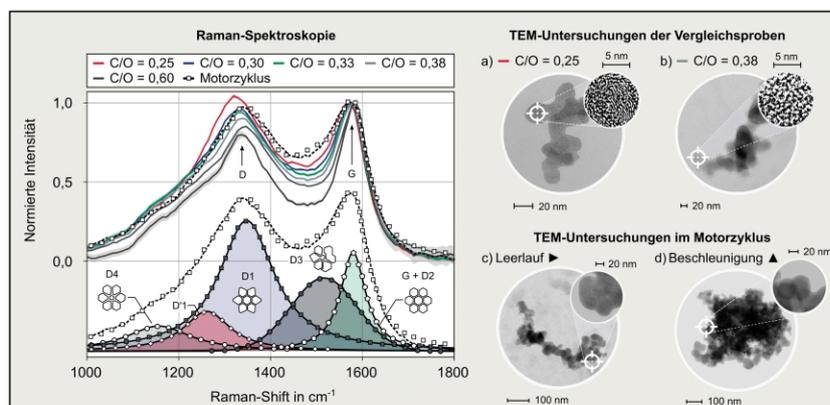


Abbildung 7: Raman-Signal der Motor- und Vergleichsproben (links) sowie TEM-Analyse der Nanostruktur (rechts).

Das Raman-Signal der Rußproben des gesamten Motorzyklus wurde in Abbildung 7 (links) in fünf Banden entfaltet, deren Peaks die Ausprägung diskreter struktureller Defekte quantifizieren (Sadezky 2005). Die Nanostruktur ausgewählter Rußproben ist in Abbildung 7 rechts dargestellt. Alle Proben zeigen Raman-Spektren mit mehr oder minder ausgeprägten D- und G-Banden bei 1350 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} . Das Verhältnis der D- und G-Bande gilt als Maß der strukturellen Ordnung: Je höher das Verhältnis, desto ausgeprägter ist der Grad der Graphitisierung der untersuchten Rußproben. Demnach weisen Rußproben des Vergleichsstandards mit geringerem C/O-Verhältnis eine höhere strukturelle Ordnung auf. Die Kohlenstoffschichten dieser Proben sind in den TEM-Aufnahmen (Abbildung 7 rechts) als fransenförmige Gebilde („fringes“) mit unterschiedlicher Form, Länge und Tortuosität zu erkennen. Rußproben mit hohem D/G-Verhältnis (a) weisen längere, zusammenhängende und teils konzentrisch angeordnete Kohlenstoffschichten mit geringerem Abstand zueinander auf. Diese lamellenförmigen Anordnungen werden den graphitischen Bereichen der Probe zugeordnet. Rußproben mit geringem D-/G-Verhältnis (b) zeigen ausschließlich kurze Kohlenstoffschichten mit relativ hohem Abstand zueinander, die sich in einer ungeordneten Struktur anordnen.

Die qualitative Analyse der Nanostruktur deutet darauf hin, dass Rußproben des innerstädtischen Zyklus eine Bandbreite unterschiedlicher Partikelgrößen und morphologischen Eigenschaften aufweisen. Die Nanostruktur beeinflusst die aktive Oberfläche der Rußpartikel und die Möglichkeit flüchtige Elemente in der Rußmatrix zu binden. Bildgebende Verfahren und Raman-spektroskopische Untersuchungen legen nahe, dass sich die Motorphasen nicht nur charakteristisch auf die Partikelgröße, sondern auch auf die morphologische Struktur auswirkt:

- Ein besonders ausgeprägter D3-Peak bei 1500 cm^{-1} lässt auf einen dominanten Anteil amorpher Kohlenstoffstrukturen schließen (Seong et al. 2013). Diese ungeordneten Strukturen konnten durch bildgebende Verfahren besonders in Rußproben der Leerlaufbetriebspunkte (c) und der Beschleunigungsphasen (d) beobachtet werden.
- Bezogen auf das D-/G-Intensitätsverhältnis der Rußproben im Motorzyklus lässt sich jedoch auch eine Ähnlichkeit mit den Vergleichsproben der geringeren C/O-Einstellungen ($C/O \approx 0,3$) beobachten. Diese sind bildgebend in (a) und (b) dargestellt und weisen einen vergleichswisen hohen Grad der Graphitisierung auf. Außerhalb der untersuchten Phasen „▲“ und „►“ mit hohen amorphen Anteilen, werden somit auch Rußpartikel ausgestoßen, deren Kohlenstoffstrukturen eine höhere strukturelle Ordnung aufweisen und geringere Anteile an flüchtigen organischen Komponenten in der Rußmatrix binden (Zöllner et al. 2019).

4.1.4 Vergleich mit Umweltproben

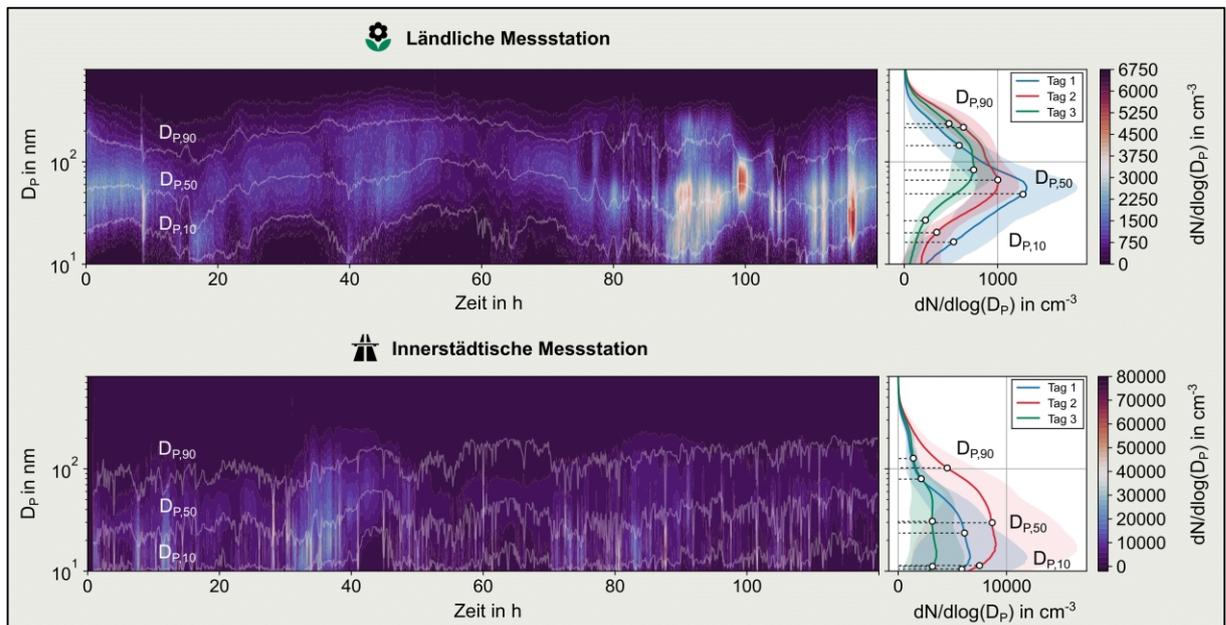


Abbildung 8: Partikelgrößenverteilung bei Freilandmessungen.

In Abbildung 8 sind die Partikelgrößenkonzentration von fünf Messtagen, der Median-Durchmesser $D_{P,50}$ und der Partikeldurchmesser $D_{P,10}$ und $D_{P,90}$ bei 10 % und 90 % der Gesamtkonzentration dargestellt. Das Tagesmittel der ersten drei Tage wurde in einen separaten Plot auf der rechten Seite abgebildet. Auf diese Weise wird die Feinstaubbelastung im Freiland charakterisiert und ins Verhältnis mit den Konzentrationen des Abgasrohrs und bei der Exposition im Luftstrom gesetzt. Dabei können charakteristische Unterschiede der beiden Freiland-Standorte unterschieden werden:

- In Straßennähe schwankte der Median-Durchmesser der Tagesmittel zwischen 23,7 nm und 41,2 nm. Dabei konnten deutlich höhere maximale Partikelgrößenkonzentrationen gemessen werden (zwischen $3527,2 \text{ cm}^{-3}$ und $9008,6 \text{ cm}^{-3}$) als in der ländlichen Region.
- Im nördlichen Fichtelgebirge konnten Agglomerationsprozesse in der Atmosphäre beobachtet werden, hier schwankte der $D_{P,50}$ zwischen 40,5 nm und 83,0 nm. Es konnten ca. eine Größenordnung geringere Partikelgrößenkonzentrationen detektiert werden als in Straßennähe.

Die Feinstaubbelastung im Freiland wird nicht nur Schadstoffen aus dem Verkehr, sondern auch anderen Quellkategorien zugeschrieben. Laut einer Studie des Umweltbundesamts (UBA) resultieren 60 % der $\text{PM}_{2,5}$ -Emissionen aus Verbrennungsvorgängen, dabei haben Haushalte und Kleinverbraucher sowie der Straßenverkehr die größten Anteile. Ca. 25 % der $\text{PM}_{2,5}$ -Emissionen stammen aus dem Straßenverkehr. Diese Kategorie schließt Rußpartikel und Abriebemissionen bei Reifen und Bremsen mit ein (Umweltbundesamt 2022).

4.2 Arbeitspaket 2: Ökotoxikologische Untersuchungen zu Effekten von LSV auf *B. terrestris*

4.2.1 Akute Toxizität von LSV bei oraler Aufnahme

Nach akuter Exposition von Individuen von *B. terrestris* mit DRP in Konzentrationen von 1 bis 16 g/l zeigten sich keine toxischen Auswirkungen. Auch bei den höchsten Konzentrationen von DRP war die Mortalität nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Überlebensanalyse, paarweise Log-Rank-Testvergleiche, $p > 0,05$ für jede DRP-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle). Nur die Positivkontrolle Dimethoat induzierte eine nahezu 100 %ige Mortalität (Überlebensanalyse, paarweise Log-Rank-Test-Vergleiche, $p < 0,001$ im Vergleich zu jeder anderen Behandlung). Außerdem fanden wir keinen Effekt der akuten DRP-Exposition auf den relativen Fettkörpergehalt der Hummeln (GLM mit Gamma-Verteilung, $F_{(8,410)} = 1,296$, $p = 0,34$).

Während wir keinerlei negative Effekte auf die Mortalität oder den Körperfettgehalt der Hummeln nachweisen konnten, scheinen die Effekte von DRP bei anderen Organismen deutlich stärker zu sein. Eine akute toxische Wirkung von DRP in Form einer erhöhten Mortalität konnte bei den Nauplienlarven der Salinenkrebse *Artemia salina* nach der Exposition gegenüber 250 mg/l Abgaspartikeln in Medium über 96 Stunden nachgewiesen werden (Pikula et al., 2021). Diese Ergebnisse sind jedoch kaum mit unseren vergleichbar, da die Expositionsbedingungen in der aquatischen Umwelt komplexer sind als bei einer reinen oralen Aufnahme, da die Tiere zusätzlich über ihre Atemwege exponiert sind (Honda & Suzuki, 2020). Komponenten, die als Hauptursache für die DRP-Toxizität diskutiert werden, sind PAK, die bei unvollständigen Verbrennungsprozessen gebildet werden (Mesquita et al., 2016). Pyren war mit 444,05 µg/g der am höchsten konzentrierte PAK, den wir in den am Testmotor erstellten DRP gefunden haben. Diese Konzentration ist möglicherweise zu niedrig, um bei *B. terrestris* nach akuter oraler Exposition nach 48 Stunden eine signifikante Mortalität zu verursachen, im Gegensatz zu einer akuten Toxizität auf Mückenlarven (Borovsky et al., 1987).

4.2.2 Chronische Toxizität

Paarweise Vergleiche (Tukey-Post Hoc mit Holm Korrektur) zeigten signifikante Unterschiede zwischen allen Behandlungsgruppen, außer dem Vergleich zwischen Negativkontrolle und 0.5 g DRP/l Zuckerwasser. Tiere, die mit 1 und 2 g DRP/l Zuckerwasser gefüttert wurden, nahmen signifikant weniger Nahrung auf als die Tiere in der Kontrolle. Individuen, welche mit Dimethoat gefüttert wurden, nahmen signifikant mehr Nahrung auf, als die Tiere in allen anderen Behandlungsgruppen. Die erhöhte Nahrungsaufnahme der Tiere der Dimethoat-Behandlungsgruppe kann durch aktivierte Entgiftungsprozesse und einem damit verbundenen erhöhten Energiebedarf erklärt werden (Ferreira et al. 2015). Die niedrigere Nahrungsaufnahme in den Behandlungsgruppen mit 1 und 2 DRP/l Zuckerwasser könnte auf eine abstoßende Wirkung des Dieselrußes zurückzuführen sein. Die aufgenommenen Dosen an DRP nahm aber mit steigender DRP Konzentration in der Behandlung zu. Die Individuen, die mit 1 und 2 DRP/l Zuckerwasser gefüttert wurden, zeigten eine signifikant verringerte Überlebenszeit im Vergleich zu den Kontrollen. Bei Individuen, die mit 1 g DRP/l Zuckerwasser gefüttert wurden, lag die Mortalität bei 32,1 % und bei Tieren, welche mit 2 g DRP/l Zuckerwasser gefüttert wurden,

lag die Mortalität bei 48,2 % (Abb. 9). Damit konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass sich Ruß aus einem Dieselmotor ab einer Konzentration von 1 g/l negativ auf das Überleben von Individuen der Dunklen Erdhummel auswirkt (siehe Abb. 9).

