

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS AUSGEWÄHLTER VARROAZIDE AUF DIE HONIGBIENE *APIS MELLIFERA* UND DEN ERREGER DER NOSEMOSE

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Marika Harz

aus Lutherstadt Wittenberg

2015

Diese Arbeit wurde im Zeitraum Februar 2011 bis Dezember 2015 am Institut für Biologie/Neurobiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Pflüger / Frau Dr. Rademacher angefertigt.

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Pflüger
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Menzel

Disputation am 30.5.2016

INHALT

1. Einleitung	4
1.1 Die Bedeutung der Honigbiene	4
1.2 Verluste von Bienenvölkern	4
1.3 Pestizide und subletale Effekte	5
1.4 Die Varroose der Honigbiene.....	6
1.5 Die medikamentöse Behandlung der Varroose.....	7
1.6 Die Nosemose der Honigbiene	8
1.7 Die medikamentöse Behandlung der Nosemose	8
1.8 Problemstellung und Ziel der Arbeit	8
2. Material und Methoden.....	12
2.1 Versuchsorganismen	12
2.2 Tierarzneimittel	15
2.3 Einfluss der Wirkstoffe Oxalsäure und Betasäuren auf <i>A. mellifera</i>	15
2.4 Einfluss der Wirkstoffe Oxalsäure und Betasäuren auf <i>Nosema</i> spp.....	20
3. Ergebnisse	26
3.1 Einfluss der Wirkstoffe Oxalsäure und Betasäuren auf <i>A. mellifera</i>	26
3.2 Einfluss der Wirkstoffe Oxalsäure und Betasäuren auf <i>Nosema</i> spp.....	41
4. Diskussion.....	49
4.1 Einfluss der Wirkstoffe Oxalsäure und Betasäuren auf <i>A. mellifera</i>	49
4.2 Einfluss der Wirkstoffe Oxalsäure und Betasäuren auf <i>Nosema</i> spp.....	53
4.3 Subletale Effekte von Varroaziden	56
5. Schlussfolgerung	58
6. Zusammenfassung/Summary.....	59
7. Danksagung	63
8. Literaturverzeichnis.....	64
9. Anhang - Rohdaten.....	72

1. EINLEITUNG

1.1 Die Bedeutung der Honigbiene

Die westliche Honigbiene *Apis mellifera* L. ist weltweit beheimatet und unverzichtbar für die Agrar- und Kulturlandschaft. Die Honigbiene bestäubt circa 80% der insektenbestäubten Nutz- und Wildpflanzen und hat damit großen volkswirtschaftlichen Nutzen, der den der Honigproduktion um ein Vielfaches übersteigt. Eine Erhöhung der Erträge im Obst- und Gemüseanbau ist durch die Bestäubung der Honigbienen möglich. Der ökonomische Wert der Imkerei in der Europäischen Union im Jahr 2005 lag bei circa 140 Mio. €, wobei die Gesamtsumme der Bestäubungsleistung annähernd 14.2 Mrd. € entsprach (Gallai et al., 2008). Etwa 35% der weltweit produzierten Lebensmittel hängen von der Bestäubung durch Tiere (Insekten, Vögel, Fledermäuse) ab, der Anteil der kommerziellen Bestäubungsleistung von Honigbienen liegt davon bei 90% (Klein et al., 2007). Die Bedeutung der Honigbiene für die Erhaltung des ökologischen Gleichgewichtes für insektenbestäubte Wildpflanzen ist nicht zu beziffern. Imkerei ist in Europa tief verwurzelt, besonders kleine Imkereien und Hobbyimker tragen zum Erhalt der Bienenvölker bei. Diese Art der Bienenhaltung ist allerdings rückläufig, zudem sind die Verluste an Bienenvölkern stark angestiegen. Zusätzlich zu den Problemen der Bienenhaltung sind die Populationen an Wildbienen ebenfalls stark dezimiert. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die intensivierte Landwirtschaft und den Einsatz von Pestiziden und Krankheiten zurückzuführen (Moritz et al., 2010).

Das Überleben von Bienenvölkern ist durch eine Vielzahl von Faktoren gefährdet. Dazu zählt der Anbau von Monokulturen in der Agrarwirtschaft, der Einsatz von Pestiziden, der stetige Rückgang in der Anzahl von Imkern auch in Deutschland und die vielfältigen Krankheitserreger, denen Bienenvölker ausgesetzt sind. Unter diesen stehen zum einen die seit Ende der 1970er Jahren in Deutschland eingeschleppte ektoparasitische Milbe *Varroa destructor* ANDERSON AND TRUEMAN und zum anderen die Microsporidien *Nosema apis* ZANDER und *Nosema ceranae* im Mittelpunkt.

1.2 Verluste von Bienenvölkern

Der Verlust von Bienenvölkern über die Winterperiode ist ein natürlicher Vorgang, der durch Königinverlust oder Futtermangel begründet sein kann. In der Regel werden Verluste von bis zu 10% an einem Bienenstand als wiederkehrende Winterverluste kompensiert. Es treten jedoch zunehmend auch in Deutschland überdurchschnittliche Winterverluste auf, die zu massiven Problemen in der Bienenhaltung führen. Im Winter 2011/2012 waren es im Durchschnitt 22% (Otten, 2012). Für die Jahre 2012/2013

Einleitung

waren die Winterverluste auf einem Niveau von bis zu 15,2% bei Imkereien mit einer Größe von 1-50 Bienenvölkern (van der Zee et al., 2014), für den Winter 2014/2015 wurden Verluste in Höhe von 22,3% berichtet (DIB, 2015).

In Europa kam es in den letzten Jahren häufiger auch zu regional begrenzten aber erheblichen Völkerverlusten. Dazu zählen die Verluste 2008 im Rheintal sowie weitere Vorfälle in Frankreich und Italien, die ursächlich durch unsachgemäße Nutzung von Neonicotinoiden bei der Beizung von Maissaat hervorgerufen wurden. Plötzliche Völkerverluste traten auch in Spanien auf, die durch die Infektion der Bienen mit *N. ceranae* hervorgerufen wurde (Higes et al., 2008).

Das Phänomen des „Colony Collapse Disorder“ (CCD) trat erstmalig in den Jahren 2006/2007 in Nordamerika auf (van Engelsdorp et al., 2009). Bisher konnte kein einzelner Erreger oder Krankheitsfaktor identifiziert werden, der zu diesen spezifischen Symptomen führt (Stokstad, 2007).

Die Gründe für die unterschiedlichen beschriebenen Völkerverluste sind sicherlich nicht nur auf den Parasiten *V. destructor* zurückzuführen (Le Conte et al., 2010). Vielmehr ist davon auszugehen, dass es sich um multifaktorielle Ursachen handelt, ein Zusammenspiel von Varroose, Sekundärinfektionen mit Viren und Mikroorganismen und speziell in Nordamerika der Art der Bienenhaltung.

1.3 Pestizide und subletale Effekte

Zu diesen Kombinationen aus Parasiten und Pathogenen kommt die fast chronische Exposition an Pestiziden. Gesunde, starke Bienenvölker werden weniger Probleme mit diesen Substanzen haben, geschwächte Bienenvölker hingegen werden höchstwahrscheinlich zusammenbrechen, da Honigbienen sehr empfindlich auf Insektizide reagieren (Thompson, 2003). Sammlerinnen können während ihrer Ausflüge mit letalen Pestizidmengen in Kontakt kommen oder diese in subletalen Mengen über Nektar, Pollen, Wasser und Baumharz ins Volk eintragen. Fischer et al. (2014) konnten zeigen, dass ausgewählte Neonicotinoide in subletalen Dosierungen das Heimfindevermögen von Sammlerinnen stören.

Die Behandlung der Varroose ist bisher immer mit dem Einsatz von Chemikalien verbunden. Im weiteren Sinne sind auch diese Stoffe Pestizide. Pestizide zur Bekämpfung der Varroose (Varroazide) stellen zugelassene veterinärmedizinische Präparate dar, bei denen die Prüfung der Verträglichkeit am Zieltier Biene und die Wirksamkeit am Parasiten Milbe in klinischen Studien bestätigt werden muss. Über subletale Effekte dieser Substanzen ist bisher jedoch wenig bekannt, da für den Zulassungsprozess die Verträglichkeit über den Parameter tot/nicht tot des Zieltieres

Einleitung

bestimmt wird. Veränderungen, hervorgerufen durch nicht letale Dosen, die sich auf das Verhalten der Bienen oder deren Physiologie auswirken, sind bisher unzureichend untersucht. Schneider (2015) konnte nach Applikation von Oxalsäure erstmals Unterschiede in der Lebensdauer sowie eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Wasser nachweisen. Am Beispiel ausgewählter Neonicotinoide konnte gezeigt werden, dass auch geringste Dosierungen einen erheblichen Einfluss auf Lebensdauer, Verhalten und damit das soziale Gefüge eines Bienenvolkes haben (Henry et al., 2012; Moritz et al., 2010).

1.4 Die Varroose der Honigbiene

Die Varroose ist eine Parasitose der adulten Bienen und der Bienenbrut, hervorgerufen durch die ektoparasitische Milbe *V. destructor* (Acari: Varroidae). Da es beim Befall von *A. mellifera* mit *V. destructor* kein Wirt-Parasit-Gleichgewicht gibt, stellt diese Parasitose heute das größte Problem in der Bienenzucht und Bienenhaltung weltweit dar. Ohne den Einsatz von Varroaziden durch den Imker mehrmals im Jahresverlauf können Bienenvölker von *A. mellifera* nicht überleben.

Die Milbe *V. destructor* parasitierte ursprünglich die östliche Honigbiene *Apis cerana* FABRICIUS, wechselte jedoch Mitte des 20. Jahrhunderts in Asien auf die westliche Honigbiene *A. mellifera* und wurde mit ihr weltweit verbreitet (Rademacher, 1990). Die Lebensweise von *V. destructor* stellt eine hervorragende Anpassung an die der einzelnen Bienen und des Bienenvolkes dar. Fortpflanzung und Entwicklung der Milben sind eng an die Erbrütung junger Bienen geknüpft. Adulte Weibchen von *V. destructor* befallen die Bienenbrut kurz vor der Verdeckelung. Die weibliche Milbe beginnt circa 60 Stunden nach der Verdeckelung und nach der Aufnahme von Hämolymphe aus der Bienenbrut mit der Eiablage. Das in der Hämolymphe enthaltene Juvenilhormon stimuliert die Eiablage der Muttermilbe (Hänel, 1983). Auf diese Weise verläuft die Vermehrung der Milben synchron mit der Entwicklung der Bienenbrut. Im 30-Stunden Takt werden vom Milbenweibchen dann bis zu sechs weitere Eier gelegt. In der Regel entwickelt sich das erste Ei zu einem Milbenmännchen, alle weiteren zu Weibchen.

Die männlichen Tiere begatten noch in der Brutzelle mehrmalig die adulten Weibchen und sterben nach der Begattung ab. Die Anzahl der Nachkommen steht in engem Zusammenhang mit der Verdeckelungszeit der Bienenbrut. Je länger die Brutzelle verdeckelt ist, desto mehr Deutonymphen entwickeln sich zu adulten Milben. In Drohnenzellen findet man daher zwei bis drei adulte Milben mehr als in Arbeiterinnenbrutzellen. Mit der schlüpfenden Jungbiene verlassen auch die Varroaweibchen die Zellen und suchen ältere Stockbienen auf. So gelangen die Milben in den gesamten Brutzellbereich und können nach wenigen Tagen oder Wochen

Einleitung

wieder in Eilage gehen. Die Reproduktionsrate eines adulten Weibchens liegt bei 1,6 erwachsenen Töchtern in Arbeiterinnenbrut und 2,9 bis 3,2 erwachsenen Töchtern in Drohnenbrut (Schulz, 1984).

Die Milbenpopulation im Volk wird entscheidend durch die Entwicklung der Bienen beeinflusst. Alle Faktoren, die eine Verlängerung der Brutperiode zur Folge haben, begünstigen auch die Fortpflanzung der Milbe. Im Jahresverlauf zeigt sich ein kontinuierlicher Anstieg der Population mit den höchsten Befallszahlen im Oktober und November. Im August ist für das Bienenvolk mit dem Beginn der Aufzucht von Winterbienen ein kritischer Zeitpunkt erreicht. Ist der Befall mit *V. destructor* schon sehr hoch, können kaum gesunde Winterbienen herangezogen werden, das Volk wird stark geschwächt und würde ohne eine Reduzierung der Milbenpopulation eingehen.

1.5 Die medikamentöse Behandlung der Varroose

Zur Bekämpfung der Varroose wurden lange Zeit synthetische Pyrethroide wie Flumethrin in Bayvarol und Fluvalinat in Apistan, aber auch Brompropylat in Folbex VA Neu und Coumaphos in Perizin (Rademacher, 1990) eingesetzt. Diese Wirkstoffe gewährleisteten eine hohe Wirksamkeit, allerdings haben sich auf Seiten des Parasiten Resistenzen entwickelt, die eine Anwendung der meisten dieser Mittel nicht mehr zuverlässig machen. In Italien konnte Milani (1995) erste Resistenzen gegen Fluvalinat und Flumethrin nachweisen. In den darauf folgenden Jahren sind Resistenzen nicht nur gegen diese Pyrethroide (Faucon et al., 1996; Thompson et al., 2002) sondern auch gegen Coumaphos (Spreafico et al., 2001) aufgetreten.

Als alternative Behandlungsmittel haben sich inzwischen organische Säuren durchgesetzt. Ameisensäure, Milchsäure und Oxalsäure zeigen hohe Wirksamkeit gegen *V. destructor* bei guter Bienenverträglichkeit und sind in Deutschland als Tierarzneimittel zur Bekämpfung des Parasiten zugelassen (Rademacher 2006, Nanetti et al., 2003b; Rademacher und Harz, 2006). Im Konzept der integrierten Varroakontrolle sind diese Säuren wichtigster Bestandteil einer erfolgreichen Bekämpfung. Das integrierte Varroabekämpfungskonzept sieht neben der medikamentösen Behandlung auch biotechnische Maßnahmen wie das Ausschneiden der Drohnenbrut vor. Im jahreszeitlichen Verlauf werden dann zwei Behandlungen mit Ameisensäure sowie eine Behandlung mit Oxalsäure empfohlen (Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung, 2007).

HopGuard® ist ein Präparat, welches kurz vor der Zulassung steht. Der Wirkstoff Betasäuren wird aus dem Hopfen *Humulus lupulus* L. extrahiert. Diese Pflanzeninhaltsstoffe sind chemisch Lupulone. Eine flüssige Formulierung in Streifen

Einleitung

getränkt, wurde in den USA etabliert (DeGrandi-Hoffmann et al., 2012). Die Wirksamkeit von Betasäuren im Bienenvolk liegt in der brutfreien Periode zwischen 80 und 90%. Für Deutschland und Europa ist eine Herbst/Winterbehandlung empfohlen (Rademacher et al., 2015).

1.6 Die Nosemose der Honigbiene

Die Nosemose ist eine Erkrankung der adulten Biene, die durch die Microsporidien *N. apis* (Microspora: Nosematidae), ursprünglich auf *A. mellifera* beschrieben (Zander, 1909), und *N. ceranae* als Parasit von *A. cerana* (Fries et al., 1996) hervorgerufen wird. Im Jahr 2007 konnten Huang et al. erstmalig eine natürliche Infektion von *N. ceranae* in *A. mellifera* nachweisen. Es wird vermutet, dass *N. ceranae* ab Ende der 1990er einen Wirtswechsel vollzogen hat und weltweit in Völkern von *A. mellifera* zu diagnostizieren ist. Befallene Völker können auch von beiden Arten infiziert sein (Klee et al., 2007). Eine anfänglich vermutete höhere Virulenz von *N. ceranae* in Einzelbienen von *A. mellifera* wurde durch Untersuchungen von Forsgren und Fries (2010) nicht bestätigt. Die Unterschiede in der Infektionsdosis und der Vermehrungsrate waren geringfügig. Auch die Mortalitätsraten waren nicht signifikant erhöht. Zur Differenzierung der Erregerarten wurde die Unterteilung in Nosemose Typ A (Erreger: *N. apis*) und Nosemose Typ C (Erreger: *N. ceranae*) vorgenommen (Coloss, 2009).

