



Schlussbericht

Referenzsystem für ein vitales Bienenvolk „FIT BEE“ - Modul 2

Zuwendungsempfänger: Goethe-Universität Frankfurt am Main	Förderkennzeichen: 2817100310
Berichtszeitraum: 01.04.2011 – 31.08.2015	

Innovative Tools zur Diagnose von Schädigungen durch Pflanzenschutzmittel und Bienenpathogene beim Lern- und Orientierungsverhalten

I. Ziele

Subletale Effekte von Pflanzenschutzmitteln können die Vitalität des Volkes beeinträchtigen, das Lernverhalten und das Orientierungsvermögen stören, sowie die Entwicklung der Biene beeinträchtigen. Wir wollten grundlegend neue Verfahren entwickeln, um Pflanzenschutzmittelvergiftungen auf den Organismus Honigbiene zu diagnostizieren. Um das Gefährdungspotential von Insektiziden zu bestimmen, wurde untersucht, wie Pflanzenschutzmittel das Verhalten von Honigbienen beeinträchtigen (Verhaltensphysiologie). Hieraus wollten wir einen verlässlichen, einfach zu handhabenden Verhaltensassay (Heimfindeverhalten) entwickeln. Die Wirkungen von Pflanzenschutzmittel auf das Nervensystem wurden mit elektrophysiologischen Methoden untersucht. Die Praxisrelevanz unserer Verfahren wurde in einem Feldversuch in Kooperation mit dem Bieneninstitut Kirchhain (Modul 1) getestet. Durch unsere Entwicklungen sollten verlässliche Diagnosemethoden zur Verfügung gestellt werden, mit denen sich Schädigungen ihrer Bienenvölker frühzeitig erkennen lassen.

1. Aufgabenstellung

Das Vorhaben hatte die Aufgabe, Verhaltenstools zu entwickeln, die es geschultem Fachpersonal ermöglichen, Insektizidvergiftungen bereits unterhalb der für ein Bienenvolk gefährlichen Schadschwelle zu diagnostizieren. Diese Diagnosetools sollten aber auch als Entscheidungshilfe für Institutionen dienen, die an der Zulassung von Pflanzenschutzmitteln beteiligt sind, dienen. Gleichzeitig sollten praxisrelevante Feldstudien die Relevanz der

Laborversuche klären. Diesen Aufgabenstellungen sind wir in vier parallelen Ansätzen nachgegangen: 1. Entwicklung eines Heimfindeassays, 2. Aufklärung physiologischer Wirkmechanismen von Insektiziden, 3. Analyse von brutschädigenden Effekten auf Bienenlarven, 4. Feldversuch mit ganzen Völkern. Während die ersten drei Projekte auf individuelle Wirkungen abzielten, wurde im Feldversuch die Praxisrelevanz unserer Beobachtungen überprüft. Im Fokus unseres Projektes standen die Neonikotinoide, eine Gruppe von Insektiziden, deren Risiken für die Vitalität von Bienenvölkern derzeit sehr kontrovers diskutiert werden. Der Projektverlauf entsprach im Wesentlichen dem im Antrag dargestellten Projektplan. Im ersten Jahr wurde in Kooperation mit Modul 1 der Feldversuch mit Thiaclopid gestartet. Er war auf drei Jahre angelegt, entsprechend wurde er 2014 beendet. Ebenfalls im Sommer 2011 wurden erste Versuche zum Heimfindevermögen unternommen, die sehr erfolgreich verliefen. Hingegen verliefen unsere Versuche, die Wirkungen von Neonikotinoiden auf Bienenneuronen in vivo zu untersuchen nicht erfolgreich. Hier gab es zahlreiche methodische Probleme. Da jedoch Ableitungen von Muskelpotenzialen deutliche Effekte von Neonikotinoiden zeigten, wurden diese Versuche weitergeführt und 2015 erfolgreich beendet. Bei den immundiagnostischen Analysen stellte sich heraus, dass die Quantifizierung der immunschädigenden Wirkungen von Insektiziden nur schwer durchzuführen ist und in Zellkultur eine hohe Variabilität beobachtbar ist. Aus zwei Gründen haben wir diese Versuche nicht weiterverfolgt: einerseits wurde dieses Projekt, das ja von Anfang an mit unserem Partner aus Modul 1 geplant war, an ganzen Bienen in vivo in Kirchhain weitergeführt. Andererseits haben wir beobachtet, dass die Verabreichung von Neonikotinoiden zu einer Beeinträchtigung des Bruterfolges im Volk führt. Insektizide führen zu einer Abnahme der AcetylcholinKonzentration im Futtersaft, was einen völlig neuen Wirkmechanismus darstellt. Daher haben wir uns auf die Brutentwicklung und deren Beeinflussung durch Neonikotinoide konzentriert.

2. Stand der Technik

Zu Beginn des Projektes war bekannt, dass Neonikotinoide auf den Acetylcholinrezeptor von Honigbienen wirken (Nauen et al. 2001; Deglise et al. 2002). Ebenso waren einige Beobachtungen über Verhaltenseffekte von Neonikotinoiden auf Honigbienen publiziert z. B. auf das Heimfindeverhalten (Bortolotti et al. 2003) oder das Duftlernen (Decourtye et al. 2005; Reviews: Tomizawa und Casida 2003; Godfray et al. 2014). Feldstudien mit Neonikotinoiden waren noch keine durchgeführt worden. Daher gab es zum Zeitpunkt der Antragstellung erhebliche Informationslücken zur Gefährlichkeit der Substanzen auf Honigbienen und kaum standardisierte und wissenschaftlich abgesicherte Methoden und Befunde. Die Recherchen zum Stand der Forschung auf diesem Gebiet wurden nach wissenschaftlichen Methoden durchgeführt und die anerkannten Plattformen *Web of Science*

Core Collection (Zugang über die Universitätsbibliothek) und Pubmed (unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> frei verfügbar). Die Methoden, die wir zur Erreichung unserer Ziele einsetzen wollten, waren teilweise bereits beschrieben (z. B. RFID-Technologie: Streit et al. 2003; künstliche Larvenaufzucht: Peng *et al.*, 1992). Andere Methoden wurden für unsere Zwecke modifiziert (z. B. Versuche mit kleinen Bienenvölkern unter Flugzelten, Präparation von Futtersaftrüsen) oder waren in Oberursel bereits gut etabliert (Muskelableitungen, Lernexperimente).