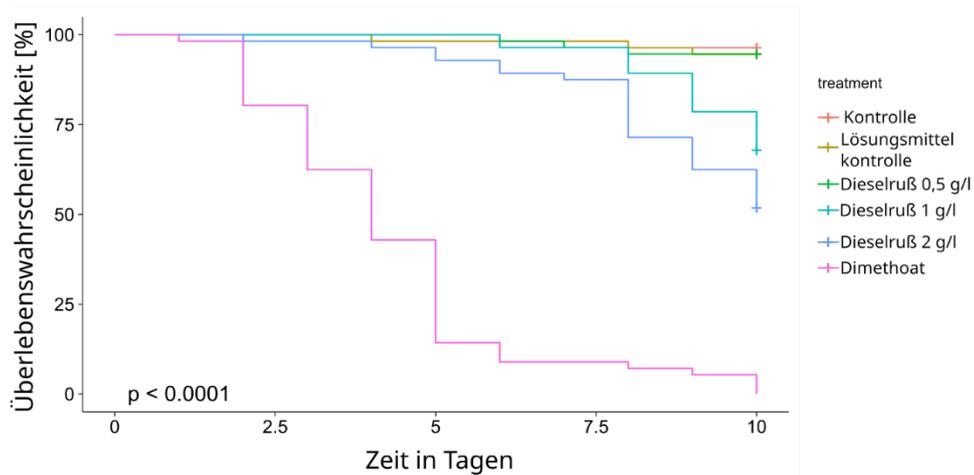


Abbildung 9: Überlebenswahrscheinlichkeit der Hummeln über den Zeitraum von 10 Tagen, die Kontrolllösungen, der Lösungsmittelkontrolle, den Konzentrationen 0,5, 1 und 2 DRP/l Zuckerwasser und Dimethoat ausgesetzt waren. Der p-Wert zeigt signifikante Unterschiede zwischen den Kaplan-Meier-Kurven der verschiedenen Behandlungsgruppen an. Verändert nach Hüftlein et al., 2023.

Die erhöhte Mortalität könnte möglicherweise durch toxische organische Bestandteile des Rußes erklärt werden (z. B. PAK) (Uy et al. 2014). Allerdings haben die Tiere auch signifikant weniger Nahrung aufgenommen als die Kontrollen, was zusätzlich Stress auf die Hummeln ausüben könnte. Die aufgenommene Menge an Zuckerwasser liegt in diesem Fall aber in allen Behandlungsgruppen in einem Rahmen, welcher die Überlebenszeit nicht negativ beeinflussen sollte (Vaudo et al. 2017). Wie genau Rußexposition zu einer erhöhten Mortalität bei Hummeln führt und welche Mechanismen dahinterstecken, muss in weiteren Experimenten (wie bspw. 4.2.4) untersucht werden. Eine Interpretation dieser Ergebnisse hinsichtlich der Umweltrelevanz ist noch nicht möglich, da es für die realistische Expositionsmenge von Insekten mit Dieselruß in der Umwelt weder empirische Daten noch hinreichende Modellierungen gibt.

In den wenigen Studien, die mit Hymenopteren bislang durchgeführt wurden, sind nur Effekte auf subletaler Ebene gezeigt worden, wie induzierter Stress im Nervensystem und veränderte Lernfähigkeit und Gedächtnisleistung in Honigbienen (Reitmayer et al. 2019). Des Weiteren gibt es Hinweise aus der Literatur, dass volatile Pflanzendüfte von Dieselruß degradiert werden und sich deshalb möglicherweise negativ auf die Nahrungssuche von Honigbienen auswirkt (Girling et al. 2013; Lusebrink et al. 2015).

4.2.3 Akute Toxizität von LSV bei Exposition im Luftstrom

Es konnte beobachtet werden, dass die Ruß-exponierten Individuen signifikant länger überleben als die Kontrollindividuen (Wilcoxon rank sum test: $n = 30$; $p = 0,009$) (Abb. 10A). Die

Überlebenszeit korrelierte signifikant negativ mit der Flugaktivität (Abb. 10B) und die Ruß-exponierten Individuen flogen signifikant weniger als die Kontrollindividuen (Wilcoxon rank sum test: $n = 30$; $p < 0,001$) (Abb. 10D).

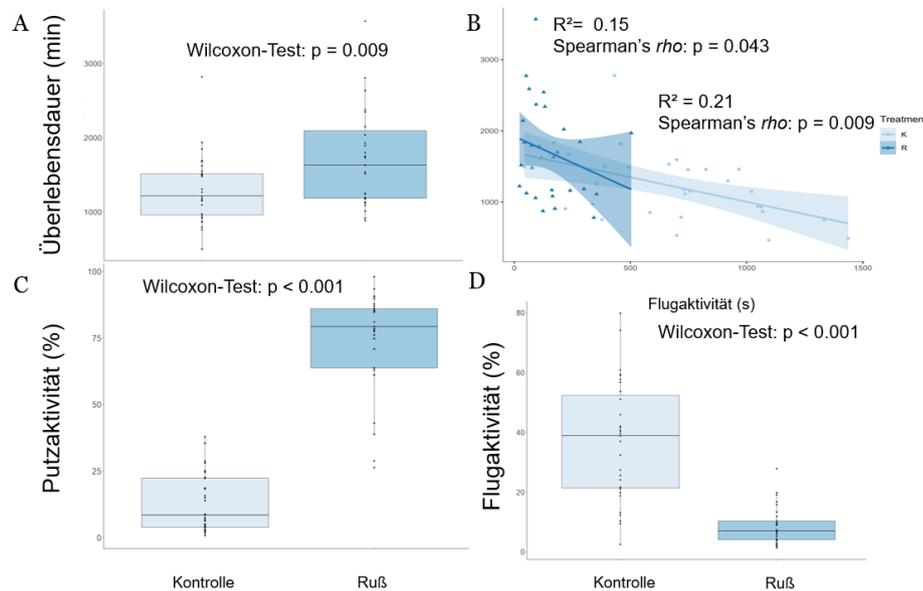


Abbildung 10: Überlebensdauer in Minuten (A) von *B. terrestris* Individuen nach 30-minütiger Ruß Exposition in einer Flugversuchsschale verglichen mit der Kontrolle; (B) Korrelation der Überlebensdauer in Minuten mit der Flugaktivität in Sekunden der Ruß-exponierten Tiere (dunkelblau) und der Kontrollen (hellblau); Putzaktivität in Prozent (C) und Flugaktivität in Prozent (D) während der Expositionszeit von Ruß-exponierten Tieren gegenüber den Kontrollen. $N = 30$.

Die kürzere Überlebenszeit der Hummeln in der Kontrolle könnte dadurch zu erklären sein, dass die Ruß-exponierten Individuen viel mehr Zeit mit Putzen verbringen als die Kontrollindividuen die eine erhöhte Flugaktivität zeigen (Abb. 10C und D). Fliegen ist auch für Insekten mit indirekter Flügelbewegung extrem energieaufwendig durch den hohen Verbrauch an ATP und der hochfrequenten Muskelkontraktionen. Durch die Tatsache, dass Bienen wie Hummeln beim Flug ausschließlich auf aeroben Metabolismus zurückgreifen können, weisen sie eine maximale Mitochondrien-Dichte in ihrer Muskulatur auf (Suarez et al. 1997; Vishnudas & Vigoreaux, 2007). Auch müssen durch die erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch die mitochondriale Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase genügend Antioxidantien bereitgestellt werden können, was ebenso den Energiebedarf erhöht (Hedges et al. 2019). Somit ist die längere Überlebensdauer der mit Ruß-behandelten Hummeln als Artefakt des Versuchsdesigns zu werten. In natürlichen Systemen könnte sich die längere Putzzeit negativ auf die Organismen auswirken, da sie weniger Zeit für die Nahrungssuche zur Verfügung haben.

4.2.4 Histologische Untersuchungen zur Aufnahme von LSV bei *B. terrestris*

Aus den Erkenntnissen von 4.2.2 folgt die Fragestellung nach dem Wirkmechanismus von LSV nach oraler Aufnahme. Andere partikuläre Substanzen haben das Potential in Organismen bei

Interaktion mit dem jeweiligen Gewebe Entzündungen und oxidativen Stress hervorzurufen (Danielsen et al. 2011; Silva et al. 2021). Der Insektendarm besitzt schützende Strukturen wie die peritrophische Membran, bestehend aus Proteinen und Chitin, um mechanischen Verletzungen vorzubeugen (Erlandson et al. 2019; Van Der Zande et al. 2020). Akkumulieren Stressoren können die schützenden Strukturen beschädigt werden. Wir haben zunächst ein Protokoll entwickelt, mit dem wir die Cuticula der Hummeln so verändern, dass diese durchsichtiger wird, um mögliche Akkumulationszonen und sogenannte „regions of interest“ (ROI) zu identifizieren (Ritschar et al., 2022).

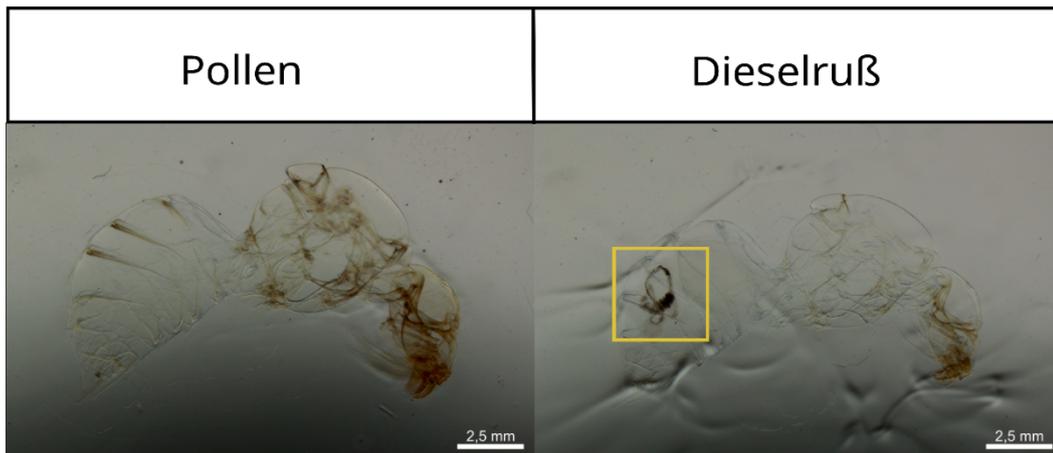


Abbildung 11: Vergleich von Hummelarbeiterinnen der verschiedenen Behandlungsmethoden in CUBIC-R (gelb markiert: Partikel im Gastrointestinaltrakt) nach 3 Tagen mit Futterlösung ohne Partikel.

Die Anwendung der angepassten *tissue clearing* -Methode wurde durchgeführt, um die Aufnahme und Akkumulation von Partikeln natürlichen Ursprungs (Pollen) mit der Aufnahme von DRP bei Drohnen und Arbeiterinnen von *B. terrestris* zu vergleichen (Abb. 11). Anders als bei den mit Pollen gefütterten Hummeln, wo in einem Großteil der Tiere keine Pollenakkumulation identifiziert werden konnte, konnten bei allen Ruß-exponierten Individuen DRP im Gastrointestinaltrakt lokalisiert werden (Abb. 11).

Diese Beobachtung deutet auf einen Unterschied des Akkumulationsverhalten hinsichtlich der aufgenommenen Partikel (Pollen bzw. DRP) im Gastrointestinaltrakt von *B. terrestris* hin. Bei den Ruß-exponierten Hummeln konnten DRP im Bereich des Kropfes, Ventrikulus und Ileums identifiziert werden, wobei sich die Lokalisation und Menge der DRP zwischen den Geschlechtern unterschied. Der Unterschied in der Rußakkumulation innerhalb der Ruß-exponierten Tiere ergibt sich anscheinend aus morphologischen Unterschieden zwischen den Geschlechtern im Aufbau des Proventrikulus. Die Bildung von Akkumulationszonen im Generellen, kann sich jedoch für beide Geschlechter negativ auf die Gesundheit auswirken. Bekannt ist aber, dass der Proventrikulus Pollen sammelt und im Anschluss geballt in den Mitteldarm abgibt (Bailey, 1952). Diese anatomische Anpassung erlaubt es den Bienen ganze Pollenpakete in den Ventrikulus abzugeben und gleichzeitig zu verhindern, dass Pollen zurück in den Kropf gelangen (Peng & Marston, 1986). Im Ventrikulus können diese Pollenpakete gezielt von Verdauungsenzymen abgebaut werden (Bailey, 1952). Da sich nun Rußpartikel im Proventrikulus ansammeln, besteht die Möglichkeit, dass im Verlauf eines erheblichen Zeitraums DRP und

damit die adsorbierten PAK schubweise in den Mitteldarm gelangen können, auch lange nach der eigentlichen Aufnahme. Es ist möglich, dass diese Partikel im Mitteldarm verzögert negative Auswirkungen haben könnten. Im Zuge dieser stoßweisen Abgabe können durch die adsorbierten organischen Bestandteile des Rußes essentielle Mikroorganismen im Darm der Hummeln negativ beeinflusst werden (siehe Kapitel 4.3.2). Weitere mögliche Auswirkungen wären, dass durch oxidativen Stress ausgelöste Veränderungen der Lipidprofile stattfinden, da DRP bei Mäusen nach der Aufnahme und Exposition über die Luftröhre nachweislich Lipidveränderungen hervorgerufen haben (Massimino et al., 2022; Pambianchi et al., 2022; Reyes-Caballero et al., 2019; Rizzo et al., 2014). Es wird angenommen, dass die Anreicherung von DRP im Gewebe von Organismen und die daraus resultierende Anreicherung von PAK der Grund für die Entfaltung ihrer Toxizität ist, allerdings erst nach längerer Expositionsdauer (Cong et al., 2021; McGrath et al., 2019). Diese Bioakkumulation von PAK könnte auch eine Gefahr für höhere trophische Ebenen darstellen, wie schon in einem aquatischen Modell gezeigt werden konnte (Wang et al., 2021). Je nach akkumulierter Menge im Darm, kann es auch zu Verstopfungen und/oder falschen Sättigungsgefühlen kommen, welche die Hummeln wiederum negativ beeinflussen könnten.

