

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem
Länderinstitut für Bienenkunde Hohen Neuendorf e.V.

Kontroversen über *Nosema ceranae* (Mikrosporidien)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin (Dr. med. vet.)
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Lennart Ludwig Horchler
Tierarzt aus Hamburg

Berlin 2021
Journal-Nr.: 4282

**Aus dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem
Länderinstitut für Bienenkunde Hohen Neuendorf e.V.**

Kontroversen über *Nosema ceranae* (Mikrosporidien)

**Inaugural Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin (Dr. med. vet.)
an der
Freien Universität Berlin**

vorgelegt von
Lennart Ludwig Horchler
Tierarzt aus Hamburg

Berlin 2021

Journal-Nr.: 4282

**Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler

Erster Gutachter: Prof. Dr. Elke Genersch

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopffleisch

Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

apis mellifera

honey bees

bombus terrestris

nosema ceranae

diagnostic techniques

bee diseases

beekeeping

epidemiology

germany

Tag der Promotion: 29.10.2021

Meinen Freunden – Linus und Kalle

Inhalt

Inhalt.....	I
1. Zusammenfassung.....	1
2. Summary.....	2
3. Einleitung / Literatur	3
3.1. Honigbienen sind Bienen, aber Bienen selten Honigbienen	3
3.2. Die ökologische und ökonomische Bedeutung der Bienen	6
3.3. Mikrosporidien der Bienen – <i>Nosema spp.</i>	9
3.3.1. Taxonomie und Epidemiologie.....	9
3.3.2. Lebenszyklus und Symptomatik.....	12
3.3.3. Virulenz und Transmission.....	17
4. Hauptteil / Publikationen	21
4.1. Long-Term Temporal Trends of <i>Nosema spp.</i> Infection Prevalence in Northeast Germany: Continuous Spread of <i>Nosema ceranae</i> , an Emerging Pathogen of Honey Bees (<i>Apis mellifera</i>), but No General Replacement of <i>Nosema apis</i>	21
4.1.1. Eigenanteil	21
4.1.2. Publikation.....	21
4.2. Diagnostic value of faecal spots on and in honey bee (<i>Apis mellifera</i>) hives	36
4.2.1. Eigenanteil	36
4.2.2. Publikation.....	36
4.3. Rapid gastrointestinal passage may protect <i>Bombus terrestris</i> from becoming a true host for <i>Nosema ceranae</i>	45
4.3.1. Eigenanteil	45
4.3.2. Publikation.....	45
5. Diskussion / Zusammenführung der Publikationen.....	63
6. Literaturverzeichnis	71
Danksagung	III
Selbstständigkeitserklärung	IV

1. Zusammenfassung

Honigbienen sind zwar die bekanntesten Bienen, aber sie stellen nur einen Bruchteil der weltweit existierenden Bienenspezies dar. Der überwiegende Teil der Bienen wird nicht vom Menschen gehalten, sondern gilt als wildlebend. Für diese Wildbienen sind, aktuellen Berichten zu Folge, deutliche Rückgänge in Anzahl und Vielfalt zu beobachten. Neben Faktoren, wie Klima und Veränderungen in der Landnutzung, gelten Krankheitserreger (Pathogene) als eine Ursache für die beobachteten Rückgänge. Unter den vielzähligen, für Honigbienen pathogenen Erregern ist auch die Gattung *Nosema* (Mikrosporidien) mit den relevanten Arten *Nosema apis* und *Nosema ceranae* finden. Bereits zu Beginn des letzten Jahrhunderts hat man *N. apis*-Infektionen als Ursache der überwiegend im Frühjahr in Honigbienenvölkern auftretenden und mit Diarrhoe verbundenen Darmerkrankung 'Nosemose' nachweisen können. Mit dem weltweiten Bekanntwerden von *N. ceranae*, der ursprünglich für die Östliche Honigbiene spezifisch geltenden *Nosema*-Art, ist eine Vielzahl von Berichten erschienen, wonach eine neuartige Form der Nosemose festzustellen sei. Diese als 'Typ-C-Nosemose' betitelte, neuartige Form soll sich von der bekannten Erkrankung besonders durch Asaisonalität, nicht vorhandene Durchfallssymptomatik und eine gesteigerte Virulenz unterscheiden. Letztere soll laut Publikationen der letzten Jahre sogar dazu geführt haben, dass *N. ceranae* sich neue Wirte, beispielsweise Hummeln, eine Gattung der Wildbienen, erschlossen habe. Auf diesen speziesübergreifenden Infektionen der Hummeln begründet, vermuten einige Wissenschaftler mindestens eine Beteiligung des neuartigen Erregers am aktuell beobachteten Rückgang der Wildbienen. Im Rahmen meiner Doktorarbeit habe ich mich intensiv mit der Epidemiologie, Symptomatik und Virulenz von *N. ceranae* beschäftigt. Diesbezüglich konnte ich wertvolle Ergebnisse für die bestehende Kontroverse über *Nosema ceranae* produzieren. Mindestens für Nordostdeutschland geltend, habe ich im Rahmen meiner vorliegenden Doktorarbeit dazu beigetragen, die Existenz einer Saisonalität von *N. ceranae*-Infektionen aufzudecken. Auch ist es gelungen, das Symptom Durchfall (Diarrhoe), bei Nosemose auf Grund von *N. ceranae*-Infektionen in Honigbienenvölkern, nachzuweisen. Abgerundet wird diese Arbeit durch die überraschenden Ergebnisse unserer umfassenden Studie über die Erreger-Wirt-Beziehung zwischen *Nosema ceranae* und *Bombus terrestris* (Hummeln), hinsichtlich der Fähigkeit des neuartigen Erregers Wildbienen infizieren zu können und somit bezüglich seines Potentials, Erreger einer sogenannten „emerging-infectious-disease“ (EID) zu sein.

2. Summary

Controversies about *Nosema ceranae* (Mikrosporidien)

Honey bees are likely to be the best-known bees, but they represent only a fraction of the world's existing bee species. The vast majority of bees is not kept by humans but considered as wildlife species. For these wild bees, according to current reports, declines in number and diversity can be observed. These declines base on a multitude of factors, such as climatic and landscape changes but also pathogens. The range of causative agents that are pathogenic for honey bees includes the genus *Nosema* (microsporidia) with its important species *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. From the beginning of last century, *N. apis*-infections were proven to be the cause of the bowel disease 'nosemosis' in honey bees, which occurs mainly in spring and is associated with diarrhoea. Accompanying the worldwide discovery of *N. ceranae*, a species which originally was considered to be associated with the Eastern honey bee, a large number of reports have appeared suggesting the occurrence of a new type of nosemosis. This new type of nosemosis, called 'type-C-Nosemosis', was reported to differ from the well-known disease and to be characterized by its aseasonality, non-existent diarrhoeic symptoms and increased virulence. According to publications of the past years, the latter helped *N. ceranae* even establishing in new hosts, e.g. bumblebees, a genus of wild bees. Based on the interspecies transmission from honey bees to bumblebees, some scientists suspect the novel pathogen to be involved in the currently observed wild bee declines. During my doctoral studies, I worked intensively on the epidemiology, symptoms and virulence of *N. ceranae*. In this regard, I was able to produce valuable results for the current controversy on *Nosema ceranae*. As part of my present doctoral thesis, we uncovered the existence of a seasonality of *N. ceranae*-infections, at least in Northeast Germany. Also, the detection and proof of diarrhoea, as a symptom of nosemosis due to *N. ceranae*-infections in honey bee colonies, was successful. Rounded off by the surprising results of our comprehensive studies on the host-pathogen interactions between *Nosema ceranae* and *Bombus terrestris* (bumblebees), my doctoral thesis is providing valuable input to the current controversy regarding the ability of this novel pathogen to infect wild bees, and thus its potential for being a causative agent of an "emerging infectious disease" (EID).

3. Einleitung / Literatur

3.1. Honigbienen sind Bienen, aber Bienen selten Honigbienen

Lebewesen unterteilen sich nach heutigem Stand der Wissenschaft in Prokaryoten und Eukaryoten. Innerhalb der Eukaryoten finden sich auch die Eumetazoa (Gewebetiere), welche sich in Vertebraten (Wirbeltiere) und Invertebraten (Wirbellose) gliedern. Zu den Wirbellosen zählen neben vielen anderen Klassen auch die Insecta (Insekten). Den Fluginsekten wiederum ist die Ordnung der Hymenoptera (Hautflügler) zugeordnet, zu der auch die Apiformes (Bienen) gehören. Von den weltweit über 20.000 bekannten Bienenarten (Michener 2007) zählen mehr als 6.000 Arten zu der Familie der Apidae (Echten Bienen) (Plant und Paulus 2016). Sie unterteilen sich ihrerseits in diverse Gattungen. Als Nutztiere in sogenannten „Beuten“ gehalten und kommerziell eingesetzt werden vor allem die zwei Gattungen *Apis* (Honigbienen) und *Bombus* (Hummeln) (Graystock et al. 2016). Der überwiegende Teil der Bienen kann somit als nicht vom Menschen gehalten, respektive als wildlebend betrachtet werden. Folglich kann jedes Individuum der gehaltenen Honigbienen und Hummeln, sowie der Wildbienen als `Biene´ bezeichnet werden. Anders herum ist eine `Biene´ aber weder eindeutig einer Gattung, noch einer Art zuzuordnen.

Erfahrungsgemäß werden mit dem unpräzisen Ausdruck `Biene´ umgangssprachlich dennoch überwiegend die Honigbienen assoziiert (Burger 2018). Sie sind die wohl bekannteste Gattung der Apiformes (Engel et al. 2009). Honigbienen gehören zu den komplex-eusozialen Insekten (Engel et al. 2009). Die komplexe Eusozialität der Honigbienen drückt sich etwa darin aus, dass jedes Lebensalter mit einer spezifischen Aufgabe im Honigbienenstaat verbunden ist (altersassoziierter Verhaltenspolymorphismus) (Robinson 1992). Zu diesen Aufgaben zählt beispielsweise das gegenseitige Füttern, Trophallaxis (Robinson 1992), welches zunächst der Brutversorgung dient, aber auch die Überwinterung des Volks begünstigt. Honigbienen überwintern als Volk, mit einer geschätzten Anzahl von bis zu 20.000 Tieren (Pritsch 2018). Diese hohe Zahl an Individuen ermöglicht frühzeitig im Jahr einen Einsatz in der Landwirtschaft, wobei durch die entwickelte Tanzsprache auch kurzzeitige Einsätze zur Bestäubung eine hohe Effizienz erreichen können (Pritsch 2018). Beschriebene Effizienz drückt sich in Sammeleifer und einer enormen Bestäubungsleistung durch das gesamte Volk aus (Pritsch 2018). Unter den Bestäubern gelten Honigbienen als wichtige Generalisten (Jaffe et al. 2010). Neben diesem besonders für höher entwickelte Ökonomien interessanten Nutzen, gilt die

Honigbienenhaltung (Imkerei), auch heute, primär der Honigproduktion (Aizen und Harder 2009). Zusätzlich zu dem Honig fallen in der Imkerei weitere, direkte Produkte wie Wachs, Pollen und Propolis an, welche auch regional vom Imker vermarktet werden können (Krell 1996; Hilmi et al. 2012). Auch wenn im asiatischen Raum auch die Östliche Honigbiene (*Apis cerana*) von Imkern gehalten wird (Winfree 2010), ist die ökonomisch wichtigste Honigbienenart weltweit die Westliche Honigbiene (Klee et al. 2007; Potts et al. 2016a).

Neben den Honigbienen sind Hummeln die zweite, in meiner Arbeit vorkommende Gattung der Bienen. Sie zählen, abgesehen von den parasitisch lebenden Hummelarten (Michener 2007), zu den primitiv-eusozialen Insekten (Free 1993; Engel et al. 2009). Ein vergleichbarer, wie in Honigbienen existierender, altersassoziierter Verhaltenspolymorphismus wurde für diese Gattung nicht beschrieben (Tobback et al. 2011). Trophallaxis, wie für Honigbienen dokumentiert, ist für Hummeln nicht bekannt (Schaefer et al. 1996; Heinrich 2004). Die Hummelkolonie wildlebender Hummeln wird jährlich neu durch eine allein in Winterstarre überwinternde, im Vorjahr begattete Königin gegründet (Free 1993). Vorzugsweise geschieht dies in ausgedienten Nestern von Kleinsäugern oder Vögeln, je nach Art, über- oder unterirdisch (Free 1993). Nur durchschnittlich 150-200 Hummeln bilden eine starke Hummelkolonie im Sommer, wohingegen Honigbienenstaaten zur gleichen Zeit bis zu 80.000 Bienen aufweisen können (Free 1993). Da Hummelkolonien nur einjährig bestehen, werden auch keine Vorräte für die Wintermonate benötigt oder angelegt (Heinrich 2004). Grundsätzlich herrschen, im Vergleich zu den Honigbienenwaben, chaotische Verhältnisse im Bau des Hummelnests (Michener 2007), ohne nennenswerte Aufkommen von Produkten im kommerziellen Sinne. Der Fokus der domestizierten Hummelhaltung liegt somit auf der Bestäubungsleistung (Free 1993).

Aus einer Vielzahl von Gründen gelten Hummeln als einer der effizientesten Bestäuber vieler Kulturen (Free 1993), vor allem in Gewächshäusern (Velthuis und Van Doorn 2006), aber auch außerhalb (Dafni et al. 2010). Zum einen wegen der transportierten Menge an Pollen in dem üppigen Körperhaar (Willmer et al. 1994). Sie sind in diesem Zusammenhang auch in der Lage mittels Vibrationssammelns („Buzzen“) an für Honigbienen verborgenen Pollen zu gelangen und eine größere Breite an Pflanzenarten zu bestäuben (Free 1993). Zum anderen erfolgt die Bestäubung durch Hummeln mit einer im Vergleich zu Honigbienen mehrfach höheren Geschwindigkeit (mehr bestäubte Blüten pro Zeiteinheit) (Poulsen 1973; Willmer et al. 1994). Weitere Unterschiede gegenüber Honigbienen sind eine vorhandene (Flug-)Aktivität von Hummeln bei dämmrigen Lichtverhältnissen (Velthuis und Van Doorn 2006) und eine Akzeptanz von vergleichsweise schlechten

Wetterverhältnissen (Willmer et al. 1994). Letztere inkludiert auch eine erhöhte Kältetoleranz durch physiologische Anpassungsprozesse des Individuums (Heinrich 1975), auf Grund derer Hummeln auch bei Temperaturen weit unter 10° Celsius aktiv sein können (Heinrich 2004; Dafni et al. 2010). Temperaturen bei denen die Aktivität von Honigbienen stark limitiert ist (Free 1993; Velthuis und Van Doorn 2006). Insgesamt ergibt sich für Hummeln somit eine Flugfähigkeit über eine längere Periode im Jahr und einen längeren Zeitraum pro Tag (Willmer et al. 1994), woraus eine länger andauernde Produktivität und Nutzbarkeit pro Jahr resultieren. Die Überlebenszeit einer kommerziell eingesetzten Hummelkolonie beträgt im Gewächshaus etwa sechs bis zwölf Wochen (Velthuis und Van Doorn 2006; Chandler et al. 2019). Eine der weltweit am häufigsten gezüchteten und in Europa verbreiteten Hummelarten ist die Dunkle Erdhummel (*Bombus terrestris*) (Chittka et al. 2004; Velthuis und Van Doorn 2006).

3.2. Die ökologische und ökonomische Bedeutung der Bienen

Die Mehrzahl der weltweiten Pflanzenarten ist bedingt abhängig von Tieren, die den Pollen transferieren und dadurch, als wichtige Ergänzung der Wind- und Selbstbestäubung, für die Befruchtung und Reproduktion der Pflanzen, aber auch die Stabilität von Ökosystemen sorgen (Potts et al. 2016b). Etwa 35% des weltweiten Nutzpflanzen-Produktionsvolumens sind überwiegend Bestäuber abhängig (Potts et al. 2016b). Für einen Teil der landwirtschaftlich genutzten, oder als Wildpflanzen in der humanen Ernährung verwendeten Pflanzenarten ist die tierische Bestäubung sogar essentiell (Free 1993; Klein et al. 2007). Der jährliche Gewinn aus der erfassten, tierischen Bestäubungsleistung beläuft sich, je nach Publikation, auf dreistellige US-Dollar-Milliardenbeträge (Potts et al. 2016b). Zwar unterliegen die oben stehenden Berechnungen bekannten Verzerrungen (Breeze et al. 2016), dennoch werden die ökologische und ökonomische Wichtigkeit der tierischen Bestäubung deutlich. Den dominierenden Teil der Bestäuber-Tiere machen Bienen aus (Potts et al. 2016b).

Um die Nahrungsmittelversorgung trotz der weltweit steigenden Bevölkerungszahl gewährleisten zu können, ist ein höheres Nahrungsmittelvolumen erforderlich (Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services 2019). Mehr Nahrungsmittelvolumen bedeutet mehr Agrikultur, woraus einerseits eine höhere Nachfrage nach Bestäubung resultiert (Aizen et al. 2008). Andererseits muss mit der wachsenden Weltbevölkerung, bei einem fixen pro Kopf Verbrauch, beispielsweise auch die Produktion von Honig steigen (Aizen und Harder 2009). Erreicht werden diese Ziele durch den verstärkten Einsatz von Honigbienenstöcken (Potts et al. 2016a), welcher je nach Quelle als sinnvoll (Kremen et al. 2002; Pritsch 2018) oder gar einzige Lösung im Rahmen der Nahrungsmittelversorgung angesehen wird (Klein et al. 2007). Allein von der Westlichen Honigbiene sind, heutigen Schätzungen zu Folge, weltweit mehr als 81 Millionen Völker landwirtschaftlich eingesetzt (Potts et al. 2016b). Dabei ist, global betrachtet, die Anzahl von kommerziell eingesetzten Honigbienenstöcken seit 1961 im Schnitt um etwa 45% gestiegen (Aizen und Harder 2009).

Neben Honigbienenstöcken werden außerdem gezüchtete Hummelkolonien für die Bestäubung eingesetzt. Bereits 1885 wurden erste Hummelköniginnen aus Großbritannien nach Neuseeland importiert, damals um für eine höhere Ausbeute der Wiesenkleoproduktion zu sorgen (Free 1993). Mit der Überwindung der von Sladen 1912 proklamierten Problemthemen 'Fortpflanzung und Überwinterung' in der Hummelhaltung Mitte des 20sten Jahrhunderts (Horber 1961; Plowright und Jay

1966;Röseler 1977;Röseler 1985) wurde die Grundlage der kommerziellen Hummelaufzucht geschaffen. Spätestens aber mit der Gründung spezialisierter Großunternehmen in den 1980er Jahren konnte dieser Wirtschaftszweig endgültig etabliert werden. Bereits 2004 wurden knapp eine Million Hummelkolonien produziert und weltweit gehandelt (Velthuis und Van Doorn 2006); 2016 sprechen Wissenschaftler in ihrer Publikation von mehr als zwei Millionen Kolonien (Graystock et al. 2016).

Trotz des Potentials in Bezug auf eine Steigerung des Nahrungsmittelvolumens, werden zunehmend negative Effekte der intensivierten Landwirtschaft und des Einsatzes von kommerziellen Honigbienenvölkern und Hummelkolonien beschrieben (Kremen et al. 2002;Klein et al. 2007). Zwar gelten für weltweit gehaltene Honigbienenvölker steigende Zahlen, aber diese Daten erfassen die Situation der wilden Honigbienen und anderen Wildbienen nicht (Aizen und Harder 2009). So hat beispielsweise die großflächige Versiegelung von natürlichen Habitaten oder dessen Umwandlung in produktive Anbauflächen zu einer Verarmung der Biodiversität geführt (Krebs et al. 1999;Kremen und Miles 2012). Speziell wildlebende Bienenarten, die besondere landschaftliche Anforderungen hinsichtlich Lebensräumen oder Futterangebot benötigen, sind negativ von den Veränderungen betroffen (Robinson und Sutherland 2002;Potts et al. 2016b). Diese Tatsache ist insbesondere interessant, weil die heutige Forschung zeigt, dass der Großteil der tierischen Bestäuber wildlebend ist (Potts et al. 2016b). Dabei gelten Bienen, die nicht der Gattung *Apis* angehören, als gleichermaßen effizient oder sogar, in Abhängigkeit von der zu bestäubenden Pflanzenart, als effizienter in ihrer Bestäubungsleistung (Kremen et al. 2002;Garibaldi et al. 2013). Nicht mehr vorhandene Wildbienen (in Masse oder Vielfalt) scheinen wiederum nicht gleichwertig durch den Einsatz von kommerziellen Honigbienenvölkern oder Hummelkolonien ersetzt werden zu können, weshalb entweder die Erhaltung von Teilen natürlichen Habitats, sogenannten „patches“, in einer konventionellen Landwirtschaft, oder eine Landwirtschaft, die grundsätzlich auf Bestäubungsleistung durch gleichzeitig wilde und domestizierte Bienen setzt, ratsam sei (Kremen et al. 2002;Winfree et al. 2007;Kremen und Miles 2012;Garibaldi et al. 2013).

Neben den agrikulturellen Entwicklungen und landschaftlichen Veränderungen, führen diverse weitere Faktoren zu dem weltweiten Geschehen, das als Rückgänge der Bienen in Masse und Vielfalt beschrieben wird (Biesmeijer et al. 2006;Le Conte und Navajas 2008;Hendriks et al. 2009;Cameron et al. 2011;Szabo et al. 2012;Pettis et al. 2013;Smith et al. 2013;Goulson et al. 2015;Kerr et al. 2015). Zu diesen Faktoren gehört auch ein breites Spektrum an potentiellen Pathogenen, welches

beispielsweise die Gesundheit der Honigbienen gefährden kann (Genersch 2010;Evans und Schwarz 2011). Hinzu kommen Berichte, wonach einige Pathogene möglicherweise von den gehaltenen Bienenvölkern oder Hummelkolonien auf ihre wilden Artverwandten übertragen werden könnten (Durrer und Schmidt-Hempel 1994;Colla et al. 2006;Otterstatter und Thomson 2008;Meeus et al. 2011;Graystock et al. 2014;Graystock et al. 2015;Graystock et al. 2016). Zu dem prinzipiellen Spektrum an Pathogenen zählen neben Bakterien, Parasiten und Viren auch Pilze, inklusive der Mikrosporidien.

3.3. Mikrosporidien der Bienen – *Nosema spp.*

3.3.1. Taxonomie und Epidemiologie

Wie bereits erwähnt, zählt zu dem Reich der Pilze auch der Stamm der Mikrosporidien (Keeling und Mcfadden 1998; Wittner und Weiss 1999; Adl et al. 2005; Corradi und Slamovits 2011). Diese auch Mikrospora genannten, einzelligen, sporenbildenden, obligaten Parasiten vermehren sich streng intrazellulär (Keeling und Mcfadden 1998; Xu und Weiss 2005; Deplazes et al. 2013). Die bekannten Wirtsspezies umfassen sowohl Invertebraten als auch Vertebraten (Wittner und Weiss 1999; Weiss 2000; Xu et al. 2006). Im Stamm der Mikrosporidien sind innerhalb der Gattung *Nosema* (*N.*) auch die für Honigbienen relevanten Arten *N. apis* und *N. ceranae* zu finden (Klee et al. 2007). Eine weitere, der Gattung zugehörige und für Hummeln spezifische Art ist *N. bombi* (Fantham und Porter 1914; Mcivor und Malone 1995), auf welche ich in meiner Arbeit nicht weiter im Detail eingehe, sie an dieser Stelle der Vollständigkeit halber aber erwähnen möchte.

Grundlegend gilt für alle durch Mikrosporidien verursachte Tierseuchen, dass diese vor allem dann auftreten können, wenn die Populationsdichte der Wirte hoch ist, wie beispielsweise in Insektenkolonien (Desportes-Livage 2000). Auf Honigbienenenvölker bezogen wurde passend dazu festgestellt, dass die *Nosema apis*-Sporenlast und -Infektionsrate steigen, wenn schlechte Wetterverhältnisse sogenannte „Reinigungsflüge“ verhindern, die Bienen dadurch gezwungen sind, in der Beute abzukoten und sich folglich der Erregerdruck im Honigbienenenvolk erhöht (Moeller 1972; Retschnig et al. 2017). *Nosema spp.*-Infektionen gelten als die häufigsten Infektionen bei adulten Honigbienen (Deplazes et al. 2013).