Referenzen:

- Bortolotti L., Montanari R., Marcelino J., Medrzycki P., Maini S., Porrini C. 2003 Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. *Bulletin of Insectology* **56**, 63--67.
- Decourtye A, Devillers J, Genecque E, Le Menach K, Budzinski H, et al. (2005) Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Archives of environmental contamination and toxicology* **48**: 242-250.
- Déglise P, Grünwald B, and Gauthier M (2002) The insecticide imidacloprid is an agonist of the honeybee neuronal nicotinic receptor. *Neurosci Lett* **321**:13-16
- Godfray HC, Blacquiere T, Field LM, Hails RS, Petrokofsky G, Potts SG, Raine NE, Vanbergen AJ, McLean AR. 2014. A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proc R Soc B* **281**:20140558.
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U. and Schmuck, R., Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis Mellifera* (Hymenoptera: Apidae), *Pest. Manag. Sci.*, **57** (2001) 577-586
- Peng YC, Mussen E, Fong A, Montague MANN, Tyler TIM. 1992. Effects of Chlortetracycline of Honey Bee Worker Larvae Reared in Vitro. *J. Invertebr. Pathol.* **60**:127–133.
- Streit S, Bock F, Pirk CWW, Tautz J (2003) Automatic life-long monitoring of individual insect behaviour now possible. *Zoology* **106**: 169–171. doi:10.1078/0944-2006-00113
- Tomizawa M, Casida JE (2003) Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Ann. Review Entomol.* **48**: 339-64.

3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Wir haben im Rahmen dieses Moduls besonders eng mit dem LLH Bieneninstitut Kirchhain (Modul 1) zusammen gearbeitet. Für den Feldversuch arbeitete Lena Faust aus Oberursel mit Dr. Reinhold Siede aus Kirchhain zusammen. Die beiden haben Präsentationen gemeinsam konzipiert, die Daten analysiert und die Experimente geplant und praktisch umgesetzt. Bei allen Phasen des Feldversuches, inklusive den Publikationen, war auch unser Industriepartner, Bayer CropScience AG eng beteiligt. Mit Modul 6 – Bieneninstitut Hohenheim und Bayer CropScience haben wir Rückstandsanalytik von Thiacloprid durchgeführt. Gemeinsam mit dem Bieneninstitut Hohenheim (Modul 3) haben wir die Heimfindeassays geplant. Da allerdings die RFID-Technologie, die wir einsetzen wollten, in Oberursel etabliert war, fanden die entsprechenden Versuche in Oberursel statt.

II. Ergebnisse

1. Erzielte Ergebnisse

1.1 Praxistest zum Heimfindeverhalten

Wir haben im Sommer 2011 mit Versuchen zum Heimfindeverhalten begonnen. Zunächst haben wir eine Methode entwickelt, heimkehrende Bienen zu markieren und kontrolliert freizulassen. Dabei untersuchten wir die Auswirkungen von neonicotinoiden Insektiziden auf das Orientierungsverhalten der Honigbienen. Zunächst wurde das Heimfindeverhalten von Honigbienen nach Fütterung von Imidacloprid und Clothianidin untersucht. Die Bienen wurden altersmarkiert und mithilfe der RFID-Methode am Stockeingang registriert. Sobald sie als Sammlerinnen Nektar sammeln, wurden ihre Tänze beobachtet und die Richtung zur besuchten Nektarquelle aus der Tanzrichtung ermittelt. Einzelne dieser Bienen wurden dann am Flugloch abgefangen und auf ihrer Route zur getanzten Futterquelle freigelassen. Von den insgesamt 20 Bienen im Experiment wurden die Dauer des Heimfluges, die Zeit bis sie erneut ausflogen und die Dauer des ersten Sammelfluges nach Rückkehr in den Stock bestimmt. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Zwar war eine Tendenz erkennbar, dass Bienen nach Imidaclopridaufnahme länger für den Rückweg benötigen. Dieser Trend ließ sich jedoch statistisch nicht nachweisen. Die Ergebnisse dieses Experimentes liefern aber wichtige methodische Hinweise, wie wir das Heimfindeverhalten von Sammlerinnen verlässlich registrieren können. Sie dienen als Grundlage für die Planung weiterer Versuche zur Standardisierung eines Assays zum Heimfindeverhalten in der Praxis.

Im zweiten Jahr haben wir Thiacloprid an Sammlerinnen gefüttert, die wir am Flugloch beim Ausflug abgefangen haben. Diese wurden mit einem RFID Chip markiert und es wurde ihnen entweder 10 µl Honigwasser mit Thiacloprid (250 ng/Biene) oder reines Honigwasser verfüttert. In Entfernungen von 200 - 900 m vom Stock wurden sie unmittelbar anschließend an vier verschiedenen Auflassstellen freigelassen. Thiacloprid-gefütterte Bienen fanden seltener zum Volk zurück als die Kontrolltiere. Die Zeit, die die Tiere, die zum Stock zurück fanden, für die Strecke benötigten, unterschied sich nicht. Hohe Dosen von Thiacloprid beeinträchtigen also offensichtlich das Orientierungsvermögen der Honigbienen.

Im dritten Projektjahr haben wir diese Befunde reproduziert und sind einen wesentlichen Schritt in Richtung Standardisierung des Heimfindeassays gegangen. Zum einen untersuchten wir, bei welchen Zeitintervallen (0, 30, 60 und 90 Minuten) nach der Fütterung von Thiacloprid das Heimfindeverhalten der Bienen besonders beeinträchtigt wird. Zum anderen haben wir die Distanz zwischen Auflassstelle und Volk mit 570m standardisiert. Hierfür wurden die Bienen wie beschrieben abgefangen, mit einem RFID-Chip markiert und zu zwei Auflassstellen gebracht, die mit im selben Abstand zum Bienenstock, aber in unterschiedlichen Habitaten (Wald bzw. Wiese) lagen. Nach direktem Auflassen und bis zu

60 Minuten nach der Fütterung kehrten signifikant weniger Bienen zum Bienenstock zurück. Vom Auflassort „Wiese“ benötigten die mit Thiacloprid gefütterten Bienen für ihren Heimflug nach allen Zeitintervallen signifikant mehr Zeit als die Kontrollbienen. Vom Auflassort „Wald“ konnte bei einem Zeitintervall von 60 Minuten ein signifikanter Unterschied in der Heimkehrdauer festgestellt werden. Die Aufnahme einer akuten Dosis Thiacloprid scheint nach ca. 60 Minuten die größte Wirkung auf das Orientierungs- und Heimfindeverhalten der Bienen zu haben.

Im vierten Versuchsjahr wurden die Versuche aus dem dritten Versuchsjahres mit Clothianidin als weiterer Testsubstanz durchgeführt. Die Bienen wurden ebenfalls von zwei Plätzen mit einem Abstand von 570 Metern zum Bienenstock nach unterschiedlichen Zeitintervallen aufgelassen. Sie wurden akut mit 10 µl Honigwasser mit Clothianidin (1 ng/ Biene) oder 10 µl reinem Honigwasser gefüttert. In der Dauer, die die Bienen für die Heimkehr zum Bienenstock benötigten, wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollbienen und mit Clothianidin gefütterten Bienen beobachtet. Von beiden Auflassorten und zu beinahe allen Zeitintervallen jedoch kehrten signifikant mehr mit Clothianidin gefütterte Bienen zurück als Kontrollbienen. Bei der Heimflugrate zeigte sich dagegen an beiden Auflassorten nach fast allen Zeitintervallen, dass die akut mit Clothianidin gefütterten Bienen häufiger zurück in den Stock fanden.