4.2.5 Einfluss von Bremsabrieb auf die Reizwahrnehmung und das Verhalten von *B. terrestris*

Eine weitere Quelle für LSV stellt Bremsabrieb dar. Ist die Konzentration von Bremsabriebpartikeln in der Umgebungsluft sehr hoch, kann es sein, dass Hummeln bei der Suche nach geeigneten Futterpflanzen eingeschränkt werden, da bereits an Honigbienen gezeigt werden konnte, dass Dieselabgase die LSV enthalten das zentrale Nervensystem der Bienen negativ beeinflussen kann (Reitmayer et al., 2019). Hummeln sind stark auf die Wahrnehmung von volatilen Substanzen über die Antennen angewiesen, um Nahrung zu finden oder mit ihrer Umwelt zu interagieren (Saleh et al., 2007). Unsere Hypothese war, dass Antennen von im Luftstrom mit Bremsabrieb exponierten Hummeln verschmutzter sind als die Antennen von Hummeln welche in unbelasteter Luft geflogen waren. Dadurch bedingt, vermuteten wir eine verringerte Fähigkeit der exponierten Antennen Reize wahrzunehmen verglichen mit Kontrollantennen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Antennen von Hummeln, welche Bremsabrieb exponiert waren, signifikant stärker verschmutzt sind als die Antennen der Kontrolltiere (Mann-Whitney U- Test: $U = 0,0$, $p > 0.001$) (Abb. 12).

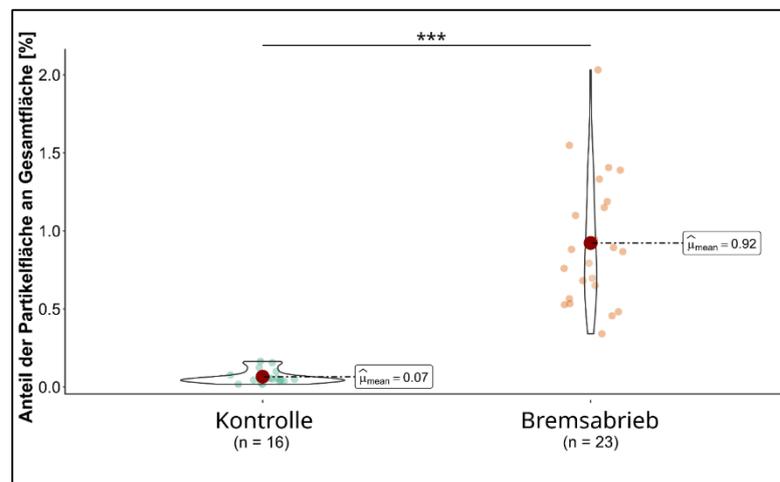


Abbildung 12: Vergleich des relativen Anteils an Partikeln an der Gesamtfläche der Sensillenbasis der Hummelantennen zwischen Bremsabrieb und Kontrolle. Die roten Punkte stehen für den Mittelwert. Sterne kennzeichnen die Signifikanz (***) = $p < 0.001$).

Man muss allerdings beachten, dass auch nach Exposition die durchschnittliche Verschmutzung nur bei 1% liegt und wahrscheinlich sehr behaarte Bereiche und dadurch die elektrostatische Ladung der Hummeln selbst die Partikel stärker anzieht und die Partikel so von den Antennen fernhält (Pellecchia & Negri, 2018). Zudem sind Verwirbelungen in der Expositions-kammer sehr stark, was dazu führen könnte, dass die Hummeln nicht so vielen Partikeln ausgesetzt sind wie wir durch die Bremsungen generieren und dadurch die Verschmutzung der Antennen so gering ausfällt.

Die multiplen Vergleiche der Elektroantennographie-Antworten ergaben weder signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen nach 0 und 5 min, noch innerhalb der Behandlungsgruppen zwischen 0 und 5 min (alle Mehrfachvergleich $p > 0,05$) (Abb. 13).

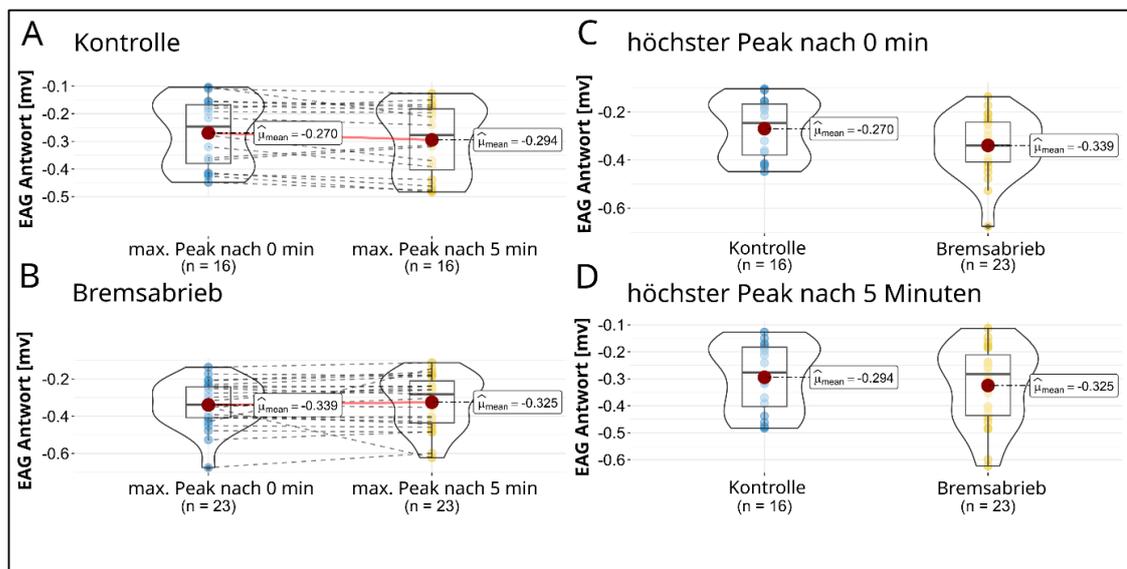


Abbildung 13: Vergleiche der maximalen EAG-Antwort in mV zwischen A) 0 und 5 Minuten bei Kontrollantennen; B) 0 und 5 Minuten bei Bremsabriebantennen und zwischen C) Kontrolle und Bremsabrieb nach 0 Minuten und D) Kontrolle und Bremsabrieb nach 5 Minuten. Die roten Punkte stehen für den Mittelwert.

Wie oben schon erwähnt, betrug die bedeckte Fläche des Antennenglieds im Mittel nur 1 %, was wiederum zu wenig sein könnte, um wirklich eine nennenswerte Anzahl von Sensillen auf der Antennenoberfläche zu beeinträchtigen. Zudem haben basikonische Sensillen, welche wohl hauptsächlich als Chemosensoren dienen, nur eine endständige Pore weshalb die Wahrscheinlichkeit bei so geringer Verschmutzungslast auch sehr gering ist, dass die Sensillen beeinträchtigt werden (Huang et al., 2023). Des Weiteren, sind viele Partikel an der Antenne bereits vorher agglomeriert und daher eventuell zu groß um in Poren einzudringen und dort tatsächlich Schaden anzurichten (Steinbrecht, 2007).

4.3 Arbeitspaket 3: Untersuchungen zu Effekten von LSV auf Physiologie-, Genexpressions- und Kolonieebene

4.3.1 Entwicklung eines Windkanals zur Exposition der Hummeln im Luftstrom

Die Konzentration, bei welcher die Hummeln exponiert wurden, lag bei $0,4 \pm 0,12 \text{ mg/mm}^3$. Es konnte ohne Zugabe neuen Rußes keine rußfreie Atmosphäre erzeugt werden. Die Menge an Ruß, welcher von den Wänden resuspendiert, liegt bei $0,19 \pm 0,08 \text{ mg/mm}^3$.

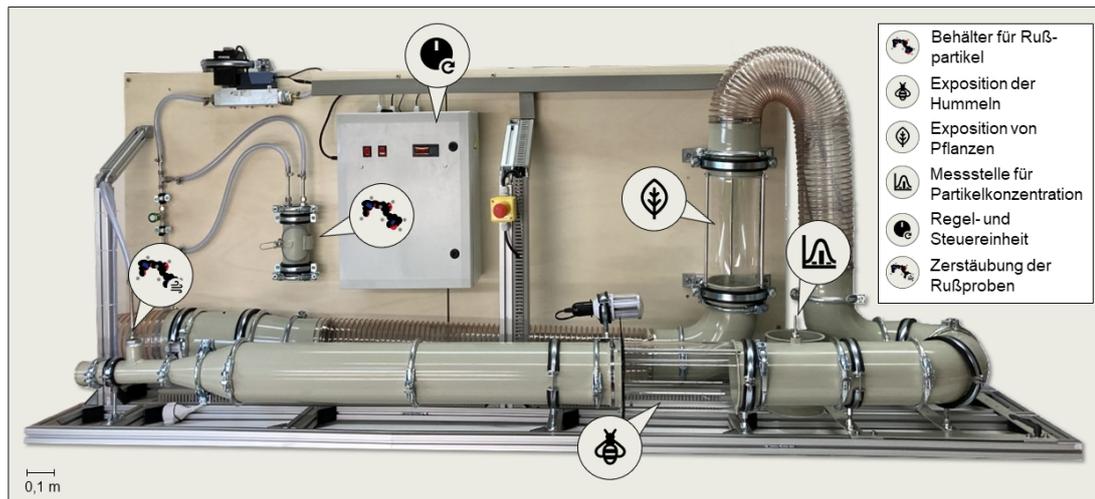


Abbildung 14: Aufbau für die Exposition von Hummeln mit Rußpartikelproben.

Partikelgröße: Im direkten Vergleich der Rohemissionen innerhalb der Beschleunigungsphase („▲“) und Exposition im Windkanal („☼“) konnten Agglomerationsprozesse durch den Probenahmeprozess im Abgasrohr und Zerstäubungsprozess im Windkanal beobachtet werden. Zur Abscheidung grober Fragmente wurde deshalb die Möglichkeit der Abscheidung durch einen Impaktor ergänzt. Der Größenbereich der Windkanal-Messungen („☼“) ist vergleichbar mit den Analysen der ländlichen Messstation („🌿“). Bei beiden Szenarien konnten ultrafeine Partikel ($< 100 \text{ nm}$) und feine Partikel bis zu einem elektrischen Mobilitätsdurchmesser von 600 nm nachgewiesen werden.

Partikelgrößenkonzentration: Die Zerstäubung im Windkanal („☼“) erzeugt weitaus geringere Partikelgrößenkonzentrationen als die Rohemissionen innerhalb der Beschleunigungsphase („▲“). Es konnten jedoch Konzentrationen vergleichbar zur Feinstaubbelastung der innerstädtischen Messstation („▲“) für die Exposition eingestellt werden.

4.3.2 Charakterisierung der Wirkmechanismen von LSV über physiologische Stress- und Immunparameter

Es zeigten sich keine Effekte der DRP auf die Phenoloxidase-Aktivität der Hummeln (GLM mit Gamma Verteilung, $F_{4,136} = 1.881$, $p = 0.13$) (Abb. 15).