Nosema apis ist als Erreger in der Westlichen Honigbiene lange bekannt (Matheson 1993; Klee et al. 2007; Forsgren und Fries 2010). Die Erreger-Wirt-Beziehung wurde bereits 1909 erstmals offiziell beschrieben (Zander 1909). Der jahreszeitliche Verlauf von *N. apis*-Infektionen in *Apis mellifera* ist relativ beständig und charakterisiert durch geringe Infektionsraten während der warmen Sommermonate, kurzzeitig vermehrt auftretende Infektionen im Herbst, und dann, in Einklang mit den oben beschriebenen Beobachtungen, einen kontinuierlichen Anstieg der Infektionsraten während der Wintermonate, mit Höchstwerten im Frühjahr (Bailey 1955; Fries 1993). Seit einiger Zeit scheint die Prävalenz von *N. apis*-Infektionen in diversen Ländern zu Gunsten einer verhältnismäßig neuen Art, *Nosema ceranae*, stark zu sinken (Klee et al. 2007; Paxton et al. 2007; Emsen et al. 2016).

Nosema ceranae wurde 1996 offiziell das erste Mal als Pathogen in der Östlichen Honigbiene diagnostiziert (Fries et al.). Anfang der 2000er wurde dieser Erreger dann auch in der Westlichen Honigbiene in Europa entdeckt (Higes et al. 2006; Huang et al. 2007). Nach der Etablierung einer molekularen Differenzierungsmethode (Klee et al. 2007) haben Arbeitsgruppen weltweit den ursprünglich für *Apis cerana* spezifisch geltenden Organismus in *A. mellifera* nachgewiesen (Klee et al. 2007; Chen et al. 2008; Williams et al. 2008; Fries 2010; Yoshiyama und Kimura 2011). Retrospektive Arbeiten bezüglich der Verbreitung von *N. ceranae* in Honigbienen weisen mittels PCR auf eine Existenz dessen in *A. mellifera* bereits vor der offiziellen Entdeckung hin (Paxton et al. 2007; Ferroglio et al. 2013; Teixeira et al. 2013; Traver und Fell 2015). Als primärer Faktor für die weltweite Verbreitung des Erregers wird die Globalisierung des Handels von Honigbienen und Imkereiprodukten vermutet (Smith et al. 2013; Goblirsch 2018; Martin-Hernandez et al. 2018). Unabhängig von der Ursache der Verteilung stellt *N. ceranae* heute eines der am häufigsten in der Westlichen Honigbiene nachgewiesenen Pathogene dar (Higes et al. 2013) und gilt global als einer der häufigsten Erreger von Darminfektionen adulter Honigbienen (Deplazes et al. 2013).

Diese Entwicklung wurde, auf Grund der beobachteten Verteilung der Erregerarten in Europa, bereits frühzeitig als Nord-Süd-Gradient interpretiert (Klee et al. 2007). Passend dazu wird das Geschehen für südliche, wärmere Länder wie Spanien, Italien und Griechenland, aktuell sogar als eine Verdrängung von *N. apis* durch *N. ceranae* dargestellt (Fries 2010; Traver und Fell 2011; Martin-Hernandez et al. 2012; Milbrath et al. 2015). Diese Darstellung scheint für Länder mit eher gemäßigttem Klima nicht zuzutreffen (Klee et al. 2007; Gisder et al. 2010; Stevanovic et al. 2013). Auch deshalb wird ein Einfluss des Klimas auf das Infektionsgeschehen und die Prävalenz der Erreger diskutiert, zumal experimentelle Ergebnisse *N. ceranae* als kältesensibel im Vergleich zu *N. apis* präsentieren (Fenoy et al. 2009; Martin-Hernandez et al. 2009; Fries 2010; Gisder et al. 2010). Die Vermutung von deutlichen Unterschieden zwischen den beiden Erregern wird außerdem gestützt durch Berichte aus Spanien, wonach, statt einer von *N. apis*-Infektionen her bekannten Saisonalität des Auftretens, durchgängig hohe *N. ceranae*-Infektionsraten, von Ende Sommer bis ins nächste Frühjahr hinein, beobachtet werden konnten (Higes et al. 2006; Martin-Hernandez et al. 2007; Higes et al. 2008a). Daher wurde die fehlende „Saisonalität“ als eines der Hauptmerkmale von *N. ceranae* definiert.

Auf Grund der bezeichneten Auffälligkeiten habe ich im Rahmen meiner Dissertation Untersuchungen zur Prävalenz und Saisonalität von *N. ceranae*-Infektionen in Nordostdeutschland, sowie zu der abzuleitenden Fragestellung bezüglich der zukünftigen Bedeutung von *N. ceranae*-Infektionen für die Bienengesundheit, durchgeführt. Diese umfangreiche Untersuchung, über einen bis dato nicht angewendeten Zeitraum, wird in der ersten Publikation dargestellt (Kapitel 4.1.).

3.3.2. Lebenszyklus und Symptomatik

In der Umwelt kommen die obligat intrazellulären Parasiten der Gattung *Nosema* als infektiöse Sporen vor (Keeling und Mcfadden 1998). An diese umweltstabile Phase schließen sich, nach der Aufnahme der infektiösen Sporen durch einen geeigneten Wirt, zwei intrazelluläre Phasen (Merogonie und Sporogonie) an (Wittner und Weiss 1999). Der Entwicklungsverlauf von *N. apis* und *N. ceranae* wird allgemein als ähnlich dargestellt (Fries et al. 1996; Higes et al. 2007; Chen et al. 2009), weshalb ich ihn im Folgenden für die beiden Erreger gemeinsam beschreibe. Schematisch ist der Entwicklungsverlauf von *N. apis* in *A. mellifera* abgebildet (Abb. 1).

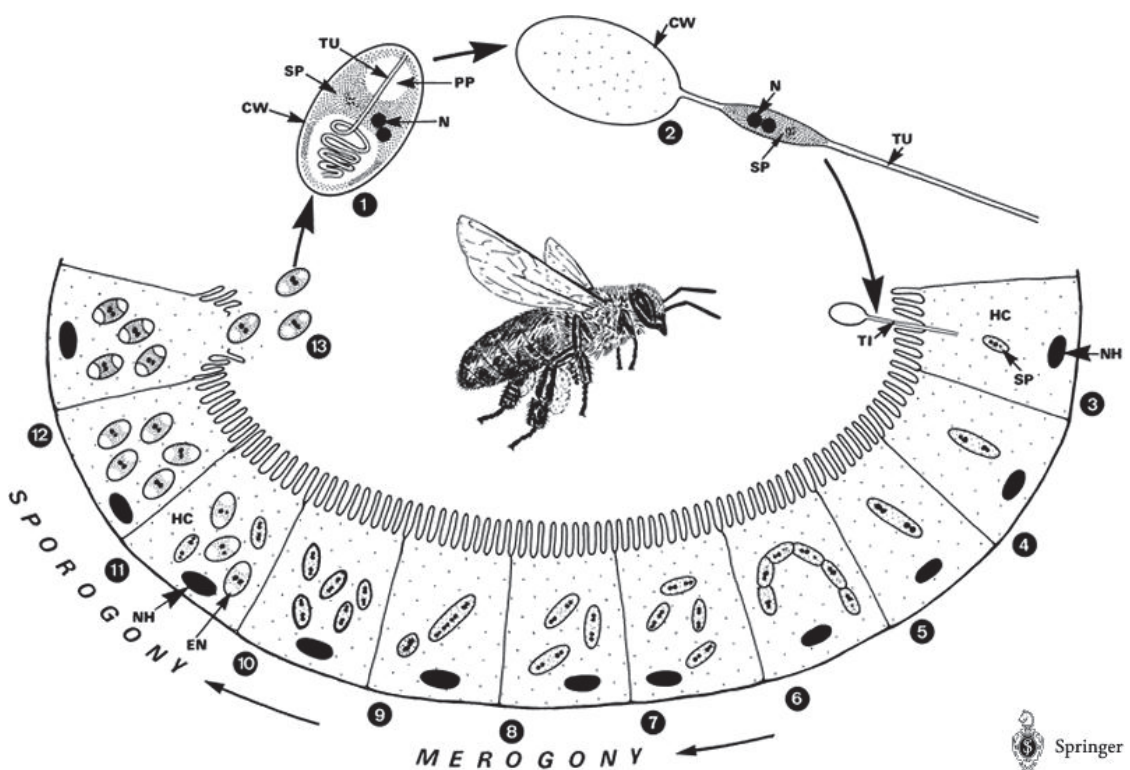


Abbildung 1: Lebenszyklus von *Nosema apis*; 1: Die infektiöse Spore mit einem typisch zweikernigen Sporoplasma; Bienen infizieren sich durch die orale Aufnahme der Sporen. 2-3: Mit dem Auskeimen der Sporen im Darmlumen wird der Infektionsapparat ausgestülpt um anschließend die Wirtszelle zu perforieren; das Sporoplasma (SP) wird durch den Tubulus in die Epithelzelle injiziert. 4-12: Das Sporoplasma teilt sich in der Wirtszelle zunächst ungeschlechtlich über vierkernige Stadien (Merogonie); dann schließen sich die entgültige Teilung und Enzystation an (Sporogonie). 13: Freisetzung der reifen *Nosema apis*-Sporen aus den lysierten Wirtszellen in das Darmlumen. CW: Sporenwand; EN: Enzystation; HC: Wirtszelle; N: Zellkern; NH: Zellkern der Wirtszelle (Darmepithelzelle); PP: Polaroplast; SP: Sporoplasma; TI: Tubulus (injiziert); TU: Tubulus. (Mehlhorn 2008)

Nach der bereits erwähnten Aufnahme durch einen geeigneten Wirt, gelangen die *Nosema* spp.-Sporen in den Mitteldarm des Wirts, wo sie, auf einen bisher nicht vollständig geklärten Primärimpuls hin, auskeimen (Xu und Weiss 2005; Gisder 2012). Das Auskeimen bezeichnet einen komplexen Ablauf, welcher mit einer Erhöhung des

hydrostatischen Drucks innerhalb der Spore beginnt und im Ausstülpfen des Mikrosporidien-spezifischen Infektionsapparats, auch Polfaden oder Tubulusapparat genannt, resultiert (Desportes-Livage 2000). Mittels dieses Infektionsapparats werden die Zielzellen (Mitteldarmepithel) aus der Ferne perforiert (Gisder et al. 2011) und das infektiöse Sporoplasma, mit dem genetischen Material des Erregers, aus der Spore durch den Tubulus in das Zielzellinnere übertragen (Keeling und Mcfadden 1998;Thomarat et al. 2004;Xu und Weiss 2005). *In vitro* konnte ermittelt werden, dass eine Dosis von etwa 10^2 , bzw. 10^4 lebensfähiger *Nosema* spp.-Sporen notwendig ist, um in einem Infektionsversuch 50%, bzw. 100% der Honigbienen-Arbeiterinnen zu infizieren (Forsgren und Fries 2010). Nach der erfolgreichen Einbringung des Sporoplasmas in die Mitteldarmepithelzellen des Wirts findet im Zytoplasma der Zielzelle zunächst die Vervielfältigung des Erregers (erste intrazelluläre Phase, proliferative Phase, Merogonie) und später dessen Sporenentwicklung (zweite intrazelluläre Phase, sporenbildende Phase, Sporogonie) statt (Larsson 1986). Für eine erfolgreiche Entwicklung ist die Einbringung des Erregers ins Zytoplasma des Wirts notwendig, da Mikrosporidien, als obligat intrazelluläre Parasiten, vollständig vom Metabolismus der Wirtszelle abhängig sind (Becnel und Andreadis 2014). Unzählige, ungeschlechtliche Zellteilungsvorgänge lassen während der Merogonie zunächst spindelförmige Meronten entstehen, welche dann während weiterer Teilungsvorgänge als gruppen- oder kettenförmige Zwischenstadien zu finden sind (Gray et al. 1969;Fries et al. 1996;Higes et al. 2007;Gisder et al. 2011). Aus den gebildeten Meronten entwickeln sich während der Sporogonie vorübergehend Sporonten, welche sich dann in Sporoblasten und folgend in sogenannte „primary- oder early-spores“ weiter differenzieren (Fries 1988;Desportes-Livage 2000;Higes et al. 2007). Manche der unreifen early-spores keimen scheinbar ohne Stimulus bereits in der Wirtszelle aus und infizieren mittels sogenannter „Autoinfektion“ ihrerseits Nachbarzellen (Avery und Anthony 1983;Sprague et al. 1992;Fries et al. 1996;Xu und Weiss 2005;Becnel und Andreadis 2014). Der intrazelluläre Lebenszyklus dauert durchschnittlich 72 Stunden (Gisder et al. 2011;Poppinga et al. 2016). Ungefähr nach zwei Wochen (*N. apis*), respektive 10 Tagen (*N. ceranae*) erreichen die Infektionen mit den jeweiligen Erregern ihre Höhepunkte, was sich histologisch durch vollständig parasitierte und mit reifen, umweltstabilen und infektiösen Sporen gefüllte Mitteldarmepithelzellen ausdrückt (Bailey 1955;Gisder et al. 2011;Poppinga et al. 2016). Die Enterozyten zeigen in Folge dessen deutliche Zeichen von Degeneration und lysieren schließlich (Higes et al. 2007;Dussaubat et al. 2012;Poppinga et al. 2016). Aus den zerrissenen Epithelzellen werden die frischen Sporen in das Darmlumen abgegeben, von wo sie dann mit dem Kot in die Umwelt gelangen

(Becnel und Andreadis 2014). Mit dem Absatz der infektiösen Sporen in die Umwelt beginnt ein neuer Infektionszyklus.

Unter natürlichen Bedingungen gelten *Nosema* spp.-infizierte Arbeiterinnen, insbesondere die Sammlerinnen, als die am stärksten befallenen Individuen im Honigbienenvolk (Higes et al. 2008a; Meana et al. 2010). Auf Infektionen mit *N. ceranae* bezogen konnte passend dazu festgestellt werden, dass in älteren Honigbienen die Gesamtsporenzahl höher ist, als in ihren jüngeren Schwestern, letztere eine *N. ceranae*-Infektion allerdings schlechter überlebten (Roberts und Hughes 2014). Im Artenvergleich scheint die Anzahl der produzierten Sporen im Falle einer *N. ceranae*-Infektion grundsätzlich höher zu sein, als bei einer *N. apis*-Infektion (Paxton et al. 2007; Huang und Solter 2013; Williams et al. 2014), was sich durch ein für *N. ceranae* gegenüber *N. apis* höheres, sogenanntes „biotisches Potential“ (maximale Kapazität der Reproduktion des Erregers unter optimalen Umweltbedingungen) erklären lasse (Martin-Hernandez et al. 2009). Diese Ergebnisse gewinnen besonders an Bedeutung während solcher Phasen, in denen beispielsweise schlechte Wetterverhältnisse (keine Reinigungsflüge möglich, Abkoten im Stock) die Populationsdichte des Wirts und somit den Erregerdruck im Honigbienenvolk steigen lassen (Übergang der Infektion von Individualebene auf Volksebene). Unter solchen, für *Nosema* spp. günstigen, Bedingungen, kann sich aus einer im Allgemeinen asymptomatischen Infektion (Anderson und Giaccon 1992; Desportes-Livage 2000) eine symptomatische Infektion entwickeln (Becnel und Andreadis 2014). Der Moment der klinischen Manifestation einer Infektion, beschreibt den Ausbruch einer Infektionskrankheit (Selbitz et al. 2011), hier also den Ausbruch einer `Nosemose`.

Es wird angenommen, dass die negativen Effekte von *Nosema* spp.-Infektionen auf die Physiologie der Honigbiene für die beiden Erregerarten ähnlich seien (Kralj und Fuchs 2010). Es lassen sich unter den beschriebenen Veränderungen generell diverse Gemeinsamkeiten finden, so zum Beispiel ein beeinträchtigter Proteinmetabolismus der individuellen Honigbiene (Malone und Gatehouse 1998). Auffällig für die Einzelbiene scheint auch ein vorzeitiges Altern mit folglich frühreifen Sammlertätigkeiten zu sein (Wang und Moeller 1970; Woyciechowski und Kozlowski 1998; Dussaubat et al. 2013). Dabei ist eine erhöhte Flugaktivität, bei gleichzeitig beeinträchtigtem Orientierungsvermögen und Heimfinde-Verhalten festgestellt worden (Woyciechowski und Kozlowski 1998; Kralj und Fuchs 2010; Goblirsch et al. 2013). Die Lebensdauer der individuellen Honigbiene scheint kürzer zu sein (Fries 1993; Malone und Giaccon 1996; Woyciechowski und Kozlowski 1998; Fries 2010). Da die Brut- und Bienenmasseentwicklung in der Folge einer *Nosema* spp.-Infektion

ebenso herabgesetzt zu sein scheinen, können diese Veränderungen gesamtheitlich zu schwachen Völkern führen (Bailey 1955;Botias et al. 2013). Eine solche Schwäche führt auf Volksebene zu einer geringeren Honigproduktion, sowie einer verminderten Bestäubungsleistung (Anderson und Giaccon 1992;Fries et al. 1996;Food and Agriculture Organization 2006;Botias et al. 2013).

Im Gegensatz zu den vorgenannten, wenig diskutierten klinischen Erscheinungen einer Nosemose, gibt es über das Symptom `Durchfall` (Diarrhoe) starke Kontroversen. Diarrhoe gilt grundsätzlich als eine Veränderungen des Kotabsatzes in Frequenz, Konsistenz und Menge auf Grund einer Vielzahl von möglichen Ursachen (World Health Organization 2021). Als eine mögliche Ursache gelten auch Infektionskrankheiten des Gastrointestinal Traktes (World Health Organization 2021), wie etwa eine Nosemose. Die Food and Agriculture Organization (FAO), beispielsweise, definiert die Nosemose zwar allgemein als eine durch Diarrhoe bei erwachsenen Honigbienen gekennzeichnete Erkrankung, relativiert dies aber im Verlaufe der Veröffentlichung auf *N. apis*-Infektionen (Food and Agriculture Organization 2020). Denn akzeptiert gilt Diarrhoe in Form von Kotflecken, abgesetzt in charakteristischen, sogenannten „Pünktchenketten“ am Flugloch oder sogar im Beuteninneren, bisher nur für eine *N. apis*-Infektion (Bailey 1955;Fries 1993). Es sind auch Veröffentlichungen zu finden, wonach eine derartige Diarrhoe genauso bei Nosemose auf Grund einer *N. ceranae*-Infektion existiere (Stevanovic et al. 2013;Poppinga et al. 2016), der größere Teil an Publikationen der letzten Jahre hält aber daran fest, dass dieses Symptom bei Nosemose auf Grund einer *N. ceranae*-Infektion nicht zu finden sei. Vielmehr stünde dort eine deutlich erhöhte Mortalität, mit teilweise sogar spontanen Zusammenbrüchen von Honigbienenvölkern, ohne vorherige Durchfall-Symptomatik im Vordergrund (Higes et al. 2006;Martin-Hernandez et al. 2007;Higes et al. 2008a). Die deutlichen Divergenzen drücken sich konkret in der Definition einer vermeintlich andersartigen Nosemose, namens „Typ-C-Nosemose“, aus (Higes et al. 2010), zu deren charakteristischen Merkmalen, neben der fehlenden Saisonalität, die fehlenden Durchfallerscheinungen gehören.

Um die, bei Diarrhoe im Honigbienenvolk (vorzugsweise im Frühjahr) klassischer Weise im Raum stehende Verdachtsdiagnose `Nosemose` genauer bewerten und der bestehenden Diskussion belastbare Fakten beisteuern zu können, habe ich im Rahmen meiner Dissertation, unter Anwendung einiger nachstehend aufgeführter Laborverfahren, diesbezüglich Untersuchungen durchgeführt. Das Ziel war es, den diagnostischen Wert von Durchfall in Form von Kotflecken im Bienenvolk zu ermitteln. Alle Resultate und die umfassende Analyse bilden die zweite Veröffentlichung (Kapitel 4.2.).

Diagnostik

Im Rahmen der Diagnostik möchte ich an dieser Stelle erneut auf die Tatsache der überwiegend asymptomatischen Infektionen hinweisen. Symptomatische, *Nosema* spp.-infizierte Honigbienen können makroskopisch häufig an einem geschwollenen Abdomen erkannt werden. Der resezierte Gastrointestinal Trakt dieser Honigbienen fällt meistens durch einen glänzend milchig-weißen statt hellbraunen Farbeindruck auf (Fries 1993;Fries et al. 1996;Food and Agriculture Organization 2006). Für die auf dem Nachweis der *Nosema* spp.-Sporen basierende, qualitative und quantitative Routineuntersuchung unter einem Lichtmikroskop, werden meistens zerkleinerte Honigbienen- oder Kotproben nativ unter 400-facher Vergrößerung analysiert (Cantwell 1970). Auch für eine Differenzierung von weiteren Probenbestandteilen, wie Hefen oder Pilzsporen, ist hier die lichtbrechende Eigenschaft der Sporen, speziell bei gleichzeitiger Anwendung eines Phasenkontrastmikroskops, hilfreich (Fries et al. 2013). Als das Standardnachweisverfahren für Mikrosporidien im Gewebe, finden Giemsa-gefärbte Quetschpräparate des Gastrointestinal Traktes auch bei dem *Nosema*-spp.-Nachweis ihre Anwendung (Fries et al. 2013). Da die Unterscheidung der Erregerarten unter dem Lichtmikroskop, auf Basis der Morphologie der Sporen, selbst erfahrenen Wissenschaftlern schwer fällt (Fries et al. 2013) und die Erreger häufig gemeinsam, also als Mischinfektionen, in Honigbienen zu finden sind (Chen et al. 2009;Burgher-Maclellan et al. 2010), haben sich für die Differenzierung der Arten diverse molekulare Verfahren etabliert. Hauptsächlich werden aktuell PCR-basierte Verfahren genutzt (Klee et al. 2007;Evans et al. 2013;Gisder und Genersch 2013). Eine neue, im Vergleich zur PCR sensitivere, sowie schnellere und insgesamt kostengünstigere Technik zur Detektion von (bisher nur) *N. ceranae* bietet die sogenannte „loop-mediated isothermal amplification“ (LAMP) (Lannutti et al. 2020). Für besondere Fragestellungen sind eine spezifische „Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung“ (FISH) und sogar ein Zellkulturverfahren beschrieben (Gisder et al. 2011). Eine Quantifizierung der *Nosema* spp.-Infektionen, basierend auf der Zählung der Sporen, findet meist mit Hilfe eines Haemozytometers statt (Cantwell 1970).

3.3.3. Virulenz und Transmission

Die Pathogenität, also die qualitative Eigenschaft einer Erregerspezies, in einem Wirtsorganismus eine Krankheit auslösen zu können, ist für *Nosema* spp. weiter oben beschrieben und in Honigbienen grundsätzlich bestätigt. Die Virulenz hingegen beschreibt die quantitative Eigenschaft eines Pathogenes, Schädigungen im Organismus hervorzurufen, oder anders gesagt, das Ausmaß der Schädigungen (Selbitz et al. 2011). Sie wird auf Erregerseite durch Virulenzfaktoren bestimmt, also Eigenschaften einer Art, welche dem Erreger zu einer erfolgreichen Infektion eines Organismus verhelfen (Selbitz et al. 2011). Zur Virulenz zählt auch die Eigenschaft eines Pathogenes, sich neue Wirte zu erschließen und damit seinen „Lebensraum“ zu vergrößern (Selbitz et al. 2011). Dies kann, je nach Ausprägung der Wirtsspezifität, innerhalb einer Spezies (intraspezifisch), aber auch zwischen verschiedenen Spezies oder Gattungen (interspezifisch) stattfinden (Deplazes et al. 2013). Für einen erfolgreichen Wirtswechsel, also die Etablierung eines Pathogenes in einem neuen Wirt, muss das Pathogen den Wirt zunächst infizieren, sich anschließend selbst vervielfältigen und in der Wirtspopulation verbreiten können (Selbitz et al. 2011; Deplazes et al. 2013). Dazu ist neben den Eigenschaften des Erregers auch eine für das jeweilige Pathogen vorliegende Empfänglichkeit (Sensibilität) seitens des Wirts nötig (Selbitz et al. 2011). Neben den beschriebenen, sogenannten „echten Wirten“ existieren beispielsweise Transportwirte, welche dem Pathogen ausschließlich als Vehikel, im Sinne eines belebten mechanischen Vektors, dienen (Selbitz et al. 2011; Deplazes et al. 2013). In solchem Fall passiert der Erreger zum Beispiel unverändert und ohne Interaktion den Gastrointestinal Trakt des Wirts (Selbitz et al. 2011). Die Bedeutung von Transportwirten liegt dabei vor allem in der Verbreitung (Transmission) eines Erregers (Selbitz et al. 2011).