1.7 Die medikamentöse Behandlung der Nosemose

Zur medikamentösen Behandlung der Nosemose stehen zurzeit in der EU keine Präparate zu Verfügung. Obwohl sich das Antibiotikum Fumagillin als hochwirksam gegen beide *Nosema* Arten erwiesen hat, besteht in Europa keine Zulassung mehr, da ein MRL (Maximum Residue Limit) für Honig fehlt (Higes et al., 2010). Als alternative Behandlungsmittel haben vor allem verschiedene Pflanzenextrakte gute Ergebnisse erzielt (Pohorecka, 2004; Porrini et al., 2011). Thymol und Resveratrol konnten als Zusatzstoff in Futtersirup die Infektion mit *Nosema* spp. vermindern bzw. die Lebensdauer infizierter Arbeiterinnen verlängern (Maistrello et al., 2008; Costa et al., 2010). Auch gute imkerliche Praxis wie der Austausch alter Waben, das Ersetzen der Königin und hygienisches Arbeiten an den Völkern trägt zur Vorbeugung bei (Kryger, 2009).

1.8 Problemstellung und Ziel der Arbeit

Oxalsäure ist eine starke Säure mit einem pH-Wert von 2 und wird im Spätherbst in einer Konzentration von 3.5% gelöst in 50% Zuckerwasser und einer Dosis von 30-50ml in Bienenvölker geträufelt. Obwohl es wahrscheinlich nur zu geringer oraler Aufnahme kommt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Oxalsäure in den Mitteldarm der Bienen gelangt und subletal eine pH Veränderung des

Einleitung

Mitteldarminhaltiges und auch in den Mitteldarmzellen bewirkt. Oxalsäure ist nach dermalen und oraler Behandlung an Einzelbienen im Verdauungstrakt und der Hämolymphe nachgewiesen worden (Nozal et al., 2003). Nanetti (2003a) konnte 12 Stunden nach einer Träufelapplikation auf Volksebene in Einzelbienen in allen Darmabschnitten C^{14} markierte Oxalsäure nachweisen. Es kann auch davon ausgegangen werden, dass die Säure nach dermalen Behandlung die Cuticula der Biene durchdringt. Eine toxikologische Untersuchung von Oxalsäure an der Einzelbiene war nicht Teil der Zulassung zum Medikament. In unserer Arbeitsgruppe Bienenpathologie wurde im Anschluss an die erfolgreiche Zulassung eine Verträglichkeitsstudie durchgeführt (Rademacher und Harz, 2009).

Betasäuren haben sich ebenfalls als hochwirksam gegenüber *V. destructor* erwiesen und durchlaufen zurzeit den Zulassungsprozess als Bienenmedikament (Rademacher et al., 2015). Im Gegensatz zu Oxalsäure wirken Betasäuren allerdings im alkalischen Bereich mit einem pH-Wert von 10. Betasäuren werden im Spätherbst durch Streifen ins Bienenvolk eingebracht. Durch Belaufen der Streifen kommen die Bienen mit der Wirksubstanz in Kontakt. Auch hier kann nicht ausgeschlossen werden, dass Betasäuren in geringen Mengen durch Zerfressen der Streifen oral aufgenommen werden. Die toxikologische Untersuchung von Betasäuren wurde im Rahmen eines Drittmittelprojektes an der Freien Universität Berlin im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt und ist im Folgenden dargestellt.

Der Einfluss dieser beiden Wirkstoffe in subletalen Dosen auf den physiologischen pH der Abschnitte des Verdauungssystems der Honigbiene und somit auch auf andere Krankheitserreger ist bisher nicht untersucht. Seit dem vermehrten Einsatz organischer Säuren insbesondere Oxalsäure zur Behandlung der Varroose hat sich das Auftreten von periodischen „Nosema-Jahren“ nach Berichten aus der Praxis verringert.

Oxalsäure ist der in Deutschland wohl am häufigsten eingesetzte Wirkstoff in der Herbst/Winterbehandlung von Bienenvölkern. Es kann davon ausgegangen werden, dass auch Betasäuren zukünftig einen breiten Einsatz finden, da der Wirkeintritt schnell verläuft und sich Betasäuren somit für eine Behandlung stark befallener Völker eignen.

Keimungsfähige Sporen von *Nosema* spp. reagieren empfindlich auf unterschiedliche Säuregrade (Baily, 1955; Olsen et al., 1986), wobei alkalische pH-Werte die Keimung positiv verstärken (Undeen und Epsky, 1990). Veränderungen der pH-Struktur des Mitteldarmes, die möglicherweise durch eine Behandlung mit Oxalsäure oder Betasäuren hervorgerufen werden, könnten die Entwicklung von *Nosema* spp. in künstlich infizierten Bienen und Bienenvölkern beeinflussen.

Einleitung

Der pH-Wert des Vorderdarms wird durch die Nahrungs- und Nektarquelle bestimmt und variiert dadurch stark. Der Mitteldarm pH-Wert liegt für die meisten Insekten bei 6-7, dieser wird abgepuffert und stabil gehalten, die meisten Enzyme erreichen in diesem Bereich ihr Optimum. Der Enddarm ist saurer als der Mitteldarm, was durch die Sekretion der Malphigischen Gefäße hervorgerufen wird. Die Hämolymphe der Insekten misst einen physiologischen pH-Wert von 6,4-6,8 (Chapman, 1998). Der pH-Wert einzelner Darmabschnitte adulter Bienen ist bisher wenig untersucht. Bignell und Heath (1985) beschreiben für das 5. Larvalstadium einen Mitteldarm pH-Wert von 7,5. Diehl (2009) untersuchte Bienen direkt nach der Entnahme aus dem Volk, die einzelnen Darmabschnitte wurden mit Indikatorpapier gemessen: Honigblase pH 4,4; Mitteldarm pH 5,4; Enddarm pH 5,1 und Hämolymphe 6,1. Für die weitere Betrachtung wird es allerdings notwendig sein, in dieser Arbeit einen pH-Wert als Standard für die einzelnen Abschnitte des Darmsystems sowie der Hämolymphe mit einer höheren Messgenauigkeit zu ermitteln.

Diese Arbeit untersucht den Einfluss einer Behandlung der Varroaziden Wirkstoffe Oxalsäure und Betasäuren hinsichtlich der Verträglichkeit an der Einzelbiene, der pH-Struktur des Verdauungssystems und der Hämolymphe sowie der Befallsentwicklung des Erregers der Nosemose.

Die Bienenmedikamente Oxuvar® mit dem Wirkstoff Oxalsäuredihydrat (kurz Oxalsäure) und HopGuard® mit dem Wirkstoff Hopfenbetasäuren (kurz Betasäuren) wurden für diese Untersuchungen ausgewählt und die folgenden Schwerpunkte bearbeitet:

Einleitung

Teil 1: Einfluss der Wirkstoffe Oxalsäure und Betasäuren auf *A. mellifera*

- (1) Untersuchung der Verträglichkeit von Oxalsäure nach Behandlung von Einzelbienen in dermalen und oraler Applikation.
- (2) Untersuchung der Verträglichkeit von Betasäuren nach Behandlung von Einzelbienen in dermalen und oraler Applikation.
- (3) Erstellung eines Standards des physiologischen pH der Abschnitte des Verdauungssystems adulter Honigbienen (Honigblase, Ventriculus, Rectum) sowie der Hämolymphe.
- (4) Untersuchung des pH-Wertes in den einzelnen Abschnitten des Verdauungssystems sowie der Hämolymphe nach Behandlung von Einzelbienen mit Oxalsäure in dermalen und oraler Applikation.
- (5) Untersuchung des pH-Wertes in den einzelnen Abschnitten des Verdauungssystems sowie der Hämolymphe nach Behandlung von Einzelbienen mit Betasäuren in dermalen und oraler Applikation

Teil 2: Einfluss der Wirkstoffe Oxalsäure und Betasäuren auf *Nosema* spp.

- (6) Semi-Feldversuch: Vergleich der Befallsentwicklung *Nosema* infizierter Einzelbienen nach Behandlung mit Oxalsäure und Betasäuren
- (7) Feldversuch: Vergleich der Befallsentwicklung *Nosema* infizierter Bienenvölker nach Behandlung mit Oxuvar® und HopGuard®

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchsorganismen

2.1.1 *A. mellifera*

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Versuchstiere bzw. Versuchsvölker der westlichen Honigbiene *A. mellifera* speziell der Unterart *Apis mellifera carnica* POLLMANN genutzt. Während der einzelnen Versuche mussten Tiere gezielt getötet werden oder sind durch die Behandlungen gestorben. Gezieltes Abtöten einzelner Bienen wurde auf schnellste Art und Weise unternommen. Die Haltung der Bienenvölker erfolgte am Bienenstand des Instituts für Biologie/Neurobiologie im Botanischen Garten der Freien Universität Berlin. Der Standort ist sonnig und geschützt. Alle Völker des Bienenstandes wurden gemäß der Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V. regelmäßig gegen Varroose behandelt und nach guter imkerlicher Praxis geführt. Eine Infektion mit den Erregern der Nosemose wurde durch vorherige stichprobenartige Untersuchungen an betreffenden Versuchsvölkern ausgeschlossen.

Zur Gewinnung altersdatierter Jungbienen wurde in den Versuchsvölkern die Königin für drei Tage auf einer Wabe gesperrt. Diese Wabe wurde durchbestiftet und für weitere 15 Tage im Bienenvolk belassen. Zwei Tage vor dem errechneten Schlupf der Jungbienen wurde die Brutwabe dem Volk entnommen und in einen Brutschrank bei 34.5°C eingehängt. Nach dem Schlüpfen wurden die adulten Jungbienen von der Wabe genommen und in Gruppen zu je 100 Bienen in Holzkästchen gesetzt.

Die gekäfigten Bienen wurden im Labor im Dunkeln und unter Zugfreiheit bei einer Temperatur von 22°C und 65% relativer Luftfeuchte gehalten. Sie erhielten Futterteig (NEKTAPOLL) und Zuckerwasser (50% w/w) *ad libitum* über geeignete Futtergefäße.

2.1.2 *Nosema* spp.

Morphologisch sind die Sporen der beiden *Nosema* Arten unter dem Lichtmikroskop kaum zu differenzieren (Abbildung 2-1). Allerdings erscheinen die Sporen von *N. apis* etwas größer als die von *N. ceranae* (Fries et al., 2006). Die Sporen sind durch die Sporenhülle (Exospore) gut abgegrenzt und lassen sich im Phasen-Kontrast-Mikroskop von anderen Bestandteilen des Darminhalts unterscheiden. Die Charakterisierung beider Arten ist über Elektronenmikroskopie (unterschiedliche Anzahl der Polarfilamentringe: *N. apis* > 30, *N. ceranae* = 20-23; Fries et al., 1996) und über eine Analyse mit real-time PCR, multiplex PCR und anderen molekularen Methoden möglich (Higes et al., 2010).

Material und Methoden

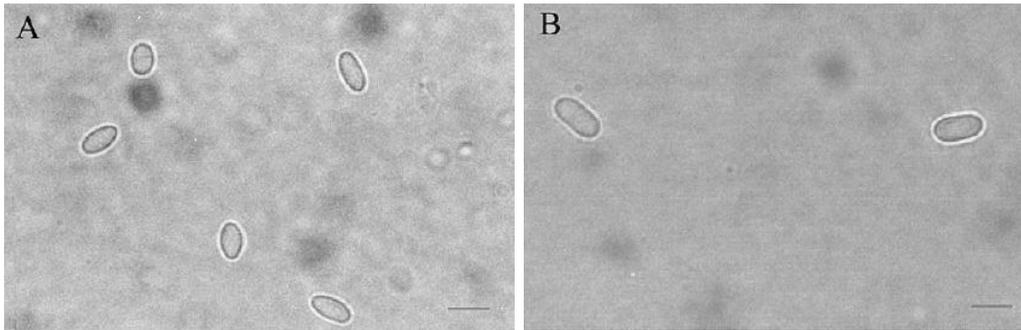


Abbildung 2-1: Sporen von *N. ceranae* (A) erscheinen lichtmikroskopisch kleiner als Sporen von *N. apis*. Maßstab = 5µm (aus Fries et al., 2006).

Microsporidien sind eukaryotische, obligat intrazelluläre sporenbildende Parasiten. Die einzelligen Sporen von *N. ceranae* haben eine hohe Thermotoleranz und sind vor Austrocknung gut geschützt (Fenoy et al., 2009), allerdings nimmt die Überlebensfähigkeit bei niedrigen Temperaturen ab. Ein Bestimmungsmerkmal ist der Polfaden, welcher bei einer Infektion ausgeschleudert wird. In Abhängigkeit von der Spezies können über 30 Filamente vorhanden sein (Weiss, 2001). Phylogenetische Analysen unterstützen eine Klassifizierung innerhalb der Pilze (Weiss, 2001; Sina et al., 2005).

Die Infektion adulter Arbeiterinnen erfolgt durch die orale Aufnahme keimungsfähiger Sporen durch Putzaktivitäten der Bienen innerhalb des Stockes oder gegenseitige Futteraufnahme über Trophallaxis. Die Sporen passieren die Honigblase, erreichen den Mitteldarm und keimen aus. Die Keimung wird u.a. durch pH-Wert Änderungen, Dehydrierung, Kationen und Anionen ausgelöst (Weiss, 2001). Die Epithelzellen des Mitteldarms werden durch das Ausschleudern des Polfadens infiziert, über den das Sporoplasma in die Wirtszelle eindringt. Bei *N. ceranae* bleibt der Kontakt zwischen Plasmalemma und Cytoplasma der Epithelzelle nach der Infektion erhalten. Im Anschluss beginnen die vegetativen Phasen der Merogonie, wobei die Anzahl der Proliferationszyklen noch nicht abschließend bestimmt ist. Die Sporogonie endet mit der Bildung reifer Sporen (Abbildung 2-2). Der Entwicklungszyklus ist innerhalb von drei Tagen abgeschlossen (Gisder et al., 2011; Higes et al., 2010).

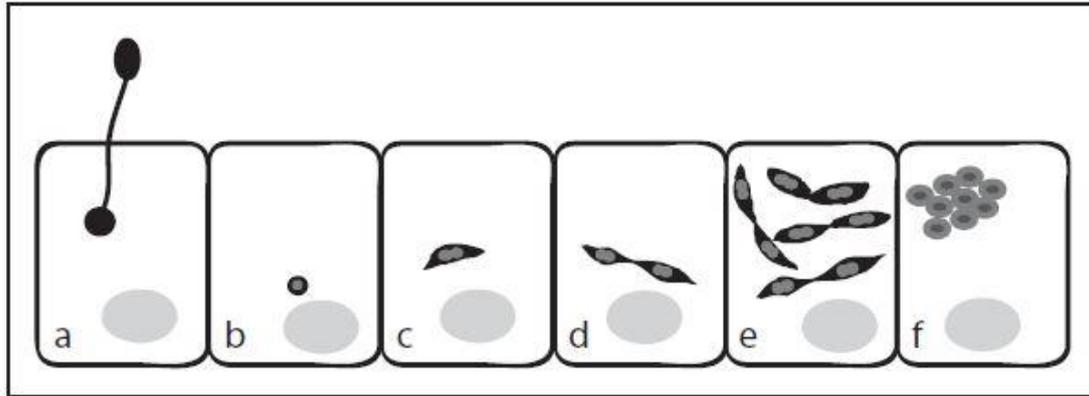


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von *N. ceranae*. (a) Eindringen des Polfadens und Injektion des Sporoplasmas. (b) Sporoplasma in der Wirtszelle. (c) Sporoplasma entwickelt sich zum Meronten. (d) Zellteilung des Meronten. (e) Zellteilungen der paarigen Meronten. (f) Meronten separieren sich und entwickeln sich in ovale Sporonten. (aus Gisder et al., 2011).

Aus Sporonten entwickeln sich Sporoblasten und keimungsfähige Sporen, die eine Autoinfektion verursachen können (Higes et al., 2010) oder über das Darmlumen in die Kotblase gelangen und mit dem Enddarminhalt ausgeschieden werden. Bei hohem Befall des Darmepithels mit *N. apis* kommt es zu starken Störungen des Eiweißhaushaltes, da die parasitären Stadien auf Eiweiß angewiesen sind. Nosematöse Bienen wiesen nur einen Stickstoffgehalt von 3,3% auf (Vergleich gesunde Bienen: 11,4%) und die Verfütterung von Pollen als Eiweißquelle führte zu einer stärkeren Vermehrung von *N. apis* im Vergleich zu pollenfreiem Futter (Borchert, 1974).