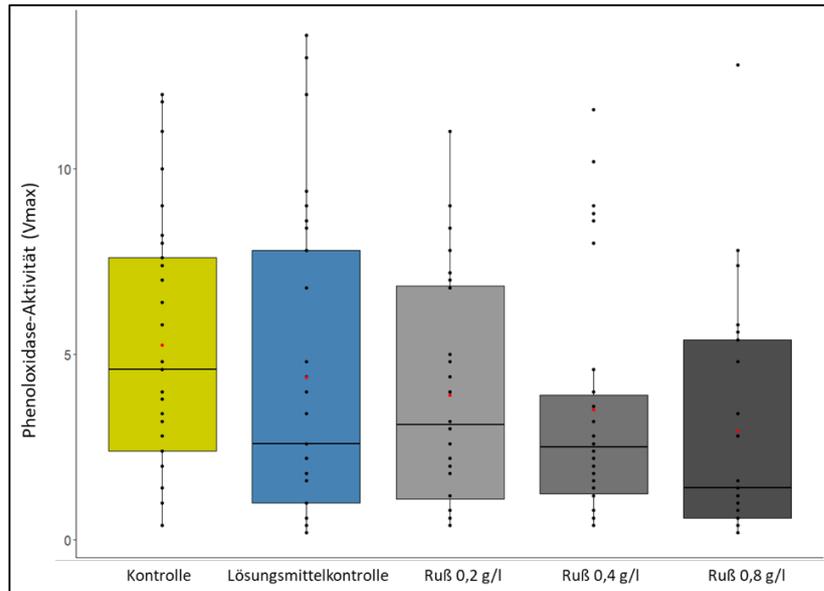


Abbildung 15: Phenoloxidase-Aktivität der verschiedenen Behandlungsgruppen (Kontrolle, Lösungsmittelkontrolle, Ruß 0,2 g/l, Ruß 0,4 g/l, Ruß 0,8 g/l). Die schwarzen Punkte zeigen die individuellen Messungen, die roten Punkte zeigen den Mittelwert der jeweiligen Behandlungsgruppe. Die Boxplots reichen vom 25. bis zum 75. Perzentil mit dem Median als horizontale Linie.

Gleichermaßen zeigten sich keine signifikanten Effekte der Exposition mit Dieselruß (0,2 – 0,8 g/l) auf den relativen Körperfettgehalt (GLM mit Normalverteilung: $F_{4,137} = 1.067$, $p = 0.375$).

4.3.3 Untersuchung der Effekte von LSV auf die Genexpression von Hummeln

Das Genexpressionsmuster bei chronischer Belastung unterschied sich signifikant zwischen Arbeiterinnen, die mit DRP in der Nahrung konfrontiert waren, und den Kontrollen (Abb. 16). Diese Effekte waren deutlich stärker als potentielle Kolonie-spezifische Genexpressionsunterschiede. Insgesamt waren 324 Gene differentiell zwischen diesen beiden Gruppen exprimiert (165 Gene waren signifikant stärker und 159 Gene signifikant schwächer exprimiert). Nach GO-Analyse waren vor allem solche Gene besonders stark in der mit Dieselruß behandelten Gruppe höher exprimiert, die eine Protein-Bindefunktion haben, die Enzymkomplexe bilden, sowie solche, die an metabolischen und hier vor allem katabolischen Prozessen beteiligt sind. Hingegen waren Gene, die an biosynthetischen Prozessen sowie der Bildung von Mitochondrien- und Organellenmembranen beteiligt sind z. T. signifikant herunterreguliert. Allerdings konnten diese differentiell exprimierten Gene kaum über funktionelle Netzwerkanalysen bestimmten Stoffwechselwegen zugeordnet werden (Seidenath et al. 2023).

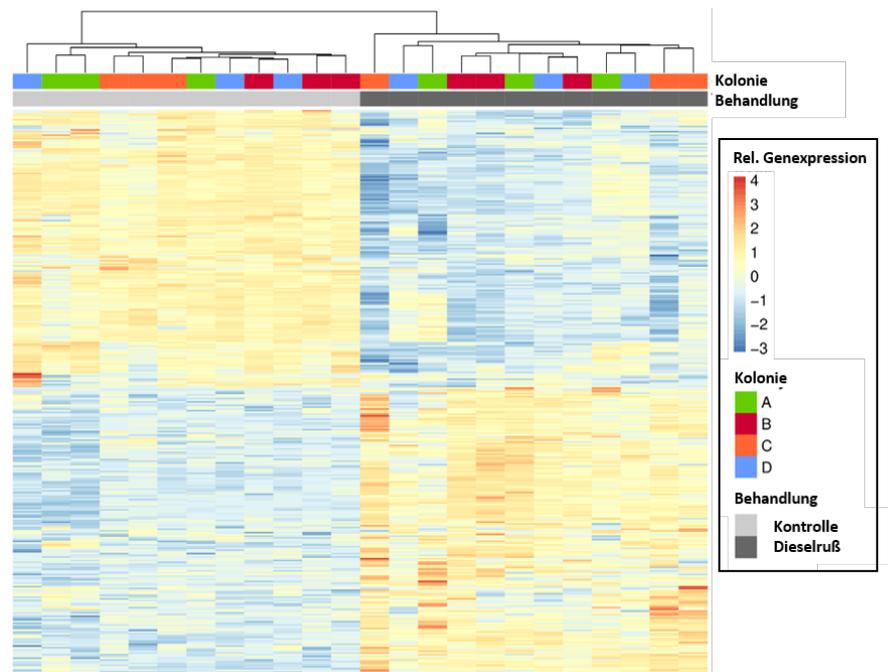


Abbildung 16: Heat-Map der differentiell exprimierten Gene von Hummelarbeiterinnen. Während sich Arbeiterinnen verschiedener Kolonien bei gleicher Behandlung stark in ihrem Genexpressionsmuster ähneln, führt die Behandlung mit DRP zu einer signifikant veränderten Genexpression.

Die von uns gefundenen, durch DRP in der Nahrung induzierten Veränderungen in der Genexpression, deuten darauf hin, dass diese in Zusammenhang mit einer generellen Stressantwort der Hummeln stehen. Hochregulierte Gene umfassen solche, die in metabolische und vor allem katabolische Prozesse eingebunden sind. Herunterregulierte Gene umfassen metabolische und vor allem biosynthetische Prozesse. Beides weist darauf hin, dass mit der Nahrung aufgenommene DRP höhere metabolische Kosten verursachen. Solche Veränderungen im Stoffwechsel scheinen bei Insekten eine typische Antwort auf Umweltschadstoffe zu sein, die oft biochemische Prozesse im Insektenkörper beeinträchtigen. Ähnliche Unterschiede im Genexpressionsmuster wurden bereits bei Honigbienen und Hummeln gefunden, die subletalen Dosen von Neonicotinoiden ausgesetzt waren (Bebane 2019, Colgan 2019) oder anderen Insekten, die Schwermetallen oder PAK exponiert waren (Chen et al. 2021; Zhang et al. 2019). Auch wenn es Unterschiede im Detail gibt, so scheinen bestimmte Prozesse häufig von Umweltschadstoffen beeinflusst zu werden. So wirken sich - ähnlich wie in unserer Studie DRP - sowohl Insektizide als auch PAK anscheinend negativ auf das Funktionieren von Mitochondrien aus und damit auf einen wichtigen Teil des Insekten- Energiestoffwechsels (Colgan et al. 2019; Zhang et al. 2019). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Umweltschadstoffe indirekt zu einem höheren Energieverbrauch bei Insekten führen (Calow 1991).

4.3.4 Untersuchung der Effekte von LSV auf das Darmmikrobiom von *B. terrestris*

Mit Hilfe von Mikrobiom-Analysen kann untersucht werden, ob sich mit Hummeln assoziierte Mikrobengemeinschaften bei LSV-Exposition verändern. Insbesondere das Darmmikrobiom besitzt wichtige Funktionen, unter anderem im Stoffwechsel und der Immunabwehr (Mockler et al. 2018, Raymann & Moran 2018). Entsprechend untersuchten wir das Darmmikrobiom der

Hummelarbeiterinnen und verwendeten hierfür Tiere aus dem in 4.3.3 beschriebenen Versuch zu Veränderungen der Genexpression durch LSV (jeweils fünf Arbeiterinnen pro Kolonie und Behandlungsgruppe). Ein 291 Basenpaar langes Fragment 16S rDNA des Darminhaltes wurde auf der Illumina iSeq-100 Plattform sequenziert (mit den Primern 515F-Y (Turner et al. 1999) und 806RB (Aprill et al. 2015) wie im 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation protocol (Part # 15044223 Rev. B, www.illumina.com)) und nachfolgend mit QIIME2 (Boylan et al. 2019) analysiert.

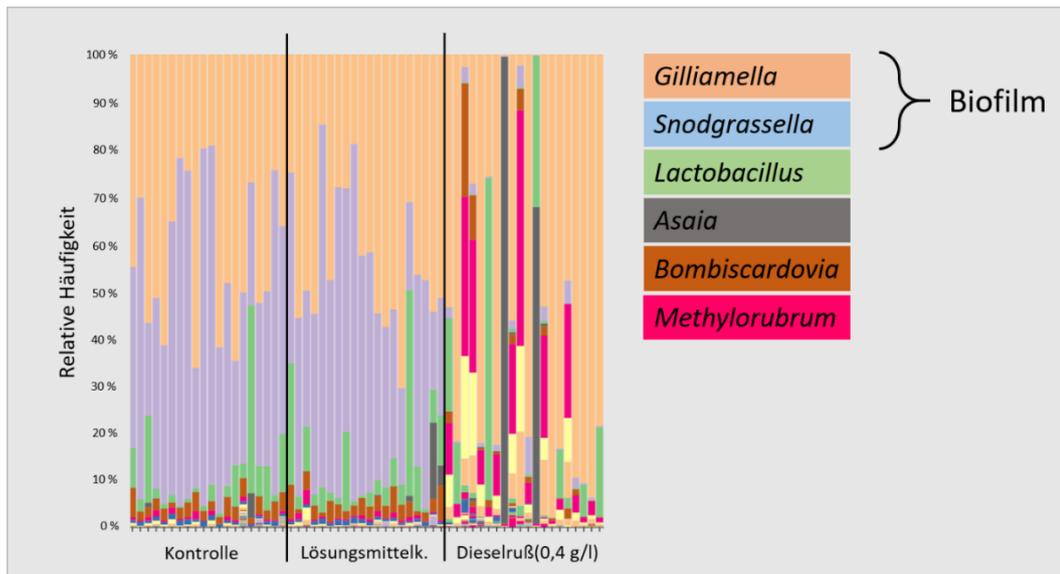


Abbildung 17: Relative Häufigkeiten der Bakterien im Darmmikrobiom von *B. terrestris* Arbeiterinnen. Die Bakterien *Gilliamella* sp. und *Snodgrassella* sp. sind typischerweise im Darmmikrobiom der Hummeln vertreten und sind an der Bildung eines Biofilms entlang der peritropischen Membran im Darm der Hummeln beteiligt. Dieser Biofilm hat wahrscheinlich eine wichtige Schutzfunktion gegenüber Pathogenen oder Umweltschadstoffen im Darm.

Wir konnten eine signifikante Veränderung der Bakteriengemeinschaften des Darmmikrobioms bei Hummeln feststellen, die mit DRP in Zuckerwasser gefüttert wurden (Abb. 17; Paarweise PERMANOVA mit Benjamini-Hochberg korrigierten p-Werten; Dieselruß vs. Kontrolle: pseudo-F = 32.247, $p = 0.002$; Dieselruß vs. Lösungsmittelkontrolle: pseudo-F = 30.651, $p = 0.002$), nicht aber zwischen der Kontrolle und der Lösungsmittelkontrolle (Seidenath et al. 2023). Wir gehen davon aus, dass die in Dieselruß enthaltenen PAK verantwortlich für diese Veränderung sein könnten, da für diese organischen Stoffe bereits toxische und mutagene Effekte bei Organismen nachgewiesen wurden (Sun et al. 2021). Bei anderen Tieren wurden auch bereits PAK-induzierte Veränderungen des Darmmikrobioms nachgewiesen (DeBofsky 2021; Ding et al. 2020). Andererseits könnte die große Menge an Kohlenstoff in den DRP wie Aktivkohle wirken und über das große Oberfläche-Volumen-Verhältnis Mikroben an die Oberfläche der Partikel gebunden werden und dann gemeinsam mit den Partikeln aus dem Darm ausgeschieden werden (Naka et al. 2001). Vor allem das Bakterium *Snodgrassella* sp., welches normalerweise eine hohe relative Häufigkeit im Darmmikrobiom von gesunden Hummeln hat (Hammer et al. 2021) fehlt nahezu völlig in Tieren, die mit Dieselruß gefüttert wurden.

Snodgrassella scheint besonders anfällig gegenüber Umweltschadstoffen zu sein, denn Rotman et al. (2020) konnten bereits einen deutlichen Rückgang in der relativen Häufigkeit dieses Bakteriums nach Exposition von Hummeln mit Kupfer, Selen oder Glyphosat zeigen. Gemeinsam mit *Gilliamella* sp. bildet dieses Bakterium offenbar einen Biofilm, der die Innenwand des Ileums der Hummeln schützt (Hammer et al. 2021). Dieser Biofilm scheint gegen den Darmparasiten *Crithidia bombi* zu schützen, der sich in den Hummelwirten an die Darminnenwand anheften muss, um dort zu persistieren (Näpflin & Schmid-Hempel 2018).