Die Transmission von *Nosema* spp. erfolgt nach heutigem Wissensstand horizontal und überwiegend auf einer fäkal-oralen Infektionsroute (Fries und Camazine 2001). Vor allem werden Infektionen durch die Aufnahme von Sporen bei Reinigungstätigkeiten innerhalb der Beuten (Fries 1993; Webster 1993) beschrieben, beispielsweise durch Säuberung der Beute von Kotresten oder über kontaminiertes Wachs (Malone und Gatehouse 1998). Als weitere ernstzunehmende Infektionsquelle gilt kontaminiertes Futter (Desportes-Livage 2000; Weiss 2000; Fries und Camazine 2001; Martin-Hernandez et al. 2018). So sind zum Beispiel Infektionen nach der Aufnahme von *N. ceranae*-kontaminiertem Pollen (Higes et al. 2008b) beschrieben. Speziell auf Trachtpflanzen mit nutritiver Funktion für verschiedene Arten entfällt diesbezüglich eine besondere Bedeutung. Sie werden aktuell von der Literatur im Sinne sogenannter „pathogen hubs“ diskutiert, also als ursächliche Knotenpunkte für

die Transmission von Pathogenen (Durrer und Schmidt-Hempel 1994; Otterstatter und Thomson 2008; Fürst et al. 2014; Goulson et al. 2015; Graystock et al. 2015).

Vermeehrt haben Wissenschaftler in den letzten Jahren Ergebnisse zum Nachweis von *N. ceranae* in Hummeln präsentiert und sehen darin Beweise für eine bereits stattgefunden Transmission des Pathogenes (Plischuk et al. 2009). Weltweit existieren Berichte von *N. ceranae*-Infektionen in fast allen Gattungen der Apidae, vor allem aber in Hummeln und innerhalb dieser Gattung überwiegend in *Bombus terrestris* (Graystock et al. 2013; Fürst et al. 2014; Arbulo et al. 2015; Martin-Hernandez et al. 2018). Einige Wissenschaftler behaupten sogar, mit den Ergebnissen aus Infektionsversuchen Beweise dafür gefunden zu haben, dass Hummeln als echte Wirte für *N. ceranae* in Frage kämen (Li et al. 2012; Fürst et al. 2014).

Unter diesen Umständen wäre es folglich richtig, anzunehmen, dass *Nosema ceranae* eventuell doch eine gesteigerte Virulenz gegenüber *N. apis* aufweise (Paxton et al. 2007). Und daraus abgeleitet, *N. ceranae* bisher unbekannte Eigenschaften besäße, die es diesem Erreger ermöglicht hätten, einen neuen Wirt zu erschließen. Weitergehend wäre man der Ursache für die mancherorts dramatischen Rückgänge von wildlebenden Hummeln in Häufigkeit und Vielfalt (Cameron et al. 2011; Goulson et al. 2015) möglicherweise näher. In diesem Zusammenhang wird *N. ceranae* in einigen Publikationen als ein Erreger einer sogenannten „emerging infectious disease“ (EID) beschrieben (Plischuk et al. 2009; Graystock et al. 2013). Von solchen, neuartigen Infektionskrankheiten geht potentiell eine Gefahr für Menschen, Tiere und Umwelt aus (Binder et al. 1999; Daszak et al. 2000). Eine Beteiligung an den vorherrschenden Speziesverlusten gilt für sie als wahrscheinlich (Daszak et al. 2000). Als interspezifisches Infektionsgeschehen wären die *Nosema ceranae*-Infektionen in Hummeln daher von besonderer Relevanz. Mittelbar aus ökonomischer und unmittelbar aus epidemiologischer sowie mikrobiologischer Sicht.

Andererseits könnte man die oben genannten Berichte über *Nosema ceranae*-Infektionen in einer neuen Wirtsspezies anzweifeln, da die Ergebnisse nahezu ausschließlich auf reinen PCR-Nachweisen beruhen und der alleinige Nachweis von Fragmenten der Erreger-DNA nicht ausreichend ist für den Nachweis einer Infektion (Brown 2017). Denkbar wären auch Fehler in der Interpretation der angewandten Techniken, beispielsweise hinsichtlich der Differenzierung einer Kontaminationen von einer Infektionen (Huang und Solter 2013). In der dritten Veröffentlichung (Kapitel 4.3.) werden deshalb in diversen Infektionsversuchen die Fähigkeiten von *Bombus terrestris*, als echter Wirt für *Nosema ceranae* zu dienen, untersucht, um die Relevanz

des Erregers, auch im Zusammenhang mit Wildbienenverlusten und der vermuteten Rolle als Erreger einer EID, besser einschätzen zu können.

4. Hauptteil / Publikationen

4.1. Long-Term Temporal Trends of *Nosema* spp. Infection Prevalence in Northeast Germany: Continuous Spread of *Nosema ceranae*, an Emerging Pathogen of Honey Bees (*Apis mellifera*), but No General Replacement of *Nosema apis*

4.1.1. Eigenanteil

In dieser Langzeitstudie haben wir uns intensiv mit der Prävalenz und Saisonalität der *Nosema* spp. in Nordostdeutschland beschäftigt. Meine Arbeit lag vor allem in der anteiligen, experimentellen Umsetzung der Studie. So konnte ich sowohl durch die mikroskopische und molekulare Diagnostik, aber auch durch die nachfolgende Analyse der Ergebnisse entscheidend dazu beitragen, das Kernstück dieser Veröffentlichung herauszuarbeiten. Der Beteiligung an der inhaltlichen Überarbeitung des Manuskripts folgte meine Zustimmung zur publizierten Endversion.

4.1.2. Publikation

Titel: Langzeittrends der *Nosema* spp.-Infektionsprävalenz in Nordostdeutschland: Kontinuierliche Ausbreitung von *Nosema ceranae*, einem neuartigen Krankheitserreger in Honigbienen (*Apis mellifera*), jedoch keine allgemeine Verdrängung von *Nosema apis*

Autoren: Sebastian Gisder¹
Vivian Schüler¹
Lennart L. Horchler¹
Detlef Groth²
Elke Genersch^{1,3}

¹ Departm. of Molecul. Microbiol. and Bee Diseases, Institute for Bee Research, Hohen Neuendorf, Germany

² Institute of Biochemistry and Biology, University of Potsdam, Potsdam-Golm, Germany

³ Instit. für Mikrobiol. und Tierseuchen, Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin, Berlin, Germany

Journal: Front. Cell. Infect. Microbiol., Juli 2017, Vol. 7, Art. 301

DOI: 10.3389/fcimb.2017.00301
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00301>



Long-Term Temporal Trends of *Nosema* spp. Infection Prevalence in Northeast Germany: Continuous Spread of *Nosema ceranae*, an Emerging Pathogen of Honey Bees (*Apis mellifera*), but No General Replacement of *Nosema apis*

Sebastian Gisder¹, Vivian Schüler¹, Lennart L. Horchler¹, Detlef Groth^{2*} and Elke Genersch^{1,3*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Anton Aebischer,
Robert Koch Institut, Germany

Reviewed by:

Katherine E. Roberts,
University of Exeter, United Kingdom
Robert John Paxton,
Martin Luther University of
Halle-Wittenberg, Germany

*Correspondence:

Detlef Groth
dgroth@uni-potsdam.de
Elke Genersch
elke.genersch@hu-berlin.de

Received: 23 February 2017

Accepted: 20 June 2017

Published: 06 July 2017

Citation:

Gisder S, Schüler V, Horchler LL,
Groth D and Genersch E (2017)
Long-Term Temporal Trends of
Nosema spp. Infection Prevalence in
Northeast Germany: Continuous
Spread of *Nosema ceranae*, an
Emerging Pathogen of Honey Bees
(*Apis mellifera*), but No General
Replacement of *Nosema apis*.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 7:301.
doi: 10.3389/fcimb.2017.00301

¹ Department of Molecular Microbiology and Bee Diseases, Institute for Bee Research, Hohen Neuendorf, Germany,

² Institute of Biochemistry and Biology, University of Potsdam, Potsdam-Golm, Germany, ³ Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin, Berlin, Germany

The Western honey bee (*Apis mellifera*) is widely used as commercial pollinator in worldwide agriculture and, therefore, plays an important role in global food security. Among the parasites and pathogens threatening health and survival of honey bees are two species of microsporidia, *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. *Nosema ceranae* is considered an emerging pathogen of the Western honey bee. Reports on the spread of *N. ceranae* suggested that this presumably highly virulent species is replacing its more benign congener *N. apis* in the global *A. mellifera* population. We here present a 12 year longitudinal cohort study on the prevalence of *N. apis* and *N. ceranae* in Northeast Germany. Between 2005 and 2016, a cohort of about 230 honey bee colonies originating from 23 apiaries was sampled twice a year (spring and autumn) resulting in a total of 5,600 bee samples which were subjected to microscopic and molecular analysis for determining the presence of infections with *N. apis* or/and *N. ceranae*. Throughout the entire study period, both *N. apis*- and *N. ceranae*-infections could be diagnosed within the cohort. Logistic regression analysis of the prevalence data demonstrated a significant increase of *N. ceranae*-infections over the last 12 years, both in autumn (reflecting the development during the summer) and in spring (reflecting the development over winter) samples. Cell culture experiments confirmed that *N. ceranae* has a higher proliferative potential than *N. apis* at 27° and 33°C potentially explaining the increase in *N. ceranae* prevalence during summer. In autumn, characterized by generally low infection prevalence, this increase was accompanied by a significant decrease in *N. apis*-infection prevalence. In contrast, in spring, the season with a higher prevalence of infection, no

significant decrease of *N. apis* infections despite a significant increase in *N. ceranae* infections could be observed. Therefore, our data do not support a general advantage of *N. ceranae* over *N. apis* and an overall replacement of *N. apis* by *N. ceranae* in the studied honey bee population.

Keywords: honey bee, *Apis mellifera*, *Nosema* spp., epidemiology, replacement

INTRODUCTION

The Western honey bee *Apis mellifera* is a valuable generalist pollinator for many flowering plants in both natural and agricultural ecosystems. In agriculture, commercial pollination of crop plants, that depend on insect pollination for fruit set and seed production, is provided mostly by managed *A. mellifera* colonies which can, therefore, be regarded as productive livestock. The cultivation of pollinator-dependent crops is expanding all over the world; hence, there is an increasing demand for insect pollination in worldwide agriculture (Aizen et al., 2008, 2009; Aizen and Harder, 2009). Although, this demand is partially met by a globally increasing number of managed honey bee colonies (Aizen et al., 2008, 2009; Moritz and Erler, 2016), increasing problems with honey bee health resulting in severe honey bee colony losses pose a serious threat to human food security. Research of the last decade has identified a multitude of factors like pathogens, pesticides, and abiotic stressors being associated with unusually high and inexplicable losses of honey bee colonies (Genersch, 2010; Ratnieks and Carreck, 2010; Cornman et al., 2012; Pettis et al., 2013; Goulson et al., 2015). Among the pathogens studied and discussed in this context are two microsporidian parasites, *Nosema apis* (*N. apis*) and *N. ceranae*, (Cox-Foster et al., 2007; Higes et al., 2008; Genersch, 2010) which infect adult honey bees (Bailey, 1955).

Microsporidia are highly specialized, spore-forming fungi which are optimally adapted to an obligate intracellular parasitic life style (Keeling and Fast, 2002). Outside of host cells, microsporidia exist as metabolically inactive, infective spores. For *N. apis* and *N. ceranae*, the infection process starts with the ingestion of infective spores by an adult honey bee. The spores germinate in the midgut thereby extruding the polar tube. If the polar tube pierces a host cell, the sporoplasm is injected into the cell through the polar tube (Bigliardi and Sacchi, 2001; Franzen, 2005). Following the injection of the sporoplasm, it takes about 96 h until the first environmental spores are produced by an infected cell (Gisder et al., 2011). The spores are released into the gut lumen through cell lysis and leave the body of the infected host by defecation (Bailey, 1955; Bailey and Ball, 1991). Heavy *Nosema* spp.-infections of adult honey bees may result in dysentery (Bailey, 1967). Adult bees suffering from diarrhea will show abnormal defecation behavior, i.e., will defecate inside the hive, resulting in fecal spots on combs and frames. Nest mates cleaning these spots will ingest *Nosema* spp. spores and become infected (Bailey and Ball, 1991). Infections with *Nosema* spp. are widespread in honey bee populations. Most infected honey bees do not develop nosemosis and do not show any obvious symptoms like dysentery but may have an increased foraging or flight activity (Woyciechowski and Kozłowski, 1998; Dussaubat et al., 2013) despite impaired orientation and homing skills (Kralj

and Fuchs, 2010; Wolf et al., 2014) and may have a suppressed immune system (Antunez et al., 2009; Chaimanee et al., 2012), as well as a reduced life span (Wang and Moeller, 1970; Malone and Giaccon, 1996; Fries, 2010).

Nosema apis-infections in honey bees have been studied intensively over the last 100 years and there is little debate on the rather low impact of this parasite on *A. mellifera* colonies (Bailey and Ball, 1991). However, the impact of *N. ceranae*-infections on colony health and survival is still controversially discussed (Higes et al., 2008; Genersch et al., 2010; Gisder et al., 2010; Guzman-Novoa et al., 2011; Stevanovic et al., 2011; Fernández et al., 2012). The emerging picture is that *N. ceranae* might cause colony death in warmer climates like Southern Europe (Higes et al., 2007, 2008, 2009; Martin-Hernandez et al., 2007; Botfás et al., 2013; Cepero et al., 2014) whereas colony losses in Northern Europe or the Americas could not be associated with *N. ceranae* so far (Invernizzi et al., 2009; Genersch et al., 2010; Gisder et al., 2010; Williams et al., 2010; Guzman-Novoa et al., 2011) suggesting a climatic influence on *N. ceranae* virulence (Gisder et al., 2010) or differences in *N. ceranae* susceptibility between regionally predominating *A. mellifera* subspecies (Fontbonne et al., 2013; Huang et al., 2015).

Initially it was thought that *N. apis* is specific for the Western honey bee *A. mellifera* (Zander, 1909), while its congener *N. ceranae* was described as a microsporidian parasite of the Eastern honey bee *A. cerana* (Fries et al., 1996), a native of South- and Southeast Asia. Although, experimental infection showed from the very beginning that *N. ceranae* can also successfully infect *A. mellifera* (Fries, 1997), it took nearly a decade until the first natural infections of *A. mellifera* colonies with *N. ceranae* were reported (Higes et al., 2006; Huang et al., 2007). It soon became evident that *N. ceranae* was not only much more widespread than expected in the global *A. mellifera* populations but that it was even the predominant species in many regions (Klee et al., 2007; Chen et al., 2008; Williams et al., 2008; Invernizzi et al., 2009; Chen and Huang, 2010; Yoshizawa and Kimura, 2011; Copley et al., 2012). Based on this epidemiological evidence it was suggested that *N. ceranae* is replacing *N. apis* in the honey bee populations worldwide. This process is thought to be driven by an asymmetric within-host competition between *N. apis* and *N. ceranae* favoring the spread of *N. ceranae* (Williams et al., 2014; Natsopoulou et al., 2015) although not all studies observed interspecific competition between *N. apis* and its congener *N. ceranae* (Forsgren and Fries, 2010; Milbrath et al., 2015).

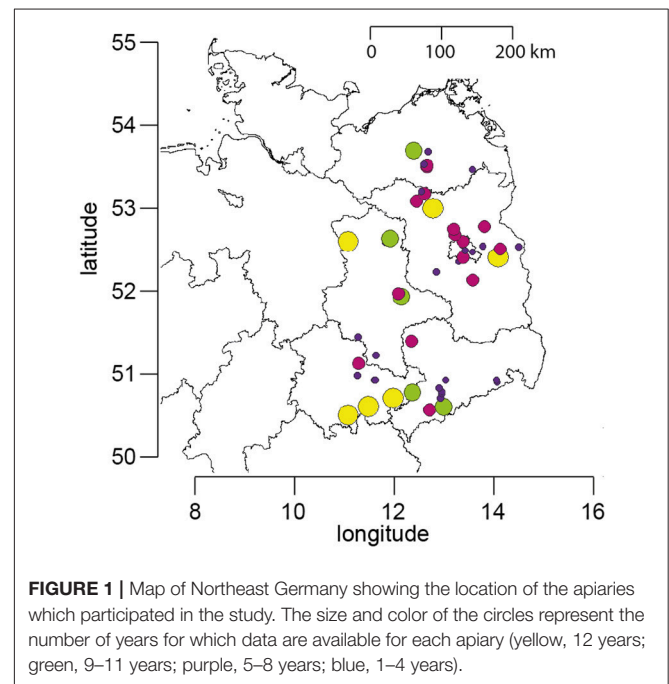
However, a pan-European study on the prevalence of *N. apis* and *N. ceranae* reported that in South-European countries, such as Italy and Greece, *N. ceranae* had indeed practically replaced *N. apis* while this was not observed in Northern Europe (Ireland, Sweden, Norway, and Germany) (Klee et al., 2007). These data pointed to climatic factors differentially influencing

assertiveness, establishment, spread, and, hence, prevalence of *N. apis* and *N. ceranae*. Experimental evidence exists showing that *N. ceranae* spores, but not *N. apis* spores, nearly lose their ability to germinate and, hence, their infectivity when exposed to temperatures close to or below freezing (Fenoy et al., 2009; Fries, 2010; Gisder et al., 2010). In addition, experimental infection of adult bees showed proliferation of *N. ceranae*—but not of *N. apis*—to be unaffected by temperatures above 33°C (Martin-Hernandez et al., 2009). These data strongly argue for an advantage of *N. ceranae* over *N. apis* in warmer climates. In contrast, the cold-sensitivity of *N. ceranae* spores might slow down the replacement process in colder climates (Gisder et al., 2010), a hypothesis that could recently be substantiated by mathematical modeling of the replacement process when taking into account the parameters warmer and colder climate (Natsopoulou et al., 2015). However, long term epidemiological data on *Nosema* spp. prevalence allowing the observation of the spread of the emerging pathogen *N. ceranae* and evaluating the proposed process of replacement of *N. apis* by *N. ceranae* in a given honey bee population have been lacking so far. To fill this gap, we here present our results of a 12 year cohort study on the prevalence of *N. apis* and *N. ceranae* in Northeast Germany conducted on a cohort of about 230 honey bee colonies. The duration of the study, and the size of the cohort enabled us to statistically analyse the long term temporal trends in prevalence of *N. apis*- and *N. ceranae*-infections in the study area. We also show data from laboratory experiments substantiating our epidemiological data. We provide evidence that the continuous spread of *N. ceranae* and continuously increasing levels of *N. ceranae*-infection prevalence at population level not necessarily result in the replacement of *N. apis*.

MATERIAL AND METHODS

Bee Samples, Field Survey and Molecular Differentiation of *N. apis* and *N. ceranae*

The data set on *Nosema* spp. prevalence comprises data from spring 2005 to autumn 2016, which were collected in the course of a 5 year longitudinal cohort-study on *Nosema* spp. epidemiology (Gisder et al., 2010) and of the still ongoing “German Bee Monitoring Project” (Genersch et al., 2010). About 23 apiaries located in Northeast-Germany (Figure 1) participated in the projects with 10 colonies (“monitoring colonies”) each. Monitoring colonies that collapsed during the study were replaced by colonies from the same apiary, if available by a nucleus colony made from the collapsed colony in the previous year. This procedure ensured that each apiary always contributed 10 monitoring colonies throughout the study period. Due to the long duration of the study, some fluctuation of participating apiaries could not be avoided. However, nearly half of the apiaries (11 of ~23) participated for more than 9 years and six of them even for the entire duration of the study, i.e., 12 years; at least 20 bee keepers provided samples over a time period of consecutive 5–11 years (Figure 1). When an apiary dropped out, a similar apiary in terms of size, bee race, landscape, region, and history of losses and diseases was chosen



as replacement and included in the study as soon as possible. This resulted in an annual mean of 22.67 ± 1.72 (mean \pm SD) apiaries participating in spring and 24.0 ± 2.83 (mean \pm SD) apiaries participating in autumn. All monitoring colonies were sampled twice a year, in spring and in autumn, resulting in a total of 5,600 honeybee samples collected and analyzed from the participating apiaries over the 12 year study period (Table 1).

Sampling of bees as well as diagnosis of *N. apis* and *N. ceranae* were performed essentially as already described (Gisder et al., 2010). Briefly, from each apiary, a group of 10 bee colonies [annual mean: 10 ± 0.31 (mean \pm SD) colonies in spring and 10.01 ± 0.14 (mean \pm SD) colonies in autumn] was randomly selected at the beginning of the study or when the beekeeper entered the study and designated “monitoring colonies.” From these colonies, bee samples were collected in spring and autumn each year and were stored at -20°C until analysis. Spring samples collected end of March/beginning of April consisted of dead bees fallen onto the bottom board during the winter season (representing the bees that died over winter) to enable sampling of colonies that collapsed during the winter season (October to March) as well as of surviving colonies. Autumn samples collected in late September/beginning of October consisted of live in-hive bees taken from a super above the queen excluder thus ensuring that only the oldest bees (representing the most frequently infected bees) were sampled (Fries et al., 2013). Diagnosis of *Nosema* spp. infections was performed by microscopic examination of 20 homogenized bee abdomens according to the “Manual of Standards for Diagnostics and Vaccines” published by the Office International des Epizooties (OIE), the World Organization for Animal Health (Anonymous, 2008). The moderate sample

TABLE 1 | Prevalence of colonies infected with *N. apis* only (*N. apis*) or *N. ceranae* only (*N. ceranae*) or with *N. apis* and *N. ceranae* (co-infection) from spring 2005 to autumn 2016.

		Total number of analyzed colonies	Infected Colonies [infection categories]					
			<i>N. apis</i>		<i>N. ceranae</i>		co-infection	
			<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Spring	2005	220	37	16.8	9	4.1	6	2.7
Autumn	2005	237	19	8.0	10	4.2	1	0.4
Spring	2006	238	43	18.1	10	4.2	14	5.9
Autumn	2006	226	15	6.6	3	1.3	2	0.9
Spring	2007	228	7	3.1	34	14.9	10	4.4
Autumn	2007	219	10	4.6	4	1.8	1	0.5
Spring	2008	209	35	16.8	18	8.6	21	10.1
Autumn	2008	210	6	2.9	5	2.4	0	0.0
Spring	2009	210	33	15.7	23	11.0	12	5.7
Autumn	2009	180	9	5.0	7	3.9	0	0.0
Spring	2010	247	27	10.9	25	10.1	4	1.6
Autumn	2010	250	10	4.0	16	6.4	0	0.0
Spring	2011	230	42	18.3	25	10.9	16	7.0
Autumn	2011	255	7	2.8	7	2.8	5	2.0
Spring	2012	252	24	9.5	33	13.1	23	9.1
Autumn	2012	278	6	2.2	19	6.8	0	0.0
Spring	2013	233	15	6.4	30	12.9	12	5.2
Autumn	2013	257	17	6.6	21	8.2	4	1.6
Spring	2014	224	41	18.3	33	14.7	7	3.1
Autumn	2014	261	4	1.5	8	3.1	0	0.0
Spring	2015	198	25	12.6	15	7.6	7	3.5
Autumn	2015	250	5	2.0	3	1.2	0	0.0
Spring	2016	230	43	18.7	21	9.1	4	1.7
Autumn	2016	258	8	3.1	27	10.5	0	0.0

Given are the total number of analyzed colonies per year and season as well as the numbers (*n*) and proportions (%) of colonies within each infection category.

size is adequate because the experimental unit is the colony (Doull and Cellier, 1961; Doull, 1965). Infection status of the colonies represents detectable levels of infection above 15% with 96% probability of detection (Fries et al., 1984, 2013; Pirk et al., 2013) which can be considered biologically relevant (Higes et al., 2008). For molecular species differentiation, *Nosema* spp.-positive homogenates were processed and analyzed via PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) as previously described (Gisder et al., 2010). Results were further verified by re-analyzing randomly selected samples via a recently developed differentiation protocol (Gisder and Genersch, 2013) which is based on the detection of species-specific sequence differences in the highly conserved gene coding for the DNA-dependent RNA polymerase II largest subunit. Based on the diagnostic results, four infection categories were defined: Microscopic analysis resulted in the category “*Nosema* spp.” while molecular differentiation allowed for the categories “*N. apis*” (single infection), “*N. ceranae*” (single infection), and “co-infection” (infection with both *N. ceranae* and *N. apis*) (Table 1).