Ziel der beschriebenen Versuche war es, die Wirkungen subletaler Dosen von Pflanzenschutzmitteln auf das Heimfindeverhalten zu erfassen und hieraus einen einfach anzuwendenden Test zu entwickeln. Dieser Verhaltenstest soll von geschultem Fachpersonal durchgeführt werden können, um Bienenvölker auf eine potenzielle Schädigung durch Pflanzenschutzmittel zu untersuchen. Zudem soll die Möglichkeit gegeben sein, unterschiedliche verhaltenswirksame Insektizide zu vergleichen.

Der von uns entwickelte standardisierte Test erfüllt weitgehend die formulierten Ziele. Durch die durchgeführten Versuche konnten deutliche Einflüsse von Insektiziden auf die Heimkehrrate von Bienen aufgezeigt werden. Es ist möglich, die Wirkung unterschiedlicher Insektizide miteinander zu vergleichen. Da sich in den Versuchen kein eindeutiger Einfluss auf die Heimkehrdauer der Bienen gezeigt hat, besteht die Möglichkeit, den Test für die Anwendung in der Praxis zu vereinfachen. Die Anwendung der kostspieligen und aufwändigeren RFID-Technik ist für eine Bestimmung der Heimkehrrate, über die eine Wirkung der Insektizide beobachtet werden kann, nicht zwingend vonnöten. So ist eine Anwendung des Tests schnell und einfach möglich.

1.2 Flugverhalten von Sammlerinnen nach chronischer Fütterung im Volk

Um zusätzlich neben den Auswirkungen der chronischen Fütterung auf Vollvölker auch die Auswirkungen auf Einzelbienen zu untersuchen, haben wir in drei aufeinanderfolgenden Jahren Untersuchungen zum Flugverhalten durchgeführt. Hierfür wurden kleine Volkseinheiten (Mini-Plus-Beuten) chronisch mit 5000 ppb Thiacloprid eingefüttert. Zusätzlich wurden im letzten Versuchsjahr kleine Völker mit 50 ppb Clothianidin eingefüttert. Die nach mehreren Wochen aus diesen Völkern geschlüpften Bienen wurden mit RFID-Chips markiert und die Aus- und Einflüge mithilfe von Scannern am Stockeingang registriert. Die Daten geben Aufschluss über das Alter, an dem die Bienen zum ersten Orientierungsflug ausflogen, sowie über die gesamte Lebensdauer der Bienen.

Wir konnten Auswirkungen der chronischen Fütterung mit Thiacloprid auf Einzelbienen beobachten. Die Bienen der Versuchsvölker flogen einige Tage später zum ersten Orientierungsflug aus als die Bienen der Kontrollvölker. Auf die Lebensdauer hingegen konnten keine eindeutigen Effekte beobachtet werden. Die chronische Fütterung mit Clothianidin deutete ähnliche Ergebnisse an; allerdings sind weitere Versuche notwendig und eine Wiederholung der Versuche, um beobachtete Auswirkungen zu überprüfen und zu bestätigen.

Ziel dieses Versuchs war es, weitere Erkenntnisse über die Wirkung von Neonicotinoiden auf das Flugverhalten von adulten Bienen zu gewinnen. Durch die Unterschiede sowohl zwischen den Einzelbienen als auch zwischen den unterschiedlichen Völkern sind generelle Aussagen über die Wirkungen auf das Flugverhalten anhand dieser Beobachtungsmethode jedoch nur bedingt möglich.

1.3 Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Motorik und Lernen von Bienen

Dieses Projekt beschäftigt sich mit den physiologischen Wirkungsweisen von Insektiziden auf Nervensystem und Verhalten von Bienen. Das Duftlernen besteht aus mehreren Komponenten, unter anderem dem Zuckerstimulus, der normalerweise den Rüsselreflex der Biene auslöst und in der Lernsituation als Belohnung fungiert. Bevor die Auswirkungen von Insektiziden auf das Duftlernen getestet wurden, wurden zunächst die Auswirkungen verschiedener Insektizide auf diesen Reflex getestet, um verhaltensrelevante Insektizidkonzentrationen zu bestimmen.

Dafür wurden *in vivo* Muskelableitungen etabliert, um die Auswirkungen von Neonicotinoiden (Thiacloprid, Imidacloprid und Clothianidin) direkt physiologisch zu untersuchen. Abgeleitet wurden Aktionspotenziale vom Muskel M17. Dieser Muskel ist am Rüsselreflex (proboscis extension reaction, PER) der Biene beteiligt. Für die Messung wurden die Bienen in

Plastikröhrchen eingespannt, der Kopf mit Dentalwachs fixiert und die Kopfkapsel der Bienen geöffnet, sodass die verschiedenen Insektizide direkt appliziert werden konnten. In einem Vortest wurde getestet, ob die Bienen einen Rüsselreflex zeigen, wenn ihnen Zuckerwasser als Stimulus angeboten wird. Anschließend wurde die jeweilige Substanz bzw. die Ringerlösung als Kontrolle appliziert (1 µl) und zu verschiedenen Zeiten nach Applikation (10 min, 20 min, 30 min und 60 min) ein weiterer Test mit Zuckerwasser durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine erhöhte Muskelaktivität nach der Applikation von Clothianidin (1 µM) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei manchen Tieren führt die Clothianidingabe sogar zu einer kontinuierlichen Spikeaktivität im Muskel. Im Gegensatz dazu verringerte sich die Muskelaktivität nach Applikation von Thiacloprid (je 1 µM) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Imidacloprid erzeugte keine messbaren Effekte. Diese Ergebnisse der Muskelableitungen zeigen, dass die verschiedenen Neonikotinoide unterschiedliche physiologische Wirkungen haben. Obgleich die Konzentrationen in unseren Versuchen deutlich über den erwarteten Dosen im Freiland liegen, lassen sich eindeutige, verhaltensrelevante Veränderungen unter Insektizideinwirkung nachweisen.

Um die Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Substanzen zu bestimmen, wurden Clothianidin (1 µM) und Thiacloprid (10 µM) in unterschiedlicher Reihenfolge im Abstand von 30 Minuten in die Kopfkapsel der Biene appliziert (jeweils 1 µl). Es zeigt sich, dass die Spikerate immer erhöht ist, egal, ob zuerst Thiacloprid und dann Clothianidin oder zuerst Clothianidin und anschließend Thiacloprid appliziert wurde. Synergistische Effekte wurden nicht beobachtet. Da die erhöhte Spikerate auf Clothianidin zurückzuführen ist, scheint Clothianidin in der Doppelapplikation immer dominierend zu wirken.