4.3.5 Entwicklung LSV-exponierter *B. terrestris* Kolonien im Labor

Bei keinem der gemessenen Parameter (Anzahl lebender Arbeiterinnen, die Anzahl Brut (Larven und Puppen), der relative Körperfettgehalt sowie die Körpergröße) konnten wir Unterschiede zwischen der Kontrolle und der mit DRP gefütterten Gruppe erkennen (Abb. 18). Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Hummeln die Exposition mit Umweltschadstoffen auf Kolonieebene unter Laborbedingungen relativ gut abpuffern können. Da Nahrung *ad libitum* zur Verfügung stand könnten die Tiere beispielsweise in der Lage sein schneller Brut nachzuziehen, falls die Mortalität leicht erhöht ist. Zudem könnten sich Fitness-Effekte erst zeigen, wenn die Kolonien reproduktive Tiere produzieren, also neue Königinnen und Männchen (van Oystaeyen et al. 2021).

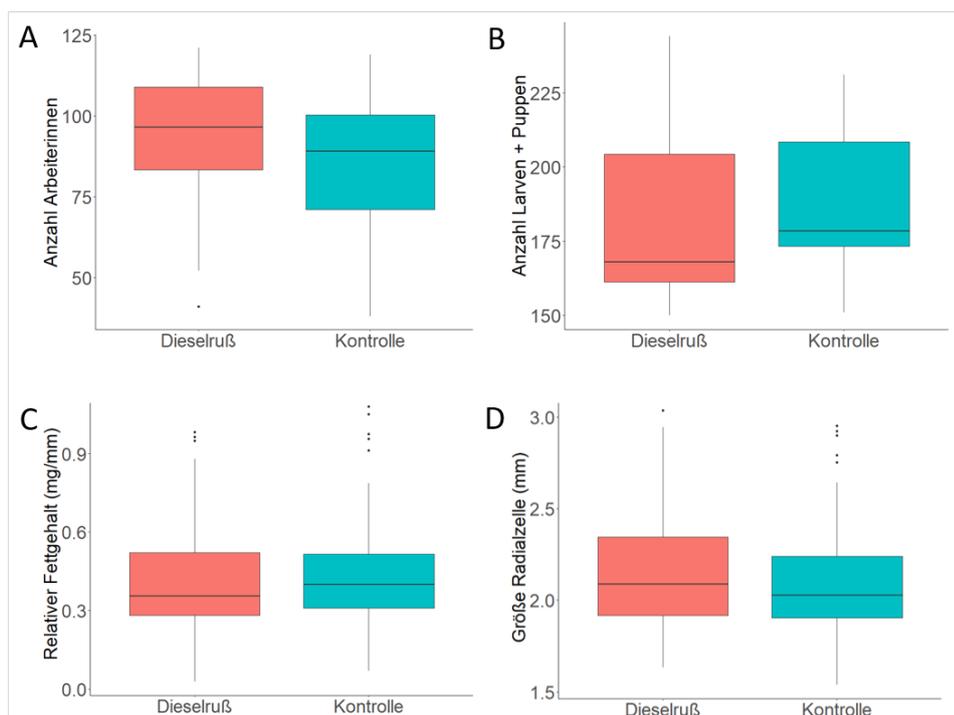


Abbildung 18: Entwicklung von *B. terrestris* Kolonien im Labor bei Fütterung mit Dieselruß-kontaminierten Pollen (0,2% w/w) versus Kontrollen mit nicht kontaminiertem Pollen. A: Anzahl Arbeiterinnen; B: Anzahl Larven und Puppen; C: Relativer Fettgehalt der Arbeiterinnen; D: Größe der Radialzelle der Vorderflügel der Arbeiterinnen als Maß für Körpergröße nach einem Zeitraum von 65 Tagen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen mit Dieselruß behandelten und Kontrollkolonien (n=10 Kolonien pro Gruppe).

4.3.6 Untersuchung der Effekte von LSV auf Hummelkolonien unter natürlichen Bedingungen: Kolonieentwicklung und Pathogenprävalenz

Es zeigte sich, dass die Ruß-exponierten Hummeln Probleme mit dem vertikalen Flugstart haben und deshalb zunächst längere Zeit benötigen, um zurück zur Kolonie zu fliegen. Anschließend zeigte sich allerdings kein signifikanter Unterschied in der Zeit, die die Hummeln benötigten, um die Kolonie wieder zu erreichen. Wir konnten auch keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Hummeln feststellen, die nicht mehr zurück in die Kolonie kamen.

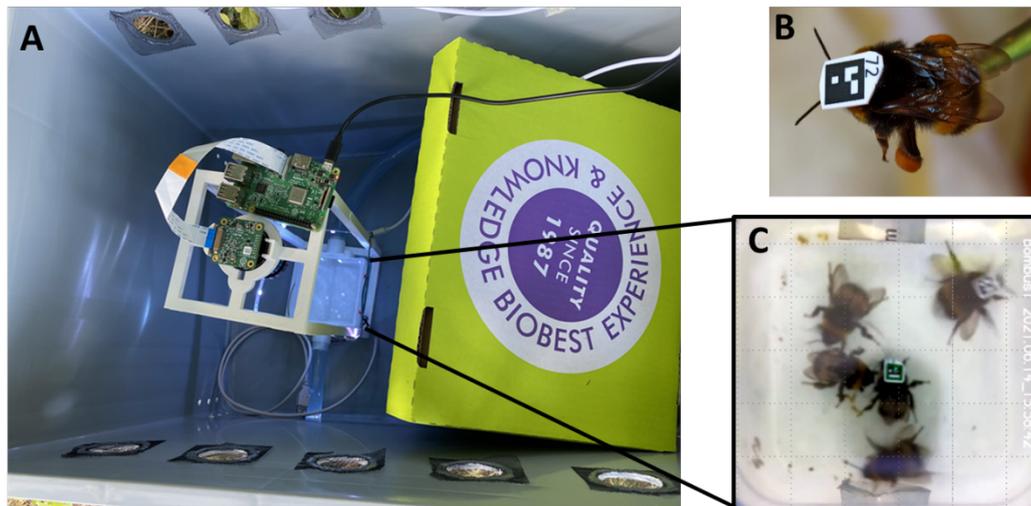


Abbildung 19: Setup für Freilandexperimente: Außenbox mit Hummelnest (A), Hummel mit aufgeklebtem Papier-Tag (B), Videoaufnahme mit automatisierter Hummelerkennung (C).

Für das Feldexperiment 2022 haben wir 20 Hummelkolonien aus kommerzieller Zucht (Biobest Group NV) zunächst in Außenboxen für 14 Tage (15.7. bis 28.7.2022) zur Eingewöhnung rund um die Universität Bayreuth an beschatteten Standorten mit (noch) relativ gutem Nahrungsangebot ausgebracht (Abb. 19). Da in diesem Zeitraum und auch nachfolgend extrem hohe Tagestemperaturen herrschten (z.T. bis 40°C) trat eine hohe Koloniesterblichkeit auf, so dass nach diesen 14 Tagen nur noch acht Kolonien für die nachfolgenden Versuche genutzt werden konnten. Diese acht Kolonien wurden dann zufällig in vier Kontrollkolonien und vier mit Dieselruß behandelte Kolonien aufgeteilt.

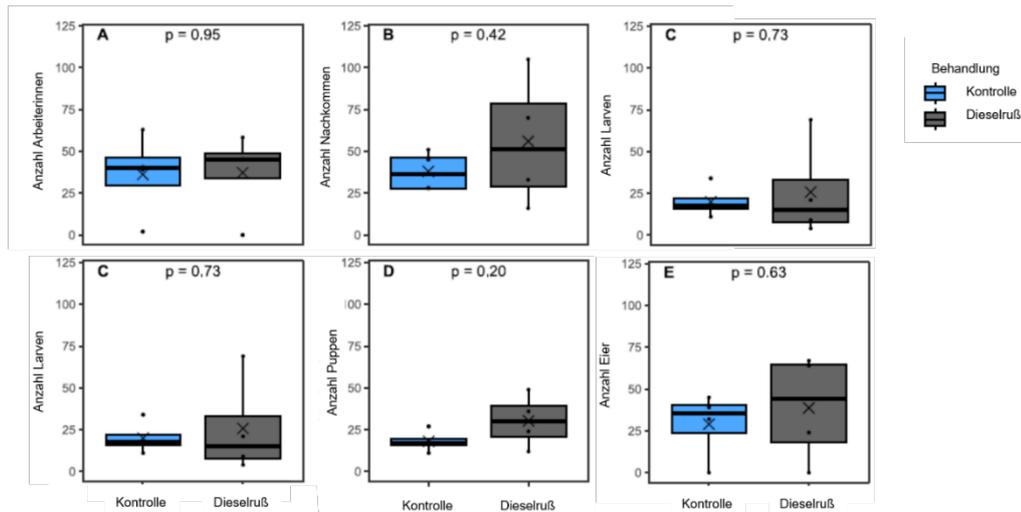


Abbildung 20: Anzahl Arbeiterinnen (A) sowie der Gesamtzahl Nachkommen (B), aufgeteilt in Larven (C), Puppen (D) und Eier (E) nach Ende des Freilandversuchs. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollkolonien und den mit DRP behandelten Kolonien (jeweils n=4).

Auch in diesem Feldversuch in der natürlichen Umgebung konnten wir keine signifikanten Effekte von DRP auf das Koloniewachstum (Abb. 20; Anzahl Arbeiterinnen nach Abschluss des Versuchs und die Brutentwicklung), und den individuellen Gesundheitszustand der Hummeln feststellen. Außerdem zeigte die ermittelte Anzahl von potentiellen Gastarten und Hummel-Antagonisten (wie etwa Schlupfwespen) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen. Wir gehen davon aus, dass potentielle Effekte auf die Kolonieentwicklung im Freiland durch die Exposition mit DRP durch die extreme Hitze und Trockenheit – und damit verbunden Nahrungsknappheit - überlagert worden sein könnten. Über den gesamten Versuchszeitraum zeigten die meisten der 8 Kolonien, die die Eingewöhnungsphase überlebt hatten, nur eine geringe Außenaktivität.

5 Zusammenfassung

5.1 Arbeitspaket 1: Erzeugung, Sammlung und Charakterisierung der Feinstaubpartikel

Das Arbeitspaket 1 umfasste ingenieurwissenschaftliche Aufgabenstellungen, durch die Feinstaubpartikel aus der motorischen Verbrennung erzeugt, gesammelt und charakterisiert werden. Dabei können folgende Kernaussagen zusammenfassend getroffen werden:

- Methodenentwicklung zur Herstellung von Feinstaubpartikeln:
Im Rahmen des Projekts wurde ein elektrostatisches Filtersystem in den Abgasstrang eines Diesel-Serienmotors integriert. Der Aufbau wurde darauf ausgelegt, größere Mengen an Partikelproben in Pulverform sammeln zu können, die für die physikochemische Analyse sowie die Exposition benötigt werden.
- Erzeugung von Partikeln unter verschiedenen Motorbetriebsszenarien:
Am Motorenprüfstand wurde ein Referenzzyklus etabliert, der jeweils Teil- und Volllastszenarien des innerstädtischen Stop-and-Go Betriebsverhaltens nachbildet, um eine Bandbreite an unterschiedlichen Partikeleigenschaften abzudecken.
- Charakterisierung der vom Dieselmotor emittierten Partikel:
Bei der Analyse der physikochemischen Eigenschaften der Rußpartikel des gesamten innerstädtischen Referenzzyklus können folgende Kernaussagen getroffen werden:
 - Partikelgrößenkonzentration:
Die Größe der gesammelten DRP variiert zwischen 52,1 nm und 101,9 nm. Die Betriebsart des Motors wirkt sich dabei charakteristisch auf die Partikelgrößenverteilung auf. Während Beschleunigungsphasen wurden hauptsächlich feste Partikel ausgestoßen, während lastfreien Laufzeiten hingegen überwiegend volatile Aerosole in der Nukleationsphase detektiert wurden.
 - Elementare Zusammensetzung:
Bezogen auf die Masse der Partikelproben konnte 72,2 % elementaren Kohlenstoff, 23,2 % organischen Anteilen und 4,6 % anorganischen Komponenten zugeschrieben werden. Anorganische Komponenten konnten u. a. auf Motorabrieb und Verbrennungsrückstände von Kraftstoff und Motoröl zurückgeführt werden
 - Analyse der chemischen Eigenschaften:
Von den sieben untersuchten PAK, die auf der EPA-Liste der hochprioritären PAK stehen, lag nur Pyren über der Bestimmungsgrenze mit einer Konzentration von 444 ppm. Die Konzentrationen von Fluoranthren und Phenanthren lagen über der Nachweisgrenze, aber unter der Bestimmungsgrenze.
 - Analyse der Nanostruktur:
Die Rußpartikel des Motorzyklus weisen eine hohe Bandbreite an physikalischen Eigenschaften auf. Es konnten u. a. ein ausgeprägter Anteil amorphen Kohlenstoff beobachtet werden. Diese ungeordneten Nanostrukturen wurden in Rußproben der Leerlaufbetriebspunkte und der Beschleunigungsphasen bildgebend aufgelöst. Raman-spektroskopische Untersuchungen deuten darauf hin, dass Rußproben des übrigen Motorzyklus über einen vergleichsweise hohen Grad der Graphitisierung verfügen.