Purification of *Nosema* spp. Spores for *In Vitro*-Infection

Honey bee colonies of the apiary of the Institute for Bee Research were screened for *Nosema* spp.-infections by microscopic analysis of 20 randomly collected adult bees (see above and Anonymous, 2008). *Nosema* spp.-positive samples were molecularly differentiated as previously described (Gisder and Genersch, 2013) to identify samples either containing only *N. ceranae* or only *N. apis* spores. Purification of *N. apis* or *N. ceranae* spores was exclusively performed with freshly sampled bees, because freezing or long-term storage affect spore viability and infection rate (Fenoy et al., 2009; Fries, 2010; Gisder et al., 2010). Midguts were carefully isolated from individual bees by using fresh forceps for each bee. Twenty midguts were pooled in 1.5 ml reaction tubes and spore purification was performed as already described (Gisder et al., 2010).

Viability of the purified spores was checked via *in vitro*-germination. To this end, an aliquot of freshly isolated spores was air-dried onto glass slides for 30 min at room temperature. Germination was triggered by adding 20 μ l of 0.1 M sucrose solution buffer directly to the dried spores. Germination process was analyzed under an inverse microscope (VWR, Darmstadt, Germany) at 400x magnification with phase contrast. *Nosema* spp. spores were counted in a hemocytometer (Neubauer-improved, VWR, Darmstadt, Germany) under an inverse microscope (VWR, Darmstadt, Germany) at 100x magnification. Only those spore preparations that were able to germinate under *in vitro* conditions were used for cell culture experiments.

In vitro-Infection of Cultured IPL-LD-65Y Cells

The insect cell line IPL-LD-65Y derived from the gypsy moth *Lymantria dispar* was obtained from the *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ, Braunschweig, Germany) and maintained for routine culture as given in the accompanying data sheet. For *in vitro*-infection of cultured IPL-LD-65Y-cells, aliquots of about 5×10^7 spores, purified as described above, were dried in 1.5 ml reaction tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany) in a vacuum concentrator (Eppendorf, Hamburg, Germany) for 30 min at 30°C. Subsequently, infection of IPL-LD-65Y cells with germinating spores was performed as previously described (Gisder et al., 2011). Briefly, IPL-LD-65Y cells were infected with freshly isolated *N. apis* or *N. ceranae* spores with a multiplicity of infection (MOI) of 20. Infected cells (100 μ l with 2.5×10^5 cells/ml) were seeded in the cavities of six 96-well microtiter plates. *N. apis*- and *N. ceranae*-infected cells were incubated at 21°, 27°, or 33°C. Infected cells were centrifuged on glass slides at the time points 24, 32, 48, 72, and 96 h post initial infection and were subsequently Giemsa-stained as described (Gisder et al., 2011). The number of meronts, sporonts, and mature spores of *N. apis* or *N. ceranae* was counted under an inverse microscope Eclipse Ti-E (Nikon Instruments, Düsseldorf, Germany) at 600x magnification in 10 individual cells for each time point as well as for each temperature and expressed as mean \pm SD.

Statistical Analysis

For statistically analyzing the seasonality of *Nosema* infections, spring vs. autumn, the Wilcoxon signed rank test was used because the proportions of infected colonies (Table 1) were not normally distributed. In addition, the Spearman rank correlation was determined with R (version 3.2.5, R Development Core Team, 2016) to analyse the relationship between infection categories. The Spearman correlation coefficient determined the strength of the monotonic relationship between season and infection prevalence with effect sizes between 0.10 and 0.29 representing weak correlations, coefficients between 0.30 and 0.49 representing medium correlations, and coefficients of 0.50 or above representing strong correlations.

For each time point, the expected rate of co-infections ($E_{\text{co-inf}}$) was calculated as the product of the observed rates of single infections with either *N. apis* (R_{apis}) or *N. ceranae* (R_{ceranae}): $E_{\text{co-inf}} = R_{\text{apis}} * R_{\text{ceranae}}$. Subsequently, the differences between the observed and expected rates of co-infections were calculated for each time point. Because those differences were normally distributed, a one sample *t*-test was used to check if these differences were significantly different to zero.

The statistical analysis of temporal trends was performed using RStudio (version 0.99.489) based on R using version 3.2.5. For visualizing infection prevalence data, dotplots were plotted with R, separately for spring and autumn. Generalized linear models (GLM) were fitted with lme4 (Linear Mixed-Effects Models, version 1.1-12) (Bates et al., 2015) for exploring the data set and visualizing the relationship between the dependent variables (*Nosema* spp.) and the independent variables (year). For statistical analysis of *N. apis* and *N. ceranae* prevalence over the 12 year study period we used mixed-effect binary logistic regressions analysis defining year as fixed factor and apiary as random factor to take into account the lack of independence of data within each apiary. Even after 12 years of sampling, the amount of data is still not sufficient to define colony as random factor to fully acknowledge relative data dependence. The sampling consisted of about 230 individual colonies per season, stratified within apiaries, and the prevalence of *N. apis*-, *N. ceranae*-, or co-infections at the individual level were analyzed with defining “0” if absent or “1” if present in each colony. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals [CIs] were used to assess the strength of the associations.

For statistical analysis of the counted number of different developmental stages of *Nosema* spp. in infected IPL-LD-65Y cells, individual student's *t*-tests for each time point were performed followed by Benjamini-Hochberg correction (Benjamini and Hochberg, 1995). A $p < 0.05$ was considered significant for the statistical tests.

RESULTS

Prevalence and Seasonality of *Nosema* spp.-Infections

The huge data set on *Nosema* spp.-infection prevalence in Northeast Germany, which was generated during the 12 year longitudinal cohort study, provided a unique opportunity for a

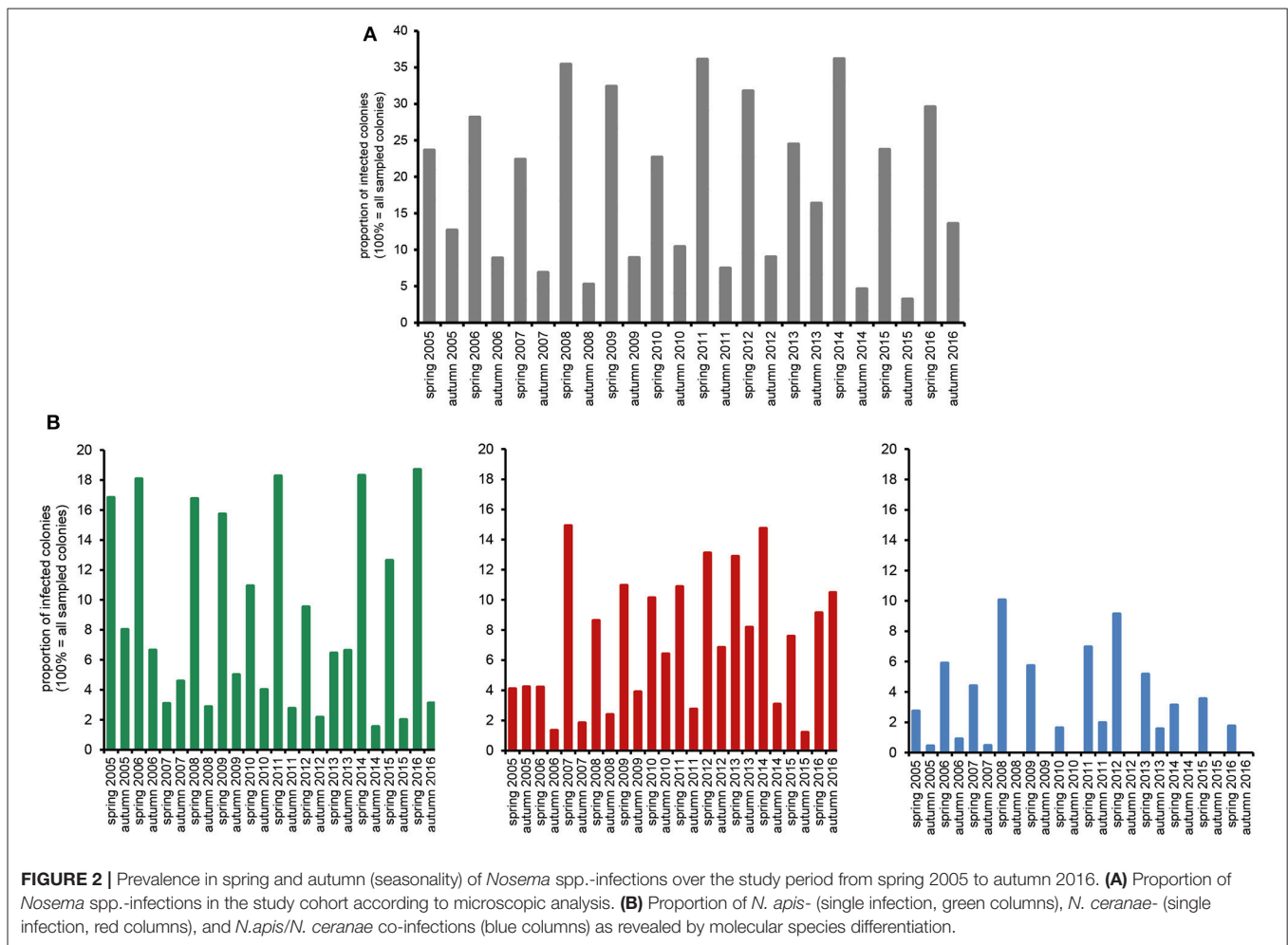
comprehensive analysis of the spread and success of *Nosema* spp., and especially of *N. ceranae*, in a restricted honey bee population. We first analyzed the seasonality of *Nosema* spp.-infections based on classical microscopic diagnosis without molecular species differentiation. The data revealed a clear and expected (Bailey and Ball, 1991) seasonality of *Nosema* spp.-infections for the whole duration of the study period with spring values being always higher than the autumn values of the same year and autumn values being always lower than the spring values of the following year (Figure 2A).

Molecular species differentiation of all *Nosema* spp.-positive samples enabled analysing the seasonality of *N. apis*-, *N. ceranae*-, and co-infections (Table 1). The same seasonality as already observed for *Nosema* spp.-infections was also evident for *N. apis*-infections over the entire study duration despite for the time point “spring 2007” when less colonies were found infected with *N. apis* than in the preceding autumn 2006 and the following autumn 2007 (Figure 2B). With this exception for “spring 2007,” when only 3.1% of the colonies carried detectable *N. apis*-infections, the proportion of *N. apis*-infected colonies varied between 6.4% (spring 2013), and 18.7% (spring 2016). In autumn, the prevalence of *N. apis*-infected colonies ranged between 1.5% (autumn 2014) and 8.0% (autumn 2005).

For *N. ceranae*-infections, the described seasonality with higher prevalence in spring than in the following autumn and lower prevalence in autumn than in spring next year could be observed from autumn 2006 onward until spring 2016, whereas between spring and autumn 2016 the prevalence of *N. ceranae*-infections did not decrease as expected but instead further increased (from 9.1 to 10.5%; Figure 2B). Spring prevalence from 2007 to 2016 varied for *N. ceranae*-infections between 7.6% (spring 2015) and 14.9% (spring 2007), while autumn prevalence ranged between 1.2% (autumn 2015) and 8.2% (autumn 2013).

The prevalence of colonies co-infected with *N. apis* and *N. ceranae* showed the same seasonal pattern fluctuating between spring (higher prevalence) and autumn (lower to no prevalence). Values for co-infection prevalence ranged between 1.6% (spring 2010) and 10.0% (spring 2008) in spring and between 0.0% (autumn 2008, 2009, 2010, 2012, 2014, 2015) and 2.0% (autumn 2011) in autumn (Figure 2B).

Statistical analysis of the seasonality of *Nosema* spp.-, *N. apis*-, *N. ceranae*-, and co-infections using a Mann-Whitney test confirmed the above given, rather descriptive evaluation (for all infection categories, $p < 0.01$). Spearman correlation analysis further substantiated this finding (Figure 3). A strong negative correlation (coefficient values between -0.69 and -0.87) was found between season and all infection categories indicating that in each year and for all four infection categories (*Nosema* spp.-, *N. apis*-, *N. ceranae*-, co-infection) the infection prevalence decreased significantly from spring to autumn (for all infection categories: $p < 0.01$). Medium to strong positive correlations (coefficient values between 0.44 and 0.85) were found between the infection categories implying that all infection categories followed the same prevalence trend. For example, high infection prevalence for *N. apis* correlated with high infection prevalence for *N. ceranae*- or co-infections. This correlation was significant for all infection categories ($p < 0.05$).



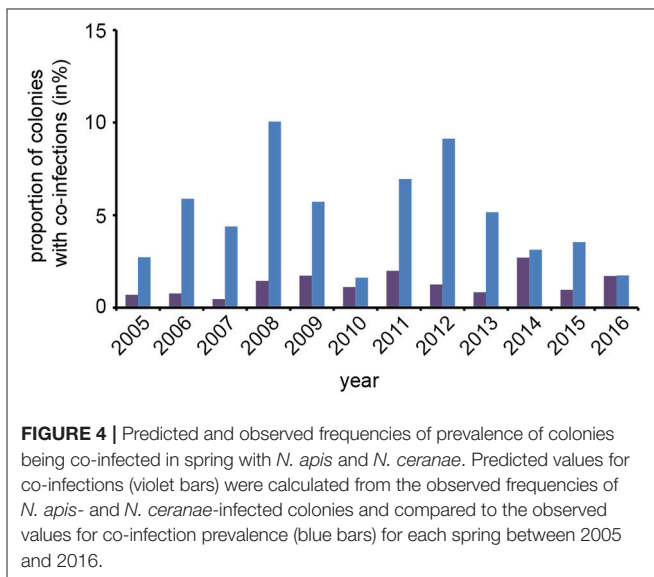
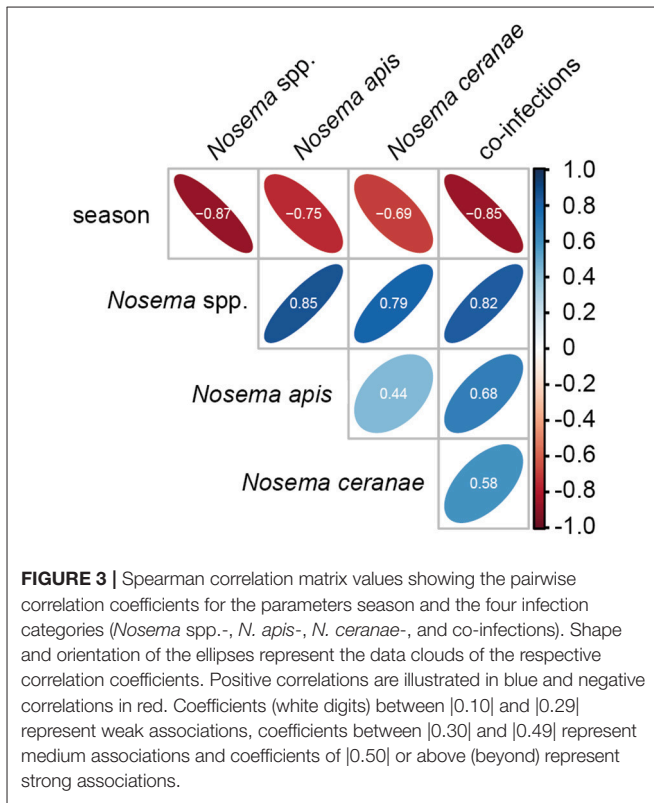
An interesting question in regard to co-infections was, whether or not the observed prevalence of co-infections in spring was congruent with the expected prevalence. To answer this question, we first calculated the rate of expected co-infections for each year from the rate of observed *N. apis*- and *N. ceranae*-infections in this season. Comparing these values with the observed frequency of co-infections revealed that over the entire study period, the observed prevalence of co-infections was always significantly {one sample *t*-test; $M = 0.037$, [0.0195, 0.0546], $t_{(23)} = 4.6389$, $p < 0.01$ } higher than expected when assuming that the occurrence of co-infections was only influenced by the prevalence of single infections (Figure 4).

Temporal pattern of *Nosema* spp. Prevalence

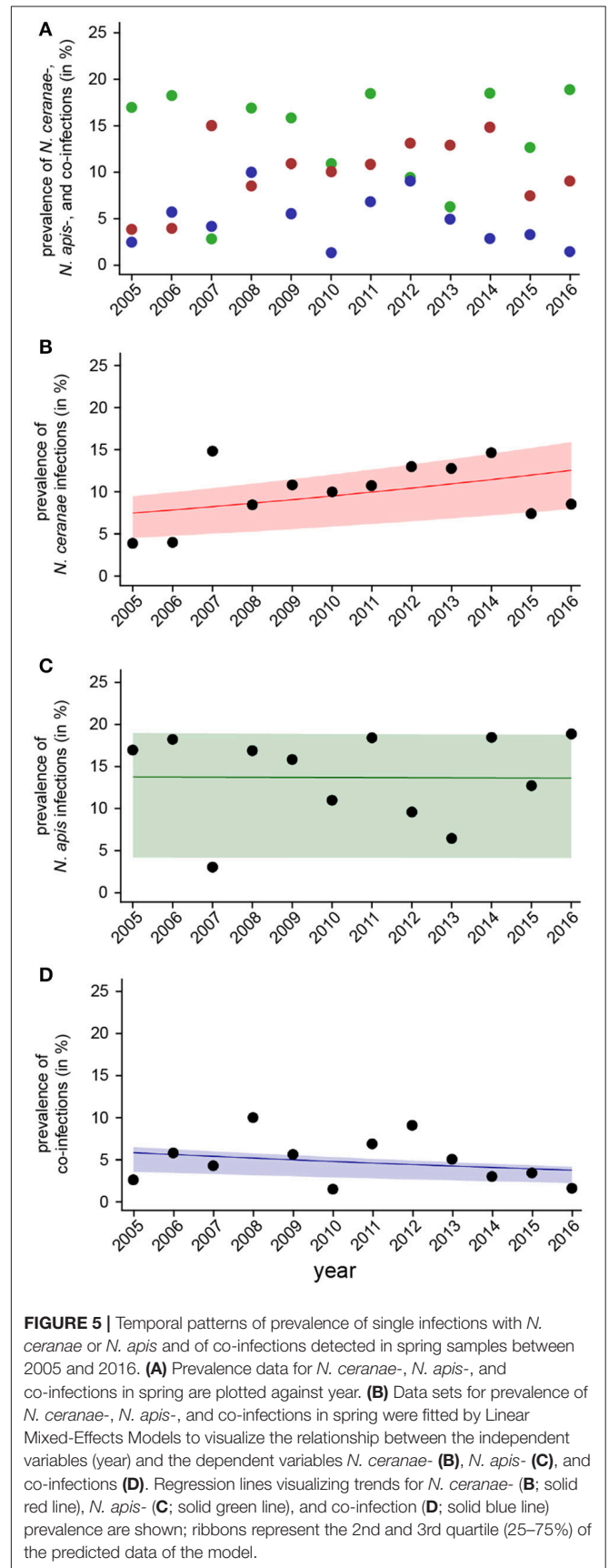
For evaluating spread and assertiveness of the emerging honey bee pathogen *N. ceranae*, we analyzed the temporal patterns of *N. ceranae*-, *N. apis*-, and co-infections by plotting and statistically analysing the respective values separately for the spring (Figure 5) and autumn (Figure 6) seasons between 2005 and 2016. While the patterns for *N. apis*- and co-infections in spring did not show a consistent trend, the pattern

for *N. ceranae*-infection prevalence suggested a continuously increasing trend over the years (Figure 5A). Generalized linear models (GLM) of the prevalence data confirmed this interpretation (Figures 5B–D). Logistic regression analysis (Table 2) demonstrated that the continuous increase in spring prevalence of *N. ceranae*-infections observed over the entire 12 year study period, i.e., between 2005 and 2016, was on average about 5% per year (Odd Ratio: 1.05 [1.01, 1.1]) and was significant (GLM, Likelihood Ratio test of the model, $p = 0.02$) (Figure 5B). This increase, however, was not accompanied by any significant (GLM, Likelihood Ratio test of the model, $p = 0.95$) change in the spring prevalence of *N. apis*-infections (Odd Ratio: 1.0 [0.96, 1.04]) (Figure 5C). Likewise, no significant trends (GLM, Likelihood Ratio test of the model, $p = 0.17$) were observed for co-infections in spring (Odd Ratio: 0.96 [0.9, 1.02]) (Figure 5D).

The dotplot of autumn prevalence of *N. ceranae*-, *N. apis*-, and co-infections (Figure 6A) showed a different pattern with an increasing trend for *N. ceranae*- being accompanied by a decreasing trend for *N. apis*-infections. This finding could be substantiated by GLM-analysis and Likelihood Ratio tests of the models (Table 2, Figures 6B–D). In autumn, the prevalence of



N. ceranae-infections was significantly (GLM, Likelihood Ratio test of the model, $p = 0.0003$) increasing by an average of about 15 % per year (Odd Ratio: 1.15 [1.07, 1.25]) over the study period (Figure 6B) while at the same time the prevalence of *N. apis*-infections was significantly decreasing by an average of about 11% per year (Odd Ratio: 0.89 [0.84, 0.95]) (GLM, Likelihood Ratio test of the model, $p = 0.0003$) (Figure 6C). For co-infections, however, no significant (GLM, Likelihood Ratio



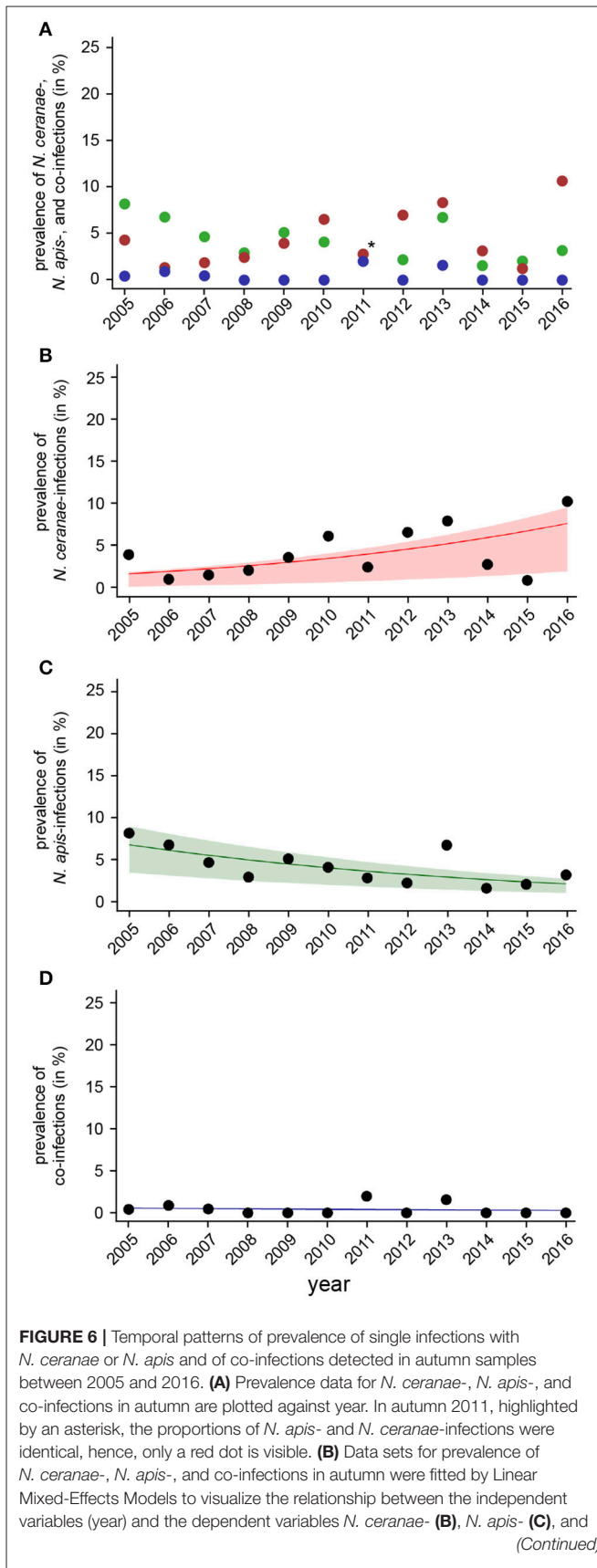


FIGURE 6 | Continued
co-infections **(D)**. Regression lines visualizing trends for *N. ceranae*- **(B)**, *N. apis*- **(C)**, and co-infection **(D)** prevalence are shown; ribbons represent the 2nd and 3rd quartile (25–75%) of the predicted data of the model.