Um die physiologischen Effekte von Neonikotinoiden auf Bienen sowie Effekte auf das Duftlernen zu untersuchen, wurden die Muskelableitungen weitergeführt und Lernversuche durchgeführt. Zusätzlich zu den M17-Versuchen mit Applikation in die Kopfkapsel wurden M17-Ableitungen nach akuter Fütterung mit entweder Clothianidin (1 ng in 10 µl Zuckerwasser) oder Thiacloprid (250 ng in 10 µl Zuckerwasser) durchgeführt. Die Durchführung der Versuche lief wie oben beschrieben ab, allerdings wurden die Substanzen oder die Kontrolllösung (10 µl Zuckerwasser) direkt und akut an die Bienen verfüttert und die Tests 15, 30, 45, 60, 75, 90 und 120 Minuten nach der Fütterung durchgeführt. Die Fütterung mit Clothianidin erhöht zu den Versuchszeitpunkten 45, 75 und 90 Minuten die Muskelaktivität signifikant. Thiaclopridgefütterte Bienen weisen eine reduzierte Spikeanzahl auf. Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse des Vorjahres. Um zu untersuchen, ob diese Wirkungen auch bei Tieren nachweisbar sind, die chronisch im Volk gefüttert wurden, wurden M17-Ableitungen von Bienen durchgeführt, die aus entsprechend (50 ppb Clothianidin oder 5.000 ppb Thiacloprid oder Kontrollfutter) eingefütterten Mini-Plus-Völker

abgefangen wurden. Für die Versuche wurden altersmarkierte Sammlerinnen verwendet, die ausschließlich mit dem ihnen gegebenen Futter aufgewachsen waren. Auch in diesem Versuch zeigt sich eine Erhöhung der Spikeanzahl nach Gabe von Clothianidin. Eine Verminderung der Spikeanzahl ist nach Gabe von Thiacloprid nachweisbar. Die Versuchs- und Kontrollvölker entwickelten sich während der gesamten Versuchsdauer ähnlich. Individuelle Bienen zeigen also deutliche Auswirkungen nach Fütterung mit Neonikotinoiden, die sich in der Vitalität des ganzen Volkes nicht widerspiegeln. Bienen reagieren offensichtlich auf Expositionen mit Clothianidin mit einer Aktivitätserhöhung und auf Thiacloprid mit einer Aktivitätsverringering.

Das zeigt sich auch in Verhaltensversuchen, bei denen das Laufverhalten der Tiere unter Einfluss von Neonikotinoiden gemessen wird. Hierzu werden die Bienen einzeln in eine Glaspetrischale gesetzt und für 3 min unter dunklem Rotlicht ihre Laufspur aufgezeichnet. Es zeigt sich, dass Bienen, die mit 10 μL Zuckerwasserlösung (plus 0.4 μM Clothianidin) gefüttert wurden, weitere Strecken mit höherer Geschwindigkeit zurücklegten. Thiacloprid (400 μM) hatte den gegenteiligen Effekt: die Tiere wurden langsamer. Damit haben wir verschiedene, gut und einfach zu handhabende Verhaltensassays entwickelt, um Insektizidvergiftungen aufzudecken.

Bei den Verhaltensexperimenten zum Lernvermögen der Bienen unter Insektizideinfluss haben wir die Habituation untersucht. Dabei wird eine Antenne mit einem Zuckerwasserstimulus wiederholt gereizt. Nach einigen Stimulationen zeigen die Bienen keinen Rüsselreflex mehr. Es konnte gezeigt werden, dass Fütterungen von Clothianidin und Thiacloprid das Kurzzeit-Habituationsgedächtnis der Honigbiene beeinflussen. Alle verabreichten Dosen von Clothianidin (0,5 – 10 ng/Biene) verzögerten die Habituation; die Tiere benötigen mehr Stimulationen bis zur Habituation. Thiacloprid zeigte dagegen unterschiedliche Effekte. Die niedrigste Dosis (2 ng/Biene) hatte ebenfalls hemmende Wirkung auf die Gedächtnisbildung. Die zwei höheren, getesteten Dosen (20 ng/Biene und 2,8 μg /Biene) hatten dagegen keinen Effekt. Das Langzeit-Habituationsgedächtnis (getestet 24h nach dem ersten Habituationlernen) beeinflussten Clothianidin oder Thiacloprid nicht.

Außerdem wurde eine weitere, komplexe Lernaufgabe unter Einfluss von Neonikotinoiden durchgeführt. Dabei wurde Clothianidin (0,25 ng in 1 μl PBS bzw. 1 ng in 1 μl PBS) oder eine Kontrolllösung (PBS) in den Thorax der Bienen injiziert. Diese Injektion fand entweder vor dem Akquisitionstest oder direkt vor dem ersten Abrufftest statt. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen zeigen keine Beeinträchtigung des Lernverhaltens, der Gedächtnisbildung oder des Gedächtnisabrufes durch Clothianidin. Kontrolltiere und behandelte Tiere lernten gleich gut. Das ist ein erstaunlicher Befund, da wir eine recht komplexe Lernaufgabe untersucht haben, in denen die Bienen zwischen unbelohnten Einzeldüften und einem aus diesen

Einzeldüften bestehenden Duftgemisch, das belohnt wird, unterscheiden müssen, was für die Biene eine durchaus schwierige Aufgabe darstellt. Wir sind dabei davon ausgegangen, dass sich diese Lernaufgabe nur mit einem intakten Gehirn lösen lässt. Clothianidin beeinträchtigt diese kognitiven Fähigkeiten offensichtlich nicht. Wir können diese Tests also nicht als verlässliche Diagnosetools einsetzen. Allerdings haben wir ja auch in den Heimfindeversuchen keine Beeinträchtigung der Orientierung durch Clothianidin festgestellt.

Ziel dieses Projekts war die Charakterisierung physiologischer Wirkungsweisen von Pflanzenschutzmitteln auf das Nervensystem und das Lernverhalten der Biene. Dafür wurden extrazelluläre Ableitungen vom Muskel M17 und Duftkonditionierungen durchgeführt. Wir konnten Schwellen für physiologische Wirkungen detektieren und die Muskelableitungen sind somit ein verlässliches Maß für die Insektizidwirkungen. Demgegenüber haben wir keinen Einfluss von Clothianidin auf das Dufterlernen festgestellt. Als verlässliches Diagnosetool eignet sich ein Lerntest somit nicht. Diese unterschiedlichen Ergebnisse am Muskel und im Lerntest deuten darauf hin, dass in der Biene verschiedene Rezeptorsubtypen vorhanden sind, die individuelle pharmakologische Eigenschaften besitzen, was die unterschiedlichen Effekte auf den Muskel bzw. auf das Lernverhalten erklären könnte. Damit sind wir unserem Teilziel, der Aufklärung neuronaler Grundlagen von Insektiziden, deutlich näher gekommen.

Als weiteres Ziel wurde festgelegt, die Diskrepanz zwischen beobachteten Effekten auf Einzelbienen und dem gesamten Volk näher zu untersuchen. Wie oben beschrieben zeigen Einzelbienen deutliche Unterschiede in ihrer Muskelspikeaktivität, wenn sie mit Neonikotinoiden behandelt wurden. Bienen aus behandelten Völkern zeigen jedoch im Freiland ein normales Flugverhalten. Daher wurden Bienenvölker im letzten Projektjahr chronisch eingefüttert und daraus einzelne Bienen entnommen und Muskelableitungen durchgeführt. Damit konnte gezeigt werden, dass auch hier Effekte an den Einzelbienen nachweisbar sind, die Volksentwicklung jedoch wie die des Kontrollvolkes, und somit ohne sichtbare negative Effekte, verlief. Dieser Befund bestätigt die anfängliche Beobachtung, dass Effekte auf Einzelbienen durch das gesamte Volk aufgefangen werden können.