- Freilanduntersuchungen zur Ermittlung der Feinstaubbelastung:
Die Feinstaubbelastung wurde an fünf Tagen und jeweils zwei Messstationen untersucht. In Straßennähe schwankte der Median-Durchmesser $D_{P,50}$ der Feinstaubbelastung im Tagesmittel zwischen 23,7 nm und 41,2 nm. Dabei konnten deutlich höhere maximale Partikelgrößenkonzentrationen gemessen werden als auf dem Land. Hier konnten Agglomerationsprozesse in der Atmosphäre beobachtet werden. Der $D_{P,50}$ schwankte zwischen 40,5 nm und 83,0 nm.

5.2 Arbeitspaket 2: ökotoxikologische Untersuchungen zu Effekten von LSV auf *B. terrestris*

Im Rahmen des Projekts wurden Expositionsszenarien der Hummeln mit DRP in einem Windkanal zur Simulation der trachealen Aufnahme in der Umwelt und über Zuckerwasser zur Simulation der oralen Aufnahme über den Nektar etabliert. Im nächsten Schritt wurden die Effekte von DRP auf *B. terrestris* nach akuter und chronischer oraler Exposition und nach akuter Exposition im Luftstrom charakterisiert. Des Weiteren wurden durch histologische Analysen und der Etablierung eines *tissue clearing* Verfahrens Akkumulationszonen definiert und Regionen für Effektanalysen etabliert. Die Effekte lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Nach akuter oraler Exposition über 48 h mit Dosen von 1 bis 16 g DRP/l Zuckerwasser konnte keine signifikant erhöhte Mortalität festgestellt werden.
- Die orale Exposition über einen Zeitraum von 10 Tagen, ergab eine signifikant erhöhte Mortalität ab 1 g DRP/l Zuckerwasser.
- Individuen, welche für 30 Minuten einem Luftstrom Rußpartikel exponiert waren, putzten sich signifikant länger, überlebten aber auch länger als die Kontrollindividuen. Dieses auf den ersten Blick überraschende Ergebnis ist damit zu erklären, dass die Kontrolltiere signifikant länger geflogen sind und deshalb mehr Energie verbraucht haben und weniger Reserven zur Verfügung standen. Dieses Ergebnis stellt daher wahrscheinlich ein dem Versuchsdesign geschuldetes Artefakt dar. In natürlichen Ökosystemen könnten längere Putzzeiten negative Auswirkungen auf Organismen haben, da sie dadurch weniger Zeit für die Suche nach Nahrung haben.
- Wir konnten geschlechtsspezifische Unterschiede der Partikelakkumulation im Darm bei *B. terrestris* nach oraler Aufnahme feststellen. Der verfütterte Ruß akkumuliert bei Weibchen vor allem im Bereich zwischen Mitteldarm und dem Beginn des Enddarms (Ileum), bei Männchen zusätzlich noch am Übergang von Proventrikulus zum Mitteldarm. Akkumulationszonen im Darm könnten dazu führen, dass adsorbierte organische Substanzen durch die längere Kontaktzeit potentiell Schäden an umliegendem Gewebe anrichten.

5.3 Arbeitspaket 3: Untersuchungen zu Effekten von LSV auf Physiologie-, Genexpressions- und Kolonieebene

Es wurden die Effekte subletaler Dosen der Rußpartikel auf physiologische Immun- und Stressantworten analysiert. Dabei wurde vor allem der Phenoloxidase-Signalweg und der Fettkörper eingehend betrachtet, da diese größtenteils für Immunantworten und Entgiftungsvorgänge verantwortlich sind. Weiterhin wurde der Einfluss von DRP nach oraler Aufnahme auf

das Darmmikrobiom und das Transkriptom untersucht. Letztlich galt es noch den Einfluss der Partikel auf die Entwicklung von Hummelkolonien im Freiland zu untersuchen. Folgende Ergebnisse lassen sich zusammenfassen:

- Entwicklung eines Windkanals zur Exposition der Hummeln im Luftstrom: Im Rahmen des Projekts wurde ein Messaufbau konzipiert und gebaut, um definierte Mengen an DRP im Luftstrom zu zerstäuben und für die Exposition zu dosieren. Der Größenbereich der Partikelproben im Windkanal ist vergleichbar mit den Analysen der ländlichen Messstation. Die Konzentration der zerstäubten Partikelproben im Windkanal entsprach Feinstaubbelastungen, die in Straßennähe gemessen werden konnten.
- Die orale Exposition mit subletalen Rußkonzentrationen zeigte keine signifikanten Änderungen in der Phenoloxidase- Aktivität gegenüber den Kontrollen.
- Der relative Körperfettanteil unterscheidet sich nicht signifikant zwischen rußexponierten Individuen und Kontrollindividuen von *B. terrestris*.
- Es konnten signifikante Veränderungen im Darmmikrobiom aber auch im Transkriptom von *B. terrestris* nach Exposition mit subletalen Dosen Dieselruß nachgewiesen werden. Das in Kontrollindividuen von *Gilliamella* und *Snodgrassella* dominierte Darmmikrobiom verändert sich, vor allem durch einen deutlichen Rückgang in der relativen Häufigkeit von *Snodgrassella*, welches als ein wichtiges Bakterium des Darmmikrobioms gesunder Hummeln angesehen wird, da es an der Bildung eines die Darminnenwand schützenden Biofilms beteiligt ist.
- Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Entwicklung zwischen mit DRP behandelten und Kontrollkolonien im Freiland beobachtet werden. Allerdings war der Sommer sehr heiß und trocken, wodurch der Einfluss des Rußes durch den starken Trocken- und Hitzestress maskiert worden sein könnte.

Wir können abschließend sagen, dass die gefundenen Effekte nach oraler Exposition, sowohl akut als auch chronisch, nur bei sehr hohen Dosen nachgewiesen werden konnten, welche wir in der Umwelt vermutlich nicht vorfinden werden. Das heißt aber nicht, dass Dieselruß nicht schädlich für Bestäuber sein kann. Es gibt Hinweise aus der Literatur, dass Dieselabgase die Lernfähigkeit einschränken und die Toleranz von Honigbienen gegenüber zusätzlichen Stressfaktoren verringern können (Reitmayer et al., 2019). Darüber hinaus führt Dieselruß zum Abbau von flüchtigen Stoffen in der Blüte, wodurch die chemische Kommunikation zwischen Bestäuber und Blüte gestört wird, was es den Insekten erschwert, geeignete Futterplätze zu finden (Girling et al., 2013; Lusebrink et al., 2015). Einige der von uns gefundenen Effekte, wie die deutlichen Veränderungen des Darmmikrobioms nach chronischer Exposition mit DRP bei deutlich subletalen Konzentrationen weisen aber darauf hin, dass auch geringere Konzentrationen an DRP langfristige Auswirkungen haben könnten und beispielsweise die Anfälligkeit der Hummeln gegenüber Pathogenen erhöht sein könnte und generell die Widerstandsfähigkeit gegenüber multipler Stressoren in der Umwelt beeinträchtigen könnte. Die von uns gefundenen Effekte auf das Darmmikrobiom sowie die von anderen Autoren gefundenen Effekte auf die Lernfähigkeit und Stresstoleranz (siehe oben) weisen auf negative Auswirkungen der DRP hin. Die Größe der Partikel sowie deren chemische Eigenschaften, wie z.B. der von uns nachgewiesene hohe Anteil an organischen Substanzen (speziell PAK), die an die Rußpartikel adsorbiert sind, könnten für diese negativen Effekte verantwortlich sein.

6 Ausblick

Emissionen von Feinstaub durch Verbrennungsmotoren und Bremsvorgänge sind lediglich zwei mögliche Quellen luftgetragener Schadstoffe, die mit dem Verkehr in Verbindung stehen. Um ein umfassendes Bild der Auswirkungen dieser Schadstoffe zu erhalten, ist eine gezielte Untersuchung verschiedener Feinstaubquellen mithilfe etablierter Expositionsverfahren unerlässlich. Dabei sollten auch der Reifenabrieb und andere Quellen von PM_{2,5}-Emissionen wie beispielsweise die Verbrennung von Holz in Haushalten oder Emissionen bei Produktionsprozessen (z.B. Metall- und mineralische Produktfertigung) berücksichtigt werden (Umweltbundesamt, 2022).

Wir haben in dem Bayökotox Teilprojekt 4 „Einfluss von Feinstaub auf Insekten“ den Grundstein für eine Gefährdungsbeurteilung von LSV gelegt in dem wir Dosis-Wirkungs-Kurven ermittelt haben. Jedoch müssen zukünftige Untersuchungen chronische Expositionen auf umweltrelevante Dosen und zusätzliche subletale Endpunkte erweitern. Beispielsweise könnten Untersuchungen zur generationsübergreifenden Toxizität oder zur Kommunikationsfähigkeit mittels Elektroantennographie weitere wichtige Erkenntnisse zur Toxizität von Dieselruß und Bremsabrieb liefern. Zusätzlich sollten Experimente mit multiplen Stressoren durchgeführt werden, da die Auswirkungen von Dieselruß in Kombination mit Pestiziden, Hitze, Parasiten oder Nahrungsmangel deutlich negativer für Hummelkolonien sein könnten. Bestäuber sind in der sich aktuell ändernden Umwelt oft mit solchen multiplen Stressoren konfrontiert (Goulson 2015). Da die Dunkle Erdhummel (*Bombus terrestris*) ein primitiv eusoziales Insekt ist und Effekte von Feinstaub auf Kolonieebene abgepuffert werden könnten, wäre es sinnvoll in zukünftigen Studien vergleichend auch mit solitären Wildbienen und Schwebfliegen zu arbeiten, welche häufig anfälliger für Stressoren sind.

7 Veröffentlichungen

Feldhaar, H., Otti, O. (2020) Pollutants and their interaction with diseases of social Hymenoptera. *Insects*, 11(3), 153.

Seidenath, D., Holzinger, A., Kemnitz, K., Langhof, N., Lücker, D., Opel, T., Otti, O. Feldhaar, H. (2021) Individual vs. combined short-term effects of soil pollutants on colony founding in a common ant species. *Frontiers in Insect Science*, 1,761881.

Ritschar, S., Hüftlein, F., Schell, L. M., Brehm, J., Laforsch, C. (2022) Taking advantage of transparency: A proof-of-principle for the analysis of the uptake of labeled microplastic particles by organisms of different functional feeding guilds using an adapted CUBIC protocol. *Science of the Total Environment*, 832, 154922.

Seidenath, D., Weig, A. R., Mittereder, A., Hillenbrand, T., Brüggemann, D., Opel, T., Langhof, N., Riedl, M., Feldhaar, H., Otti, O. (2023) Diesel exhaust particles alter gut microbiome and gene expression in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Ecology and Evolution*, im Druck. DOI: 10.1002/ece3.10180

Hüftlein, F., Seidenath, D., Mittereder, A., Hillenbrand, T., Brüggemann, D., Otti, O., Feldhaar, H., Laforsch, C., Schott, M. (2023) Effects of diesel exhaust particles on the health and survival of the buff-tailed bumblebee *Bombus terrestris* after acute and chronic oral exposure. Preprint unter <https://ssrn.com/abstract=4415186>

Literaturverzeichnis

- [1] Abbas, I., Badran, G., Verdin, A., Ledoux, F., Roumié, M., Courcot, D., Garçon, G. (2018) Polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives in airborne particulate matter: sources, analysis and toxicity. *Environmental Chemistry Letters*, 16(2), 439–475. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0697-0>
- [2] Apprill, A., McNally, S., Parsons, R., Weber, L. (2015) Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 75(2), 129-137. <https://doi.org/10.3354/ame01753>
- [3] Ariel, P. (2017) A beginner's guide to tissue clearing. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 84, 35–39. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.12.009>
- [4] Arnal, C., Alfè, M., Gargiulo, V. Alzueta, M., Millera, Á. et al. (2013) Characterization of soot in cleaner combustion. In: F. Battin – Leclerc, J. M. Simmie, E. Blurock (Eds.) *Cleaner Combustion – Developing Detailed Chemical Kinetic Models*. Springer, London, S. 333-362.
- [5] Bailey, L. (1952) The action of the proventriculus of the worker honeybee, *Apis mellifera* L. *Journal of Experimental Biology*, 29(2), 310–327.