TABLE 2 | Results of the binary logistic regression analysis of prevalence of *N. apis*-, *N. ceranae*- and co-infections over the 12 year study period (see also **Figures 5, 6**).

	Infection categories	Odds Ratios (CI)*	p-value
spring	<i>N. apis</i> -infections	0.00 (0.96, 1.04)	0.95
	<i>N. ceranae</i> -infections	1.05 (1.01, 1.10)	0.02
	co-infections	0.96 (0.90, 1.02)	0.17
autumn	<i>N. apis</i> -infections	0.89 (0.84, 0.95)	0.0003
	<i>N. ceranae</i> -infections	1.15 (1.07, 1.25)	0.0003
	co-infections	0.95 (0.81, 1.10)	0.49

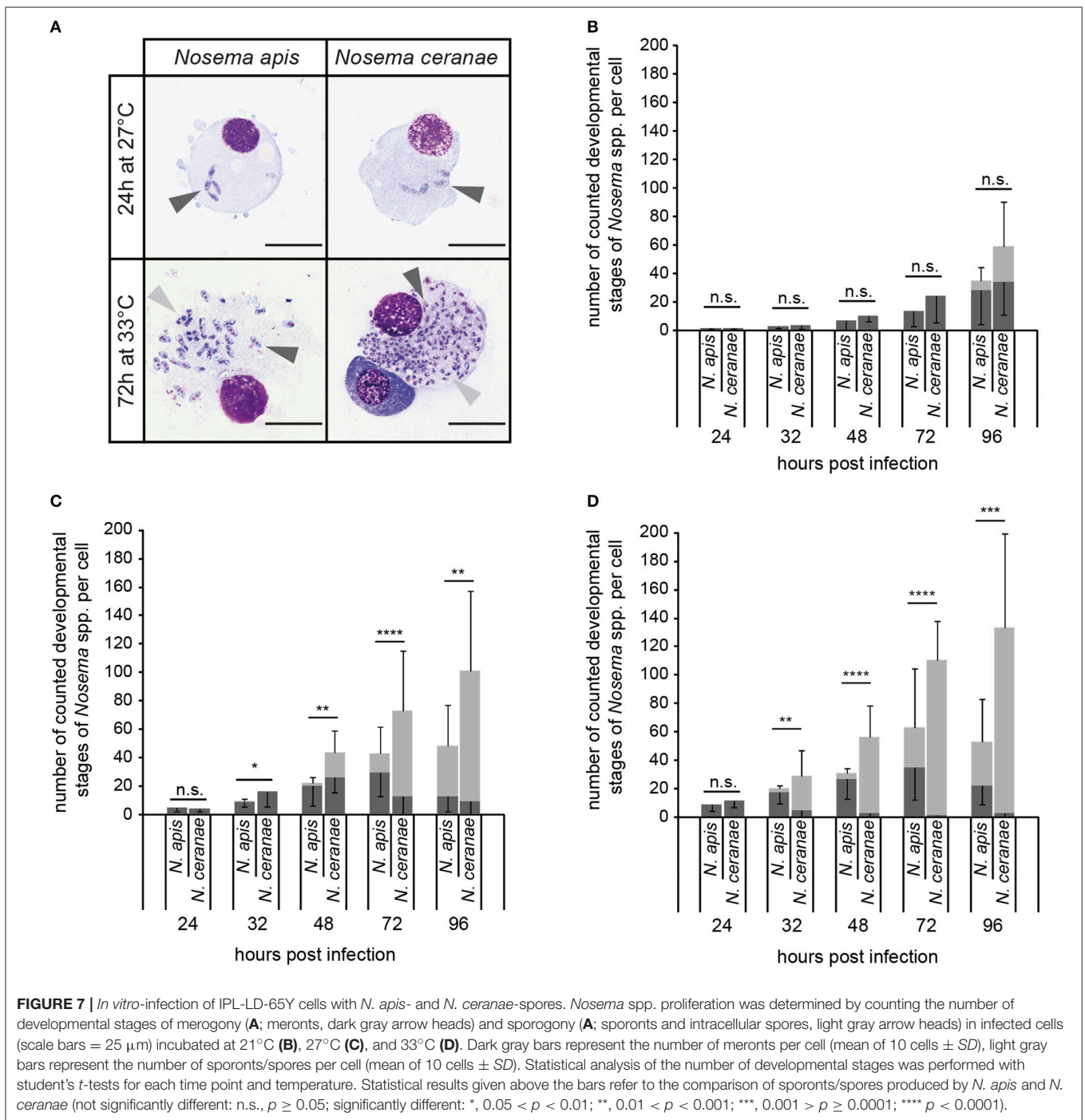
*, 95% confidence interval.

test of the model, $p = 0.5$) change in prevalence could be demonstrated between 2005 and 2016 (Odds Ratio: 0.95 [0.81, 1.11]) (**Figure 6D**).

In vitro-Infection of IPL-LD-65Y Cells

To explain the obvious success of *N. ceranae* over *N. apis* in the studied honey bee population in summer, we experimentally analyzed the proliferative capacity of both microsporidian species in infected cells at temperatures between 21° and 33°C. To this end, we used an established cell culture model for *N. apis* and *N. ceranae* based on experimentally infecting cultured IPL-LD-65Y-cells. This insect cell line derived from *Lymantria dispar* had been shown to support replication of both microsporidian species (Gisder et al., 2011).

Intracellular proliferation of *N. apis* and *N. ceranae* at three different temperatures (21°, 27°, and 33°C) was evaluated by determining the number of the developmental stages per cell produced during merogony (meronts) and sporogony (sporonts/spores) of *Nosema* spp. (**Figure 7A**). The number of both meronts and sporonts/spores increased for *N. apis* as well as for *N. ceranae* over the observation time period of 96 h at all three tested temperatures. However, the number of the different developmental stages varied between *N. apis* and *N. ceranae* infected cells depending on incubation time and incubation temperature. At 21°C, there was no significant difference in the proliferative capacity of *N. ceranae* and *N. apis* in infected cells for both meronts and sporonts/spores at all tested time points (24, 32, 48, 72, and 96 h post-infection) (all $p > 0.05$) (**Figure 7B**). However, at 27°C and even more so at 33°C, a higher proliferation rate and a faster proliferation of *N. ceranae* compared to *N. apis* could be observed. In infected cells which were incubated at 27°C (**Figure 7C**), the number of meronts was not significantly different between *N. apis* and *N. ceranae* after 32 and 72 h post-infection ($p > 0.05$) but was significantly different at time points 24, 48, and 96 h post-infection ($p > 0.05$). More



importantly, the number of counted sporonts/spores at 32, 48, 72, and 96 h post-infection was significantly higher ($p < 0.05$) in *N. ceranae*- than in *N. apis*-infected cells (Figure 7C). When the host cells were incubated at 33°C, the number of *N. apis* meronts was significantly (all $p < 0.01$) higher than the number of *N. ceranae* meronts at 32, 48, 72, and 96 h post-infection (Figure 7D) and the numbers of sporonts/spores were significantly higher at 32, 48, 72, and 96 h post-infection (all $p < 0.01$) in *N. ceranae*-infected host cells than in cells infected with *N. apis*.

DISCUSSION

Prevalence of *N. ceranae* Infections Follows the Same Seasonality as *N. apis* Infections

Nosema ceranae is an emergent pathogen of the Western honey bee *A. mellifera*. Its first detection in colonies of *A. mellifera* dates back a decade (Higes et al., 2006; Huang et al., 2007), although, it obviously switched host from *A. cerana* to *A. mellifera* about 40

years ago (Teixeira et al., 2013) and is now endemic in the global *A. mellifera* population. Several differences between *N. ceranae* and its congener *N. apis* have been reported, including differences in virulence, in seasonality of infections, and in temperature dependence of spore germination and biotic potential. Most of these differences seem to work in favor for *N. ceranae* resulting in its continuous spread in the bee population and a supersession of *N. apis* in many regions (Klee et al., 2007; Chen et al., 2008; Williams et al., 2008; Invernizzi et al., 2009; Chen and Huang, 2010; Stevanovic et al., 2011; Yoshizawa and Kimura, 2011; Copley et al., 2012). However, studies claiming lack of seasonality of *N. ceranae* or replacement of *N. apis* in a given honey bee population are rather short-termed studies rarely performed over more than 2 years and most often involving only a limited set of samples. Our epidemiology data based on observing a cohort 230 bee colonies sampled twice a year over 12 years now revealed a different picture at least for the study area.

Nosema apis-infections are known to follow a seasonal pattern with spring prevalence being higher than autumn prevalence. This seasonality can be explained by the pathobiology of *N. apis*: (i) Only the spores of *N. apis* are infective; (ii) older bees are more likely to be infected and carry more spores; and (iii) spores are most efficiently transmitted through the fecal-oral route (Bailey, 1967; Bailey and Ball, 1991). Therefore, *N. apis* transmission within the colony is favored by conditions with low or no brood rearing and forcing adult bees to stay inside the hive for longer periods and to have close in-hive contacts (Bailey, 1967; Bailey and Ball, 1991). These conditions are regularly fulfilled during the winter months in climatic zones with winter temperatures falling below 10°C not allowing bees to fly out (Winston, 1987). Instead, in these regions honey bee colonies hibernate by longlived adult winter bees forming a winter cluster around the queen bee and not leaving the hive for weeks or months until weather conditions allow cleansing and foraging flights and restarting brood rearing to replace the old winter bees (Winston, 1987). This explains why *N. apis*-infection levels increase over winter but normally decrease over summer when the rather shortlived summer bees are engaged in foraging, are able to defecate outside the hive, and when newly raised bees regularly replace older more heavily infected bees (Bailey, 1967; Bailey and Ball, 1991; Retschnig et al., 2017).

In contrast, *N. ceranae*-infections were described to lack this characteristic seasonality (Higes et al., 2006, 2010) suggesting fundamental differences in pathobiology and preferred routes of transmission which would be interesting to investigate. To analyse this suggested lack of seasonality, we collected bee samples in spring and autumn without gap over 12 years from a cohort of around 230 honey bee colonies and analyzed all samples for the presence of *Nosema* spp. spores and performed molecular species differentiation in all *Nosema* spp.-positive samples. Surprisingly, the data clearly disproved that *N. ceranae*-infections differ from *N. apis*-infections in regard to seasonality. Quite the contrary was true: All four infection categories, *Nosema* spp.-, *N. apis*-, *N. ceranae*-, and co-infections, followed the same seasonal pattern with spring prevalence of infection regularly being higher than autumn prevalence suggesting that *N. ceranae* and *N. apis* circulating in Northeast Germany are similar in

regard to pathobiology and preferred transmission routes. Since reports on the lack of seasonality predominantly stem from South Europe (Higes et al., 2006, 2010), further experimental studies are necessary to analyse whether the differences in seasonality between the Northern and Southern parts of Europe are due to climatic factors or intraspecies differences in *N. ceranae*.

No Evidence for a General Advantage of *N. ceranae* Over *N. apis* and for an Overall Replacement of *N. apis* by *N. Ceranae*

In many regions of the world, prevalence data collected for *N. apis* and *N. ceranae* indicated that *N. ceranae* has become the dominant species in the worldwide honey bee populations and it was suggested that *N. ceranae* has replaced or is about to replace its congener globally (Chen et al., 2012; Martin-Hernandez et al., 2012). However, in Europe, a South to North gradient was observed with *N. ceranae* being dominant in Southern European countries already 10 years ago while at that time *N. apis* was still dominant in the Northern part of Europe (Klee et al., 2007) which might reflect an already discussed climatic aspect in *N. ceranae* spread and assertiveness (Fenoy et al., 2009; Martin-Hernandez et al., 2009; Gisder et al., 2010; Chen et al., 2012; Natsopoulou et al., 2015).

Congruent with this South to North gradient (Klee et al., 2007), at the beginning of our epidemiology study we observed very low levels of prevalence for *N. ceranae*-infections in Northeast Germany compared to *N. apis*-infections. This starting condition, the size of the cohort, and the design and duration of the study provided a unique opportunity to follow the spread of the emerging pathogen *N. ceranae* and analyse the impact of this spread on its congener *N. apis*, well established in the observed honey bee population. Our epidemiology data show that starting from a very low level, the prevalence of *N. ceranae*-infections significantly increased continuously in the observed cohort of honey bee colonies during the last 12 years. This increase was true for both time points of sampling, in spring (showing the development over winter) and autumn (showing the development over summer) clearly indicating that *N. ceranae* became successfully established and expanded its presence in the honey bee population of Northeast Germany.

With regard to replacement of *N. apis* by *N. ceranae*, the obtained epidemiology data showed a complex picture. For assuming a replacement process at the population level, *N. apis* infection prevalence should have concomitantly decreased during the study period. However, a significant decrease in *N. apis*-infection prevalence was only observed for autumn indicating that during the bee season in summer *N. ceranae* successfully competed with *N. apis* at the population level over the course of the study. Surprisingly and in contrast to autumn, no significant change in *N. apis* infection prevalence was evident in spring despite a significant increase in *N. ceranae* prevalence. Therefore, no replacement of *N. apis* by *N. ceranae* in the honey bee population of Northeast Germany took place over winter during the last 12 years. Instead, the increase in *N. ceranae* prevalence in spring came on top of the unaltered *N. apis* infection prevalence suggesting that the two microsporidian

parasites did not compete with each other over winter at the colony and population level. In addition, the long term stability of *N. apis*-infection frequency in spring indicate, that whatever mechanisms are acting on *N. apis* during summer and causing its decrease in the population, they are compensated for and reversed during winter preventing a supersession of *N. apis* through *N. ceranae* in the observed honey bee population.

Replacement of *N. apis* by *N. ceranae* at the population level during summer but not during winter points to different mechanisms acting on or influencing the two microsporidian parasites in summer and over winter. Although the exact mechanism responsible for presence (summer) and absence (winter) of replacement at the population level still remain elusive, experimental data providing explanations at the individual bee level for the increase in *N. ceranae* infection prevalence over summer exists. In a recent study by Martin-Hernandez et al. (2009), infection experiments with caged bees were performed at different temperatures and the “biotic index” was calculated for both microsporidia as the total *N. apis* or *N. ceranae* spore count per day after infection. This “biotic index” was higher for *N. ceranae* than for *N. apis* at 25°C but no significant difference could be observed at 33°C (Martin-Hernandez et al., 2009). Although these results did not provide convincing proof for an advantage of *N. ceranae* over *N. apis* during summer, they pointed into an interesting direction. Therefore, we extended the approach and performed infection experiments in cell culture (Gisder et al., 2011), which allowed a detailed analysis of the time course of proliferation and of the proliferative potential of *N. ceranae* and *N. apis* at different temperatures. Our *in vitro* results revealed a significant advantage of *N. ceranae* over *N. apis* at 27° and 33°C, the normal range of daily maximum temperatures in summers in Northeast Germany. At both temperatures, *N. ceranae* completed its replicative cycle faster and replicated more efficiently than *N. apis*. These results were in accordance with a recent study, suggesting a generally higher proliferation rate for *N. ceranae* compared to *N. apis* in experimentally infected, caged bees incubated at 30°C for 20 days (Huang and Solter, 2013). Earlier and higher production of spores, which are transmitting the disease within and between colonies, may translate into higher infection prevalence at population level. These data explain an increase of *N. ceranae* infection levels, however, they still do not explain the observed replacement of *N. apis* by *N. ceranae* over summer.

For replacement of *N. apis* by *N. ceranae*, a simple increase in *N. ceranae* infection prevalence is not sufficient but a successful interspecies competition, with *N. ceranae* at least more often than *N. apis* winning the game, is necessary. Again, only experimental data at the individual bee level are available. Co-infection experiments with caged bees and simultaneous feeding of *N. apis* and *N. ceranae* spores did not provide evidence for intra-host competition between the two species (Forsgren and Fries, 2010; Milbrath et al., 2015). In contrast, sequential feeding of spores of the two species resulted in within-host competition: The first parasite significantly inhibited the growth of the second, regardless of species (Natsopoulou et al., 2015). This would have prevented the spread of *N. ceranae* because *N. apis* had been

present in the bee population before *N. ceranae* arrived and would always have been first. However, this so-called “priority effect” proved to be asymmetric and *N. ceranae* exhibited a stronger inhibitory effect on *N. apis* than *N. apis* on *N. ceranae* (Natsopoulou et al., 2015). Mathematical modeling proposed that this priority effect will result in a successful replacement process at population level even when taking into account that the cold sensitivity of *N. ceranae* but not of *N. apis* spores (Fenoy et al., 2009; Gisder et al., 2010) provides a disadvantage for *N. ceranae* during cold winters (Natsopoulou et al., 2015).

However, for spring samples our epidemiology data clearly showed that although *N. ceranae*-infection prevalence increased over time, this increase did not result in a replacement of *N. apis*. Remarkably, *N. apis*-infection prevalence in spring remained rather stable over the 12 years study period although the autumn infection prevalence and, hence, the infection prevalence at the beginning of winter, has been declining during this period. Therefore, the two *Nosema* species rather not competed during winter and the mechanisms promoting the increase of *N. ceranae* in the studied honey bee population over winter did not influence the prevalence of *N. apis*.

Furthermore, we observed higher than expected co-infection rates in spring suggesting that there is no interspecies within-host competition at colony or population level during overwintering. The co-infection levels rather suggested that an infection with any one of the two microsporidia pre-existing in a colony favored an additional infection of the colony with the other microsporidium. This is in contrast to the above mentioned report (Natsopoulou et al., 2015) showing interspecies within-host competition with a priority effect favoring the spread *N. ceranae* over *N. apis*. However, this inter-species competition was shown at the individual bee level whereas our epidemiology data concern the colony and population levels. And indeed, at the colony and population level it is hardly conceivable how an *N. ceranae* infection of one bee or colony might inhibit a nestmate or a neighboring colony, respectively, to become infected by *N. apis* - and the other way round. Actually, the concept of interspecies within-host competition of an obligate intracellular parasite due to competition for the same limited cellular energy resources cannot easily be translated to the colony or population level where limitation or shortage of resources (in this case: new hosts) is not yet the problem. However, if the prevalence of *N. ceranae*-infections keeps increasing like it did over the last 12 years, within-colony and between-colony competition might become an issue once all colonies are infected with either one of the microsporidia. Therefore, a continuation of this study will further our understanding of the long term epidemiology and interspecies competition at population level of these two important honey bee pathogens.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

EG and SG conceived and designed the study and the experiments. SG, VS, and LH carried out the experiments and the microscopic and molecular diagnosis of *Nosema* spp. SG, VS, and DG performed the statistical analysis. EG supervised all work,

SG supervised the laboratory experiments, and DG supervised the statistical analysis. SG and EG wrote the paper. All authors revised the manuscript and approved the final version.

FUNDING

This study was supported by the Ministries responsible for Agriculture of the German Federal States of Brandenburg (MIL) and Sachsen-Anhalt (MLU), Germany, by a grant from the German Ministry of Agriculture through the *Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung* (BLE, grant no. 2816SE004), and

by a grant of the German Research Foundation (DFG, GRK2046). VS received a fellowship from the German Research Foundation (DFG, GRK2046).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Marion Schröder, Andrea Jäkisch, and Caspar Schöning for sampling the honey bee colonies over the last 12 years, numerous students for help with processing the bee samples, and Alice Ballard for help with the GLM analysis.

REFERENCES

- Aizen, M. A., and Harder, L. D. (2009). The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Curr. Biol.* 19, 1–4. doi: 10.1016/j.cub.2009.03.071
- Aizen, M. A., Garibaldi, L. A., Cunningham, S. A., and Klein, A. M. (2008). Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency. *Curr. Biol.* 18, 1572–1575. doi: 10.1016/j.cub.2008.08.066
- Aizen, M. A., Garibaldi, L. A., Cunningham, S. A., and Klein, A. M. (2009). How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. *Ann. Bot.* 103, 1579–1588. doi: 10.1093/aob/mcp076
- Anonymous, P. (2008). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Paris: Office Internationale des Epizooties.
- Antunez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., and Higes, M. (2009). Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ. Microbiol.* 11, 2284–2290. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01953.x
- Bailey, L. (1955). The infection of the ventriculus of the adult honeybee by *Nosema apis* (Zander). *Parasitology* 45, 86–94. doi: 10.1017/S0031182000027451
- Bailey, L. (1967). *Nosema apis* and dysentery of the honey bee. *J. Apicult. Res.* 6, 121–125. doi: 10.1080/00218839.1967.11100171
- Bailey, L., and Ball, B. V. (1991). *Honey Bee Pathology*. New York, NY; London: Academic Press.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., and Walker, S. (2015). Fitting linear mixed effects models using lme4. *J. Stat. Softw.* 67, 1–48. doi: 10.18637/jss.v067.i01
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statistic. Soc. B* 57, 289–300.
- Bigliardi, E., and Sacchi, L. (2001). Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes Infect.* 3, 373–379. doi: 10.1016/S1286-4579(01)01393-4
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Meana, A., and Higes, M. (2013). *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Vet. Res.* 44:25. doi: 10.1186/1297-9716-44-25
- Cepero, A., Ravoet, J., Gomez-Moracho, T., Bernal, J. L., Del Nozal, M. J., Bartolome, C., et al. (2014). Holistic screening of collapsing honey bee colonies in Spain: a case study. *BMC Res. Notes* 7:649. doi: 10.1186/1756-0500-7-649
- Chaimanee, V., Chantawannakul, P., Chen, Y., Evans, J. D., and Pettis, J. S. (2012). Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *J. Insect Physiol.* 58, 1090–1095. doi: 10.1016/j.jinsphys.2012.04.016
- Chen, Y. P., and Huang, Z. (2010). *Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia. *Apidologie* 41, 364–374. doi: 10.1051/apido/20100021
- Chen, Y. W., Chung, W. P., Wang, C. H., Solter, L. F., and Huang, W. F. (2012). *Nosema ceranae* infection intensity highly correlates with temperature. *J. Invertebr. Pathol.* 111, 264–267. doi: 10.1016/j.jip.2012.08.014
- Chen, Y., Evans, J. D., Smith, I. B., and Pettis, J. S. (2008). *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J. Invertebr. Pathol.* 97, 186–188. doi: 10.1016/j.jip.2007.07.010
- Copley, T. R., Chen, H., Giovenazzo, P., Houle, E., and Jabaji, S. H. (2012). Prevalence and seasonality of *Nosema* species in Québec honey bees. *Can. Entomol.* 144, 577–588. doi: 10.4039/tce.2012.46
- Cornman, R. S., Tarpay, D. R., Chen, Y., Jeffreys, L., Lopez, D., Pettis, J. S., et al. (2012). Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PLoS ONE* 7:e43562. doi: 10.1371/journal.pone.0043562
- Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E. C., Palacios, G., Evans, J. D., Moran, N. A., et al. (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318, 283–287. doi: 10.1126/science.1146498
- Doull, K. M. (1965). The effects of time of day and method of sampling on the determination of *Nosema* disease in beehives. *J. Invertebr. Pathol.* 7, 1–4. doi: 10.1016/0022-2011(65)90143-6
- Doull, K., and Cellier, K. (1961). A survey of incidence of *Nosema* disease (*Nosema apis* Zander) of the honey bee in South Australia. *J. Insect Pathol.* 3, 280–288.
- Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Crauser, D., Beslay, D., Costagliola, G., Soubeyrand, S., et al. (2013). Flight behavior and pheromone changes associated to *Nosema ceranae* infection of honey bee workers (*Apis mellifera*) in field conditions. *J. Invertebr. Pathol.* 113, 42–51. doi: 10.1016/j.jip.2013.01.002
- Fenoy, S., Rueda, C., Higes, M., Martín-Hernández, R., and Del Aguila, C. (2009). High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6886–6889. doi: 10.1128/AEM.01025-09
- Fernández, J. M., Puerta, F., Cousinou, M., Dios-Palomares, R., Campano, F., and Redondo, L. (2012). Asymptomatic presence of *Nosema* spp. in Spanish commercial apiaries. *J. Invertebr. Pathol.* 111, 106–110. doi: 10.1016/j.jip.2012.06.008
- Fontbonne, R., Garnery, L., Vidau, C., Aufauvre, J., Texier, C., Tchamitchian, S., et al. (2013). Comparative susceptibility of three Western honey bee taxa to the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Infect. Gen. Evol.* 17, 188–194. doi: 10.1016/j.meegid.2013.04.016
- Forsgren, E., and Fries, I. (2010). Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Vet. Parasitol.* 170, 212–217. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.02.010
- Franzen, C. (2005). How do microsporidia invade cells? *Folia Parasitol.* 52, 36–40. doi: 10.14411/fp.2005.005
- Fries, I. (1997). “Protozoa,” in *Honey Bee Pests, Predators, and Diseases*, eds R. A. Morse and K. Flottum (Medina, OH: A.I. Root Company), 59–76.
- Fries, I. (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 103, S73–S79. doi: 10.1016/j.jip.2009.06.017
- Fries, I., Chauzat, M.-P., Chen, Y.-P., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., et al. (2013). Standard methods for *Nosema* research. *J. Apicult. Res.* 52, 1–28. doi: 10.3896/IBRA.3891.3852.3891.3814.
- Fries, I., Ekbohm, G., and Villumstad, E. (1984). *Nosema apis*, sampling techniques and honey yield. *J. Apicult. Res.* 23, 102–105. doi: 10.1080/00218839.1984.11100617
- Fries, I., Feng, F., Dasilva, A., Slemenda, S. B., and Pieniasek, N. J. (1996). *Nosema ceranae* n sp (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *Eur. J. Protistol.* 32, 356–365. doi: 10.1016/S0932-4739(96)80059-9