1.4 Effekte von Neonikotinoiden auf die Bienenentwicklung

In den Jahren 2013 und 2014 haben wir unter praxisnahen Bedingungen (kleine Volkseinheiten, sog. Mini-Plus Beuten unter einem Flugzelt) Versuche zu brutschädigenden Effekten von Thiacloprid durchgeführt. Wir wollten herausfinden, ob die Brut selbst durch das Insektizid geschädigt wird oder aber durch die Schädigung der Ammenbienen ein

verändertes Brutpflegeverhalten resultiert. Hierfür wurden die Bienenvölker chronisch mit Thiacloprid im Zuckersirup eingefüttert; die Kontrollvölker bekamen Zuckersirup.

Im ersten Jahr wurden zwischen je einem Thiaclopridvolk und einem Kontrollvolk je eine Brutfläche mit Eiern ausgetauscht. Alle zwei Tage wurden die Brutflächen abgezeichnet, um den Verlauf der Brutentwicklung zu beobachten. Unsere Beobachtungen ließen allerdings noch keinen eindeutigen Schluss zu, denn es wurden sowohl Eier in den Kontrollvölkern als auch in den Thiaclopridvölkern ausgeräumt.

Im zweiten Jahr wurden die Versuche mit veränderten und verbesserten Methoden wiederholt und liefern nun ein deutlicheres Ergebnis. Mini-Plus-Völker wurden unter Flugzelten mit Kontrollfutter oder Thiacloprid-haltigem Futter (8800 ppb) eingefüttert. Nach fünf Wochen wurden bestiftete Waben teils zwischen den Völkern ausgetauscht, teils verblieben sie im Ursprungsvolk. Die Entwicklung der Brutflächen wurde alle zwei Tage fotografisch dokumentiert. In den Völkern, bei denen die Brutwabe im Volk verblieb, wurden ca. 45 % der Brutzellen verdeckelt. Das gleiche Ergebnis zeigte sich auf der Brutwabe, die vom Kontrollvolk in das Thiacloprid-gefütterte Volk eingehängt wurde. Ausschließlich im Kontrollvolk, in welches die Brutwabe aus dem Thiacloprid-gefütterten Volk eingehängt wurde, wurde die Brut komplett ausgeräumt; es gab keine verdeckelten Zellen.

Die Ergebnisse lieferten einen deutlichen Hinweis auf Auswirkungen des Neonikotinoids Thiacloprid auf die Ammenbienen. Weitere Versuche sind jedoch notwendig, um die Beobachtungen deuten zu können und genauere Aussagen über die Auswirkungen treffen zu können.

Um die genauen Mechanismen der Beeinträchtigung des Bruterfolgs von mit Neonikotinoiden behandelten Völkern zu untersuchen und um die Effekte von Neonikotinoiden auf die Ontogenese der Bienenlarven zu untersuchen, wurden Bienenlarven mit künstlichem Futtersaft, dem Insektizide beigemischt wurden, im Laborinkubator *in vitro* aufgezogen.

Dabei zeigte sich, dass die Fütterung mit Clothianidin die Überlebensdauer der Bienenlarven erst bei Konzentrationen (450ppb), die deutlich über der LD50 liegen, vermindert, während Thiacloprid die Larvalentwicklung selbst in hohen Konzentrationen (8800ppb) *in vitro* nicht beeinträchtigt (wohl aber *in vivo*, wie wir in einem anderen Projekt herausgefunden haben).

Um diese Diskrepanz zwischen Effekten auf Volksebene und fehlenden Effekten auf der individuellen Ebene der künstlich aufgezogenen Larve aufzuklären, haben wir uns entschieden, hier weitere Studien zu unternehmen, Ziel war es auch, weitere Parameter eines vitalen Bienenvolkes zu definieren. Es galt, erhebliche Entwicklungsarbeit für eine standardisierte Assaybeschreibung zu leisten.

Der Fokus unserer Versuche lag ab Frühjahr 2013 auf der Aufklärung des beobachteten Bruttoxizität von Neonikotinoiden auf Volksebene. Wir wollten herausfinden, ob die Brut selbst durch das Insektizid geschädigt wird oder aber ob durch die Schädigung der Ammenbienen die Brutpflege beeinträchtigt wird. Dabei haben wir bei Untersuchungen zu brutschädigenden Effekten von Neonikotinoiden auf Volksebene einen bislang unbekanntem Mechanismus, wie Neonikotinoide den Bruterfolg im Bienenvolk beeinflussen, aufgeklärt.

Gelee Royal, das Futter der Bienenlarven, enthält außergewöhnlich viel Acetylcholin (ACh) (5000nmol/g), dem wichtigsten Neurotransmitter im Insektengehirn. Wir fanden heraus, dass ACh von den Ammenbienen produziert und in den Gelee Royal abgegeben wird. Dort, im Futtersaft, ist es erstaunlich stabil. Nun konnten wir zeigen, dass dieses sezernierte ACh eine wichtige Funktion bei der Larvenentwicklung hat, denn 1.) entwickeln sich die Bienenlarven ohne ACh im Futtersaft nicht normal weiter; 2.) sterben die Bienenlarven, wenn wir den Rezeptor für ACh blockieren. Dieser Befund ist außerordentlich interessant, da die Neonikotinoide auf den ACh-Rezeptor von Bienen wirken. Das über diesen Weg die Entwicklung der Bienenlarven gestört wird, wäre ein ganz neuer Wirkmechanismus von Neonikotinoiden, Nachdem wir durch das Verfüttern von ACh-reduziertem Futtersaft belegen konnten, dass ACh im Larvenfutter für die Larvenentwicklung essentiell ist, haben wir 2014 Untersuchungen an *in vitro* aufgezogenen Larven durchgeführt. Parallel hierzu wurde die Brutentwicklung bei chronischer Neonikotinoidfütterung (Clothianidin, Thiacloprid) im Flugzeltversuch auf Volksebene beobachtet. Die Befunde waren eindeutig: die chronische Behandlung mit Neonikotinoiden auf Volksebene hat massive Effekte, aber auf die Larvenentwicklung der individuellen Larve nur einen geringen Effekte.

Der Bruterfolg von *in vitro* unter Neonikotinoideinfluss aufgezogenen Larven unterscheidet sich nur gering von dem der Larven, die mit Kontrollfutter aufgezogen wurden. Die Substanzen selber sind also nur wenig larventoxisch. Bei der Behandlung mit gleicher Konzentration auf Volksebene jedoch war der Bruterfolg deutlich verringert, teilweise starben alle Larven zu einem frühen Stadium. Vermutlich findet die Schädigung durch Neonikotinoide also nicht bei der Larve, sondern vor allem bei der Ammenbiene und der gestörten Futtersaftproduktion statt. Um dem weiter nachzugehen, haben wir den ACh-Gehalt im Futtersaft bei behandelten und Kontrollvölkern (aus den Brutzellen) bestimmt. Zusätzlich wurden Futtersaftdrüsen von Ammenbienen aus den verschiedenen Völkern im Flugzelt elektronenmikroskopisch untersucht. Wir konnten zeigen, dass der ACh-Gehalt im Futtersaft der mit Neonikotinoid behandelten Völkern um 80% reduziert ist. Grund hierfür sind wahrscheinlich die deutlich verkleinerten Futtersaftdrüsen, die wir aus den Ammenbienen aus den behandelten Völkern präpariert und untersucht haben. Die Drüsen können zudem offensichtlich kein ACh mehr synthetisieren und in den Gelee Royal sezernieren.