Die Verbreitung von Volk zu Volk kann durch verschiedene Aktivitäten des Imkers begünstigt werden. Zum einen durch das Umhängen von Waben mit und ohne Futter, Brut und durch das Zuschlagen von Bienen. Zum anderen durch die Nutzung von verschmutzten Geräten, Waben- und Beutenmaterial. Die Bienen verbreiten die Erreger durch Verfliegen, Räuberei und Schwärmen. Nosemose, hervorgerufen durch *N. apis*, lässt sich im Frühjahr durch braune Kotflecken am Flugloch und auf den Waben erkennen, Bienen zeigen stark angeschwollene Abdomen, da sie bei langen Winterperioden den notwendigen Reinigungsflug nicht durchführen können, oftmals kommt es dann zu verstärktem Abkoten im Volk. In der Regel kann eine eingeschränkte Brutentwicklung und reduzierte Volksstärke beobachtet werden (Borchert, 1974; Higes et al., 2010). Die Diagnose mit *N. ceranae* ist vielfach schwieriger, da klassische Symptome fehlen. Eine Schwächung der Völker ist über längere Zeiträume zu beobachten. Stark infizierte Sammlerinnen kehren nicht zurück, es zeigt sich reduzierte Brutpflege. Es ist denkbar, dass jüngere Bienen zeitiger den Sammlerinnendienst aufnehmen müssen und sich das Gefüge der Arbeitsteilung

zeitlich verschiebt wie Natsopoulou et al. (2015) zeigen. Zudem können Sporen von *N. ceranae* über das gesamte Jahr nachgewiesen werden (Higes et al., 2010).

2.2 Tierarzneimittel

Oxalsäure kam in Form des zugelassenen Tierarzneimittels Oxuvar® mit dem Wirkstoff Oxalsäuredihydrat 3,5% zur Verwendung. Der pH-Wert der gebrauchsfertigen Lösung liegt bei pH 2,0. Betasäuren wurden durch den Hersteller BetaTec® in Form von BetaStab 10A (10%-ig) mit einem pH-Wert von 10 in Lösung zur Verfügung gestellt. Für Einzelversuche wurden Verdünnungsreihen der Substanzen hergestellt. Für den Feldversuch wurde Oxuvar® und das sich in der Zulassung befindliche Präparat HopGuard® mit dem Wirkstoff Betasäuren 16% gemäß Anwendungshinweisen des Medikamentes verwendet.

TEIL 1

2.3 Einfluss der Wirkstoffe Oxalsäure und Betasäuren auf *A. mellifera*

2.3.1 Verträglichkeit von Oxalsäure und Betasäuren nach Behandlung von Einzelbienen

Die Überprüfung der akuten Toxizität der Wirkstoffe erfolgte unter Laborbedingungen in Kästchenversuchen an Einzelbienen. Arbeiterinnen wurde individuell bei dermalen Applikation 5µl der zu behandelnden Lösung ventral auf das Abdomen geträufelt oder bei oraler Applikation 10µl der Lösung in Zuckerwasser (50%) gefüttert. Es wurden jeweils 30 Bienen pro Dosierung (3 x 10 Bienen pro Kästchen) mit einer Wiederholung behandelt (Tabelle 2-1 und 2-2). Die Temperatur und Luftfeuchtigkeit wurde auf 22°C und 65% eingestellt. Nach der Behandlung hatten die Versuchstiere freien Zugang zu den Futtergefäßen. Eine Kontrollgruppe (3 x 10 Bienen pro Kästchen und Wiederholung) wurde mit destilliertem Wasser bzw. Zuckerwasser behandelt. Der Bientotenfall wurde in Intervallen von 24, 48 und 72 Stunden beobachtet.

Material und Methoden

Tabelle 2-1: Applikationsschema zur Überprüfung der dermalen und oralen Toxizität von Oxalsäure nach Rademacher und Harz (2009); Diehl (2009).

	Konzentration % (w/v)	Menge / Biene (μ l)	Dosis Oxalsäure / Biene (μ g)	n Bienen (gesamt) \geq	Beobachtung des Bientotenfalls nach Stunden
dermal	0,00	5	0	60	24, 48, 72
	3,5	5	175	60	24, 48, 72
	4,25	5	212,5	60	24, 48, 72
	5,0	5	250	60	24, 48, 72
	7,5	5	375	60	24, 48, 72
	10	5	500	60	24, 48, 72
oral	0,1	10	10	60	24, 48, 72
	0,5	10	50	60	24, 48, 72
	0,75	10	75	60	24, 48, 72
	0,8	10	80	60	24, 48, 72
	1,0	10	100	60	24, 48, 72

Material und Methoden

Tabelle 2-2: Applikationsschema zur Überprüfung der dermalen und oralen Toxizität von Betasäuren nach Rademacher et al. (2015); Rademacher und Harz (2011)

	Konzentration % (w/w)	Menge / Biene (μ l)	Dosis Betasäuren / Biene (μ g)	n Bienen (gesamt) \geq	Beobachtung des Bientotenfalls nach Stunden
dermal	0,00	5	0	60	24, 48, 72
	0,125	5	6	60	24, 48, 72
	0,25	5	12,5	60	24, 48, 72
	0,50	5	25	60	24, 48, 72
	0,75	5	37,5	60	24, 48, 72
	1,00	5	50	60	24, 48, 72
oral	0,50	10	50	300	24, 48, 72
	0,75	10	75	120	24, 48, 72
	1,00	10	100	100	24, 48, 72

Die Untersuchung der oralen Toxizität wurde im Vorfeld der Promotion in der Arbeitsgruppe durchgeführt (Rademacher und Harz, 2011).

2.3.2 Erstellung eines Standards des physiologischen pH-Wertes der Abschnitte des Verdauungssystems und Hämolymphe adulter Honigbienen

Zur Etablierung eines Standards als pH-Wert der Abschnitte des Verdauungssystems und Hämolymphe adulter Honigbienen wurden Arbeiterinnen aus einem Versuchsvolk des Bienenstandes von einer Honigwabe in Holzkästchen gefegt. Die Holzkästchen haben die Maße 105/65/120mm (L/B/H) und sind durch ein Bienengitter (3mm Maschenweite) sowie einer Glasscheibe an den Seiten begrenzt. Im Anschluss wurden die Bienen ins Labor gebracht und umgehend für 30 Minuten eingefroren. Nach einer kurzen Auftauzeit erfolgte die Präparation der Darmbereiche Honigblase, Ventriculus und Rectum wie von Dade (1977) beschrieben. Die einzelnen Darmabschnitte wurden auf einen Objektträger transferiert (Abbildung 1).



Abbildung 2-3: Das Verdauungssystem der Honigbiene – Honigblase (A), Ventriculus (B), Rectum (C)

Material und Methoden

Zur Messung des pH-Wertes der Darmabschnitte wurde eine InLab® Surface pH-Elektrode (Mettler Toledo), angeschlossen an ein FiveGo™ pH-Meter (Mettler Toledo, Messbereich pH 0,00 – 14,00; Fehlergrenze $\pm 0,01$ pH), verwendet. Vor jeder Messreihe wurde eine 2-Punkt Kalibrierung des Messgerätes nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

Die Surface Elektrode ermöglicht pH-Wertmessungen geringer Volumina. Die Messung selbst erfolgte durch Aufsetzen der Elektrode in bis zu 5µl Flüssigkeit bis zum Anzeigen des Endpunktes. Zwischen den Messungen wurde die Elektrode mit destilliertem Wasser gereinigt.

Hämolymphe wurde am Thorax nach Entfernen der Vorder- und Hinterflügel entnommen. Durch Druck an der Flügelbasis austretende Hämolymphe wurde mithilfe von Einmal-Mikro-Pipetten mit Ringmarke (Hirschmann®) aufgenommen und ebenfalls auf Objektträger übertragen. Um eine Mindestmenge von 5µl Hämolymphe zu erreichen, wurden einzelne Proben gepoolt. Die pH-Wertmessung erfolgte durch Aufsetzen der Elektrode in den Flüssigkeitsfilm bis zum Anzeigen des Endpunktes. Zwischen den Messungen wurde die Elektrode mit destilliertem Wasser gereinigt.

2.3.3 pH-Werte der Abschnitte des Verdauungssystems sowie der Hämolymphe nach Behandlung von Einzelbienen mit Oxalsäure und Betasäuren in oraler und dermaler Applikation

Die Behandlung mit Oxalsäure (OS) und Betasäuren (BS) erfolgte an Arbeiterinnen, die durch Abfegen von Honigwaben aus einem Versuchsvolk entnommen wurden. Die Bienen entstammten dem gleichen Volk wie für Versuch 2.3. Nach dem Abfegen in Holzkästchen wurden die Bienen für 24 Stunden im Labor gehalten. Zur Vorbereitung der oralen Behandlung wurden 2 Kästchen mit Bienen 12 Stunden vor der Behandlung nicht gefüttert. Durch die Hungerzeit wird eine bessere Aufnahme der säure- und basehaltigen Lösungen bei oraler Applikation erreicht. Die Unterschiede in der verabreichten Dosis ergeben sich aus Angaben zur Bienentoxizität nach oraler bzw. dermaler Applikation der beiden Wirkstoffe.

Oxalsäure (pH-Wert 2,0) wird in Dosierungen bis zu 50µg/Biene nach oraler und bis zu 250µg/Biene nach dermaler Applikation von Bienen über einen Zeitraum von 72 Stunden sehr gut toleriert (Rademacher und Harz, 2009).

Die orale Applikation wurde mit 10µl Oxuvar® (0,35%-ige Oxalsäuredihydratlösung in 50% Zuckerwasser) durchgeführt. Diese Verdünnung entspricht einer Einzeldosis von 35µg/Biene und ist bei oraler Applikation gut bienenverträglich. Die Bienen wurden mit einer Pipette individuell gefüttert. Durch die Hungerphase reagierten die Tiere schnell

Material und Methoden

mit dem Strecken der Proboscis zur Futteraufnahme. Die Aufnahme des gesamten Volumens (10µl) wurde sichergestellt.

Die dermale Applikation erfolgte in einer Menge von 5µl der gebrauchsfertigen Lösung Oxuvar® (3,5%-ige Oxalsäuredihydratlösung in 50% Zuckerwasser) und einer entsprechenden Einzeldosis von 175µg/Biene. Den Bienen wurde 5µl Lösung mit einer Pipette ventral auf das Abdomen geträufelt.

Betasäuren, in Form von BetaStab® 10A (pH-Wert 10,3), werden in Dosierungen bis 50µg/Biene nach oraler und bis zu 150µg/Biene nach dermaler Applikation von Bienen über einen Zeitraum von 72 Stunden im Labor gut toleriert (Rademacher und Harz, 2011; Rademacher et al., 2015).

Die orale Applikation erfolgte mit 10µl BetaStab® 10A (0,1%-ig in 50% Zuckerwasser). Diese Verdünnung entspricht einer Einzeldosis von 10µg/Biene. Den Bienen wurde mit einer Pipette 10µl Lösung gefüttert. Durch den Zusatz von Zucker sollte die Attraktivität der aufzunehmenden Lösung gesteigert werden. Durch die Hungerphase reagierten die Tiere auch hier umgehend mit dem Strecken der Proboscis zur Futteraufnahme. Die Aufnahme des gesamten Volumens wurde sichergestellt.

Die dermale Applikation erfolgte in einer Menge von 5µl BetaStab® 10A (1%-ige Betasäurenlösung) und einer Einzeldosis von 50µg/Biene. Den Bienen wurde 5µl Lösung mit einer Pipette ventral auf das Abdomen geträufelt. In dieser Lösung war kein Zuckerwasser enthalten, da Zucker im Tierarzneimittel HopGuard® nicht als Zusatzstoff enthalten ist. Die Bienen wurden nach der Applikation in Behandlungsgruppen zu jeweils 10 Bienen/Kästchen im Labor für die Versuchsdauer von 72 Stunden gehalten (n pro Gruppe 60). Die Kontrollbienen blieben als Negativkontrollen unbehandelt und wurden separat zu jeweils 10 Bienen/Kästchen gehalten. Die Bienen erhielten nach der Behandlung Futterteig und Zuckerwasser *ad libitum*. Es wurde eine Wiederholung durchgeführt.

In Intervallen von 24, 48 und 72 Stunden nach der Behandlung wurden die Bienen durch Einfrieren getötet, anschließend wie unter Punkt 2.3.2 beschrieben, präpariert und der pH-Wert der Abschnitte des Verdauungssystems sowie der Hämolymphe ermittelt.

Material und Methoden

Tabelle 2-3: Zusammenfassung Behandlung der Einzelbienen und Probennahme zur pH-Wert Bestimmung einzelner Abschnitte des Verdauungssystems und der Hämolymphe

Behandlung	Konz. % (w/w)	Menge / Biene (μ l)	Dosis / Biene (μ g)	n Bienen gesamt	Präparation nach	n Bienen / Zeitintervall (24, 48, 72 Std.)
OA oral	0,35	10	35	120	24, 48, 72 Std.	40
OA dermal	3,5	5	175	120	24, 48, 72 Std.	40
BS oral	0,1	10	10	120	24, 48, 72 Std.	40
BS dermal	1,0	5	50	120	24, 48, 72 Std.	40

TEIL 2

2.4 Einfluss der Wirkstoffe Oxalsäure und Betasäuren auf *Nosema* spp.

2.4.1 Künstliche Infektion von Arbeiterinnen mit *Nosema* spp. unter Laborbedingungen

Arbeiterinnen wurden mit *Nosema* spp. unter Laborbedingungen künstlich infiziert. Dazu wurden altersdatierte Jungbienen nach dem Schlupf in Kästchen überführt und im Brutschrank gehalten, um sich an die Laborbedingen anpassen zu können. Die Bienen hatten freien Zugang zu Futter. Am 3. Tag nach dem Schlupf erhielten 120 Versuchstiere nach einer Hungerphase von 3 Stunden das *Nosema* Inoculum (57450 Sporen/10 μ l Applikationsmenge). Das Inoculum wurde nach den Vorgaben von Fries et al. (2013) aus 10 *Nosema*-positiven Bienen aus einem Flugraumvolk hergestellt. Die infizierten Bienen wurden dann in Kästchen mit 4x30 Bienen im Brutschrank gehalten, eine Kontrollgruppe von 1x30 Bienen wurde nicht infiziert. Die Kästchen wurden in Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 – Kontrolle (n=30), Gruppe 2 – Lebensdauer nach Infektion (n=60) und Gruppe 3 – Befallsgrad nach Infektion (n=60). Der Infektionserfolg und die Lebensdauer wurden über 26 Tage beobachtet. Der Befallsgrad mit *Nosema* spp. wurde 72 Stunden sowie 8, 13, 19 und 26 Tage nach der Infektion an jeweils 10 Bienen der Gruppe durch Auszählung nach Cantwell (1970) bestimmt.



Abbildung 2-4: Aufstellung der Versuchskästchen im Brutschrank

2.4.2 Semi-Feldversuch: Vergleich der Befallsentwicklung von *Nosema* spp. nach Behandlung von Einzelbienen mit den Wirkstoffen Oxalsäure und Betasäuren

Entwicklung von Nosema spp. im Flugraumvolk

Im Flugraum des Institutes für Biologie/Neurobiologie wurde ein Bienenvolk (einzargig, Flugraumvolk 2) im Flugnetz aufgestellt. Die Bienen konnten frei fliegen und hatten Zugang zu gemörsertem Pollen und Zuckersirup (Apiinvert®, verdünnt) über geeignete Futtergefäße. Über eine Zeit von 6-8 Wochen infizieren sich Flugraumbienen in der Regel stark mit *Nosema* und weisen einen pathologischen Befund auf. Innerhalb des Flugnetzes kommt es häufig zum Koten am Flugloch und auch im Bienenvolk, da der Ausflugradius sehr begrenzt ist. Die Bienen nehmen dann durch Putzen und Beleckern der bekoteten Flächen Sporen auf.

Die Beprobung des Bienenvolkes erfolgte wöchentlich, um eine Befallsdiagnose durchzuführen. Jeweils 20 Einzelbienen wurden auf das Vorhandensein von *Nosema* Sporen untersucht. Nach 30-minütigem Tiefrieren wurde durch Ziehen am letzten Abdominalsegment der Darm entfernt. Der Darm wurde mit Wasser (5µl) aufgeschwemmt und mit einem Pistill gequetscht. Im Anschluss wurde die Darmflüssigkeit auf einen Objektträger übertragen und ein Ausstrichpräparat angefertigt. Mit einem Lichtmikroskop (Zeiss Axiostar plus, 400x) unter Phasen-Kontrast erfolgte für die einzelnen Präparate eine Befallsdiagnose. Die Einteilung des Befalls bei positiven Proben erfolgte nach Genersch et al. (2010) über die Anzahl Sporen im Sichtfeld: gering (< 20 Sporen), mittel (20 – 100) und stark (> 100 Sporen). Nach 6 Wochen wurde starker Befall in 50% der Proben festgestellt (Tabelle 9-20 im Anhang). Auf der Befallsdiagnose nach 6 Wochen basierend, erfolgten die weiteren Versuche.

Material und Methoden

Eine Differenzierung *Nosema*-positiver Bienenproben am Länderinstitut für Bienenkunde, Hohen Neuendorf ergab eine Mischinfektion mit den Erregern *N. apis* und *N. ceranae*.