- [6] Bazazi, S., Arganda, S., Moreau, M., Jeanson, R., Dussutour, A. (2016) Responses to nutritional challenges in ant colonies. *Animal Behaviour*, 111, 235-249. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2015.10.021>
- [7] Bebane, P. S., Hunt, B. J., Pegoraro, M., Jones, A. C., Marshall, H., Rosato, E., Mallon, E. B. (2019) The effects of the neonicotinoid imidacloprid on gene expression and DNA methylation in the buff-tailed bumblebee *Bombus terrestris*. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 286(1905), 20190718. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0718>
- [8] Borovsky, D., Linley, J. R., Kagan, J. (1987) Polycyclic aromatic compounds as photo-toxic mosquito larvicides. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 3(2), 246–250.
- [9] Borsuk, G., Ptaszyńska, A. A., Olszewski, K., Domaciuk, M., Krutmuang, P., Paleolog, J. (2017) A new method for quick and easy hemolymph collection from Apidae adults. *PloS One*, 12(1), e0170487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170487>
- [10] Calow, P. (1991) Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications. *Comparative Biochemistry and Physiology C Comparative Pharmacology and Toxicology*, 100(1-2), 3-6. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(91\)90110-f](https://doi.org/10.1016/0742-8413(91)90110-f)
- [11] Cameron, S. A., Sadd, B. M. (2020) Global trends in bumble bee health. *Annual Review of Entomology*, 65, 209–232. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011118-111847>
- [12] Chen, J., Guo, Y., Huang, S., Zhan, H., Zhang, M., Wang, J., Shu, Y. (2021) Integration of transcriptome and proteome reveals molecular mechanisms underlying stress responses of the cutworm, *Spodoptera litura*, exposed to different levels of lead (Pb). *Chemosphere*, 283, 131205. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131205>.
- [13] Colgan, T. J., Fletcher, I. K., Arce, A. N., Gill, R. J., Ramos Rodrigues, A., Stolle, E., Chittka, L., Wurm, Y. (2019) Caste-and pesticide-specific effects of neonicotinoid pesticide exposure on gene expression in bumblebees. *Molecular Ecology*, 28(8), 1964-1974. <https://doi.org/10.1111/mec.15047>
- [14] Cong, Y., Wang, Y., Zhang, M., Jin, F., Mu, J., Li, Z., Wang, J. (2021) Lethal, behavioral, growth and developmental toxicities of alkyl-PAHs and non-alkyl PAHs to early-life stage of brine shrimp, *Artemia parthenogenetica*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 220, 112302. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112302>
- [15] Danielsen, P. H., Møller, P., Jensen, K. A., Sharma, A. K., Wallin, H., Bossi, R., Autrup, H., Mølhav, L., Ravanat, J. L., Briedé, J. J., De Kok, T. M., Loft, S. (2011) Oxidative stress, DNA damage, and inflammation induced by ambient air and wood smoke particulate matter in human A549 and THP-1 cell lines. *Chemical Research in Toxicology*, 24(2), 168–184. <https://doi.org/10.1021/tx100407m>

- [16] DeBofsky, A., Xie, Y., Challis, J. K., Jain, N., Brinkmann, M., Jones, P. D., Giesy, J. P. (2021) Responses of juvenile fathead minnow (*Pimephales promelas*) gut microbiome to a chronic dietary exposure of benzo [a] pyrene. *Environmental Pollution*, 278, 116821. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116821>
- [17] Ding, J., Zhu, D., Wang, H.T., Lassen, S.B., Chen, Q.L., Li, G., Lv., M., Zhu, Y. G. (2020) Dysbiosis in the gut microbiota of soil fauna explains the toxicity of tire tread particles. *Environment, Science and Technology*, 54(12), 7450-7460. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c00917>
- [18] Dirzo, R., Young, H. S., Galetti, M., Ceballos, G., Isaac, N. J. B., & Collen, B. (2014) Defaunation in the Anthropocene. *Science*, 345(6195), 401–406. <https://doi.org/10.1126/science.1251817>
- [19] Dudley, R., Ellington, C. P. (1990) Mechanics of forward flight in bumblebees. *Journal of Experimental Biology*, 148, 19–52. <https://doi.org/10.1242/jeb.148.1.19>
- [20] Erlandson, M. A., Toprak, U., Hegedus, D. D. (2019) Role of the peritrophic matrix in insect-pathogen interactions. *Journal of Insect Physiology*, 117, 103894. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103894>
- [21] Ferreira, N. G. C., Morgado, R., Santos, M. J. G., Soares, A. M. V. M., Loureiro, S. (2015) Biomarkers and energy reserves in the isopod *Porcellionides pruinosus*: The effects of long-term exposure to dimethoate. *Science of the Total Environment*, 502, 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.062>
- [22] Fiebig, M., Knauer, M., Schmid, J., Ivleva, N. P., Grotheer, H., Hoffmann K., Wahl C. (2011) Reaktiver Ruß - Filterregeneration durch reaktiven Ruß. FVV-Abschlussbericht Vorhaben Nr. 954, Heft 943-2011.
- [23] Friard, O., Gamba, M. (2016) BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(11), 1325–1330. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12584>
- [24] Girling, R. D., Lusebrink, I., Farthing, E., Newman, T. A., Poppy, G. M. (2013) Diesel exhaust rapidly degrades floral odours used by honeybees. *Scientific Reports*, 3, 2779. <https://doi.org/10.1038/srep02779>
- [25] Goulson, D. (2003). *Bumblebees: their behaviour and ecology*. Oxford University Press, USA.
- [26] Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., Rotheray, E. L. (2015) Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229). <https://doi.org/10.1126/science.1255957>

- [27] Granero, A. M., Sanz, J. M. G., Gonzalez, F. J. E., Vidal, J. L. M., Dornhaus, A., Ghani, J., A. Roldán Serrano & Chittka, L. (2005). Chemical compounds of the foraging recruitment pheromone in bumblebees. *Naturwissenschaften*, 92, 371-374. <https://doi.org/10.1007/s00114-005-0002-0>
- [28] Gupta, S. K., Kupper, M., Ratzka, C., Feldhaar, H., Vilcinskas, A., Gross, R., Dandekar, T., Förster, F. (2015) Scrutinizing the immune defence inventory of *Camponotus floridanus* applying total transcriptome sequencing. *BMC Genomics*, 16(1), 540. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1748-1>
- [29] Haine, E. R., Rolff, J., Siva-Jothy, M. T. (2007) Functional consequences of blood clotting in insects. *Developmental & Comparative Immunology*, 31(5), 456-464. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.08.004>
- [30] Hallmann, C. A., Sorg, M., Jongejans, E., Siepel, H., Hofland, N., Schwan, H., Stenmans, W., Müller, A., Sumser, H., Hörren, T., Goulson, D., De Kroon, H. (2017) More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PLoS ONE*, 12(10): e0185809. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185809>
- [31] Hammer, T. J., Le, E., Martin, A. N., Moran, N. A. (2021) The gut microbiota of bumblebees. *Insectes Sociaux*, 68(4), 287-301. <https://doi.org/10.1007/s00040-021-00837-1>
- [32] Hedges, C. P., Wilkinson, R. T., Devaux, J. B. L., Hickey, A. J. R. (2019) Hymenoptera flight muscle mitochondrial function: Increasing metabolic power increases oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 230, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.01.002>
- [33] Honda, M., & Suzuki, N. (2020). Toxicities of polycyclic aromatic hydrocarbons for aquatic animals. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(4), 1363. <https://doi.org/10.3390/ijerph17041363>
- [34] Hopke, P. K., Dai, Q., Li, L., Feng, Y. (2020) Global review of recent source apportionments for airborne particulate matter. *Science of the Total Environment*, 740, 140091. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140091>
- [35] Huang, X., Xu, X., Li, R., Wang, S., Tian, L. (2023) Ultrastructure and distribution of antennal sensilla of *Bombus terrestris* (Hymenoptera : Apidae). *Zoologischer Anzeiger*, 302, 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2022.12.006>
- [36] IPCC (2022) Summary for policymakers. *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.*
- [37] Keith, L. H. (2015). The source of US EPA's sixteen PAH priority pollutants. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 35(2-4), 147-160

- [38] Konno, A., Okazaki, S. (2018) Aqueous-based tissue clearing in crustaceans. *Zoological Letters*, 4, 13. <https://doi.org/10.1186/s40851-018-0099-6>
- [39] Lusebrink, I., Girling, R. D., Farthing, E., Newman, T. A., Jackson, C. W., Poppy, G. M. (2015) The effects of diesel exhaust pollution on floral volatiles and the consequences for honey bee olfaction. *Journal of Chemical Ecology*, 41(10), 904–912. <https://doi.org/10.1007/s10886-015-0624-4>
- [40] Massimino, L., Bulbarelli, A., Corsetto, P. A., Milani, C., Botto, L., Farina, F., Lamparelli, L. A., Lonati, E., Ungaro, F., Maddipati, K. R., Palestini, P., Rizzo, A. M. (2022) LSEA Evaluation of lipid mediators of inflammation in lung and cortex of mice exposed to diesel air pollution. *Biomedicines*, 10(3), 712. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10030712>
- [41] McGrath, J. A., Joshua, N., Bess, A. S., Parkerton, T. F. (2019) Review of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) sediment quality guidelines for the protection of benthic life. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 15(4), 505–518. <https://doi.org/10.1002/ieam.4142>
- [42] Medler, J. T. (1962) Morphometric studies on bumble bees. *Annals of the Entomological Society of America*, 55(2), 212-218.
- [43] Mesquita, S. R., Dachs, J., van Drooge, B. L., Castro-Jiménez, J., Navarro-Martín, L., Barata, C., Vieira, N., Guimarães, L., Piña, B. (2016) Toxicity assessment of atmospheric particulate matter in the Mediterranean and Black Seas open waters. *Science of the Total Environment*, 545–546, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.055>
- [44] Mockler, B. K., Kwong, W. K., Moran, N. A., Koch, H. (2018) Microbiome structure influences infection by the parasite *Crithidia bombi* in bumble bees. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(7), e02335-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02335-17>
- [45] Näpflin, K., Schmid-Hempel, P. (2018) High gut microbiota diversity provides lower resistance against infection by an intestinal parasite in bumblebees. *American Naturalist*, 192(2), 131-141. <https://doi.org/10.1086/698013>
- [46] Naka K, Watarai S, Inoue K, Kodama Y, Oguma K, Yasuda T, Kodama H (2001) Adsorption effect of activated charcoal on enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 63(3), 281-285. <https://doi.org/10.1292/jvms.63.281>
- [47] Ne'eman, G., Ne'eman, R. (2017) Factors determining visual detection distance to real flowers by bumble bees. *Journal of Pollination Ecology*, 20(1), 1–12. [https://doi.org/10.26786/1920-7603\(2017\)one](https://doi.org/10.26786/1920-7603(2017)one)
- [48] OECD (2017) Guideline for the testing of chemicals: Bumblebee, acute contact toxicity test. OECD No. 247. <https://doi.org/10.1787/9789264284104-en>

- [49] Pambianchi, E., Pecorelli, A., Valacchi, G. (2022). Gastrointestinal tissue as a “new” target of pollution exposure. *IUBMB Life*, 74(1), 62–73. <https://doi.org/10.1002/iub.2530>
- [50] Pellecchia, M., & Negri, I. (2018). Particulate matter collection by honey bees (*Apis mellifera*, L.) near to a cement factory in Italy. *PeerJ*, 6, e5322. <https://doi.org/10.7717/peerj.5322>
- [51] Peng, Y., Marston, J. M. (1986). Filtering mechanism of the honey bee proventriculus. *Physiological Entomology*, 11(4), 433–439. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1986.tb0043>
- [52] Pikula, K., Tretyakova, M., Zakharenko, A., Johari, S. A., Ugay, S., Chernyshev, V., Chaika, V., Kalenik, T., Golokhvast, K. (2021) Environmental risk assessment of vehicle exhaust particles on aquatic organisms of different trophic levels. *Toxics*, 9, 261. <https://doi.org/10.3390/toxics9100261>
- [53] Pimm, S. L., Raven, P. (2000) Extinction by numbers. *Nature*, 403(6772), 843–845.
- [54] Raymann, K., Moran, N. A. (2018) The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current Opinion in Insect Science*, 26, 97-104. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.012>
- [55] Reitmayer, C. M., Ryalls, J. M. W., Farthing, E., Jackson, C. W., Girling, R. D., Newman, T. A. (2019) Acute exposure to diesel exhaust induces central nervous system stress and altered learning and memory in honey bees. *Scientific Reports*, 9, 5793. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41876-w>
- [56] Reyes-Caballero, H., Rao, X., Sun, Q., Warmoes, M. O., Penghui, L., Sussan, T. E., Park, B., Fan, T. W. M., Maiseyeu, A., Rajagopalan, S., Girnun, G. D., Biswal, S. (2019). Air pollution-derived particulate matter dysregulates hepatic Krebs cycle, glucose and lipid metabolism in mice. *Scientific Reports*, 9, 17423. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53716-y>
- [57] Richardson, D. S., & Lichtman, J. W. (2015). Clarifying tissue clearing. *Cell*, 162(2), 246-257. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.067>
- [58] Ritschar, S., Hüftlein, F., Schell, L. M., Brehm, J., Laforsch, C. (2022) Taking advantage of transparency: A proof-of-principle for the analysis of the uptake of labeled microplastic particles by organisms of different functional feeding guilds using an adapted CUBIC protocol. *Science of the Total Environment*, 832, 154922. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154922>
- [59] Rizzo, A. M., Corsetto, P. A., Farina, F., Montorfano, G., Pani, G., Battaglia, C., Sancini, G., Palestini, P. (2014). Repeated intratracheal instillation of PM10 induces lipid reshaping in lung parenchyma and in extra-pulmonary tissues. *PLoS ONE*, 9(9), e106855. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106855>