Im letzten Projektjahr (2015) wurde der Zeltversuch zur Untersuchung der Bedeutung von Acetylcholin (ACh) auf die Larvalentwicklung und deren Beeinträchtigung durch Neonikotinoide mit feldrealistischen Konzentrationen fortgesetzt. Laut EFSA liegen die maximal nachweisbaren Rückstände von Clothianidin in Pollen bei 11,4ppb und in Nektar bei 8,6ppb (Nachweisgrenze 1ppb). Deshalb wurden zusätzlich zu 100 ppb Clothianidin (Positivkontrolle) auch Konzentrationen von 10 ppb und 1 ppb Clothianidin, sowie 200 ppb und 8.800 ppb Thiacloprid (Positivkontrolle) verfüttert.

Wie erwartet war der ACh-Gehalt in den Futtersaftproben der hohen getesteten Dosen um bis zu 80% reduziert und die ACh-Neusynthese in den Futtersaftdrüsen war um 85% reduziert. Allerdings konnte bei den 10 ppb Clothianidin und 200 ppb Thiacloprid auch eine Reduktion des ACh-Gehalts gezeigt werden. Das bedeutet, dass wir sogar bei geringen Dosen auf der Ebene des Larvenfutters bereits Effekte sehen, obwohl die Völker noch keine Vergiftungssymptomatik erkennen lassen. Völker, die mit 100 ppb Clothianidin eingefüttert wurden, überlebten den Versuch nur mit großer imkerlicher Hilfe (wiederholte Verstärkung der Völker).

Hinsichtlich der von uns zu bestimmenden Schadschelle bedeutet dass: Thiacloprid ist bereits bei feldrelevanten Dosen von 200 ppb für die Brutentwicklung schädlich, allerdings tolerieren die Völker Dosierungen bis zu 2000 ppb (siehe Feldversuch und Modul 1). Clothianidin schädigt die Völker oberhalb 50 ppb deutlich, die Schadschwelle für nachweisbare Bruteffekte liegt um den Faktor 5-10 geringer, bei ca. 1-10 ppb. Manche Völker waren bereits bei Dosierungen von 1 ppb sehr schwach und hatten starke Defizite im Brutbereich. Dieser Effekt war zudem saisonabhängig und im Mai stärker ausgeprägt als im August. Allerdings konnten wir diese Experimente nicht mehr reproduzieren.

Fazit:

Es ist es uns gelungen, einen Assay ,bestehend aus *in vitro* Larvenaufzucht, Zeltversuch und Messungen des ACh-Gehalts und -Synthesefähigkeit, zu entwickeln, der den Bruterfolg als Vitalparameter des Bienenvolkes betrachtet.

Die Brutauffälle auf Volksebene, die durch Neonikotinoide verursacht werden, sind mit degradierten Futtersaftdrüsen belasteter Ammenbienen und ihrer verminderten ACh-Synthesefähigkeit zu erklären. Die *in vitro* Larvenaufzucht weist eine geringe Larventoxizität nach.

Auch wenn sich dieses Assay nicht als Schnelltest umsetzen lässt, sollte bei der Risikoanalyse eines neonikotinoiden Insektizids stets der Einfluss auf die Futtersaftdrüsen überprüft werden.

Neben der Größe und des Gewichts der Futtersaftdrüse stellt die ACh-Synthesefähigkeit ein weiteres Merkmal des Bruterfolg und damit für Vitalität eines Bienenvolkes dar.

1.5 Feldversuch mit Thiaclopid

Im Feldversuch zur multifaktoriellen Belastung von Bienenvölkern untersuchten wir die Auswirkungen von kontinuierlich gefütterten, geringen Mengen Thiaclopid auf die Vitalität der Völker. Der Feldversuch wurde in Zusammenarbeit mit dem Bieneninstitut Kirchhain (Modul 1) und der Firma Bayer CropScience AG Monheim (BCS) durchgeführt. Der Wirkstoff Thiaclopid wird im Raps eingesetzt. Von der Rapsblüte tragen Sammlerinnen Thiaclopidrückstände in die Bienenstöcke ein. Der Feldversuch ist auf drei Jahre angelegt, um die Verlässlichkeit der Daten zu gewährleisten. Die Ergebnisse der Studie sind detailliert im Bericht von Modul 2 beschrieben. Im Folgenden stellen wir daher nur die wesentlichen Befunde vor.

Auf einem Außenstand in der Nähe von Kirchhain wurden 30 Völker in drei Gruppen aufgestellt. Jede Gruppe erhielt unterschiedliche Mengen an Thiaclopid (vorgelöst in Aceton) im Zuckerfutter (ApilInvert):

- K: Kontrolle, nur Lösungsmittel im Futter (0,1 ml Aceton / 1 L ApilInvert)
- T1: 0,2 mg Thiaclopid in 0,1 ml Aceton / 1 L ApilInvert (entspricht 200 ppb)
- T2: 2 mg Thiaclopid in 0,1 ml Aceton / 1 L ApilInvert (entspricht 2000 ppb)

Das mit Thiaclopid angereicherte Futter wurde den Völkern von Juli bis Oktober kontinuierlich verabreicht. Populationsschätzungen an fanden an jeweils 4 Terminen im Herbst und 4 Terminen im Frühjahr statt. Gemessen wurden die Parameter Volksentwicklung (Schätzung der Anzahl erwachsener Bienen und der Brutzellen), Gewicht der Völker, Belastung mit Nosema, Viren und Varroa und die Thiaclopidrückstände im Futter und im Bienenbrot.

Wir haben keine Effekte durch die Fütterung von 200 ppb und 2000 ppb Thiaclopid auf die Vitalität, die Volkstärke und die Überwinterungsrate festgestellt. Alle Thiaclopid-behandelten Völker entwickelten sich vergleichbar mit den Kontrollvölkern. Lediglich eine geringfügig verringerte Anzahl der Brutzellen beobachteten wir in den mit 2000 ppb Thiaclopid behandelten Völkern im ersten Versuchsjahr. Auch die Belastungen mit Parasiten (Varroa destructor und Nosema spec) unterscheiden sich zwischen den Gruppen nicht.

Mit dem Feldversuch haben wir Neonikotinoidwirkungen unter sehr praxisnahen Bedingungen untersucht und eine Standardmethode zur Risikoabschätzung entwickelt. Der Feldversuch zur Auswirkung von Thiaclopid wurde planmäßig 2014 beendet, die Daten sind vollständig ausgewertet (vgl. Abschlussbericht Modul 1) und als Tagungsbeiträge teilweise bereits publiziert. Sie sind in die Dissertation von Lena Faust an der Goethe-Universität Frankfurt am Main eingeflossen und werden derzeit zur Publikation vorbereitet.