Behandlung mit Oxalsäure und Betasäuren

Am 02.03.2015 wurden dem Volk 400 Arbeiterinnen entnommen und in Versuchskästchen (4x100 Bienen) eingefegt. Die Bienen erhielten unter Laborbedingungen freien Zugang zu Flüssigfutter und Futterteig. Am 03.03.2015 erfolgte eine thorakale Farbmarkierung der Bienen zur späteren Zuordnung im Volk (weiß: Gruppe 1 – Oxalsäure; blau: Gruppe 2 – Betasäuren) und die Behandlung der Bienen für Gruppe 1: 3,5% Oxalsäure (5µl/Biene, n=200) und Gruppe 2: 1% Betasäuren (5µl/Biene, n=200) in dermalen Applikation. Alle behandelten Bienen wurden im Anschluss in das Flugraumvolk zurückgesetzt. Die Beprobung des Flugraumvolkes (10 Bienen pro Gruppe; 10 unbehandelte Bienen als Kontrolle) erfolgte 3, 8, 13, 16, 26 und 35 Tage nach der Behandlung durch Abfangen der markierten Bienen im Volk. Nach dem Abtöten der Tiere durch Tiefrieren wurden der pH-Wert des Mitteldarms und Enddarm gemessen; die Bestimmung des Befallsgrades mit *Nosema* Sporen für Mitteldarm und Enddarm erfolgte über die Sichtfeldeinteilung. An den Versuchstagen 3, 8 und 16 erfolgte zusätzlich bei allen *Nosema* positiven Proben eine Auszählung der Sporenmenge des Mitteldarms mittels Zählkammer. Am 35. Tag nach der Behandlung waren keine markierten Bienen der Gruppe 1 mehr vorhanden.

2.4.3 Feldversuch: Vergleich der Befallsentwicklung von *Nosema* spp. nach Behandlung von Bienenvölkern mit Oxuvar® und HopGuard®

Ablegerbildung

Zur Vorbereitung des Feldversuches wurden im September 2014 nach der Auffütterung und zweiten Ameisensäurebehandlung aus zwei Wirtschaftsvölkern neun Bienenvölker (Ableger) auf Dreierböden gebildet. Fries et al. (2013) empfehlen für Feldversuche zur Untersuchung von *Nosema* Befallsentwicklung die Bildung von Kunstschwärmen. Für diesen Versuch sollten die Völker jedoch über mehrere Monate stabil sein, was durch Brutableger auch zu dieser Jahreszeit möglich ist. In jedem Dreierboden - Kompartiment wurden eine Brutwabe mit gedeckelter Brut und Arbeiterinnen, eine Futterwabe mit Pollen und eine ausgebaute Wabe eingehängt. In jedes Kompartiment wurde eine junge begattete Königin (Schwesternköniginnen bereitgestellt vom Länderinstitut für Bienenkunde, Hohen Neuendorf) eingeweiselt. Drei Wochen nach Einsetzen der Königinnen wurden die Waben auf Eiablage kontrolliert. In sieben von neun Ablegern hatten sich die Königinnen etabliert und sind in Brut gegangen. Wöchentlich erfolgte eine Überprüfung des natürlichen Totenfalls von *V. destructor*

Material und Methoden

durch Auszählen der Bodeneinlagen. Vor Versuchsbeginn wurden alle Ableger beprobt (20 Bienen pro Volk) und auf das Vorhandensein von *Nosema* Sporen untersucht. Oxuvar® und HopGuard® sind zur Varroabehandlung während der brutfreien Herbst/Winterperiode als Tierarzneimittel zugelassen. Die Brutfreiheit der Ableger wurde Mitte November festgestellt. Am 17.11. 2014 erfolgte die Populationsschätzung nach der Liebefelder Schätzmethode (Imdorf et al., 1987) bei einer Außentemperatur von 9°C. Die Volksstärken der sieben Ableger sind in Tabelle 2-3 dargestellt.



Abbildung 2-5: Kompartimente der Ableger im Dreierboden

Tabelle 2-4: Volksstärken der Versuchsvölker nach Populationsschätzung

Ableger Nr.	Einheiten mit Bienen	Anzahl Bienen	Anzahl Waben	Einschätzung der Volksstärke
1.1	12	1320	3	mittel
1.3	3	330	3	schwach
2.3	8	880	3	schwach
3.1	21	2310	3	mittel
10	19	2090	3	mittel
23	38	4180	4	stark
23a	42	4620	4	stark

Entwicklung von *Nosema spp.* im Flugraumvolk, Herstellung eines Inoculums und Infektion von Ablegern mit *Nosema spp.*

Im Flugraum des Institutes für Biologie/Neurobiologie wurde ein einzargiges Bienenvolk (Flugraumvolk 1) im Flugnetz aufgestellt. Die Bienen konnten frei fliegen und hatten Zugang zu gemörsertem Pollen und Zuckersirup (Apiinvert®, verdünnt) über geeignete Futtergefäße.

Die Beprobung des Bienenvolkes erfolgte wöchentlich, um eine Befallsdiagnose wie in Punkt 2.6.1 beschrieben, durchzuführen. Nach 7 Wochen wurde starker Befall in 70% der Proben festgestellt (Tabelle 9-10 im Anhang). Auf die Befallsdiagnose nach 7 Wochen basierend, erfolgten die folgenden Versuche.

Im Folgenden wurden 200 Arbeiterinnen aus dem Volk entnommen und durch Schockgefrieren getötet. Nach Abtrennung der Abdomen wurden diese gemörsert, mit Wasser aufgeschwemmt, gesiebt und filtriert. Große Partikel konnten entfernt werden. Die Suspension wurde dann in Petrischalen im Brutschrank bei 60°C für 72 Stunden zum Auftrocknen belassen. Die Auftrocknung der Sporen ist essentiell für die Infektiosität des Inoculums (Olsen et al., 1986). Nach der Resuspension mit 100ml Aqua dest. wurde die Sporenmenge nach Cantwell (1970) in einer Zählkammer (Neubauer Improved mit 0,1mm Tiefe; 0,0025mm²) gemessen. Die Sporenmenge betrug 650.000 Sporen/ml Suspension. Um eine bessere Aufnahme der Sporen zu gewährleisten, wurde eine 1:5 Verdünnung der Lösung mit Zuckerwasser (50%-ige Sucroslösung) hergestellt. Die Testvölker wurden am 27.11.2014 je nach Volksstärke mit 25-30ml Inoculum infiziert. Die zuckerhaltige Suspension wurde in die bienenbesetzten Wabengassen und auf die Oberträger der Rähmchen in den Ablegern geträufelt.

Behandlung mit Varroaziden

Die Behandlung der Testvölker mit Oxuvar® bzw. HopGuard® erfolgte 7 Tage nach der Infektion am 4.12.2014. Die oxalsäurehaltige Lösung wurde nach Gebrauchsinformation angewendet, das Einzelvolk erhielt 30ml Lösung. Ein Streifen HopGuard® wurde in die Testvölker eingehängt. Die Kontrollvölker blieben unbehandelt. Das Versuchsschema ist in Tabelle 2-5 zusammengefasst.

Material und Methoden

Tabelle 2-5: Versuchsschema Feldversuch

<i>Ableger Nr.</i>	<i>Versuchsgruppe</i>	<i>Infektion mit Inoculum</i>	<i>Behandlung</i>
1.1	Test	25ml	1 Streifen HG
4.3	Test	25ml	Zusammenbruch
2.3	Test	25ml	Zusammenbruch
3.1	Test	25ml	1 Streifen HG
10	Kontrolle negative	0ml	unbehandelt
23	Test	30ml	30ml OX
23a	Kontrolle positive	30ml	unbehandelt

HG – HopGuard; OX – Oxuvar. Die Völker 1.3 und 2.3 brachen zwischen Infektions- und Behandlungszeitpunkt zusammen.

Die Beprobung der Ableger (20 Bienen pro Volk) wurde 6, 12, 18, und 25 Tage nach der Behandlung mit Varroaziden durchgeführt. Die Bestimmung des Befallsgrades mit *Nosema Sporen* erfolgte durch Auszählen der Einzelproben nach Cantwell (1970).

2.4.4 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm SigmaStat 3.0. Signifikante Unterschiede in der akuten dermalen und oralen Toxizität der Wirkstoffe wurden mit dem χ^2 - Test bzw. Mann-Whitney-*U* Test im Vergleich zur Kontrollgruppe bestimmt. Der Vergleich der pH-Werte in den jeweiligen Gruppen wurde bei normalverteilten Daten mit dem t-Test durchgeführt. Für nicht normalverteilte Datensätze wurde der Mann-Whitney-Rang-Summen-Test genutzt. Die Überlebenskurven der *Nosema* infizierten Bienen und der nicht-infizierten Kontrollgruppe wurde mit der Kaplan-Meier-Survival Analyse: Grehan-Breslow verglichen. Die durchschnittliche Sporenbelastung an den Versuchstagen wurde mit dem t-Test geprüft, bei Ungleichheit der Varianzen wurde der Mann-Whitney-Rang-Summen-Test durchgeführt. Unterschiede im proportionalen Anteil infizierter Bienen zu den Versuchszeitpunkten wurden mit dem z-Test ermittelt. Die Ergebnisse wurden bei einem $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet.

3. ERGEBNISSE

TEIL 1

3.1 Einfluss der Wirkstoffe Oxalsäure und Betasäuren auf *A. mellifera*

3.1.1 Verträglichkeit von Oxalsäure nach Behandlung von Einzelbienen

Nach *dermaler* Applikation von Oxalsäure steigt die Bienenmortalität im Versuchsverlauf langsam an (Abbildung 3-1). In den Dosierungen 175µg und 212,5µg zeigt sich ein Totenfall von 3,3% bzw. 6,7%, der sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe unterscheidet (χ^2 - Test, $p \geq 0,05$). Ab einer Dosis von 250µg/Biene ist ein signifikanter Anstieg der Mortalitätsraten zu verzeichnen (χ^2 - Test, $p \leq 0,05$). In den höchsten Dosierungen 375µg und 500µg übersteigt der Totenfall 20%.

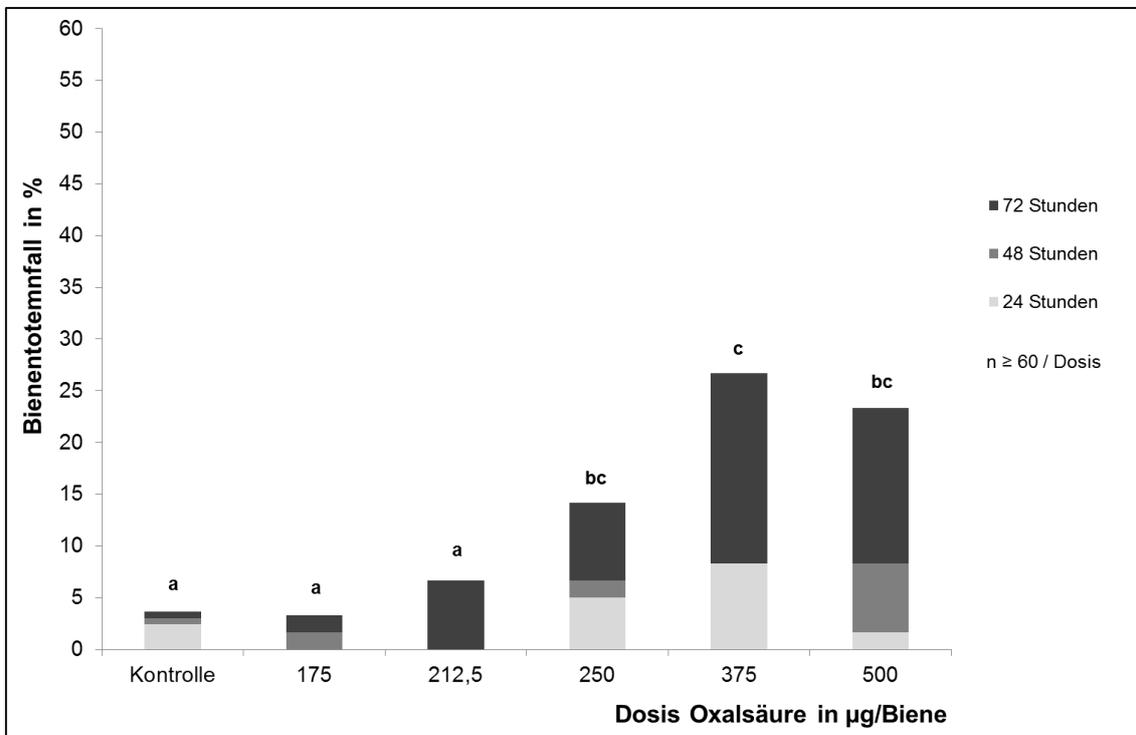


Abbildung 3-1: Bienenmortalität nach *dermaler* Applikation von Oxalsäure während des Versuchszeitraumes von 72 Stunden. Unterschiedliche Buchstaben beschreiben einen signifikanten Unterschied im Vergleich der Dosierungen (χ^2 - Test, $p \leq 0,05$).

Ergebnisse

Nach *oral*er Applikation tritt bereits bei geringen Dosen Bientotenfall auf (Abbildung 3-2), der sich aber nicht signifikant von der Kontrollgruppe unterscheidet (χ^2 - Test, $p \geq 0,05$). Ab einer Dosis von $75\mu\text{g}/\text{Biene}$ steigt die Mortalität signifikant an ($11,7\%$, χ^2 - Test, $p \leq 0,05$). Bei einer applizierten Dosis von $100\mu\text{g}/\text{Biene}$ werden nach 72 Stunden 55% der Bienen getötet.

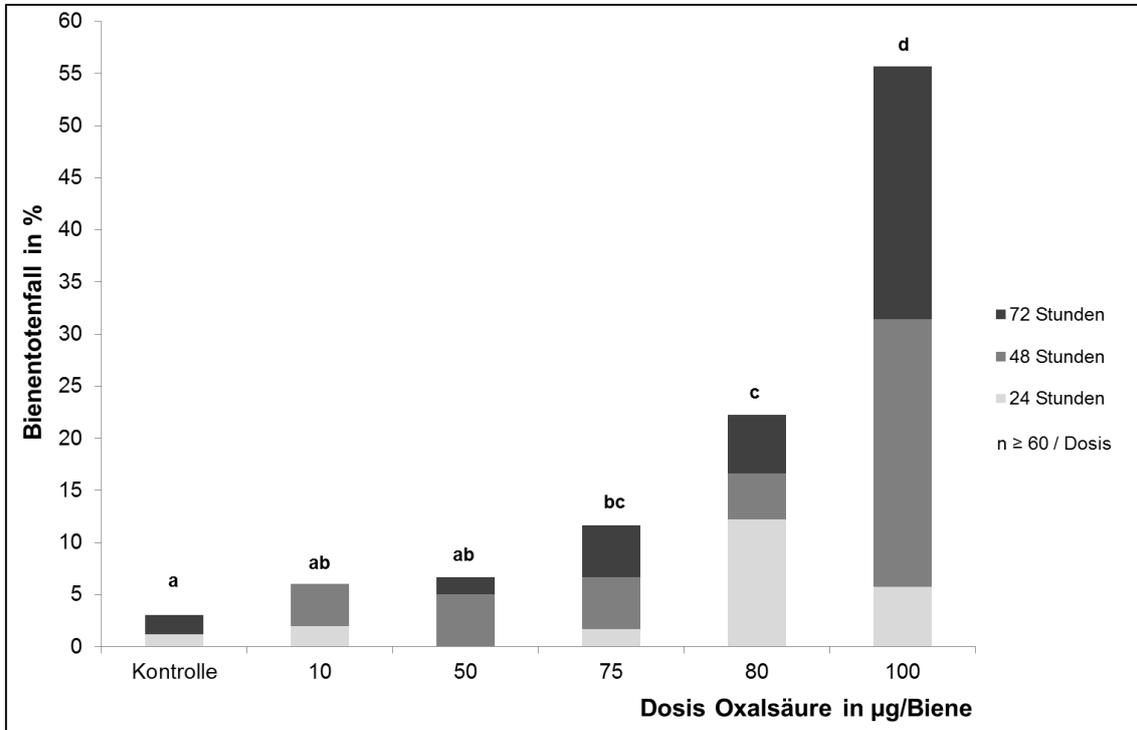


Abbildung 3-2: Bienenmortalität nach oraler Applikation von Oxalsäure während des Versuchszeitraumes von 72 Stunden. Unterschiedliche Buchstaben beschreiben einen signifikanten Unterschied im Vergleich der Dosierungen (χ^2 - Test, $p \leq 0,05$).