- Genersch, E. (2010). Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 87–97. doi: 10.1007/s00253-010-2573-8
- Genersch, E., von der Ohe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Büchler, R., et al. (2010). The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* 41, 332–352. doi: 10.1051/apido/2010014
- Gisder, S., and Genersch, E. (2013). Molecular differentiation of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* based on species-specific sequence differences in a protein coding gene. *J. Invertebr. Pathol.* 113, 1–6. doi: 10.1016/j.jip.2013.01.004
- Gisder, S., Hedtke, K., Möckel, N., Frielitz, M. C., Linde, A., and Genersch, E. (2010). Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3032–3038. doi: 10.1128/AEM.03097-09
- Gisder, S., Möckel, N., Linde, A., and Genersch, E. (2011). A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee pathogenic microsporidia. *Environ. Microbiol.* 13, 404–413. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02346.x
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., and Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347:1255957. doi: 10.1126/science.1255957
- Guzman-Novoa, E., Hamiduzzaman, M. M., Arechavala-Velasco, M. E., Koleoglu, G., Valizadeh, P., and Correa-Benitez, A. (2011). *Nosema ceranae* has parasitized Africanized honey bees in Mexico since at least 2004. *J. Apicult. Res.* 50, 167–169. doi: 10.3896/IBRA.1.50.2.09
- Higes, M., Garcia-Palencia, P., Martín-Hernandez, R., and Meana, A. (2007). Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J. Invertebr. Pathol.* 94, 211–217. doi: 10.1016/j.jip.2006.11.001
- Higes, M., Martín, R., and Meana, A. (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J. Invertebr. Pathol.* 92, 93–95. doi: 10.1016/j.jip.2006.02.005
- Higes, M., Martín-Hernández, R., and Meana, A. (2010). *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* 41, 375–392. doi: 10.1051/apido/2010019
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Garrido Bailón, E., González-Porto, A. V., Barrios, L., et al. (2008). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol.* 10, 2659–2669. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x
- Higes, M., Martín-Hernandez, R., Garrido-Bailon, E., Gonzalez-Porto, A. V., Garcia-Palencia, P., Meana, A., et al. (2009). Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ. Microbiol. Rep.* 1, 110–113. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00014.x
- Huang, W. F., Jiang, J. H., Chen, Y. W., and Wang, C. H. (2007). A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* 38, 30–37. doi: 10.1051/apido:2006054
- Huang, W.-F., and Solter, L. F. (2013). Comparative development and tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. *J. Invertebr. Pathol.* 113, 35–41. doi: 10.1016/j.jip.2013.01.001
- Huang, W.-F., Solter, L., Aronstein, K., and Huang, Z. (2015). Infectivity and virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in commercially available North American honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 124, 107–113. doi: 10.1016/j.jip.2014.10.006
- Invernizzi, C., Abud, C., Tomasco, I. H., Harriet, J., Ramallo, G., Campá, J., et al. (2009). Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *J. Invertebr. Pathol.* 101, 150–153. doi: 10.1016/j.jip.2009.03.006
- Keeling, P. J., and Fast, N. M. (2002). Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 93–116. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160
- Klee, J., Besana, A. M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D. Q., et al. (2007). Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* 96, 1–10. doi: 10.1016/j.jip.2007.02.014
- Kralj, J., and Fuchs, S. (2010). *Nosema* sp. influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *Apidologie* 41, 21–28. doi: 10.1051/apido/2009046
- Malone, L. A., and Giaccon, H. A. (1996). Effects of *Nosema apis* Zander on inbred New Zealand honey bees (*Apis mellifera* ligustica L.). *Apidologie* 27, 479–486. doi: 10.1051/apido:19960607
- Martin-Hernandez, R., Botias, C., Bailon, E. G., Martinez-Salvador, A., Prieto, L., Meana, A., et al. (2012). Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environ. Microbiol.* 14, 2127–2138. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02645.x
- Martin-Hernandez, R., Meana, A., Garcia-Palencia, P., Marin, P., Botias, C., Garrido-Bailon, E., et al. (2009). Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2554–2557. doi: 10.1128/AEM.02908-08
- Martin-Hernandez, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A. M., Garrido-Bailon, E., and Higes, M. (2007). Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6331–6338. doi: 10.1128/AEM.00270-07
- Milbrath, M. O., Van Tran, T., Huang, W. F., Solter, L. F., Tarpy, D. R., Lawrence, F., et al. (2015). Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 125, 9–15. doi: 10.1016/j.jip.2014.12.006
- Moritz, R. F. A., and Erler, S. (2016). Lost colonies found in a data mine: global honey trade but not pests or pesticides as a major cause of regional honey bee colony declines. *Agric. Ecosys. Environ.* 2016, 44–50. doi: 10.1016/j.agee.2015.09.027
- Natsopoulos, M. E., McMahon, D. P., Doublet, V., Bryden, J., and Paxton, R. J. (2015). Interspecific competition in honey bee intracellular gut parasites is asymmetric and favours the spread of an emerging infectious disease. *Proc. R. Soc. B* 282:20141896. doi: 10.1098/rspb.2014.1896
- Pettis, J. S., Lichtenberg, E. M., Andree, M., Stitzinger, J., Rose, R., and vanEngelsdorp, D. (2013). Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *PLoS ONE* 8:e70182. doi: 10.1371/journal.pone.0070182
- Pirk, C. W. W., de Miranda, J. R., Kramer, M., Murray, T. E., Nazzi, F., Shutler, D., et al. (2013). Statistical guidelines for *Apis mellifera* research. *J. Apicult. Res.* 52, 1–24. doi: 10.3896/IBRA.1.52.4.13
- R Development Core Team (2016). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available online at: <http://www.R-project.org>
- Ratnieks, F. L. W., and Carreck, N. L. (2010). Clarity on honey bee collapse? *Science* 327, 152–153. doi: 10.1126/science.1185563
- Retschnig, G., Williams, G. R., A., S., and Neumann, P. (2017). Cold ambient temperature promotes *Nosema* spp. intensity in honey bees (*Apis mellifera*). *Insects* 8:20. doi: 10.3390/insects8010020
- Stevanovic, J., Stanimirovic, Z., Genersch, E., Kovacevic, S. R., Ljubenkovic, J., Radakovic, M., et al. (2011). Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie* 42, 49–58. doi: 10.1051/apido/2010034
- Teixeira, E. W., Dos Santos, L. G., Sattler, A., Message, D., Alves, M. L. T. M. F., Martins, M. F., et al. (2013). *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 114, 250–254. doi: 10.1016/j.jip.2013.09.002
- Wang, D.-I., and Moeller, F. E. (1970). The division of labor and queen attendance behavior of *Nosema*-infected worker honey bees. *J. Econ. Entomol.* 63, 1539–1541. doi: 10.1093/jee/63.5.1539
- Williams, G. R., Shafer, A. B. A., Rogers, R. E. L., Shutler, D., and Stewart, D. T. (2008). First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. *J. Invertebr. Pathol.* 97, 189–192. doi: 10.1016/j.jip.2007.08.005
- Williams, G. R., Shutler, D., and Rogers, R. E. L. (2010). Effects at Nearctic north-temperate latitudes of indoor versus outdoor overwintering on the microsporidium *Nosema ceranae* and western honey bees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 104, 4–7. doi: 10.1016/j.jip.2010.01.009
- Williams, G. R., Shutler, D., Burgher-Maclellan, K. L., and Rogers, R. E. L. (2014). Infra-population and -community dynamics of the parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, and consequences for honey bee (*Apis mellifera*) hosts. *PLoS ONE* 9:e99465. doi: 10.1371/journal.pone.0099465
- Winston, M. L. (1987). *The Biology of the Honey Bee*. (Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Wolf, S., McMahon, D. P., Lim, K. S., Pull, C. D., Clark, S. J., Paxton, R. J., et al. (2014). So near and yet so far: harmonic radar reveals reduced

- homing ability of *Nosema* infected honey bees. *PLoS ONE* 9:e103989. doi: 10.1371/journal.pone.0103989
- Woyciechowski, M., and Kozłowski, J. (1998). Division of labor by division of risk according to worker life expectancy in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 29, 191–205. doi: 10.1051/apido:19980111
- Yoshiyama, M., and Kimura, K. (2011). Distribution of *Nosema ceranae* in the European honey bee, *Apis mellifera* in Japan. *J. Invertebr. Pathol.* 106, 263–267. doi: 10.1016/j.jip.2010.10.010
- Zander, E. (1909). Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Münchener Bienenzeitung* 31, 196–204.
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Copyright © 2017 Gisder, Schüler, Horchler, Groth and Genersch. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

4.2. Diagnostic value of faecal spots on and in honey bee (*Apis mellifera*) hives

4.2.1. Eigenanteil

Mit dieser Arbeit konnten wir den diagnostischen Wert von klinisch in Honigbienenvölkern auftretenden Kotflecken ermitteln und so abschließend eine Einschätzung hinsichtlich des Symptoms 'Diarrhoe', als Folge von Nosemose auf Grund von *N. ceranae*-Infektionen, geben. Die Diagnostik und Auswertung wurden maßgeblich von mir durchgeführt. In Diskussionen konnte ich dem Manuskript relevante Ideen und Fachwissen beisteuern. Die anteilige Revision und Abnahme des Manuskripts rundeten meine Tätigkeit ab.

4.2.2. Publikation

Titel: **Diagnostischer Wert von Kotflecken an und in Bienen(*Apis mellifera*)-Beuten**

Autoren: Lennart Horchler¹
 Sebastian Gisder¹
 Otto Boecking²
 Elke Genersch^{1,3}

1 Departm. of Molecul. Microbiol. and Bee Diseases, Institute for Bee Research, Hohen Neuendorf, Germany

2 Niedersächs. LA für Verbr.schutz und Lebensm.sicherh. (LAVES) Instit. für Bienenkunde, Celle, Germany

3 Instit. für Mikrobiol. und Tierseuchen, Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin, Berlin, Germany

Journal: Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr., Nov. 2018, Vol. 131

DOI: 10.2376/0005-9366-18035
<https://doi.org/10.2376/0005-9366-18035>

**You have to purchase this part online.
Diese Publikation müssen Sie im Internet erwerben.**

4.3. Rapid gastrointestinal passage may protect *Bombus terrestris* from becoming a true host for *Nosema ceranae*

4.3.1. Eigenanteil

Um die Bedeutung von *Nosema ceranae* im Zusammenhang mit interspezifischen Infektionen zu untersuchen und damit einhergehend die aktuelle Literatur auf ihren Wahrheitsgehalt zu überprüfen, haben wir diese umfangreiche Infektionsstudie durchgeführt. Dabei konnte ich Ideen für das Konzept beisteuern und wesentlich an der experimentellen Umsetzung dessen und der anschließenden Auswertung und Diskussion der Ergebnisse arbeiten. Von der Erstellung des Manuskripts bis zu dessen Abnahme war ich vollständig involviert.

4.3.2. Publikation

Titel: **Schnelle Passage des Gastrointestinal Traktes kann *Bombus terrestris* davor schützen, ein echter Wirt für *Nosema ceranae* zu werden**

Autoren: Sebastian Gisder^{1§}

Lennart Horchler^{1§}

Franziska Pieper¹

Vivian Schüler¹

Peter Sima²

Elke Genersch^{1,3}

¹ Departm. of Molecul. Microbiol. and Bee Diseases, Institute for Bee Research, Hohen Neuendorf, Germany

² Koppert s.r.o., Komaranska cesta 13, Nove Zamky 940 01, Slovakia

³ Institut für Mikrobiol. und Tierseuchen, Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin, Berlin, Germany

§ Die Autoren haben gleichermaßen zu diesem Artikel beigetragen. Die Reihenfolge wurde anhand des Dienstalters festgelegt.

Journal: Appl. Environ. Microbiol., June 2020, Vol. 86, No. 12

DOI: 10.1128/AEM.00629-20
<https://doi.org/10.1128/AEM.00629-20>

**You have to read this part online.
Bitte lesen Sie diese Publikation im Internet.**

5. Diskussion / Zusammenführung der Publikationen

Bienen sind wichtig. Sie sind elementare Bestandteile von Ökosystemen, nützen aber auch in umfangreichem Maße verschiedenen Ökonomien. Weltweiten Berichten zu Folge, sind sowohl die Anzahl, als auch die Vielfalt an Bienen rückgängig. Was wissenschaftlich betrachtet für die Honigbienen galt (Le Conte und Navajas 2008; Hendrikx et al. 2009), wurde allgemein als sogenanntes „Bienensterben“ betitelt. Basierend auf der Verwendung von dem Begriff `Biene´ als Synonym für `Honigbiene´ führte dieser Titel zu weitreichenden Verwirrungen und Diskussionen, da er etwa vom Namen her, fälschlicher Weise, ein `Sterben aller Bienen´ suggerierte. Richtigerweise müssen die Rückgänge differenziert nach Arten betrachtet werden. Denn konträr zu den ersten Berichten, wiesen Analysen globaler Daten frühzeitig darauf hin, dass die Anzahl an gehaltenen Bienenvölkern weltweit seit Jahrzehnten konstant ansteigt (Aizen und Harder 2009). Auf den Punkt gebracht wurde es später von einigen Wissenschaftlern, wonach die Honigbienen nicht sterben würden, solange es fürsorgliche Imker gäbe (Niedersächsisches Landesamt Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit 2020). Jüngere Publikationen zeigen passend dazu, dass nicht die kommerziell gehaltenen und folglich in ihrer Anzahl vom Menschen abhängigen Arten der Honigbienen und Hummeln von den Rückgängen betroffen sind, sondern überwiegend solche Spezies, die keinen unmittelbar ökonomischen Nutzen für die Menschheit haben, also wildlebende Bienenarten (Biesmeijer et al. 2006; Cameron et al. 2011; Goulson et al. 2015; Kerr et al. 2015). Die Gründe für die beobachteten Rückgänge einzelner Spezies sind dabei vielfältig. Neben agrikulturellen und landschaftlichen Veränderungen, stellen Krankheitserreger einen der Gründe dar. Unter den Pathogenen sind auch die honigbienenrelevanten Arten *Nosema apis* und *N. ceranae* der Gattung *Nosema* (Mikrosporidien) zu finden.

Speziell auf *Nosema ceranae* konzentrieren sich Forschergruppen aller Kontinente seit Jahren. Denn *N. ceranae* ist heute zwar weltweit in der Westlichen Honigbiene (*Apis mellifera*) verbreitet, mit einem bisher wissenschaftlich dokumentierten Wirtswechsel innerhalb der letzten vier Dekaden zählt *N. ceranae*, im Vergleich zu der bereits vor mehr als einem Jahrhundert offiziell erstmalig beschriebenen Erregerart *Nosema apis*, aber auch jetzt noch als relativ neuartiges und daher weniger erforschtes Pathogen in *A. mellifera*. Wie aus der Einleitung ersichtlich ist, gilt die Beschreibung der überwiegend im Frühjahr in Honigbienenvölkern ausbrechenden Krankheit `Nosemose´, auf Grund von *N. apis*-Infektionen adulter Bienen, als etabliert und akzeptiert (Bailey 1955; Fries 1993). Im Gegensatz dazu

stehen Publikationen über die *N. ceranae*-bedingte Nosemose. Auffallen soll die, auf Grund ihres abweichenden Krankheitsbildes sogar als 'Typ-C-Nosemose' definierte, Erkrankung durch vermeintliche Asaisonalität, Asymptomatik und eine vergleichsweise gesteigerte Virulenz (Higes et al. 2006; Higes et al. 2010). Diese gesteigerte Virulenz drücke sich beispielsweise in einer höheren Mortalität aus, welche sogar zu spontanen Völkerverlusten führe (Martin-Hernandez et al. 2007; Higes et al. 2008a). Auch wird gebietsweise von einer Verdrängung des in Europa endemischen Artverwandten *N. apis* durch *N. ceranae* berichtet (Martin-Hernandez et al. 2012; Milbrath et al. 2015). Dazu kommen Veröffentlichungen, die den neuartigen Erreger, *N. ceranae*, sogar im Zusammenhang mit interspezifischen Infektionen und daraus resultierenden Wildbienenverlusten, im Rahmen einer emerging infectious disease (EID), diskutieren (Plischuk et al. 2009; Meeus et al. 2011; Fürst et al. 2014; Graystock et al. 2016).

Meine vorliegende Dissertation adressiert diese kontrovers diskutierten Aspekte und testet gleichzeitig die neue Definition einer *N. ceranae*-Infektion bedingten Nosemose. Dabei sind deutliche Abweichungen zwischen den Ergebnissen meiner Dissertation und denen aus der Literatur festzustellen. Eine mögliche und naheliegende Erklärung für diese Auffälligkeiten sind die Anwendung und Auswertung von diagnostischen Verfahren. Neben Herausforderungen der Anwendung von mikroskopischen, bei der Differenzierung von morphologisch ähnlichen Erregerarten (Fries et al. 2013), oder molekularen Techniken, wie etwa eine sehr variable Verlässlichkeit (Sensitivität und Spezifität) von in der PCR genutzten Primern (Erlor et al. 2012; Gisder und Genersch 2013), birgt vor allem die Auswertung der Befunde Risiken. So kommt es in der Literatur mitunter zu groben Fehlinterpretationen, wie der Beschreibung einer Korrelation zwischen einem positiven PCR-Ergebnis und dem Vorliegen einer Infektion (Brown 2017). Selbst in hochrangigen Veröffentlichungen wurden positive, molekulare Befunde mit dem Vorhandensein einer Infektion gleichgesetzt (Fürst et al. 2014). Außer Betracht gelassen wird auffallend häufig die Tatsache, dass rein molekular nicht zwischen einer echten Infektion und einer Kontaminationen unterschieden werden kann. Auch können, bezogen auf *Nosema* spp., nur einige Sporen des Erregers zu einem positiven, molekularen Befund führen, dieser Nachweis dabei aber nur wenig bis keine Relevanz haben (Fries et al. 2013). Grundsätzlich kann nur das Kombinieren der klinischen und labordiagnostischen Befunde, mit dem Fachwissen über die Pathogenese die Wahrscheinlichkeit für Verwechslungen und falsche Ergebnisse in der Interpretation und Diagnosefindung minimieren. Diese schrittweise und aufeinander aufbauende Herangehensweise liegt allen Bestandteilen meiner Dissertation als Basis zu Grunde.

In der ersten Publikation wurde über einen bis dato nicht dokumentierten Zeitraum das *Nosema* spp.-Infektionsgeschehen in Nordostdeutschland analysiert. Interessant ist hier vor allem die Prävalenz der Erregerarten hinsichtlich der Themen Saisonalität und Verdrängungsgeschehen. In einem nächsten Schritt sollte die klinische Erscheinungsform der Infektionskrankheit 'Nosemose' untersucht werden. Hierfür wurden in der zweiten Publikation durchfallerkrankte Honigbienenvölker beprobt und analysiert, um eine Diarrhoe, als grundsätzliches Symptom von *Nosema* spp.-Infektionen, abklären zu können. Die dritte Publikation untersucht die beschriebenen, interspezifischen *Nosema ceranae*-Infektionen in Hummeln und demzufolge das Potential von *N. ceranae* als Erreger einer EID.

Die außergewöhnliche Langzeitstudie (Kapitel 4.1.) bestätigt die bereits bekannte Saisonalität von *Nosema apis*-Infektionen und legt unverkennbar offen, dass diese auch für *Nosema ceranae*-Infektionen existiert: Auf eine hohe Prävalenz des jeweiligen Erregers in *Apis mellifera* im Frühjahr, folgen vergleichsweise niedrige Infektionslevels in den wärmeren und trockeneren Jahreszeiten. Erklären lassen sich diese Beobachtungen schlüssig durch die Pathogenese einer Nosemose. Nach Einbringung des infektiösen Erregers (Sporen) in den dafür empfänglichen Wirtsorganismus 'Honigbiene', werden die Sporen fäkal-oral im Volk verbreitet. Die Verbreitung ist besonders im Winter, bedingt durch eine hohe Anzahl sogenannter „Altbienen“ und langzeitige Phasen mit einer hohen Wirtsdichte in einem limitierten Umfeld (Beuten), intensiv. Folglich steigt der vorhandene Erregerdruck in Form der Sporenlast weiter an. Im Sommer hingegen sinkt die Sporenlast im Volk. Denn einerseits ermöglichen die in dieser Phase für Honigbienen günstigen Wetterbedingungen eine hohe Flugaktivität. Andererseits steigt auch die Reproduktion der Honigbienen (Austauschrate) in ihrer Hauptsaison, Sommer, an, sodass der Anteil von Altbienen gegenüber den jüngeren Bienen abnimmt. Gemeinsam führen diese Effekte zu einer Abnahme der Sporenlast im Bienenvolk, da infektiöser Kot außerhalb der Beuten abgegeben werden kann, ältere Sammlerinnen frühzeitig durch jüngere Honigbienen ersetzt werden und potentiell hochgradig infizierte Sammlerinnen überwiegend außerhalb der Beuten sterben. Auffällig in der Langzeitstudie sind vergleichsweise höhere Infektionsraten von *Nosema ceranae* im Herbst, bei einem nahezu ausgeglichenen Verhältnis zwischen *N. apis*- und *N. ceranae*-Infektionen im Frühjahr. Dennoch passen diese Beobachtungen zur allgemeinen Pathogenese und den Ergebnissen bisheriger Studien. Denn grundlegend lassen die Infektionsraten von *N. apis* und *N. ceranae* Abhängigkeiten von äußeren Wetterbedingungen erkennen. Während *N. apis* ein Temperaturoptimum im Bereich der Bruttemperaturen zu haben scheint (Lotmar 1943), reproduziert sich

N. ceranae offenbar besser in höheren Temperaturen (Fenoy et al. 2009). Die Differenz dieser biotischen Indices (Martin-Hernandez et al. 2009; Gisder et al. 2011; Huang und Solter 2013), in Verbindung mit der bekannten Kältesensibilität der *N. ceranae*-Sporen (Fenoy et al. 2009; Gisder et al. 2010), sind vorstellbare Vorteile für den sich schneller entwickelnden Erreger, *N. ceranae*, in Bezug auf die Infektionsraten in der Sommerphase. Im Winter dreht sich dieser Vorteil scheinbar um.

Der in der Publikation beobachtete, kontinuierliche Anstieg der Prävalenz von *N. ceranae*-Infektionen im Beobachtungsgebiet für den analysierten Zeitraum spricht außerdem für eine Etablierung des Erregers in *Apis mellifera*. Da eine gleichzeitige Abnahme der Prävalenz von *N. apis*-Infektionen nur im Herbst festzustellen war, sprechen die Ergebnisse gegen eine grundsätzliche Verdrängung des ursprünglich endemischen Erregers aus Nordostdeutschland. Denn eine Verdrängung würde vermutlich auf einer Konkurrenz zwischen den Erregern basieren. Diese scheint auf Volksebene der Honigbienen aber nicht zu existieren, da, erstens, regelmäßig ein ausgeglichenes Verhältnis der Prävalenzen für die Erregerspezies im Frühjahr besteht und zweitens, in der Langzeitstudie überraschend häufig Mischinfektionen in den Völkern detektiert werden konnten.