- [60] Rothman, J. A., Russell, K. A., Leger, L., McFrederick, Q. S., Graystock, P. (2020) The direct and indirect effects of environmental toxicants on the health of bumblebees and their microbiomes. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 287(1937), 20200980. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0980>
- [61] Sadezky, A., Muckenhuber, H., Grothe, H., Niessner, R., Pöschl, U. (2005) Raman microspectroscopy of soot and related carbonaceous materials: Spectral analysis and structural information. *Carbon* 43(8), 1731-1742. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2005.02.018>
- [62] Saleh, N., Scott, A. G., Bryning, G. P., Chittka, L. (2007). Distinguishing signals and cues: bumblebees use general footprints to generate adaptive behaviour at flowers and nest. *Arthropod-Plant Interactions*, 1(2), 119–127. <https://doi.org/10.1007/s11829-007-9011-6>
- [63] Sánchez-Bayo, F., Wyckhuys, K. A. G. (2019). Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biological Conservation*, 232, 8–27. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.020>
- [64] Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- [65] Schott, M., Wehrenfennig, C., Gasch, T., Düring, R. A., & Vilcinskas, A. (2013). A portable gas chromatograph with simultaneous detection by mass spectrometry and electroantennography for the highly sensitive in situ measurement of volatiles. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405, 7457-7467. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7196-3>
- [66] Schott, M., Sandmann, M., Cresswell, J. E., Becher, M. A., Eichner, G., Brandt, D. T., Halitschke, R., Krueger, S., Morlock, G., Düring, R. A., Vilcinskas, A., Meixner, M. D., Büchler, R., Brandt, A. (2021). Honeybee colonies compensate for pesticide-induced effects on royal jelly composition and brood survival with increased brood production. *Scientific Reports*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79660-w>
- [67] Seong H., Boehman A. (2013) Evaluation of Raman parameters using visible Raman microscopy for soot oxidative reactivity. *Energy Fuels* 27(3), 1613-1624. <https://doi.org/10.1021/ef301520y>
- [68] Silva, C. J. M., Beleza, S., Campos, D., Soares, A. M. V. M., Patrício Silva, A. L., Pestana, J. L. T., Gravato, C. (2021) Immune response triggered by the ingestion of polyethylene microplastics in the dipteran larvae *Chironomus riparius*. *Journal of Hazardous Materials*, 414, 125401. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125401>
- [69] Sørensen, F. F., Bayley, M., & Baatrup, E. (1995). The effects of sublethal dimethoate exposure on the locomotor behavior of the collembolan *Folsomia candida* (Isotomidae). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 14(9), 1587-1590. <https://doi.org/10.1002/etc.5620140919>

- [70] Statistisches Bundesamt. (2022) Statistiken zu Dieselfahrzeugen. <https://de.statista.com/themen/2564/dieselfahrzeuge/#dossierKeyfigures>
- [71] Steinbrecht, R. A. (2007). Structure and function of insect olfactory sensilla. *Novartis Foundation Symposia*, 158–183. <https://doi.org/10.1002/9780470514948.ch13>
- [72] Suarez, R. K., Staples, J. F., Lighton, J. R. B., West, T. G. (1997) Relationships between enzymatic flux capacities and metabolic flux rates: Nonequilibrium reactions in muscle glycolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(13), 7065–7069. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.7065>
- [73] Sun, K., Song, Y., He, F., Jing, M., Tang, J., Liu, R. (2021) A review of human and animals exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: Health risk and adverse effects, photo-induced toxicity and regulating effect of microplastics. *Science of the Total Environment*, 773, 145403. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145403>
- [74] Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P., Palmer, J. D. (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), 327-338. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>
- [75] Ueda, H. R., Ertürk, A., Chung, K., Gradinaru, V., Chédotal, A., Tomancak, P., Keller, P. J. (2020) Tissue clearing and its applications in neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(2), 61–79. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0250-1>
- [76] Uhl, P., Franke, L. A., Rehberg, C., Wollmann, C., Stahlschmidt, P., Jeker, L., & Brühl, C. A. (2016). Interspecific sensitivity of bees towards dimethoate and implications for environmental risk assessment. *Scientific reports*, 6(1), 34439. <https://doi.org/10.1038/srep34439>
- [77] Umweltbundesamt (2022) Emission von Feinstaub der Partikelgröße PM2,5. <https://www.umweltbundesamt.de/daten/luft/luftschadstoff-emissionen-in-deutschland/emission-von-feinstaub-der-partikelgroesse-pm25#emissionsentwicklung> (aufgerufen am 03.03.2022).
- [78] Uy, D., Ford, M. A., Jayne, D. T., Haack, L. P., Hangas, J., Jagner, M. J., Sammut, A., Gangopadhyay, A. K. (2014) Characterization of gasoline soot and comparison to diesel soot: morphology, chemistry, and wear. *Tribology International*, 80, 198-209. <https://doi.org/10.1016/j.triboint.2014.06.009>
- [79] Van Der Zande, M., Jemec Kokalj, A., Spurgeon, D. J., Loureiro, S., Silva, P. V., Khodaparast, Z., Drobne, D., Clark, N. J., Van Den Brink, N. W., Baccaro, M., Van Gestel, C. A. M., Bouwmeester, H., Handy, R. D. (2020) The gut barrier and the fate of engineered nanomaterials: A view from comparative physiology. *Environmental Science: Nano*, 7(7), 1874–1898. <https://doi.org/10.1039/d0en00174k>
- [80] Van Oystaeyen, A., Klatt, B. K., Petit, C., Lenaerts, N., Wäckers, F. (2021) Short-term

lab assessments and microcolonies are insufficient for the risk assessment of insecticides for bees. *Chemosphere*, 273, 128518. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128518>

- [81] Vaudo, A. D., Stabler, D., Patch, H. M., Tooker, J. F., Grozinger, C. M., Wright, G. A. (2016) Bumble bees regulate their intake of essential protein and lipid pollen macronutrients. *Journal of Experimental Biology*, 219(24), 3962-3970. <https://doi.org/10.1242/jeb.155911>
- [82] Vishnudas, V., Vigoreaux, J. O. (2007) Sustained high power performance. In: J. O. Vigoreaux (Ed.), *Nature's Versatile Engine: Insect Flight Muscle Inside and Out*. Springer Science and Business Media, New York, S. 188 – 196.
- [83] Wang, H., Xia, X., Wang, Z., Liu, R., Muir, D. C. G., & Wang, W. X. (2021) Contribution of dietary uptake to PAH bioaccumulation in a simplified pelagic food chain: Modelling the influences of continuous vs intermittent feeding in zooplankton and fish. *Environmental Science and Technology*, 55(3), 1930–1940. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06970>
- [84] Wagner, D. L. (2020) Insect declines in the Anthropocene. *Annual Review of Entomology*, 65(1), 457–480. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-025151>
- [85] Wei, T., Tang, M. (2018) Biological effects of airborne fine particulate matter (PM_{2.5}) exposure on pulmonary immune system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 60, 195-201. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.04.004>
- [86] Wichmann, H. E. (2007) Diesel exhaust particles. *Inhalation Toxicology*, 19(SUPPL. 1), 241–244. <https://doi.org/10.1080/08958370701498075>
- [87] Zhang, Q. L., Guo, J., Deng, X. Y., Wang, F., Chen, J.Y., Lin, L.B. (2019) Comparative transcriptomic analysis provides insights into the response to the benzo (a) pyrene stress in aquatic firefly (*Luciola leii*). *Science of the Total Environment*, 661, 226-234. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.156>
- [88] Zöllner, C., Brüggemann, D. (2019) Einsatz optischer und analytischer Methoden zur Bewertung des Betriebsverhaltens von Partikelfiltersystemen für die Anwendung im Verkehr. Dissertation, LTTT, Universität Bayreuth, 2019 Band 34 der Reihe: D. Brüggemann (Hrsg.): *Thermodynamik - Energie, Umwelt, Technik*. ISBN 978-3-8325-5032-5, Logos-Verlag, Berlin (2019)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Arbeitspakete des Teilprojekts 4 des Projektverbunds BayÖkotox. LTTT = Lehrstuhl für Technische Thermodynamik und Transportprozesse.	8
Abbildung 2:	Drehzahl-Drehmomentkennlinie des innerstädtischen Referenzzyklus.	9
Abbildung 3:	Temperaturprogramm zur Thermogravimetrische Analyse der Rußproben	10
Abbildung 4:	Übersichtsbild des 6. Flagellomers der rechten Antenne von <i>B. terrestris</i> . Rote Rahmen wurden hinzugefügt, um die Positionen für Detailaufnahmen anzuzeigen.....	14
Abbildung 5:	Partikelgrößenverteilung während ausgewählter Phasen des innerstädtischen Motorzyklus und bei Exposition der Hummeln im Windkanal.....	18
Abbildung 6:	Elementare Analyse der Rußpartikel mittels Thermogravimetrischer Analyse (links) und ICP-OES (rechts).	19
Abbildung 7:	Raman-Signal der Motor- und Vergleichsproben (links) sowie TEM-Analyse der Nanostruktur (rechts).....	19
Abbildung 8:	Partikelgrößenverteilung bei Freilandmessungen.	21
Abbildung 9:	Überlebenswahrscheinlichkeit der Hummeln über den Zeitraum von 10 Tagen, die Kontrolllösungen, der Lösungsmittelkontrolle, den Konzentrationen 0,5, 1 und 2 DRP/l Zuckerwasser und Dimethoat ausgesetzt waren. Der p-Wert zeigt signifikante Unterschiede zwischen den Kaplan-Meier-Kurven der verschiedenen Behandlungsgruppen an. Verändert nach Hüftlein et al.,2023.....	23
Abbildung 10:	Überlebensdauer in Minuten (A) von <i>B. terrestris</i> Individuen nach 30-minütiger Ruß Exposition in einer Flugversuchsschale verglichen mit der Kontrolle; (B) Korrelation der Überlebensdauer in Minuten mit der Flugaktivität in Sekunden der Ruß-exponierten Tiere (dunkelblau) und der Kontrollen (hellblau); Putzaktivität in Prozent (C) und Flugaktivität in Prozent (D) während der Expositionszeit von Ruß-exponierten Tieren gegenüber den Kontrollen. N= 30.	24
Abbildung 11:	Vergleich von Hummelarbeiterinnen der verschiedenen Behandlungsmethoden in CUBIC-R (gelb markiert: Partikel im Gastrointestinaltrakt) nach 3 Tagen mit Futterlösung ohne Partikel.	25
Abbildung 12:	Vergleich des relativen Anteils an Partikeln an der Gesamtfläche der Sensillenbasis der Hummelantennen zwischen Bremsabrieb und Kontrolle. Die roten Punkte stehen für den Mittelwert. Sterne kennzeichnen die Signifikanz (***) = $p < 0.001$).	27
Abbildung 13:	Vergleiche der maximalen EAG-Antwort in mV zwischen A) 0 und 5 Minuten bei Kontrollantennen; B) 0 und 5 Minuten bei Bremsabriebantennen und zwischen C) Kontrolle und Bremsabrieb nach	

0 Minuten und D) Kontrolle und Bremsabrieb nach 5 Minuten. Die roten Punkte stehen für den Mittelwert.....	27
Abbildung 14: Aufbau für die Exposition von Hummeln mit Rußpartikelproben.....	28
Abbildung 15: Phenoloxidase-Aktivität der verschiedenen Behandlungsgruppen (Kontrolle, Lösungsmittelkontrolle, Ruß 0,2 g/l, Ruß 0,4 g/l, Ruß 0,8 g/l). Die schwarzen Punkte zeigen die individuellen Messungen, die roten Punkte zeigen den Mittelwert der jeweiligen Behandlungsgruppe. Die Boxplots reichen vom 25. bis zum 75. Perzentil mit dem Median als horizontale Linie.....	29
Abbildung 16: Heat-Map der differentiell exprimierten Gene von Hummelarbeiterinnen. Während sich Arbeiterinnen verschiedener Kolonien bei gleicher Behandlung stark in ihrem Genexpressionsmuster ähneln, führt die Behandlung mit DRP zu einer signifikant veränderten Genexpression.....	30
Abbildung 17: Relative Häufigkeiten der Bakterien im Darmmikrobiom von <i>B. terrestris</i> Arbeiterinnen. Die Bakterien <i>Gilliamella</i> sp. und <i>Snodgrassella</i> sp. sind typischerweise im Darmmikrobiom der Hummeln vertreten und sind an der Bildung eines Biofilms entlang der peritropischen Membran im Darm der Hummeln beteiligt. Dieser Biofilm hat wahrscheinlich eine wichtige Schutzfunktion gegenüber Pathogenen oder Umweltschadstoffen im Darm.....	31
Abbildung 18: Entwicklung von <i>B. terrestris</i> Kolonien im Labor bei Fütterung mit Dieselruß-kontaminierten Pollen (0,2% w/w) versus Kontrollen mit nicht kontaminiertem Pollen. A: Anzahl Arbeiterinnen; B: Anzahl Larven und Puppen; C: Relativer Fettgehalt der Arbeiterinnen; D: Größe der Radialzelle der Vorderflügel der Arbeiterinnen als Maß für Körpergröße nach einem Zeitraum von 65 Tagen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen mit Dieselruß behandelten und Kontrollkolonien (n=10 Kolonien pro Gruppe).	32
Abbildung 19: Setup für Freilandexperimente: Außenbox mit Hummelnest (A), Hummel mit aufgeklebtem Papier-Tag (B), Videoaufnahme mit automatisierter Hummelerkennung (C).....	33
Abbildung 20: Anzahl Arbeiterinnen (A) sowie der Gesamtzahl Nachkommen (B), aufgeteilt in Larven (C), Puppen (D) und Eier (E) nach Ende des Freilandversuchs. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollkolonien und den mit DRP behandelten Kolonien (jeweils n=4).	34