Ergebnisse

3.1.2 Verträglichkeit von Betasäuren nach Behandlung von Einzelbienen

Die *dermale* Applikation von Betasäuren an Arbeiterinnen zeigt keine dosisabhängige Bienenmortalität in einem Zeitraum von 72 Stunden. Ab einer Dosis von 25µg Betasäuren/Biene tritt ein Totenfall von 5% auf, der sich auch bei höheren Dosierungen nicht signifikant zur Kontrollgruppe unterscheidet (Abbildung 3-3, MWU, $p \geq 0,05$).

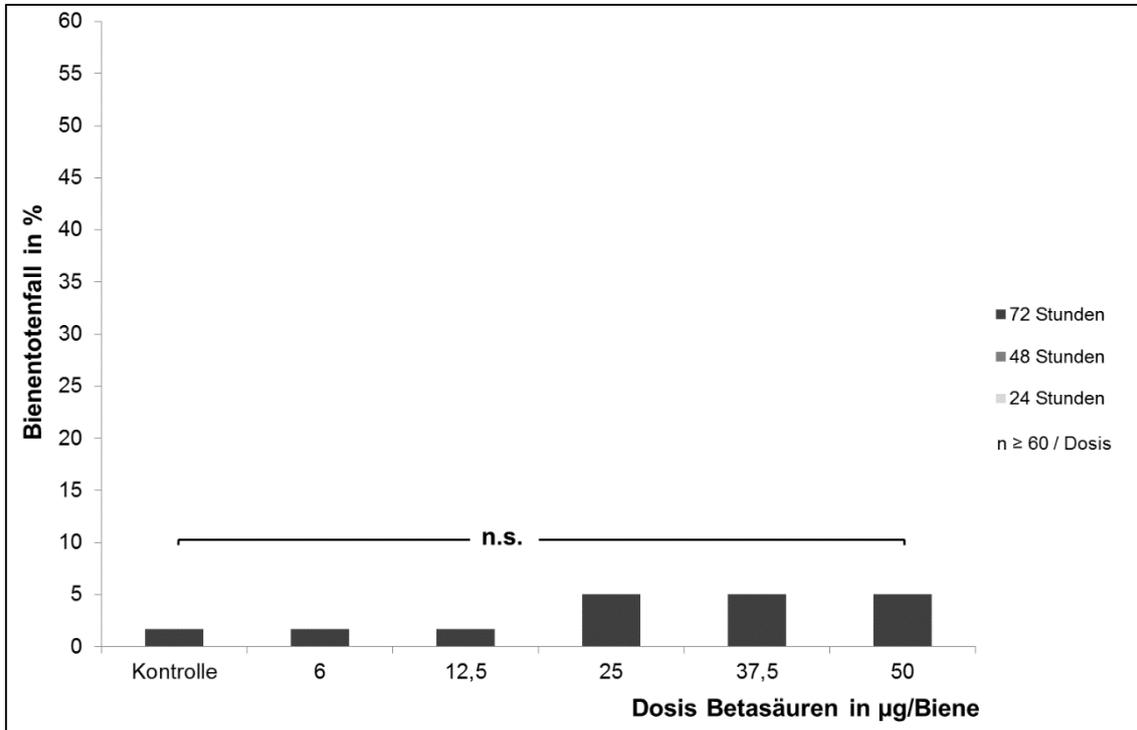


Abbildung 3-3: Bienenmortalität nach *dermaler* Applikation von Betasäuren während des Versuchszeitraumes von 72 Stunden. n.s. = nicht signifikant (MWU, $p \geq 0,05$).

Ergebnisse

Die *orale* Applikation von Betasäuren zeigt eine dosisabhängige Bienenmortalität in einem Zeitraum von 72 Stunden (Abbildung 3-4). Die Applikation von 100µg Betasäuren/Biene führt zu einem signifikanten Bientotenfall (55%) im Vergleich zur Kontrollgruppe (9,2%, MWU, $p \leq 0,05$). Auch geringere Dosierungen (50µg und 75µg) führen zu erhöhtem Totenfall (13% und 16%), der sich aber nicht signifikant zur Kontrollgruppe unterscheidet (MWU, $p \geq 0,05$).

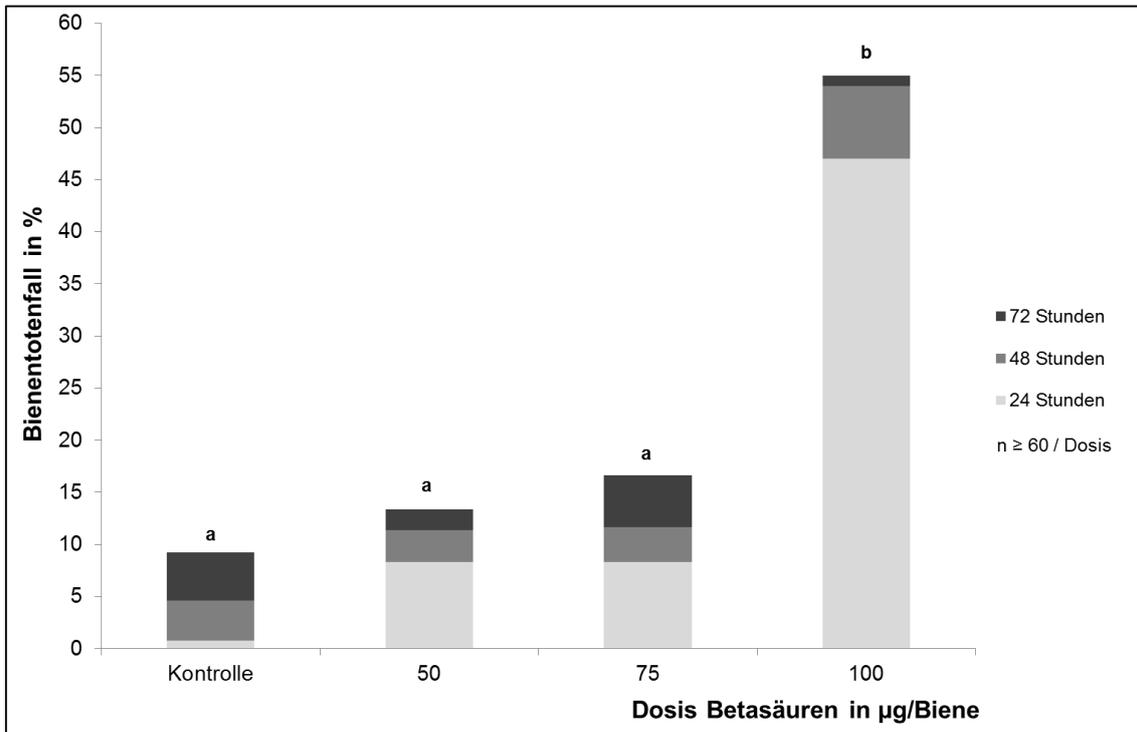


Abbildung 3-4: Bienenmortalität nach oraler Applikation von Betasäuren während des Versuchszeitraumes von 72 Stunden. Unterschiedliche Buchstaben beschreiben einen signifikanten Unterschied im Vergleich der Dosierungen (MWU, $p \leq 0,05$).

Ergebnisse

3.1.3 Der physiologische pH-Wert der Abschnitte des Verdauungssystems und Hämolymphe adulter Honigbienen als Standard

Der durchschnittliche natürliche pH-Wert der Abschnitte des Verdauungssystems und der Hämolymphe ist in Abbildung 3-5 dargestellt.

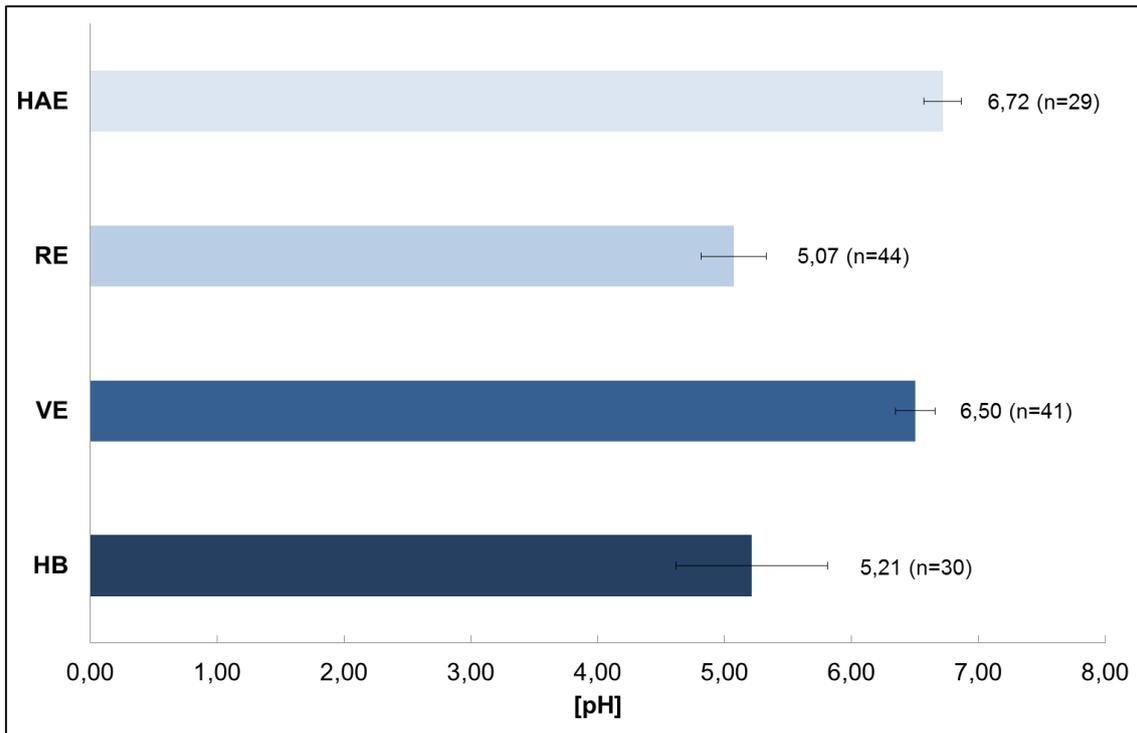


Abbildung 3-5: Durchschnittliche pH-Wert des Honigblaseninhaltes (HB), des Mitteldarminhaltes (VE), der Kotblase (RE) sowie der Hämolymphe (HAE).

Der pH-Wert der Honigblase liegt im Durchschnitt bei $5,21 \pm 0,6$. Im Vergleich zu den weiteren Abschnitten ist bei der Honigblase die höchste Standardabweichung zu finden. Der pH-Wert des Mitteldarms liegt stabil bei $6,50 \pm 0,16$ und unterliegt sehr geringen Schwankungen. Der Inhalt der Kotblase ist im Vergleich wesentlich saurer mit durchschnittlich pH-Wert $5,07 \pm 0,26$. In der Hämolympheflüssigkeit liegt ein pH-Wert von durchschnittlich $6,72 \pm 0,15$ vor.

Ergebnisse

3.1.4 pH-Wert der Abschnitte des Verdauungssystems sowie der Hämolymphe nach Behandlung von Einzelbienen mit Oxalsäure in oraler und dermaler Applikation

Honigblase

Der pH-Wert des Honigblaseninhaltes der Honigbiene unterliegt nach einer Oxalsäurebehandlung leichten Schwankungen (Abbildung 3-6).

Nach *oral*er Applikation verringert sich der pH-Wert über einen Zeitraum von 72 Stunden geringfügig von $4,62 \pm 0,4$ (24 Std.) über $4,64 \pm 0,36$ (48 Std.) zu $4,44 \pm 0,43$ (72 Std.).

Im Gegensatz dazu ist der pH-Wert bei gleichem Futter nach *dermaler* Applikation mit $4,82 \pm 0,37$ nach 24 Stunden bereits etwas höher, steigt im weiteren Verlauf auf $5,02 \pm 0,4$ (48 Std.) an und sinkt nach 72 Stunden wieder auf $4,49 \pm 0,38$ ab. In der Kontrollgruppe wurde nach 24 Stunden ein durchschnittlicher pH-Wert von $4,86 \pm 0,46$ gemessen, der sich innerhalb der Versuchsintervalle von $4,80 \pm 0,44$ (48 Std.) auf $4,99 \pm 0,92$ erhöhte. Die Unterschiede im Vergleich der Testgruppen zur Kontrollgruppe erwiesen sich aber als nicht statistisch signifikant (Mann-Whitney-Rang-Summen-Test, $p \geq 0,05$). Die Standardabweichung ist bei Messungen des Honigblaseninhaltes vergleichsweise hoch.

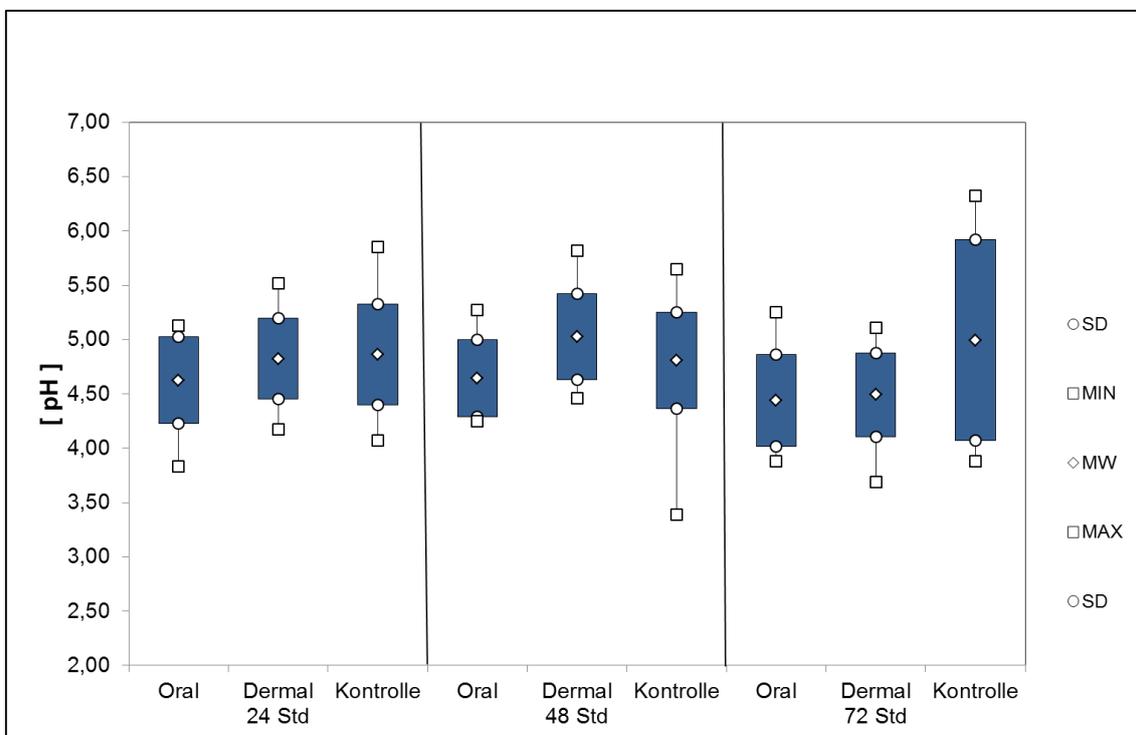


Abbildung 3-6: Durchschnittliche pH-Werte des Honigblaseninhaltes nach oraler und dermaler Behandlung mit Oxalsäure im Vergleich zur Kontrollgruppe in den Versuchsintervallen ($n \leq 52$).

Ergebnisse

Ventriculus

Die Behandlung mit Oxalsäure in oraler und dermaler Applikation führt zu Veränderungen des pH-Wertes im Mitteldarm der Honigbiene (Abbildung 3-7).

Nach *oral*er Applikation verringert sich der pH-Wert von $6,50 \pm 0,24$ (24 Std.) signifikant auf $6,38 \pm 0,32$ (48 Std., Mann-Whitney-Rang-Summen-Test, $p = 0,002$) und steigt im weiteren Verlauf mit $6,59 \pm 0,17$ (72 Std.) wieder an. Im Vergleich zum Standard ist nach 24 Stunden kein Abfall zu verzeichnen.

Innerhalb des ersten Versuchsintervalls (24 Std.) scheint die *dermale* Behandlung mit Oxalsäure keinen Einfluss auf den pH-Wert zu nehmen, zum Zeitpunkt 24 Stunden liegt der pH-Wert bei $6,52 \pm 0,17$. 48 Stunden nach Behandlung fällt der pH-Wert auf $6,40 \pm 0,21$ und unterscheidet sich signifikant von der Kontrollgruppe (t-Test, $p = 0,002$). Nach 72 Stunden erreicht der pH-Wert $6,48 \pm 0,14$, der sich ebenfalls signifikant vom korrespondierenden pH-Wert der Kontrollgruppe mit $6,55 \pm 0,16$ unterscheidet (t-Test, $p = 0,028$). Im Versuchsverlauf bleiben die pH-Werte der Kontrollgruppe auf einem stabilen Niveau: $6,55 \pm 0,2$ (24 Std.) und $6,55 \pm 0,21$ (48 Std.).