Als Resümee der ersten Publikation kann man also festhalten, dass eine Saisonalität der Prävalenz von *N. ceranae*-Infektionen im Beobachtungsgebiet besteht und der neuartige Erreger sich offensichtlich parallel zu *N. apis* etabliert, statt Letzteren zu verdrängen. Auch konnten im Rahmen der Langzeitstudie die bereits aus der Literatur bekannten und häufig asymptomatischen Infektionen für beide *Nosema*-Spezies bestätigt werden. Sie folgen ebenso der oben genannten Saisonalität. Durch diese aussagekräftigen Ergebnisse wird die Definition einer Typ-C-Nosemose fragwürdig, da eine manifeste *N. ceranae*-Infektion scheinbar nicht auf Grund von Asaisonalität oder Asymptomatik von der bekannten Nosemose zu unterscheiden ist.

Um das Charakteristikum 'Asymptomatik' quasi von der anderen Seite her zu überprüfen, wurden in der zweiten Publikation (Kapitel 4.2.) durchfallerkrankte Honigbienenvölker beprobt und auf die Erregerspezies untersucht. Die Auswertung der Ergebnisse hat die Veröffentlichungen von (Stevanovic et al. 2013; Poppinga et al. 2016) bestätigt, wonach Infektionen mit *N. apis* oder *N. ceranae* in puncto klinischem Krankheitsbild als vergleichbar einzustufen gelten. Es konnte gezeigt werden, dass Honigbienenvölker

- a) *Nosema* spp.-infiziert sein können, aber nicht erkranken müssen (keine Nosemose) und somit symptomlos bleiben;

- b) speziell im Frühjahr, Durchfall, in Form von den gemeinhin als charakteristisch beschriebenen, bräunlichen Kotflecken in Form einer Pünktchenkette (Lotmar 1951; Bailey 1967) zeigen können und dieses Symptom die Verdachtsdiagnose 'Nosemose' rechtfertigt;
- c) trotz offensichtlichen Durchfalls und Nosemose-Verdachts weder an einer Nosemose erkrankt sein müssen, noch, im Falle einer tatsächlich vorliegenden Nosemose, die verursachende Erregerspezies bereits feststünde.

Die Schlussfolgerung ist also, dass (unabhängig von der ursächlichen Spezies) jede Nosemose immer mit einem Durchfall einhergeht, aber nicht jeder Durchfall eine Nosemose sein muss! Auch wenn imkerliche Meinungen sporadisch abweichen, zeigen die Ergebnisse unverkennbar, dass Durchfall im Honigbienenvolk eine weiterführende Labordiagnostik notwendig macht. Denn differentialdiagnostisch kommt auch für das vermeintliche Leitsymptom einer Nosemose (Diarrhoe in Form von Kotflecken in Pünktchenkettchen im Honigbienenvolk im Frühjahr) eine ganze Anzahl von bekannten, infektiösen und nicht infektiösen Ursachen in Frage. *Per definitionem* sind bei dieser Betrachtung unbekannt, aber durchaus mögliche Ursachen natürlich außen vor gelassen!

Zwei der drei Charakteristika, welche die Definition einer Typ-C-Nosemose bilden, konnten mit diesen Ergebnissen, für das Beobachtungsgebiet, widerlegt werden. Um den dritten Aspekt 'Virulenz' zu beurteilen, wurde eine umfangreiche Infektionsstudie durchgeführt (Kapitel 4.3.). Denn wie bereits in der Einleitung dargestellt ist, inkludiert 'Virulenz' im weiteren Sinne auch die Eigenschaft eines Pathogenes, sich neue Wirte erschließen zu können. Mit den Berichten der letzten Jahre über *N. ceranae*-Infektionen in Hummeln einhergehend, postulierten einige Arbeitsgruppen folglich, dass *N. ceranae* virulenter als der endemische Verwandte sei und als Erreger einer emerging infectious disease klassifiziert werden solle. Für die erfolgreiche Etablierung einer EID müssen allerdings einige zwingende Voraussetzungen gegeben sein. So muss es einem Erreger, nach seiner Übertragung in eine für ihn empfängliche (sensible) Population, möglich sein, den Wirtsorganismus zu infizieren, um sich dann im Wirt vermehren und so in der Population der Wirtsorganismen verbreiten zu können (Selbitz et al. 2011; Deplazes et al. 2013). Der Fokus der Infektionsversuche der dritten Publikation lag deshalb auf der Untersuchung der Erreger-Wirt-Beziehung zwischen *Nosema ceranae* und der kommerziell gehaltenen Wildbienenart, *Bombus terrestris*.

Die Ergebnisse der Studie widerlegen die gängige Literatur erneut deutlich. Sie zeigen, dass die Sporen von *Nosema ceranae* die Darmzellen der Hummeln im weitesten Sinne nur passieren, statt diese zu infizieren. Weder die Veränderung der Dosis, noch des Alters oder der Herkunft (Genetik) der Wirtstiere, oder die Anwendung einer Kumulation von negativen Effekten, hatten einen Einfluss auf diese Feststellung. Ob die Resultate dabei auf einer Unempfindlichkeit des Wirts oder einer nicht vorhandenen Fähigkeit des Pathogenes beruhen, muss in weiteren Versuchen geklärt werden. Unter Berücksichtigung der in der Einleitung erwähnten Verarmung der Vielfalt von Landschaften, also der Abnahme an Futterpflanzen im Habitat von Bienen, wären auch Untersuchungen zum Einfluss der Zusammensetzung des Futters auf das Infektionsgeschehen in Hummeln denkbare Ansätze für zukünftige Forschungsarbeiten.

Die Typ-C-Nosemose, als eine Form der Infektionskrankheit ohne erkennbare Saisonalität, ohne Symptome wie Diarrhoe und mit einer gesteigerten Virulenz, wurde zunächst von einzelnen Wissenschaftlern postuliert (Higes et al. 2010). Heute ist diese Beschreibung auch in Veröffentlichungen von Organisationen wie der FAO und dem OIE wiederzufinden (World Organisation for Animal Health 2018; Food and Agriculture Organization 2020) und wird somit global als allgemein gültig eingeschätzt. Gesamtheitlich zeigen die drei Publikationen meiner Dissertation aber deutlich, dass, erstens, diese Definition wenigstens für Nordostdeutschland keine Gültigkeit hat und somit nicht nur überdacht, sondern auch überarbeitet werden müsste. Und zweitens, dass die Auswirkungen von *N. ceranae* auf die Gesundheit der Honigbienen, vermutlich als vergleichbar zu denen von *N. apis* eingestuft werden können, da auch die Saisonalität, Symptomatik und Virulenz vergleichbar zu sein scheinen. Ein direkter Einfluss von *N. ceranae* auf die Verluste von Wildbienen ist nicht darstellbar, da dieser Erreger keine Infektionen in *Bombus terrestris* verursachen kann und somit sehr wahrscheinlich, wie sein endemischer Verwandter, spezifisch für die Honigbienen ist.

Auch wenn Hummeln keine echten Wirte für *Nosema ceranae* darstellen, bleiben die Nachweise des Erregers in ihnen und anderen Gattungen der Apidae aus epidemiologischer Sicht problematisch. Denn im Sinne der in der Einleitung erwähnten Transportwirte dienen sie dem Erreger als mechanischer Vektor zur weiteren Verbreitung. Um also Risiken verringern und Krankheitsübertragungen verhindern zu können, wären grundsätzliche, veterinärmedizinische Screening-Untersuchungen in Völkern gehaltener Bienenarten, auch für diese Nutztiere durchaus als sinnvoll zu erwägen; so wie es von einigen Wissenschaftlern bereits beschrieben (Velthuis und Van Doorn 2006) oder gefordert wird (Fürst et al. 2014).

Etwas ganzheitlicher und im Sinne des sogenannten „One Health“-Konzepts betrachtet, wäre die Etablierung solcher langfristigen Strategien sicherlich angebracht, um Gefahren die beispielsweise von emerging infectious diseases, für Tiere und mittelbar Umwelt und Menschen, ausgehen, rechtzeitig detektieren und ihnen entsprechend entgegenwirken zu können (Binder et al. 1999).

6. Literaturverzeichnis

Adl, S. M., A. G. B. Simpson, M. A. Farmer, R. A. Andersen, O. R. Anderson, J. R. Barta, S. S. Bowser, G. Brugerolle, R. A. Fensome, S. Fredericq, T. Y. James, S. Karpov, P. Kugrens, J. Krug, C. E. Lane, L. A. Lewis, J. Lodge, D. H. Lynn, D. G. Mann, R. M. McCourt, L. Mendoza, O. Moestrup, S. E. Mozley-Standridge, T. A. Nerad, C. A. Shearer, A. V. Smirnov, F. W. Spiegel and M. F. J. R. Taylor (2005):

The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* 52: 399-451. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x.

Aizen, M. A., L. A. Garibaldi, S. A. Cunningham and A. M. Klein (2008):

Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency.

Curr Biol 18: 1572-1575. DOI: 10.1016/j.cub.2008.08.066.

Aizen, M. A. and L. D. Harder (2009):

The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination.

Curr Biol 19: 915-918. DOI: 10.1016/j.cub.2009.03.071.

Anderson, D. L. and H. Giaccon (1992):

Reduced Pollen Collection by Honey-Bee (Hymenoptera, Apidae) Colonies Infected with *Nosema-Apis* and Sacbrood Virus.

J Econ Entomol 85: 47-51. DOI: 10.1093/jee/85.1.47.

Arbulo, N., K. Antunez, S. Salvarrey, E. Santos, B. Branchiccela, R. Martin-Hernandez, M. Higes and C. Invernizzi (2015):

High prevalence and infection levels of *Nosema ceranae* in bumblebees *Bombus atratus* and *Bombus bellicosus* from Uruguay.

J Invertebr Pathol 130: 165-168. DOI: 10.1016/j.jip.2015.07.018.

Avery, S. W. and D. W. Anthony (1983):

Ultrastructural-Study of Early Development of *Nosema-Algerae* in *Anopheles-Albimanus*.

J Invertebr Pathol 42: 87-95. DOI: 10.1016/0022-2011(83)90206-9.

Bailey, L. (1955):

The Epidemiology and Control of *Nosema* Disease of the Honey-Bee.

Ann Appl Biol 43: 379-389. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1955.tb02488.x.

Bailey, L. (1967):

Nosema Apis and Dysentery of the Honeybee.

J Apic Res 6: 121-125. DOI: 10.1080/00218839.1967.11100171.

Becnel, J. J. and T. G. Andreadis (2014):

Microsporidia in Insects.

Microsporidia: Pathogens of Opportunity. L. M. Weiss and J. J. Becnel, John Wiley & Sons, Inc. 1: 521 ff.

Biesmeijer, J. C., S. P. Roberts, M. Reemer, R. Ohlemuller, M. Edwards, T. Peeters, A. P. Schaffers, S. G. Potts, R. Kleukers, C. D. Thomas, J. Settele and W. E. Kunin (2006):

Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands.

Science 313: 351-354. DOI: 10.1126/science.1127863.

- Binder, S., A. M. Levitt, J. J. Sacks and J. M. Hughes (1999):
Emerging infectious diseases: public health issues for the 21st century.
Science 284: 1311-1313. DOI: 10.1126/science.284.5418.1311.
- Botias, C., R. Martin-Hernandez, L. Barrios, A. Meana and M. Higes (2013):
Nosema spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at
the colony level.
Vet Res 44. DOI: 10.1186/1297-9716-44-25.
- Breeze, T. D., N. Gallai, L. A. Garibaldi and X. S. Li (2016):
Economic Measures of Pollination Services: Shortcomings and Future Directions.
Trends Ecol Evol 31: 927-939. DOI: 10.1016/j.tree.2016.09.002.
- Brown, M. J. F. (2017):
Microsporidia: An Emerging Threat to Bumblebees?
Trends Parasitol 33: 754-762. DOI: 10.1016/j.pt.2017.06.001.
- Burger, R. (2018):
Wildbienen first - unsere wichtigsten Bestäuber und die Konkurrenz mit dem Nutztier
Honigbiene
Naturkunde aus dem Südwesten, Institut für Naturkunde in Südwestdeutschland. 01: 7.
- Burgher-MacLellan, K. L., G. R. Williams, D. Shutler, K. MacKenzie and R. E. L. Rogers
(2010):
Optimization of duplex real-time PCR with melting-curve analysis for detecting the
microsporidian parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*.
Can Entomol 142: 271-283. DOI: 10.4039/n10-010.
- Cameron, S. A., J. D. Lozier, J. P. Strange, J. B. Koch, N. Cordes, L. F. Solter and T. L.
Griswold (2011):
Patterns of widespread decline in North American bumble bees.
Proc Natl Acad Sci U S A 108: 662-667. DOI: 10.1073/pnas.1014743108.
- Cantwell, G. E. (1970):
Standard methods for counting *Nosema* spores.
American Bee Journal 110.
- Chandler, D., E. Cooper and G. Prince (2019):
Are there risks to wild European bumble bees from using commercial stocks of domesticated
Bombus terrestris for crop pollination?
J Apicult Res 58: 665-681. DOI: 10.1080/00218839.2019.1637238.
- Chen, Y., J. D. Evans, I. B. Smith and J. S. Pettis (2008):
Nosema ceranae is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European
honey bee (*Apis mellifera*) in the United States.
J Invertebr Pathol 97: 186-188. DOI: 10.1016/j.jip.2007.07.010.
- Chen, Y. P., J. D. Evans, C. Murphy, R. Gutell, M. Zuker, D. Gundensen-Rindal and J. S.
Pettis (2009):
Morphological, Molecular, and Phylogenetic Characterization of *Nosema ceranae*, a
Microsporidian Parasite Isolated from the European Honey Bee, *Apis mellifera*.
J Eukaryot Microbiol 56: 142-147. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2008.00374.x.
- Chittka, L., T. C. Ings and N. E. Raine (2004):
Chance and adaptation in the evolution of island bumblebee behaviour.
Popul Ecol 46: 243-251. DOI: 10.1007/s10144-004-0180-1.

- Colla, S. R., M. C. Otterstatter, R. J. Gegeer and J. D. Thomson (2006):
Plight of the bumble bee: Pathogen spillover from commercial to wild populations.
Biol Conserv 129: 461-467. DOI: 10.1016/j.biocon.2005.11.013.
- Corradi, N. and C. H. Slamovits (2011):
The intriguing nature of microsporidian genomes.
Brief Funct Genomics 10: 115-124. DOI: 10.1093/bfgp/elq032.
- Dafni, A., P. Kevan, C. L. Gross and K. Goka (2010):
Bombus terrestris, pollinator, invasive and pest: An assessment of problems associated with
its widespread introductions for commercial purposes.
Appl Entomol Zool 45: 101-113. DOI: 10.1303/aez.2010.101.
- Daszak, P., A. A. Cunningham and A. D. Hyatt (2000):
Emerging Infectious Diseases of Wildlife - Threats to Biodiversity and Human Health.
Science 287: 443-449. DOI: 10.1126/science.287.5452.443.
- Deplazes, P., J. Eckert, G. von Samson-Himmelstjerna and H. Zahner (2013):
Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin.
Stuttgart, Enke Verlag.
- Desportes-Livage, I. (2000):
Biology of Microsporidia.
Cryptosporidiosis and Microsporidiosis. F. Petry. Basel, Contrib Microbiol. Karger. 6: 140–
165.
- Durrer, S. and P. Schmidt-Hempel (1994):
Shared use of flowers leads to horizontal pathogen transmission.
Proc Biol Sci 258: 299-302. DOI: <https://www.jstor.org/stable/50094>.
- Dussaubat, C., J. L. Brunet, M. Higes, J. K. Colbourne, J. Lopez, J. H. Choi, R. Martin-
Hernandez, C. Botias, M. Cousin, C. McDonnell, M. Bonnet, L. P. Belzunces, R. F. A. Moritz,
Y. Le Conte and C. Alaux (2012):
Gut Pathology and Responses to the microsporidium Nosema ceranae in the Honey Bee
Apis mellifera.
Plos One 7. DOI: 10.1371/journal.pone.0037017.
- Dussaubat, C., A. Maisonnasse, D. Crauser, D. Beslay, G. Costagliola, S. Soubeyrand, A.
Kretzchmar and Y. Le Conte (2013):
Flight behavior and pheromone changes associated to Nosema ceranae infection of honey
bee workers (Apis mellifera) in field conditions.
J Invertebr Pathol 113: 42-51. DOI: 10.1016/j.jip.2013.01.002.
- Emsen, B., E. Guzman-Novoa, M. M. Hamiduzzaman, L. Eccles, B. Lacey, R. A. Ruiz-Perez
and M. Nasr (2016):
Higher prevalence and levels of Nosema ceranae than Nosema apis infections in Canadian
honey bee colonies.
Parasitol Res 115: 175-181. DOI: 10.1007/s00436-015-4733-3.
- Engel, M. S., I. A. Hinojosa-Díaz and A. P. Rasnitsyn (2009):
A Honey Bee from the Miocene of Nevada and the Biogeography of Apis (Hymenoptera:
Apidae: Apini).
Proc Calif Acad Sci 60: 23-38. DOI: <https://www.researchgate.net/publication/228558363>.

- Erler, S., S. Lommatzsch and H. M. Lattorff (2012):
Comparative analysis of detection limits and specificity of molecular diagnostic markers for three pathogens (Microsporidia, *Nosema* spp.) in the key pollinators *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*.
Parasitol Res 110: 1403-1410. DOI: 10.1007/s00436-011-2640-9.
- Evans, J. D. and R. S. Schwarz (2011):
Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health.
Trends Microbiol 19: 614-620. DOI: 10.1016/j.tim.2011.09.003.
- Evans, J. D., R. S. Schwarz, Y. P. Chen, G. Budge, R. S. Cornman, P. De la Rúa, J. R. de Miranda, S. Foret, L. Foster, L. Gauthier, E. Genersch, S. Gisder, A. Jarosch, R. Kucharski, D. Lopez, C. M. Lun, R. F. A. Moritz, R. Maleszka, I. Munoz and M. A. Pinto (2013):
Standard methods for molecular research in *Apis mellifera*.
J Apicult Res 52. DOI: 10.3896/lbra.1.52.4.11.
- Fantham, H. B. and A. Porter (1914):
The Morphology, Biology and Economic Importance of *Nosema Bombi*, n.sp., Parasitic in Various Humble Bees (*Bombus* spp.).
Ann Trop Med Parasitol 8: 623-638. DOI: 10.1080/00034983.1914.11687667.
- Fenoy, S., C. Rueda, M. Higes, R. Martin-Hernandez and C. del Aguila (2009):
High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation.
Appl Environ Microbiol 75: 6886-6889. DOI: 10.1128/AEM.01025-09.
- Ferroglio, E., S. Zanet, N. Peraldo, E. Tachis, A. Trisciuglio, D. Laurino and M. Porporato (2013):
Nosema ceranae has been infecting honey bees *Apis mellifera* in Italy since at least 1993.
J Apicult Res 52. DOI: 10.3896/lbra.1.52.2.11.
- Food and Agriculture Organization (2006):
Honey bee diseases and pests: a practical guide
Agricultural and food engineering technical reports. Rome, Italy: 8-9.
- Food and Agriculture Organization (2020):
Good beekeeping practices: Practical manual on how to identify and control the main diseases of the honeybee (*Apis mellifera*)
Technologies and practices for small agricultural producers. Rome, Italy: 29-33.
- Forsgren, E. and I. Fries (2010):
Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees.
Vet Parasitol 170: 212-217. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.02.010.
- Free, J. B. (1993):
Using Bumblebees as Pollinators.
Insect Pollination of Crops. San Diego, United States, Elsevier Science Publishing Co Inc. 2: 74-83.
- Fries, I. (1988):
Infectivity and Multiplication of *Nosema-Apis Z* in the Ventriculus of the Honey Bee.
Apidologie 19: 319-328. DOI: 10.1051/apido:19880310.

- Fries, I. (1993):
Nosema-Apis - a Parasite in the Honey-Bee Colony.
Bee World 74: 5-19. DOI: 10.1080/0005772x.1993.11099149.
- Fries, I. (2010):
Nosema ceranae in European honey bees (*Apis mellifera*).
J Invertebr Pathol 103 Suppl 1: S73-S79. DOI: 10.1016/j.jip.2009.06.017.
- Fries, I. and S. Camazine (2001):
Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology.
Apidologie 32: 199-214. DOI: 10.1051/apido:2001122.
- Fries, I., M. P. Chauzat, Y. P. Chen, V. Doublet, E. Genersch, S. Gisder, M. Higes, D. P. McMahon, R. Martin-Hernandez, M. Natsopoulou, R. J. Paxton, G. Tanner, T. C. Webster and G. R. Williams (2013):
Standard methods for Nosema research.
J Apicult Res 52: 1-28. DOI: 10.3896/lbra.1.52.1.14.
- Fries, I., F. Feng, A. daSilva, S. B. Slemenda and N. J. Pieniazek (1996):
Nosema ceranae n sp (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae).
Eur J Protistol 32: 356-365. DOI: 10.1016/S0932-4739(96)80059-9.
- Fürst, M. A., D. P. McMahon, J. L. Osborne, R. J. Paxton and M. J. Brown (2014):
Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators.
Nature 506: 364-366. DOI: 10.1038/nature12977.
- Garibaldi, L. A., I. Steffan-Dewenter, R. Winfree, M. A. Aizen, R. Bommarco, S. A. Cunningham, C. Kremen, L. G. Carvalheiro, L. D. Harder, O. Afik, I. Bartomeus, F. Benjamin, V. Boreux, D. Cariveau, N. P. Chacoff, J. H. Dudenhofer, B. M. Freitas, J. Ghazoul, S. Greenleaf, J. Hipolito, A. Holzschuh, B. Howlett, R. Isaacs, S. K. Javorek, C. M. Kennedy, K. M. Krewenka, S. Krishnan, Y. Mandelik, M. M. Mayfield, I. Motzke, T. Munyuli, B. A. Nault, M. Otieno, J. Petersen, G. Pisanty, S. G. Potts, R. Rader, T. H. Ricketts, M. Rundlof, C. L. Seymour, C. Schuepp, H. Szentgyorgyi, H. Taki, T. Tschardtke, C. H. Vergara, B. F. Viana, T. C. Wanger, C. Westphal, N. Williams and A. M. Klein (2013):
Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance.
Science 339: 1608-1611. DOI: 10.1126/science.1230200.
- Genersch, E. (2010):
Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping.
Appl Microbiol Biotechnol 87: 87-97. DOI: 10.1007/s00253-010-2573-8.
- Gisder, S. (2012):
Das erste Zellkulturmodell für ein Bienenpathogen gibt neue Einblicke in den Lebenszyklus von *Nosema apis* und *Nosema ceranae* und ermöglicht die Entwicklung eines in vitro-Testsystems zur Anti-Nosemose-Wirkstofffindung.
Dr. rer. nat., Freie Universität Berlin.
- Gisder, S. and E. Genersch (2013):
Molecular differentiation of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* based on species-specific sequence differences in a protein coding gene.
J Invertebr Pathol 113: 1-6. DOI: 10.1016/j.jip.2013.01.004.

Gisder, S., K. Hedtke, N. Mockel, M. C. Frielitz, A. Linde and E. Genersch (2010):
Five-Year Cohort Study of *Nosema* spp. in Germany: Does Climate Shape Virulence and
Assertiveness of *Nosema ceranae*?
Appl Environ Microb 76: 3032-3038. DOI: 10.1128/Aem.03097-09.

Gisder, S., N. Mockel, A. Linde and E. Genersch (2011):
A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life
cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia.
Environ Microbiol 13: 404-413. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02346.x.

Goblirsch, M. (2018):
Nosema ceranae disease of the honey bee (*Apis mellifera*).
Apidologie 49: 131-150. DOI: 10.1007/s13592-017-0535-1.

Goblirsch, M., Z. Y. Huang and M. Spivak (2013):
Physiological and Behavioral Changes in Honey Bees (*Apis mellifera*) Induced by *Nosema*
ceranae Infection.
Plos One 8. DOI: 10.1371/journal.pone.0058165.

Goulson, D., E. Nicholls, C. Botias and E. L. Rotheray (2015):
Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers.
Science 347. DOI: 10.1126/science.1255957.

Gray, F. H., A. Cali and J. D. Briggs (1969):
Intracellular stages in the life cycle of the microsporidian *Nosema apis*.
J Invertebr Pathol 14: 391-394. DOI: 10.1016/0022-2011(69)90167-0

Graystock, P., E. J. Blane, Q. S. McFrederick, D. Goulson and W. O. H. Hughes (2016):
Do managed bees drive parasite spread and emergence in wild bees?
Int J Parasitol Parasites Wildl 5: 64-75. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2015.10.001.