Diese Versuche, die in enger Abstimmung mit dem Bieneninstitut Kirchhain stattgefunden haben, wurden im Rahmen von Modul 1 durch einen Feldversuch mit Clothianidin fortgeführt.

2. Verwertung

In unserem Modul wurden, gemeinsam mit den Modulen 1 und 4 Diagnosetools zur Identifizierung von Insektizidwirkungen auf zwei Ebenen erreicht:

Für das Gesamtvolk (Feldstudien) und für einzelne Bienen (Verhaltensdiagnostik, Physiologie). Diese beiden Ebenen wurden verknüpft durch Korrelationen zwischen Einzelbienen und Völkern (Flugverhalten / Bruterfolg und Stockvitalität. Damit haben wir unsere Ziele im Wesentlichen erreicht. Wir konnten eine Methode zur Risikobewertung chronischer Insektizidexposition auf Bienenvölker unter praxisnahen Bedingungen etablieren (Etablierung der Methode „Feldversuch“: 2011-2014; Validierung des Feldversuches: Modul 1: 2014-2015). Für unseren Kooperationspartner waren die Befunde aus dem Feldversuch besonders wertvoll, da wir Grenzen und Möglichkeiten dieses Vorgehensweise ausgelotet haben. Die Ergebnisse sind bereits von den Kollegen aus Modul 1 für die landwirtschaftliche Beratung zur Verfügung gestellt worden (Hessen: innerhalb des HMUKLV, Runder Tisch der Landwirtschaft des JKI, Landwirtschaftliche Fachschulen, Sachkundenachweis Pflanzenschutz). Unser Partner Bayer CropScience nutzt die Erkenntnisse firmenintern und für den Diskurs des Industriepartners Bayer CropScience mit Politik, Behörden (Zulassung, EFSA), Imkerverbänden, Kunden und NGOs. Er wird von BCS als higher tier-Studie für Prüfung von PSMitteln potenziell verwendet werden können.

Auf der Ebene der Einzelbiene haben wir ein Heimfindeassay entwickelt, dass als einfacher Verhaltenstest zum Vergleich verschiedener, auch neu zuzulassener Substanzen oder anderer Substanzklassen (z.B. Pyrethroide, Sulfoximine, Fungizide oder Varroazide) herangezogen werden kann. Referenzdaten sind nun vorhanden und der Test kann von geschultem Fachpersonal eingesetzt werden. Für Zulassungen neuer Substanzen sind diese versuch jedoch nur eingeschränkt geeignet, da die Varianz zu hoch ist und sehr stark vom Testgelände, der Jahreszeit und dem Zustand der Völker (unabhängig von Insektizidbelastungen) abhängt.

Für unseren Industriepartner Bayer CropScience waren Korrelationen zwischen Individualeffekten und der Volksvitalität besonders wertvoll. Hier bestehen nach wie vor die größten Wissenslücken, denn zwar gibt es zahlreiche Publikationen über Verhaltenseffekte im Labor (häufig nach Verabreichung hoher Insektiziddosen) aber relativ wenige verlässliche Feldstudien. Letztere zeigen häufig kaum Wirkungen auf die Vitalitätsparameter des Volkes. In unserem Projekt konnten wir an 2 Stellen Volksentwicklung und Einzelverhalten

verknüpfen: beim Flugverhalten/Muskelaktivität an ganzen Völkern und bei der Brutentwicklung *in vivo* und *in vitro*. Bienen zeigen bei feldrealistischen Dosen bereits Brutschädigungen aber das Volk bleibt noch intakt. Bienen aus behandelten Völkern zeigen abweichendes Flugverhalten und eine veränderte Muskelaktivität, aber das Volk zeigt keine Auffälligkeiten. Es bleibt festzuhalten dass man von der Gesamtentwicklung des Volkes nicht auf das Fehlen von individuellen Auswirkungen schließen kann und ebensowenig von Individualeffekte auf eine Volksbeeinträchtigung schlussfolgern kann. Dieser Befund kann relevant für künftige Screeningverfahren werden, wenn es darum geht, neue Wirkstoffe – noch vor der Zulassung – zu testen. In Kooperation mit Modul 4 (Universität Halle) haben wir einen weiteren Baustein entdeckt: in Oberursel haben wir festgestellt, dass unsere kleinen MiniPlus-Völker unter Flugzelten schlechter gedeihen als im Freien. Die AG Moritz hat nun gezeigt, dass das vielleicht am Stress liegt: Je kleiner die Einheiten je höher der „Stress“ der Bienen. Die kleinen Volkseinheiten könnten daher auch anfälliger sein für Pflanzenschutzexpositionen. Dieser Zusammenhang sollte Eingang finden in die Risikoabschätzung.

Unsere Daten aus allen Projekten wurden der EFSA zur Neubewertung des Risikopotenzials von Neonikotinoiden (besonders des unter dem Moratorium stehenden Clothianidin) zur Verfügung gestellt. Zur Versachlichung der öffentlichen Debatte, eines unserer wichtigsten Nebenziele, haben wir zahlreiche Vorträge für die Imkerschaft gehalten. Dies dient einerseits der Information der Imker. Zum anderen haben wir aber auch Diskussionen über Risiken und Nutzen des Pflanzenschutzmitteleinsatzes angestoßen.

3. Erkenntnisse von Dritten

Im Laufe des Projektes sind zahlreiche wissenschaftliche Publikationen zum Thema Neonikotinoidwirkungen auf Honigbienen erschienen. Jedoch hat keine einen deutlichen Bezug zu unserem Vorhaben. Lediglich Feldstudien, die im Gefolge des EU-Beschlusses zum Moratorium der Neonikotinoidzulassungen für Imidacloprid, Clothianidin und Thiametoxam durchgeführt wurden (vgl. Godfray et al. 2014, s.o.), sind vergleichbar obwohl sie gänzlich anders geplant wurden. Bei diesen Studien wurden die Bienenvölker zur Blütezeit direkt an behandelte oder unbehandelte Rapsfelder platziert und die Auswirkungen der Rapsbeizung auf die Vitalität der Völker bestimmt. Die Befunde dieser Feldstudien zeigen, dass unter sachgerechter Anwendung nur sehr geringe Rückstände im Pollen, Nektar oder Honig nachweisbar sind und in diesen geringen Dosierungen den Völkern keinen nachweisbaren Schaden zufügen. Dies bestätigt grundsätzlich unseren Befund, dass höhere Dosierungen notwendig sind, um Bienenvölker makroskopisch zu schädigen.