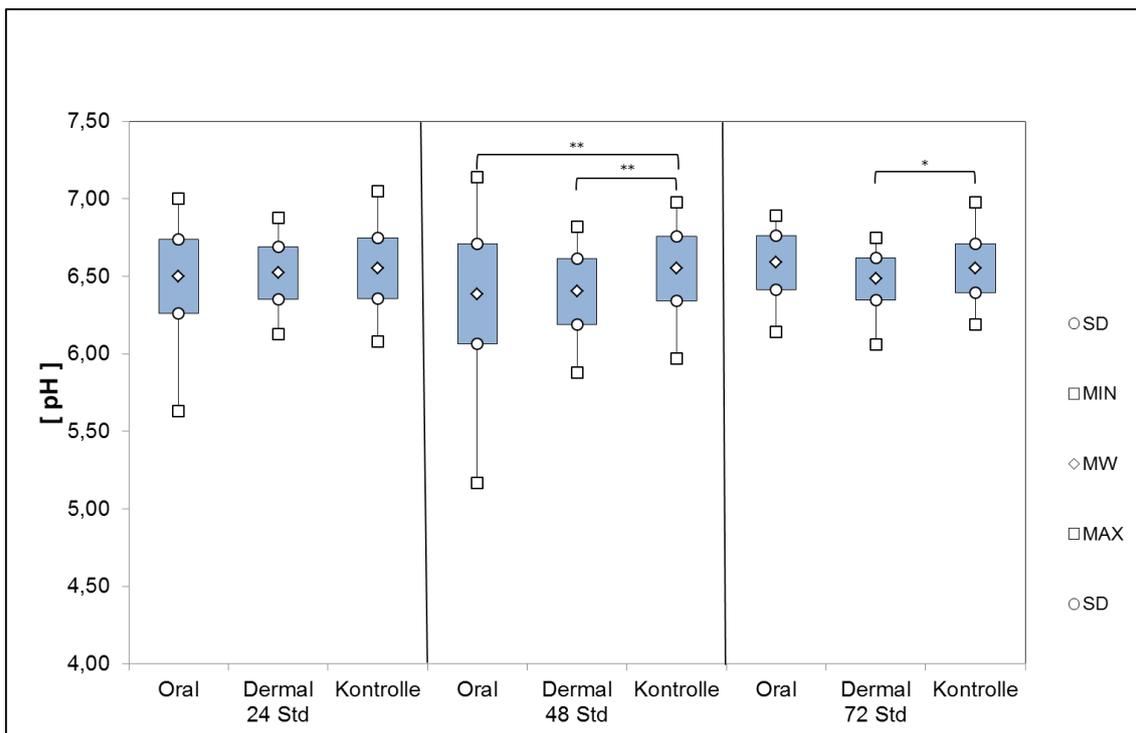


Abbildung 3-7: Durchschnittliche pH-Wert des Mitteldarminhaltes nach oraler und dermaler Behandlung mit Oxalsäure im Vergleich zur Kontrollgruppe in den Versuchsintervallen ($n \leq 68$).

Ergebnisse

Rectum

Die Behandlung mit Oxalsäure in oraler und dermaler Applikation führt zu Veränderungen des pH-Wertes im Enddarm der Honigbiene (Abbildung 3-8).

Nach *oral*er Applikation verringert sich der pH-Wert von $4,98 \pm 0,27$ (24 Std.) signifikant auf $4,77 \pm 0,18$ nach 48 Stunden (t - Test, $p < 0,001$), steigt im weiteren Verlauf wieder leicht an auf $4,83 \pm 0,16$ (72 Std.) und bleibt damit signifikant verschieden zur Kontrollgruppe (t-Test, $p = 0,003$).

Die *dermale* Behandlung mit Oxalsäure hat innerhalb der ersten zwei Versuchsintervalle keinen Einfluss auf den Enddarminhalt, nach 24 Stunden liegt der pH-Wert bei $5,09 \pm 0,16$ und steigt auf $5,11 \pm 0,18$ (48 Std.). Nach 72 Stunden erreicht der pH-Wert $5,10 \pm 0,17$, der sich signifikant vom korrespondierenden pH-Wert der Kontrollgruppe mit $4,99 \pm 0,24$ unterscheidet (t-Test, $p = 0,016$). Während der ersten zwei Versuchsintervalle liegen die pH-Werte der Kontrollgruppe bei $5,05 \pm 0,31$ für 24 Stunden und $5,05 \pm 0,24$ für 48 Stunden.

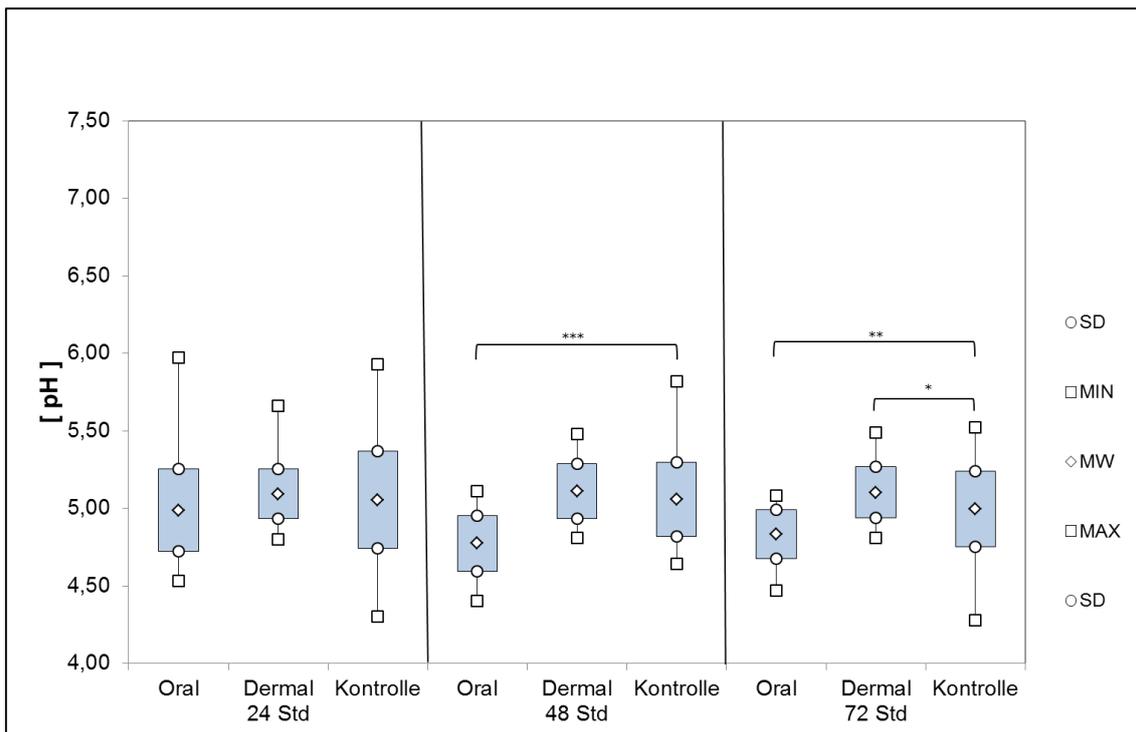


Abbildung 3-8: Durchschnittliche pH-Wert des Enddarminhaltes nach oraler und dermaler Behandlung mit Oxalsäure im Vergleich zur Kontrollgruppe in den Versuchsintervallen ($n \leq 68$).

Ergebnisse

Hämolymphe

Die Behandlung von Einzelbienen mit Oxalsäure führt zu Veränderungen im pH-Wert der Hämolymphe (Abbildung 3-9).

Bereits 24 Stunden nach *oral* Applikation ist der pH-Wert mit $6,72 \pm 0,31$ im Vergleich zur Kontrollgruppe (pH-Wert $6,98 \pm 0,17$) signifikant verringert (Mann-Whitney-Rang-Summen-Test, $p = 0,011$). Im weiteren Verlauf steigt der pH-Wert nach 48 Stunden auf $6,83 \pm 0,22$ und $6,97 \pm 0,27$ nach 72 Stunden an.

In den ersten Versuchsintervallen ergeben sich für die *dermale* Applikation keine signifikanten Unterschiede, die pH-Werte liegen mit $7,00 \pm 0,12$ (24 Std.) und $7,00 \pm 0,08$ (48 Std.) auf dem Niveau der Kontrollgruppen ($6,98 \pm 0,17$ nach 24 Std. und $6,96 \pm 0,26$ nach 48 Std.). Der pH-Wert der Hämolymphe ist 72 Stunden nach Applikation der Säure mit $6,88 \pm 0,15$ im Vergleich zur korrespondierenden Kontrollgruppe (pH-Wert $7,17 \pm 0,21$) signifikant verringert (t-Test, $p = 0,006$).

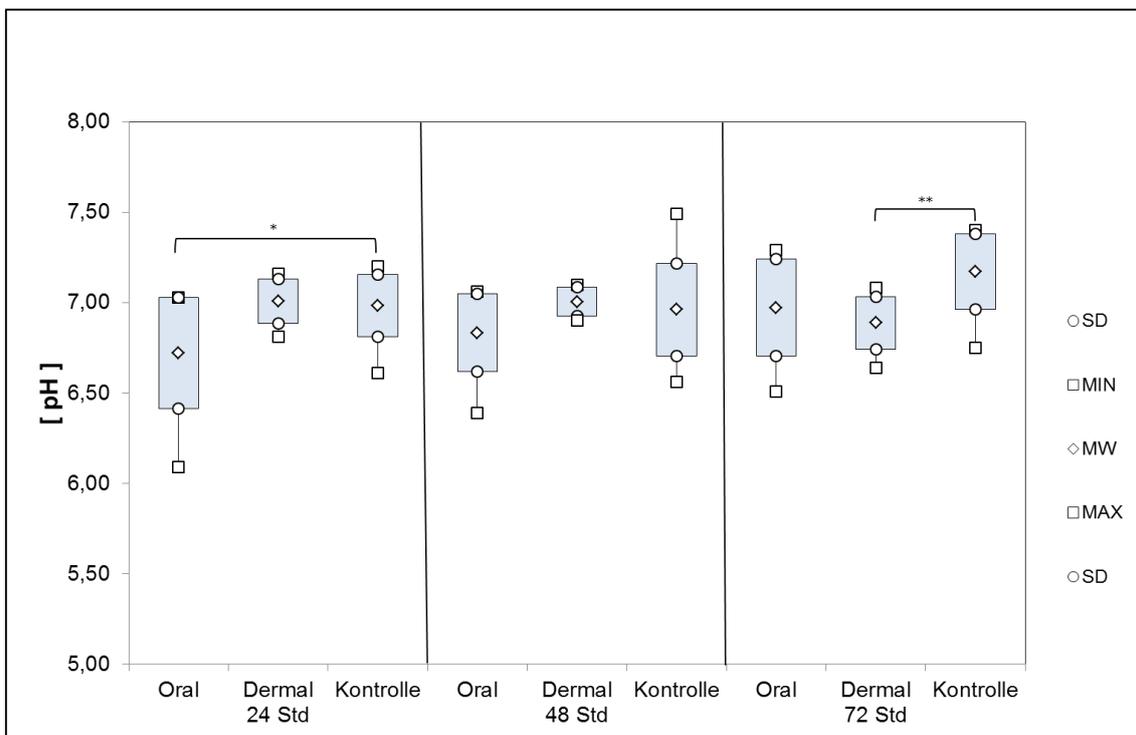


Abbildung 3-9: Durchschnittliche pH-Wert der Hämolymphe nach oraler und dermaler Behandlung mit Oxalsäure im Vergleich zur Kontrollgruppe in den Versuchsintervallen ($n \leq 24$).

3.1.5 pH-Werte der Abschnitte des Verdauungssystems sowie der Hämolymphe nach Behandlung von Einzelbienen mit Betasäuren in oraler und dermaler Applikation

Honigblase

Der pH-Wert des Honigblaseninhaltes liegt nach einer Betasäurenbehandlung in allen Testgruppen über dem pH-Wert der Kontrollen (Abbildung 3-10).

Nach *oral*er Applikation verändert sich der pH-Wert über 72 Stunden geringfügig von $5,10 \pm 0,47$ (24 Std.) über $5,14 \pm 0,49$ (48 Std.) zu $5,31 \pm 0,41$ (72 Std.), und ist im zweiten Versuchsintervall signifikant zur Kontrollgruppe ($4,80 \pm 0,44$) erhöht (t-Test, $p = 0,006$).

Bei *dermaler* Applikation liegt der pH-Wert nach 24 Stunden bei $5,04 \pm 0,42$, nach 48 Stunden ist der pH-Wert weiter erhöht (pH-Wert $5,06 \pm 0,54$), es lässt sich ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ($4,80 \pm 0,44$) zeigen (t-Test, $p = 0,03$). Im letzten Versuchsintervall steigt der pH-Wert erheblich auf $5,48 \pm 0,42$ an. Der Unterschied zur Kontrollgruppe ($4,99 \pm 0,92$) wird aufgrund der hohen Varianz nicht signifikant.

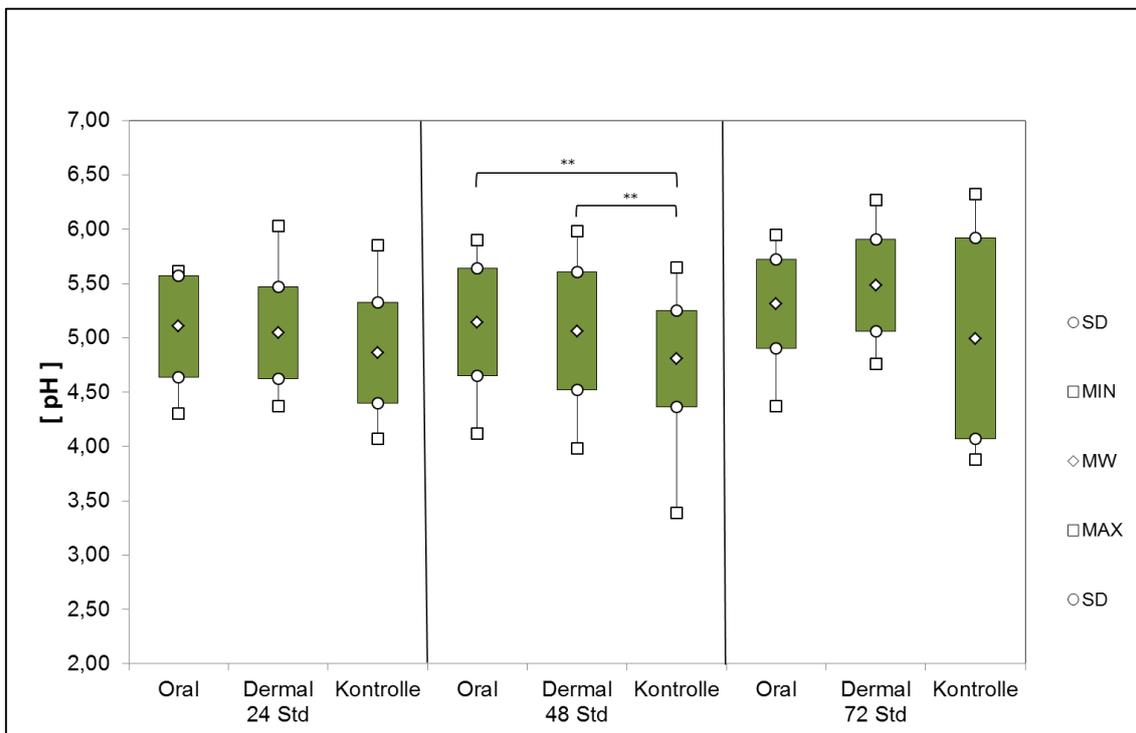


Abbildung 3-10: Durchschnittliche pH-Wert der Honigblaseninhaltes nach oraler und dermaler Behandlung mit Betasäuren im Vergleich zur Kontrollgruppe in den Versuchsintervallen ($n \leq 52$).

Ergebnisse

Ventriculus

Die gemessenen pH-Werte des Mitteldarminhaltes sind im Vergleich zu den Kontrollen zu jedem Versuchszeitpunkt leicht erhöht (Abbildung 3-11).

24 Stunden nach der *oralen* Behandlung unterscheidet sich der pH-Wert mit $6,66 \pm 0,23$ signifikant vom Kontrollwert ($6,55 \pm 0,20$, t-Test, $p = 0,015$). Im weiteren Verlauf sinkt der pH-Wert auf ein Niveau von $6,55 \pm 0,19$ (48 Std.) und $6,63 \pm 0,22$ (72 Std.). Diese Werte unterscheiden sich nicht signifikant von den Kontrollen mit $6,55 \pm 0,2$ nach 48 Stunden und $6,55 \pm 0,16$ nach 72 Stunden.