Graystock, P., D. Goulson and W. O. Hughes (2014):
The relationship between managed bees and the prevalence of parasites in bumblebees.
PeerJ 2: e522. DOI: 10.7717/peerj.522.

Graystock, P., D. Goulson and W. O. Hughes (2015):
Parasites in bloom: flowers aid dispersal and transmission of pollinator parasites within and
between bee species.
Proc Biol Sci 282: 20151371. DOI: 10.1098/rspb.2015.1371.

Graystock, P., K. Yates, B. Darvill, D. Goulson and W. O. H. Hughes (2013):
Emerging dangers: Deadly effects of an emergent parasite in a new pollinator host.
J Invertebr Pathol 114: 114-119. DOI: 10.1016/j.jip.2013.06.005.

Heinrich, B. (1975):
Thermoregulation in Bumblebees - II. Energetics of Warm-up and Free Flight.
J Comp Physiol 96: 155-166. DOI: 10.1007/Bf00706595.

Heinrich, B. (2004):
Bumblebee Economics.
Harvard, Harvard University Press.

Hendrikx, P., M. P. Chauzat, M. Debin, P. Neumann, I. Fries, W. Ritter, M. Brown, F.
Mutinelli, Y. Le Conte and A. Gregorc (2009):
Scientific Report: Bee Mortality and Bee Surveillance in Europe, European Food Safety
Authority, : 217.

- Higes, M., P. Garcia-Palencia, R. Martin-Hernandez and A. Meana (2007):
Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia).
J Invertebr Pathol 94: 211-217. DOI: 10.1016/j.jip.2006.11.001.
- Higes, M., R. Martin-Hernandez, C. Botias, E. G. Bailon, A. V. Gonzalez-Porto, L. Barrios, M. J. del Nozal, J. L. Bernal, J. J. Jimenez, P. G. Palencia and A. Meana (2008a):
How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse.
Environ Microbiol 10: 2659-2669. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x.
- Higes, M., R. Martin-Hernandez, E. Garrido-Bailon, P. Garcia-Palencia and A. Meana (2008b):
Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees.
J Invertebr Pathol 97: 76-78. DOI: 10.1016/j.jip.2007.06.002.
- Higes, M., R. Martin-Hernandez and A. Meana (2010):
Nosema ceranae in Europe: an emergent type C nosemosis.
Apidologie 41: 375-392. DOI: 10.1051/apido/2010019.
- Higes, M., R. Martin and A. Meana (2006):
Nosema ceranae, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe.
J Invertebr Pathol 92: 93-95. DOI: 10.1016/j.jip.2006.02.005.
- Higes, M., A. Meana, C. Bartolome, C. Botias and R. Martin-Hernandez (2013):
Nosema ceranae (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen.
Env Microbiol Rep 5: 17-29. DOI: 10.1111/1758-2229.12024.
- Hilmi, M., N. Bradbear and D. Mejia (2012):
Beekeeping and sustainable livelihoods.
Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Horber, E. (1961):
Beitrag zur Domestikation der Hummeln.
Vierteljahrsschrift der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich 106: 424-447.
- Huang, W.-F., J.-H. Jiang, Y.-W. Chen and C.-H. Wang (2007):
A *Nosema ceranae* isolate from the honey bee *Apis mellifera*.
Apidologie 38: 30-37. DOI: 10.1051/apido:2006054.
- Huang, W. F. and L. F. Solter (2013):
Comparative development and tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*.
J Invertebr Pathol 113: 35-41. DOI: 10.1016/j.jip.2013.01.001.
- Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services (2019):
Media Release Global Assessment Final Errata2 ENG - IPBES7
Paris, IPBES.
- Jaffe, R., V. Dietemann, M. H. Allsopp, C. Costa, R. M. Crewe, R. Dall'olio, D. L. R. P, M. A. El-Niweiri, I. Fries, N. Kezic, M. S. Meusel, R. J. Paxton, T. Shaibi, E. Stolle and R. F. Moritz (2010):
Estimating the density of honeybee colonies across their natural range to fill the gap in pollinator decline censuses.
Conserv Biol 24: 583-593. DOI: 10.1111/j.1523-1739.2009.01331.x.

Keeling, P. J. and G. I. McFadden (1998):

Origins of microsporidia.

Trends Microbiol 6: 19-23. DOI: 10.1016/S0966-842X(97)01185-2.

Kerr, J. T., A. Pindar, P. Galpern, L. Packer, S. G. Potts, S. M. Roberts, P. Rasmont, O. Schweiger, S. R. Colla, L. L. Richardson, D. L. Wagner, L. F. Gall, D. S. Sikes and A. Pantoja (2015):

Relocation risky for bumblebee colonies-Response.

Science 350: 287. DOI: 10.1126/science.350.6258.287.

Klee, J., A. M. Besana, E. Genersch, S. Gisder, A. Nanetti, D. Q. Tam, T. X. Chinh, F. Puerta, J. M. Ruz, P. Kryger, D. Message, F. Hatjina, S. Korpela, I. Fries and R. J. Paxton (2007):

Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*.

J Invertebr Pathol 96: 1-10. DOI: 10.1016/j.jip.2007.02.014.

Klein, A. M., B. E. Vaissiere, J. H. Cane, I. Steffan-Dewenter, S. A. Cunningham, C. Kremen and T. Tscharntke (2007):

Importance of pollinators in changing landscapes for world crops.

Proc Biol Sci 274: 303-313. DOI: 10.1098/rspb.2006.3721.

Kralj, J. and S. Fuchs (2010):

Nosema sp influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers.

Apidologie 41: 21-28. DOI: 10.1051/apido/2009046.

Krebs, J. R., J. D. Wilson, R. B. Bradbury and G. M. Siriwardena (1999):

The second silent spring?

Nature 400: 611-612. DOI: 10.1038/23127.

Krell, R. (1996):

Value-added products from beekeeping.

Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Kremen, C. and A. Miles (2012):

Ecosystem Services in Biologically Diversified versus Conventional Farming Systems: Benefits, Externalities, and Trade-Offs.

Ecol Soc 17. DOI: 10.5751/Es-05035-170440.

Kremen, C., N. M. Williams and R. W. Thorp (2002):

Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification.

Proc Natl Acad Sci U S A 99: 16812-16816. DOI: 10.1073/pnas.262413599.

Lannutti, L., A. Mira, M. Basualdo, G. Rodriguez, S. Erler, V. Silva, S. Gisder, E. Genersch, M. Florin-Christensen and L. Schnittger (2020):

Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and a direct LAMP for the specific detection of *Nosema ceranae*, a parasite of honey bees.

Parasitol Res. DOI: 10.1007/s00436-020-06915-w.

Le Conte, Y. and M. Navajas (2008):

Climate change: impact on honey bee populations and diseases.

Rev Sci Tech 27: 485-497, 499-510. DOI: 10.20506/rst.27.2.1819.

Li, J., W. Chen, J. Wu, W. Peng, J. An, P. Schmid-Hempel and R. Schmid-Hempel (2012):

Diversity of *Nosema* associated with bumblebees (*Bombus* spp.) from China.

Int J Parasitol 42: 49-61. DOI: 10.1016/j.ijpara.2011.10.005.

- Lotmar, R. (1943):
Über den Einfluss der Temperatur auf den Parasiten *Nosema apis*
Schweiz. Bienenztg. (Beiheft). Aarau, Verlag Sauerländer. 6: 261-284.
- Lotmar, R. (1951):
Weight studies of the healthy and nosematous bee; a contribution on metabolism and water economy.
Z Vgl Physiol 33: 195-206. DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24540844>.
- Malone, L. A. and H. S. Gatehouse (1998):
Effects of *Nosema apis* infection on honey bee (*Apis mellifera*) digestive proteolytic enzyme activity.
J Invertebr Pathol 71: 169-174. DOI: 10.1006/jipa.1997.4715.
- Malone, L. A. and H. A. Giaccon (1996):
Effects of *Nosema apis* Zander on inbred New Zealand honey bees (*Apis mellifera ligustica* L).
Apidologie 27: 479-486. DOI: 10.1051/apido:19960607.
- Martin-Hernandez, R., C. Bartolome, N. Chejanovsky, Y. Le Conte, A. Dalmon, C. Dussaubat, P. Garcia-Palencia, A. Meana, M. A. Pinto, V. Soroker and M. Higes (2018):
Nosema ceranae in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective.
Environ Microbiol 20: 1302-1329. DOI: 10.1111/1462-2920.14103.
- Martin-Hernandez, R., C. Botias, E. G. Bailon, A. Martinez-Salvador, L. Prieto, A. Meana and M. Higes (2012):
Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*?
Environ Microbiol 14: 2127-2138. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02645.x.
- Martin-Hernandez, R., A. Meana, P. Garcia-Palencia, P. Marin, C. Botias, E. Garrido-Bailon, L. Barrios and M. Higes (2009):
Effect of Temperature on the Biotic Potential of Honeybee Microsporidia.
Appl Environ Microbiol 75: 2554-2557. DOI: 10.1128/Aem.02908-08.
- Martin-Hernandez, R., A. Meana, L. Prieto, A. M. Salvador, E. Garrido-Bailon and M. Higes (2007):
Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*.
Appl Environ Microbiol 73: 6331-6338. DOI: 10.1128/Aem.00270-07.
- Matheson, A. (1993):
World Bee Health Report.
Bee World 74: 176-212. DOI: 10.1080/0005772x.1993.11099183.
- Mcivor, C. A. and L. A. Malone (1995):
Nosema-Bombi, a Microsporidian Pathogen of the Bumble Bee *Bombus-Terrestris* (L).
N Z J Zool 22: 25-31. DOI: 10.1080/03014223.1995.9518020.
- Meana, A., R. Martin-Hernandez and M. Higes (2010):
The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees.
J Apicult Res 49: 212-214. DOI: 10.3896/ibra.1.49.2.12.
- Meeus, I., M. J. Brown, D. C. De Graaf and G. Smagghe (2011):
Effects of invasive parasites on bumble bee declines.
Conserv Biol 25: 662-671. DOI: 10.1111/j.1523-1739.2011.01707.x.

Mehlhorn, H. (2008):
Nosema apis.

Encyclopedia of Parasitology. H. Mehlhorn. Berlin, Heidelberg, Springer Verlag: 1021-1021.

Michener, C. D. (2007):
Bees of the World.

Baltimore, The Johns Hopkins University Press.

Milbrath, M. O., T. van Tran, W. F. Huang, L. F. Solter, D. R. Tarpy, F. Lawrence and Z. Y. Huang (2015):

Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*).

J Invertebr Pathol 125: 9-15. DOI: 10.1016/j.jip.2014.12.006.

Moeller, F. E. (1972):

Effects of Emerging Bees and of Winter Flights on *Nosema* Disease in Honeybee Colonies.

J Apic Res 11: 117-120. DOI: 10.1080/00218839.1972.11099709.

Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. (2020).
„Bienensterben“ - eine differenzierte Betrachtung.

Retrieved 20.01.2021, 23:00, from

<https://www.laves.niedersachsen.de/startseite/tiere/bienenkunde/bienensterben---eine-differenzierte-betrachtung-165520.html>.

Otterstatter, M. C. and J. D. Thomson (2008):

Does pathogen spillover from commercially reared bumble bees threaten wild pollinators?

PLoS One 3: e2771. DOI: 10.1371/journal.pone.0002771.

Paxton, R. J., J. Klee, S. Korpela and I. Fries (2007):

Nosema ceranae has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*.

Apidologie 38: 558-565. DOI: 10.1051/apido:2007037.

Pettis, J. S., E. M. Lichtenberg, M. Andree, J. Stitzinger, R. Rose and D. Vanengelsdorp (2013):

Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*.

Plos One 8. DOI: 10.1371/journal.pone.0070182.

Plant, J. D. and H. F. Paulus (2016):

Evolution and phylogeny of bees : review and cladistic analysis in light of morphological evidence (Hymenoptera, Apoidea).

Stuttgart, E. Schweizerbart'sche Verlag.

Plischuk, S., R. Martin-Hernandez, L. Prieto, M. Lucia, C. Botias, A. Meana, A. H. Abrahamovich, C. Lange and M. Higes (2009):

South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*).

Env Microbiol Rep 1: 131-135. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2009.00018.x.

Plowright, R. C. and S. C. Jay (1966):

Rearing Bumble Bee Colonies in Captivity.

J Apic Res 5: 155-165. DOI: 10.1080/00218839.1966.11100149.

- Poppinga, L., H. Aupperle, K. Müller, S. Gisder, A. Fünfhaus and E. Genersch (2016):
Nosemose.
Diagnostischer Farbatlas der Bienenpathologie. H. Aupperle and E. Genersch. Bad
Kissingen, Laboklin Verlag: 137-148.
- Potts, S. G., V. L. Imperatriz-Fonseca, H. T. Ngo, M. A. Aizen, J. C. Biesmeijer, T. D. Breeze,
L. V. Dicks, L. A. Garibaldi, R. Hill, J. Settele and A. J. Vanbergen (2016a):
Safeguarding pollinators and their values to human well-being.
Nature 540: 220-229. DOI: 10.1038/nature20588.
- Potts, S. G., V. L. Imperatriz-Fonseca, H. T. Ngo, J. C. Biesmeijer, T. D. Breeze, L. V. Dicks,
L. A. Garibaldi, R. Hill, J. Settele, A. J. Vanbergen, M. A. Aizen, S. A. Cunningham, C.
Eardley, B. M. Freitas, N. Gallai, P. G. Kevan, A. Kovács-Hostyánszki, P. K. Kwapong, J. Li,
X. Li, D. J. Martins, G. Nates-Parra, J. S. Pettis, R. Rader and B. F. Viana (2016b):
Summary for policymakers of the assessment report of the Intergovernmental Science-Policy
Platform on Biodiversity and Ecosystem Services (IPBES) on pollinators, pollination and food
production. Bonn, Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem
Services,.
- Poulsen, M. H. (1973):
The Frequency and Foraging Behaviour of Honeybees and Bumble Bees on Field Beans in
Denmark.
J Apic Res 12: 75-80. DOI: 10.1080/00218839.1973.11099733.
- Pritsch, G. (2018):
Bienenweide - 220 Trachtpflanzen erkennen und bewerten.
Stuttgart, Franckh-Kosmos Verlag.
- Retschnig, G., G. R. Williams, A. Schneeberger and P. Neumann (2017):
Cold Ambient Temperature Promotes Nosema spp. Intensity in Honey Bees (*Apis mellifera*).
Insects 8. DOI: 10.3390/insects8010020.
- Roberts, K. E. and W. O. H. Hughes (2014):
Immunosenescence and resistance to parasite infection in the honey bee, *Apis mellifera*.
J Invertebr Pathol 121: 1-6. DOI: 10.1016/j.jip.2014.06.004.
- Robinson, G. E. (1992):
Regulation of Division of Labor in Insect Societies.
Annu Rev Entomol 37: 637-665. DOI: 10.1146/annurev.en.37.010192.003225.
- Robinson, R. A. and W. J. Sutherland (2002):
Post-war changes in arable farming and biodiversity in Great Britain.
J Appl Ecol 39: 157-176. DOI: 10.1046/j.1365-2664.2002.00695.x.
- Röseler, P. F. (1977):
Juvenile Hormone Control of Oogenesis in Bumblebee Workers, *Bombus-Terrestris*.
J Insect Physiol 23: 985-992. DOI: 10.1016/0022-1910(77)90126-3.
- Röseler, P. F. (1985):
A Technique for Year-Round Rearing of *Bombus-Terrestris* (Apidae, Bombini) Colonies in
Captivity.
Apidologie 16: 165-169. DOI: 10.1051/apido:19850206.

- Schaefer, H., C. Gretenkord and J. van der Steen (1996):
Methode zur Bestimmung der akuten oralen LD50 von Pflanzenschutzmitteln an Hummeln (*Bombus terrestris* L).
Apidologie 27 (4): 275-277. DOI: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00891348/>.
- Selbitz, H.-J., U. Truyen and P. Valentin-Weigand (2011):
Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.
Stuttgart, Enke Verlag.
- Smith, K. M., E. H. Loh, M. K. Rostal, C. M. Zambrana-Torrel, L. Mendiola and P. Daszak (2013):
Pathogens, Pests, and Economics: Drivers of Honey Bee Colony Declines and Losses.
Ecohealth 10: 434-445. DOI: 10.1007/s10393-013-0870-2.
- Sprague, V., J. J. Becnel and E. I. Hazard (1992):
Taxonomy of phylum microspora.
Crit Rev Microbiol 18: 285-395. DOI: 10.3109/10408419209113519.
- Stevanovic, J., P. Simeunovic, B. Gajic, N. Lakic, D. Radovic, I. Fries and Z. Stanimirovic (2013):
Characteristics of *Nosema ceranae* infection in Serbian honey bee colonies.
Apidologie 44: 522-536. DOI: 10.1007/s13592-013-0203-z.
- Szabo, N. D., S. R. Colla, D. L. Wagner, L. F. Gall and J. T. Kerr (2012):
Do pathogen spillover, pesticide use, or habitat loss explain recent North American bumblebee declines?
Conserv Lett 5: 232-239. DOI: 10.1111/j.1755-263X.2012.00234.x.
- Teixeira, E. W., L. G. Santos, A. Sattler, D. Message, M. L. Alves, M. F. Martins, M. L. Grassi-Sella and T. M. Franco (2013):
Nosema ceranae has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees.
J Invertebr Pathol 114: 250-254. DOI: 10.1016/j.jip.2013.09.002.
- Thomarat, F., C. P. Vivares and M. Gouy (2004):
Phylogenetic analysis of the complete genome sequence of *Encephalitozoon cuniculi* supports the fungal origin of microsporidia and reveals a high frequency of fast-evolving genes.
J Mol Evol 59: 780-791. DOI: 10.1007/s00239-004-2673-0.
- Tobback, J., V. Mommaerts, H. P. Vandersmissen, G. Smagghe and R. Huybrechts (2011):
Age- and task-dependent foraging gene expression in the bumblebee *Bombus terrestris*.
Arch Insect Biochem Physiol 76: 30-42. DOI: 10.1002/arch.20401.
- Traver, B. E. and R. D. Fell (2011):
Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia.
J Invertebr Pathol 107: 43-49. DOI: 10.1016/j.jip.2011.02.003.
- Traver, B. E. and R. D. Fell (2015):
A scientific note: Survey for *Nosema* spp. in preserved *Apis* spp.
Apidologie 46: 194-196. DOI: 10.1007/s13592-014-0306-1.

- Velthuis, H. H. W. and A. van Doorn (2006):
A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination.
Apidologie 37: 421-451. DOI: 10.1051/apido:2006019.
- Wang, D. I. and F. E. Moeller (1970):
Division of Labor and Queen Attendance Behavior of Nosema-Infected Worker Honey Bees
Hymenoptera-Apidae.
J Econ Entomol 63. DOI: 10.1093/jee/63.5.1539.
- Webster, T. C. (1993):
Fumagillin Affects Nosema apis and Honey Bees (Hymenoptera: Apidae).
J Econ Entomol 87: 601-604. DOI: 10.1093/jee/87.3.601.
- Weiss, L. M. (2000):
Molecular Phylogeny and Diagnostic Approaches to Microsporidia.
Cryptosporidiosis and Microsporidiosis. F. Petry. Basel, Contrib Microbiol. Karger. 6: 209–235.
- Williams, G. R., A. B. Shafer, R. E. Rogers, D. Shutler and D. T. Stewart (2008):
First detection of Nosema ceranae, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA.
J Invertebr Pathol 97: 189-192. DOI: 10.1016/j.jip.2007.08.005.
- Williams, G. R., D. Shutler, K. L. Burgher-MacLellan and R. E. L. Rogers (2014):
Intra-Population and -Community Dynamics of the Parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, and Consequences for Honey Bee (*Apis mellifera*) Hosts.
Plos One 9. DOI: 10.1371/journal.pone.0099465.
- Willmer, P. G., A. A. M. Bataw and J. P. Hughes (1994):
The superiority of bumblebees to honeybees as pollinators: insect visits to raspberry flowers.
Ecol Entomol 19: 271-284. DOI: 10.1111/j.1365-2311.1994.tb00419.x.
- Winfree, R. (2010):
The conservation and restoration of wild bees.
Ann N Y Acad Sci 1195: 169-197. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05449.x.
- Winfree, R., N. M. Williams, J. Dushoff and C. Kremen (2007):
Native bees provide insurance against ongoing honey bee losses.
Ecol Lett 10: 1105-1113. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2007.01110.x.
- Wittner, M. and L. M. Weiss (1999):
The Microsporidia and Microsporidiosis.
Washington, D.C., American Society for Microbiology.
- World Health Organization. (2021).
Diarrhoea.
Health Topics Retrieved 20.01.2021, 23:00, from <https://www.who.int/topics/diarrhoea/en/>.
- World Organisation for Animal Health (2018):
Nosemosis of honey bees.
Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, OIE. 8: 744-749.

Woyciechowski, M. and J. Kozłowski (1998):

Division of labor by division of risk according to worker life expectancy in the honey bee (*Apis mellifera* L.).

Apidologie 29: 191-205. DOI: 10.1051/apido:19980111.

Xu, J., G. Pan, L. Fang, J. Li, X. Tian, T. Li, Z. Zhou and Z. Xiang (2006):

The varying microsporidian genome: existence of long-terminal repeat retrotransposon in domesticated silkworm parasite *Nosema bombycis*.

Int J Parasitol 36: 1049-1056. DOI: 10.1016/j.ijpara.2006.04.010.

Xu, Y. and L. M. Weiss (2005):

The microsporidian polar tube: a highly specialised invasion organelle.

Int J Parasitol 35: 941-953. DOI: 10.1016/j.ijpara.2005.04.003.

Yoshiyama, M. and K. Kimura (2011):

Distribution of *Nosema ceranae* in the European honeybee, *Apis mellifera* in Japan.

J Invertebr Pathol 106: 263-267. DOI: 10.1016/j.jip.2010.10.010.

Zander, E. (1909):

Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene.

Münchener Bienenzeitung 31: 196-204.

Danksagung

Natürlich ist auch diese wissenschaftliche Arbeit nicht das Werk nur einer einzelnen Person. Dementsprechend möchte ich mich an dieser Stelle bei Allen bedanken, die mir die Anfertigung meiner Dissertation ermöglicht haben.

An erster Stelle gilt mein Dank meiner Doktormutter, Frau Prof. Genersch. Für ihre unerschöpflichen, stets erfolgversprechenden Ideen und Anregungen, ihre wissenschaftliche und methodische Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation und das Teilen ihrer ansteckenden und motivierenden Leidenschaft für Forschung.

Zu großem Dank bin ich außerdem Herrn Univ.-Prof. Klopffleisch und Herrn Univ.-Prof. Rösler verpflichtet. Ohne ihre Bereitschaft, meine Dissertation zu begutachten und den wertvollen akademischen Input wäre diese Arbeit nicht vollendet.

Herrn Dr. Gisder danke ich ausdrücklich für die leidenschaftliche und umfangreiche Ausbildung in der spannenden Welt der modernen Labortechnik. Ohne das bereitwillige Teilen seiner praktischen Fähigkeiten und kreativen Ansätze wäre diese Arbeit noch im Werden. Aber auch die zahlreichen, konstruktiven Gespräche und hilfreichen Anmerkungen während der gesamten Promotionszeit sollen hier Erwähnung finden.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe 'Molekulare Mikrobiologie und Bienenkrankheiten' des Länderinstituts für Bienenkunde Hohen Neuendorf e.V., für die ausdauernde und sympathische Unterstützung in den vergangenen Jahren. Ebenso möchte ich hier die gemeinsamen, nicht-wissenschaftlichen und motivierenden Momente ausdrücklich erwähnen.

Auch möchte ich meine langjährigen Freunde an dieser Stelle nicht unerwähnt lassen. So manch eine Verabredung ist der Erstellung dieser Arbeit zum Opfer gefallen und trotzdem haben sie sich nicht verprellen lassen, sondern mich motiviert.

Eine herausragende Stellung in jeglicher Hinsicht nimmt meine Familie ein. Ohne ihre liebevolle Fürsorge, unermüdliche Unterstützung und Motivierung wäre diese Arbeit nicht zu dem Werk geworden, welches sie heute ist.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Hamburg, den 29.10.2021

Lennart Ludwig Horchler