4. Veröffentlichungen

2012

- Siede R, Faust L, Maus C, Grünewald B, Büchler R (2012) Effects of chronically administered sublethal thiacloprid doses on the vitality of honeybee colonies. 59. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung, Bonn
- Fischer J, Schild HA, Grünewald B (2012) Effects of chronic neonicotinoid exposure on development of individual honeybee larvae and colonies. 59. Tagung Arbeitsgemeinschaft der Institute Bienenforschung, Bonn:
- Siede R, Faust L, Meixner M, Maus C, Grünewald B, Büchler R (2012) Dose and duration - what makes the poison? Performance of thiacloprid exposed bee colonies in a long-term trial EurBee Halle:P5.43
- Siede R, Faust L (2012): Ist Thiacloprid für Bienen auf Dauer ungefährlich? Biene/ADIZ/Imkerfreund 148 (6), 14
- Triltsch M, Fischer J, Grünewald B (2012) Effects of neonicotinoid insecticides on the spike frequency of the honeybee proboscis muscle M17. 59. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V., Bonn
- Fischer J, Triltsch M, Kabat vel Job K, Grünewald B (2012) Effects of neonicotinoid insecticides on the muscle activity of the honeybee. 2nd Biennial Meeting of the rnm², Oberwesel
- Triltsch M, Fischer J, Kabat vel Job K, Grünewald B (2012) Effects of neonicotinoid insecticides on the muscle activity of the honeybee. 5th Eurbee, Halle
- Schild HA, Ross A, Fischer J, Grünewald B (2012). Effects of chronic neonicotinoid exposition on development of individual honeybee larva 5th EurBee, Halle.

2013

- Faust L, Hahn J, Grünewald B (2013) Effects of the insecticide thiacloprid on the flight behavior of honeybees measured by Radio Frequency Identification (RFID). 60. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung, Würzburg.
- Siede R, Faust L, Maus C, Meixner M, Grünewald B, Büchler B (2013) An interim report of a field study of bee colonies chronically fed with 200 or 2000ppb of thiacloprid. 60. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung, Würzburg.

- Siede R, Faust L, Meixner M, Maus C, Grünewald B, Büchler R (2013) An Interim report of a field trial assessing side-effects of a neonicotinoid insecticide: Does a chronic exposure to sub-lethal doses of thiacloprid affect bee-colonies? 43. Apimondia Meeting, Kiev
- Triltsch M, Fischer J, Kabat vel Job K, Grünewald B (2013) Effects of neonicotinoid insecticides on motor and neuronal activity in the honeybee. 60. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V., Würzburg
- Triltsch M, Fischer J, Kabat vel Job K, Grünewald B (2013) Effects of neonicotinoid insecticides on motor and neuronal activity in the honeybee. 10th Goettingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen
- Faust L, Hahn J, Grünewald B (2013) Effects of the neuroactive insecticide thiacloprid on the flight behavior of honeybees. 10th Meeting of the German Neuroscience Society: T25-5A, Göttingen
- Grünewald B, Faust L, Siede R, Büchler R (2013) Wirkung der Neonicotinoide auf das Nervensystem der Biene“, Symposium „*Subletale Effekte von Neonicotinoiden auf das Verhalten und die soziale Organisation von Bienen*“, Fischermühle, Rosenfeld.
- Kabrede M, Fischer J, Kabat vel Job K, Grünewald B (2013) Effects of neonicotinoid insecticides on motor and neuronal activity in the honeybee. 106th Annual Meeting of the German Zoological Society, München

2014

- Faust L, Weil J, Hahn J, Grünewald B (2014) Sublethal doses of the neuroactive insecticide thiacloprid impair the homing ability of honeybees. 61. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung, Marburg
- Kabrede M, Schützmann V, Grünewald B (2014) Effects of neonicotinoid insecticides on the spike activity of the muscle M17 in the honeybee. 61. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V., Marburg
- Schild HA, Grünewald B, Michel-Schmidt RM, Kirkpatrick CJ, Wessler IK (2014) Acetylcholine the underrated component of royal jelly the elixir of life of honeybee larvae (*Apis mellifera*).“ 61. Tagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung, Marburg.
- Siede R, Faust L, Meixner M, Maus C, Grünewald B, Büchler R (2014) Are bee colonies affected by a chronic exposure to sublethal doses of thiacloprid? Meeting of the British Ecological Society and the Society for Experimental Biology. Symposium on “*The impact of pesticides on Bee Health*” London
- Siede R, Faust L, Maus C, Meixner M, Grünewald B, Büchler R (2014) Testing Thiacloprid: Does a long-term exposure affect bee colonies? 6th Eurbee, Murcia.

Faust L und Siede R (2014): Insektizide im Raps. Deutsches Bienenjournal, 5/2014: S.6-7

2015

Faust L, Grünewald B (2015) Chronic feeding of honeybee colonies with thiacloprid: Flight behavior and residue analyses. 62. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung, Münster

Siede R, Faust L, Maus C, Meixner M, Grünewald B, Büchler R (2015) Performance of bee colonies which are experimentally exposed to sublethal doses of Thiacloprid. 61. Tagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung, Münster

Kabrede M, Grünewald B. (2015) Effects of neonicotinoid insecticides on the spike activity of the muscle M17 in the honeybee. 62. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V., Münster

Siede R, Faust L, Meixner M, Maus C, Grünewald B und Büchler R (2015) Long-term exposure of honeybee colonies with thiacloprid: a field study. SETAC Meeting, Barcelona

In Vorbereitung

Siede R, Faust L, Meixner M, Maus C, Grünewald B, Büchler R (2016) Performance of bee colonies under a long-lasting exposure to sub-lethal concentrations of Thiacloprid. Pest Management Sci (*in Vorbereitung*).

Wessler IK, Gärtner HA, Michel-Schmidt RM, Brochhausen C, Schmitz L, Anspach L, Grünewald B, Kirkpatrick JC (2016) Honeybees produce non-neuronal acetylcholine for breeding: possible adverse effects of neonicotinoids PLoSOne (*in Vorbereitung*)

Dissertationen und Abschlussarbeiten:

Martina Kabrede (2015) Effekte von Neonikotinoiden auf die Aktivität des Muskels M17 und das Lernverhalten der Honigbiene. Dissertation Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Lena Faust (2016) Auswirkungen des Insektizids Thiacloprid auf das Flug- und Brutpflegeverhalten sowie die Volkentwicklung von Honigbienen. Dissertation Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Carolina Eusterholtz C (2015) Comparative analyses of acute pyrethroid and neonicotinoid effects on honeybee physiology. Masterarbeit Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Alexander Ross (2012) Light sheet-based and conventional fluorescence microscopical analysis of larvae of *Apis mellifera*. Bachelorarbeit Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Johannes Hahn (2012) Wirkung von Thiacloprid auf die Orientierung von Arbeiterinnen der Honigbiene. Bachelorarbeit Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Viola Schützmann (2013) Die Wirkung von Insektiziden auf das neuronale und muskuläre System der Honigbiene *Apis mellifera*. Bachelorarbeit Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Jonas Weil (2013) Effects of the neonicotinoid insecticide thiacloprid on the homing ability and development of the honeybee (*Apis mellifera carnica*). Bachelorarbeit Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Frederike Weßel (2014) Wirkung von Clothianidin auf die Flugaktivität und das Heimfindevermögen von Honigbienen (*Apis mellifera carnica*). Bachelorarbeit Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Annkathrin Haussmann (2014) Wirkung von Clothianidin auf komplexe Lernvorgänge der Honigbiene (*Apis mellifera*). Bachelorarbeit Goethe-Universität Frankfurt am Main.