Nach *dermaler* Applikation sind die pH-Werte im Vergleich zu den Kontrollen leicht erhöht: $6,63 \pm 0,23$ (24 Std.), $6,57 \pm 0,18$ (48 Std.) und $6,60 \pm 0,24$ (72 Std.).

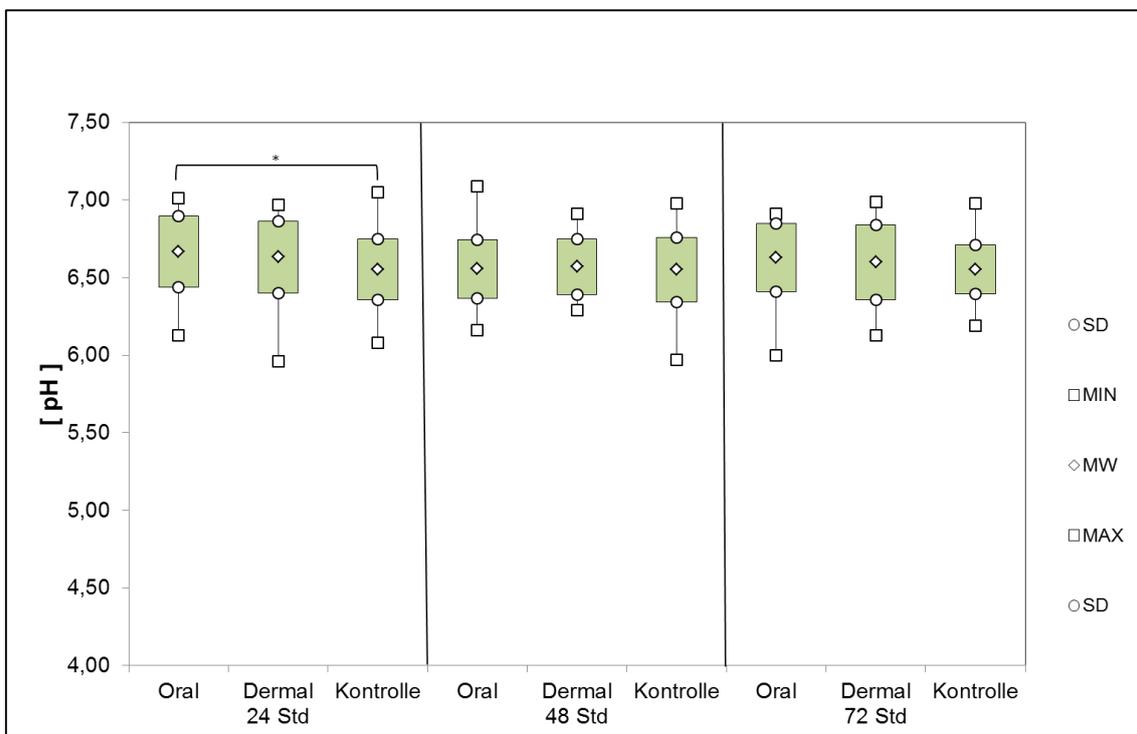


Abbildung 3-11: Durchschnittliche pH-Wert des Mitteldarminhaltes nach oraler und dermaler Behandlung mit Betasäuren im Vergleich zur Kontrollgruppe in den Versuchsintervallen ($n \leq 68$).

Ergebnisse

Rectum

Über den Versuchszeitraum von 72 Stunden sind die durchschnittlichen pH-Werte des Enddarminhalt der Testgruppen im Vergleich zu den Kontrollen erhöht (Abbildung 3-12).

In den ersten 24 Stunden nach *oral*er Applikation ist der pH-Wert mit $5,41 \pm 0,42$ im Vergleich zur Kontrollgruppe ($5,05 \pm 0,31$) signifikant höher (Mann-Whitney-Rang-Summen-Test, $p < 0,001$). Nach 48 Stunden ($5,15 \pm 0,41$) und 72 Stunden ($5,01 \pm 0,38$) liegen die Werte weiterhin über dem Niveau der Kontrollgruppen mit $5,05 \pm 0,24$ (48 Std.) und $4,99 \pm 0,24$ (72 Std.).

Auch die *dermale* Applikation resultiert nach 24 Stunden mit $5,30 \pm 0,39$ in einem signifikanten pH-Wert Unterschied (Mann-Whitney-Rang-Summen-Test, $p = 0,006$). Im weiteren Verlauf sinkt der pH-Wert leicht ab ($5,17 \pm 0,31$ nach 48 und $5,04 \pm 0,32$ nach 72 Stunden), bleibt aber über dem Niveau der Kontrollen.

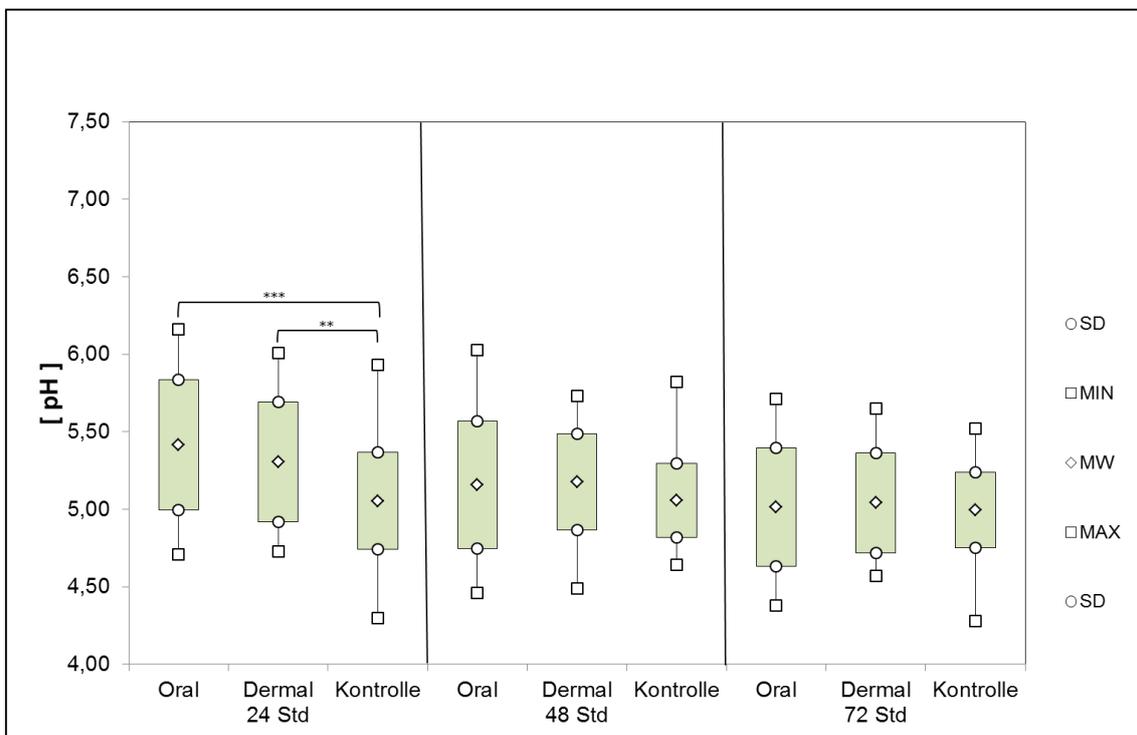


Abbildung 3-12: Durchschnittliche pH-Wert des Enddarminhalt nach oraler und dermaler Behandlung mit Betasäuren im Vergleich zur Kontrollgruppe in den Versuchsintervallen ($n \leq 68$).

Ergebnisse

Hämolymphe

Die Behandlung von Einzelbienen mit Betasäuren zeigt Veränderungen im pH-Wert der Hämolymphe (Abbildung 3-13).

Bereits 24 Stunden nach *oral* Applikation ist der pH-Wert mit $6,81 \pm 0,24$ im Vergleich zur Kontrollgruppe (pH-Wert $6,98 \pm 0,17$) signifikant verringert (t-Test, $p = 0,036$). Im weiteren Verlauf steigt der pH-Wert nach 48 Stunden auf $7,14 \pm 0,22$ und $6,94 \pm 0,20$ nach 72 Stunden an.

Im ersten Versuchsintervall ergibt sich auch für die *dermale* Applikation ein signifikant verringerter pH-Wert ($6,75 \pm 0,30$) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach 48 Stunden liegt ein pH-Wert von $7,00 \pm 0,08$ vor, dieser liegt auf dem Niveau der Kontrollgruppe ($6,96 \pm 0,26$). Der pH-Wert der Hämolymphe ist 72 Stunden nach Applikation der Betasäuren mit $6,87 \pm 0,12$ im Vergleich zur korrespondierenden Kontrollgruppe (pH-Wert $7,17 \pm 0,21$) signifikant verringert (t-Test, $p = 0,007$).

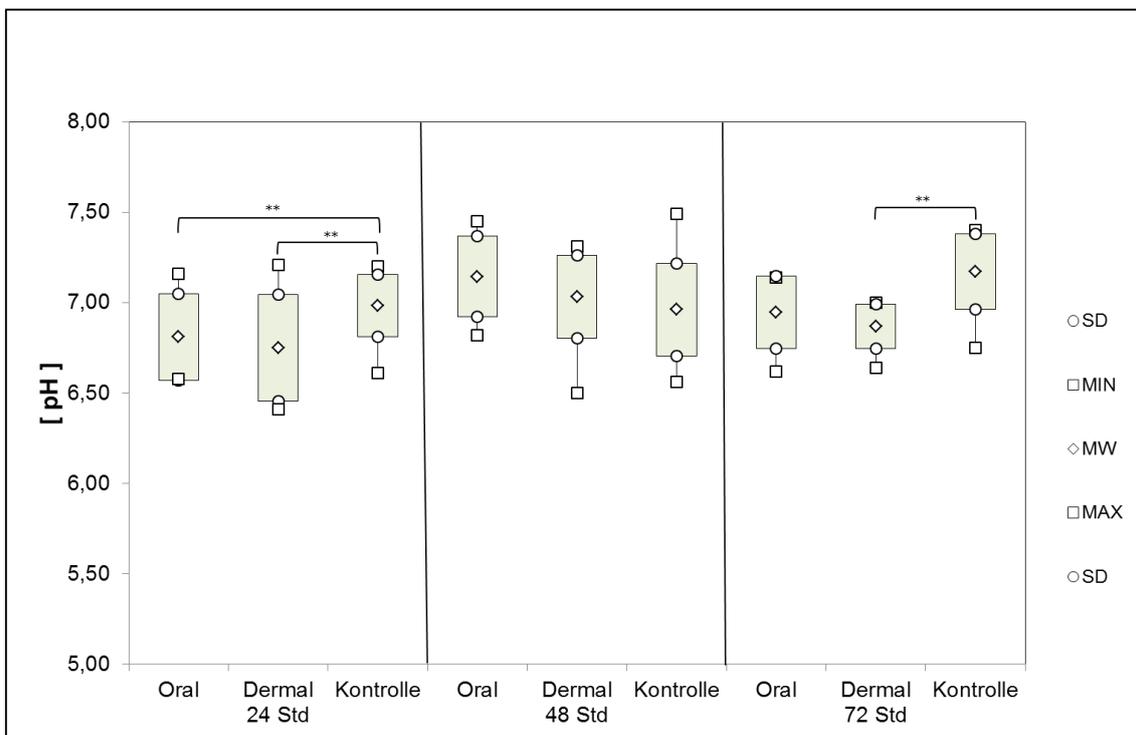


Abbildung 3-13: Durchschnittliche pH-Wert der Hämolymphe nach oraler und dermaler Behandlung mit Betasäuren im Vergleich zur Kontrollgruppe in den Versuchsintervallen ($n \leq 24$).

Ergebnisse

Vergleich: Kontrollgruppe gegen den natürlichen physiologischen pH-Wert der Abschnitte des Verdauungssystems und Hämolymphe adulter Honigbienen

Die Applikation von Oxalsäure bzw. Betasäuren verändert den Säuregrad einzelner Abschnitte des Verdauungssystems und der Hämolymphe behandelter Bienen. Durch den Vergleich der jeweiligen Kontrollgruppe (Bienen im Labor) mit dem natürlichen pH-Wert des Standards (Bienen aus dem Volk, Tabelle 3-1) kann ein Einfluss der Versuchsbedingungen gezeigt werden.

Tabelle 3-1: Vergleich des durchschnittlichen pH-Wertes der Kontrollgruppen mit dem natürlichen pH-Wert

Darmabschnitte	Std. nach Beh.	Mittelwert \pm SD (Min - Max)		t-Test	MW Rang Summen Test
		Kontrollgruppen	Standard	P	p
Honigblase	24	4,86 \pm 0,46 (4,07 - 5,85)		0,01	-
	48	4,81 \pm 0,44 (3,39 - 5,65)	5,21 \pm 0,6 (4,00 - 6,28)	-	0,002
	72	4,99 \pm 0,92 (3,88 - 6,32)		-	0,555
Ventriculus	24	6,55 \pm 0,20 (6,08 - 7,05)		0,159	-
	48	6,55 \pm 0,21 (5,97 - 6,98)	6,50 \pm 0,16 (6,09 - 6,81)	-	0,133
	72	6,55 \pm 0,16 (6,19 - 6,98)		0,102	-
Rectum	24	5,08 \pm 0,36 (4,30 - 6,50)		-	0,53
	48	5,06 \pm 0,24 (4,64 - 5,82)	5,07 \pm 0,26 (4,68 - 5,68)	-	0,950
	72	4,99 \pm 0,24 (4,28 - 5,52)		0,133	-
Hämolymphe	24	6,98 \pm 0,17 (6,61 - 7,2)		<0,001	-
	48	6,96 \pm 0,26 (6,56 - 7,49)	6,72 \pm 0,15 (6,45 - 7,10)	-	0,001
	72	7,17 \pm 0,21 (6,75 - 7,4)		<0,001	-

Der pH-Wert des Honigblaseninhaltes der Kontrollgruppe ist im Versuchsverlauf nach 24 und 48 Stunden im Vergleich zum Standard signifikant verringert. Bei Betrachtung des Mitteldarms und Enddarms sind Unterschiede zu verzeichnen, die sich aber nicht statistisch auswirken. Der pH-Wert der Hämolymphe in den Kontrollen ist in allen drei Versuchsintervallen signifikant höher als der natürliche pH-Wert des Standards.

Ergebnisse

3.1.6 Erweiterter Standard für Ventriculus und Rectum

Für Mitteldarm und Enddarm lassen sich die pH-Werte aus Standard und Kontrollgruppen zu einem erweiterten Standard mit höherem Stichprobenumfang zusammenfassen (Abbildung 3-14).

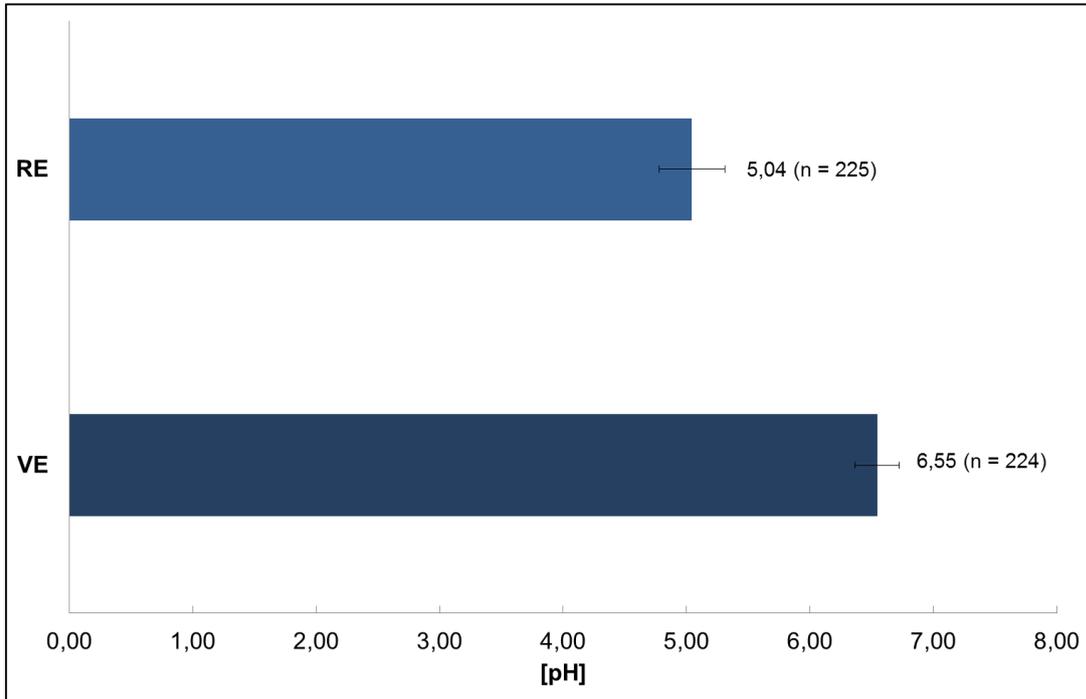


Abbildung 3-14: Durchschnittliche pH-Wert des Mitteldarminhaltes (VE) und der Kotblase (RE) als erweiterter Standard

Der erweiterte Standard pH-Wert des Mitteldarms liegt bei $6,55 \pm 0,18$ (min. 6,08; max. 7,05) und unterliegt einer geringen Standardabweichung. Der Inhalt der Kotblase ist mit durchschnittlich pH-Wert $5,04 \pm 0,27$ (min. 4,28; max. 5,93) sehr sauer.

TEIL 2

3.2 Einfluss der Wirkstoffe Oxalsäure und Betasäuren auf *Nosema* spp.

3.2.1 Künstliche Infektion von Arbeiterinnen mit *Nosema* spp. unter Laborbedingungen

Infektionsgrad

In der Versuchsreihe zum Infektionsgrad von Einzelbienen konnte zu keinem der Versuchszeitpunkte ein Befall mit *Nosema* Sporen festgestellt werden (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: Infektionsgrad nach künstlicher Infektion über den Versuchszeitraum von 26 Tagen

Anteil <i>Nosema</i> positiver Bienen [p.i.]						
Gruppe 3	n	3 Tage	8 Tage	13 Tage	19 Tage	26 Tage
K 4	30	0	0	0	-	-
K 5	30	-	-	-	0	0

Überlebensrate

Die Überlebensrate von Arbeiterinnen unter Laborbedingungen lag bei Jungbienen nach 26 Tagen bei 80% (Kontrollgruppe) und 85% (Testgruppe; Abbildung 3-15). Es konnte kein signifikanter Unterschied im Kurvenverlauf gezeigt werden (Kaplan-Meier-Survival-Analyse: Grehan-Breslow, $p = 0,908$).

Ergebnisse

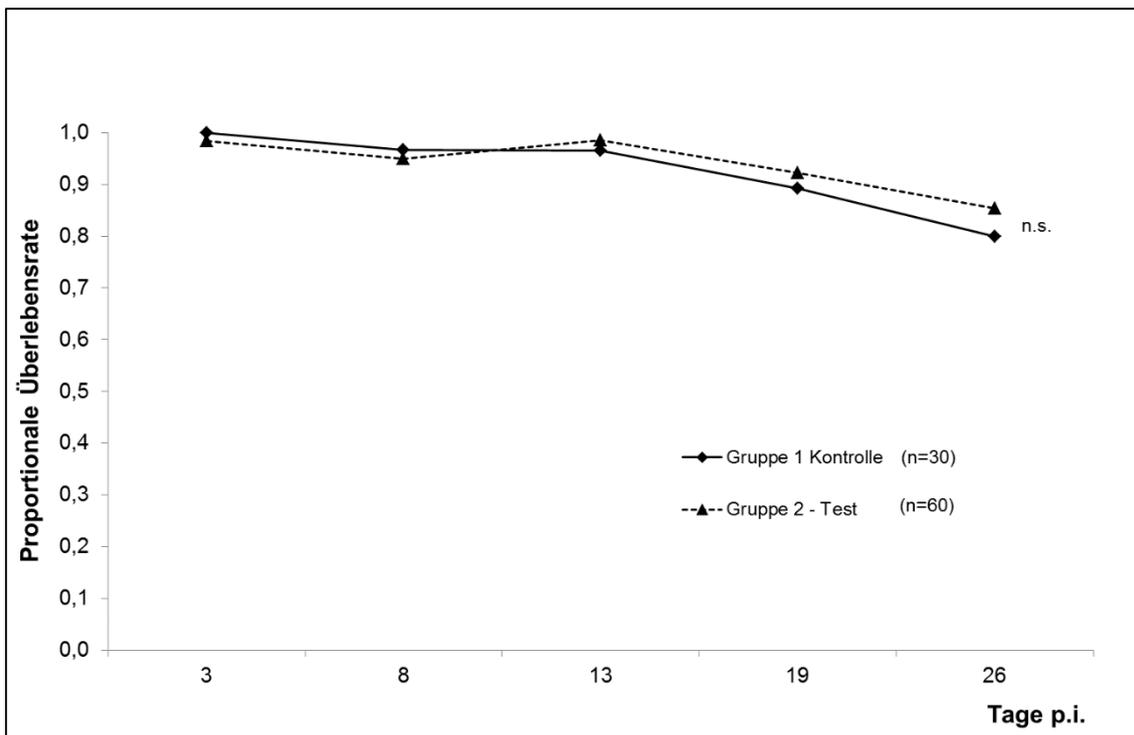


Abbildung 3-15: Überlebenskurve nicht-infizierter und infizierter Jungbienen über den Versuchszeitraum von 26 Tagen.

3.2.2 Semi-Feldversuch: Vergleich der Befallsentwicklung von *Nosema* spp. nach Behandlung von Einzelbienen mit den Wirkstoffen Oxalsäure und Betasäuren

Oxalsäure

Oxalsäure behandelte Bienen zeigten 3 Tage nach Applikation keinen Befall mit *Nosema* spp. im Mitteldarm (Abbildung 3 - 16), obwohl vor der Behandlung der Anteil infizierter Bienen im Volk bei 50% lag.

Am 8. Tag nach der Behandlung wurde eine Sporenmenge von durchschnittlich $435.714,29 \pm 1.152.791,64$ Sporen/Biene gemessen. Dieser Wert war signifikant geringer als die Sporenmenge der Kontrollgruppe mit $5.615.000,00 \pm 6.158.375,06$ Sporen/Biene (Mann-Whitney-Rang-Summen-Test, $p = 0,035$). Die Sporenmenge am 16. Tag nach der Behandlung war im Vergleich zu den vorherigen Versuchstagen mit $9.140.000,00 \pm 5.257.304,44$ Sporen/Biene stark erhöht, aber nicht signifikant verschieden zur Kontrollgruppe (t-Test, $p = 0,383$).

Am 3. Tag nach der Oxalsäurebehandlung sank der Anteil infizierter Bienen signifikant auf 30% im Vergleich zur Kontrollgruppe (90%; z-Test, $p = 0,022$). Ab dem 8. Versuchstag waren 100% der Versuchstiere mit *Nosema* Sporen infiziert (Tabelle 3-3).

Ergebnisse

Tabelle 3-3: Anteil positiver Bienenproben (Mitteldarm und Enddarm) zu den Versuchszeitpunkten unter den Behandlungen mit Oxalsäure und Betasäuren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Unterschiedliche Buchstaben beschreiben einen signifikanten Unterschied im proportionalen Anteil infizierter Bienen am Versuchstag (z-Test, $p \leq 0,05$).

Anteil infizierter Bienen [%]							
Gruppe	vor Behandlung	Tage nach Behandlung					
		3	8	13	16	26	35
Oxalsäure		30a	100a	100a	100a	100a	-
Betasäuren	50	70ab	60a	100a	100a	100a	100a
Kontrollen		90b	70a	100a	90a	100a	100a

Betasäuren

Betasäuren behandelte Bienen zeigten 3 Tage nach der Applikation einen schwachen Befall mit *Nosema* spp. (Abbildung 3 - 16). Die durchschnittliche Sporenmenge lag bei $1.140.000 \pm 1.561.409,62$ Sporen/Biene und war trotz nominaler Unterschiede aufgrund der hohen Varianz nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe mit $14.770.000 \pm 27.157.747,51$ Sporen/Biene (Mann-Whitney-Rang-Summen-Test, $p = 0,222$). Am 8. Tag nach der Behandlung konnte eine reduzierte Sporenmenge von $370.000 \pm 1.170.042,73$ Sporen/Biene ermittelt werden. Dieser Wert lag signifikant unter dem der Kontrollgruppe (Mann-Whitney-Rang-Summen-Test, $p = 0,018$). Die Sporenmenge am 16. Tag nach der Behandlung war mit $29.237.500 \pm 19.732.223,01$ Sporen/Biene sehr stark erhöht und signifikant verschieden zur Kontrollgruppe mit $6.230.000 \pm 4.707.653,34$ Sporen/Biene (t-Test, $p = 0,038$).

Am 3. Tag nach der Betasäurenbehandlung wurde ein Infektionsgrad von 70% infizierter Bienen ermittelt. Nach 8 Tagen reduzierte sich der Anteil auf 60%, allerdings nicht signifikant zur Kontrollgruppe (70%; z-Test, $p = 1,000$). Im weiteren Verlauf waren alle Individuen der Gruppe mit *Nosema*sporen infiziert (Tabelle 3-3).

Ergebnisse

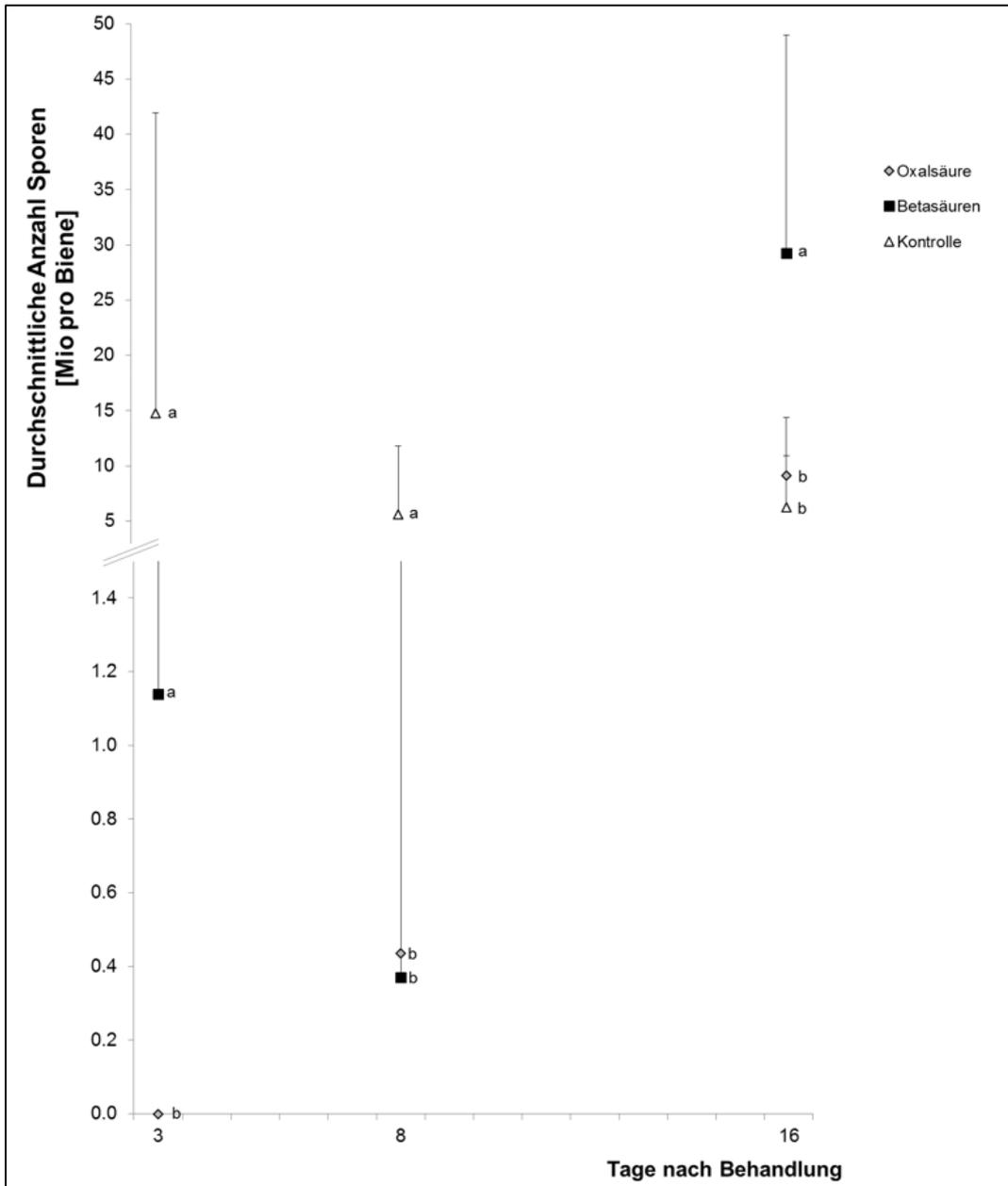


Abbildung 3-16: Durchschnittlichen Sporenmenge (\pm SD) im Mitteldarm behandelter Bienen 3, 8 und 16 Tage nach der Behandlung. Unterschiedliche Buchstaben beschreiben einen signifikanten Unterschied (t-Test, bei Ungleichheit der Varianzen Mann Whitney Rang Summen Test, $p \leq 0,05$; $n \leq 10$ pro Gruppe und Versuchstag).

Ergebnisse

Einfluss des pH-Wertes auf den Befallsgrad des Mitteldarmes

Eine negative Korrelation zwischen dem Befallsgrad der Bienen und dem pH-Wert des Mitteldarms deutet sich am 16. Tag nach der Behandlung in der Testgruppe Betasäuren mit einem Korrelationskoeffizienten von $R^2 = 0,7798$ an. Schwache bis mittlere Befallsgrade in der Oxalsäuregruppe konzentrieren sich im pH-Wert Bereich von 5,7 bis 6,4. Die Kontrollgruppe verzeichnet die geringste Streuung, wobei fast alle Werte unter dem physiologischen pH-Wert des Mitteldarms liegen (Abbildung 3-17).

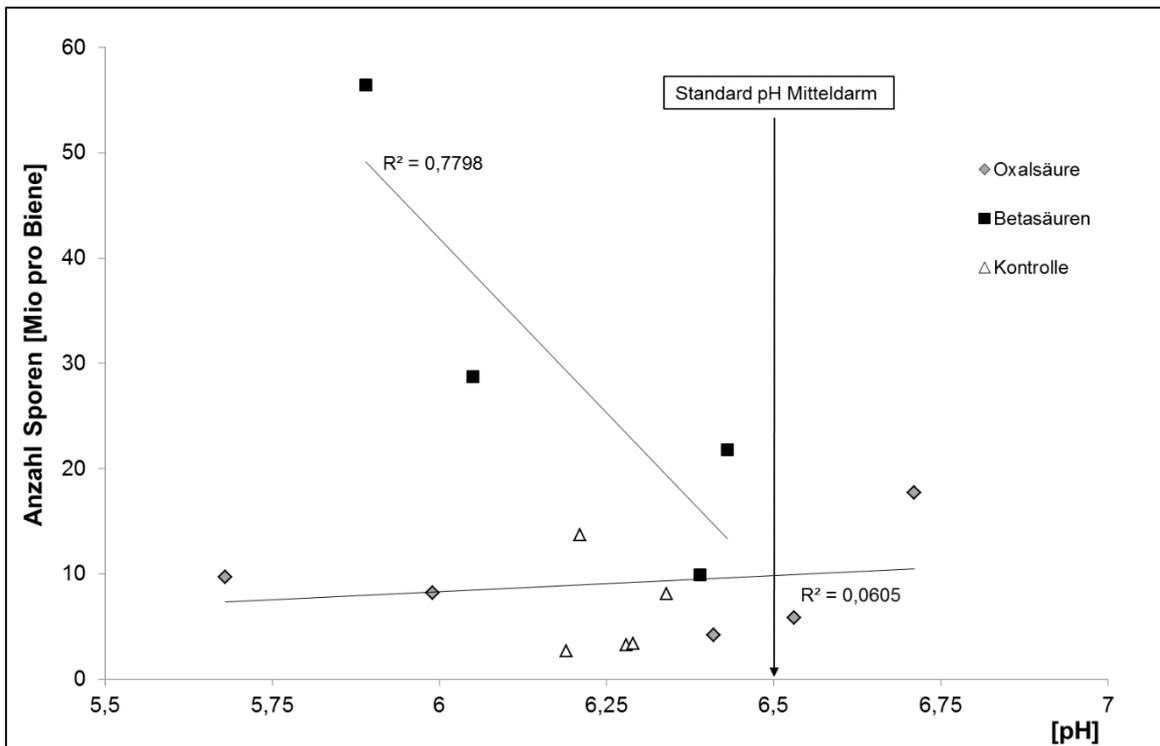


Abbildung 3-17: Sporenbelastung in Abhängigkeit des pH-Wertes des Mitteldarms 16 Tage nach der Behandlung mit Oxalsäure bzw. Betasäuren im Vergleich zu unbehandelten Kontrollbienen

Entwicklung des pH-Wertes über den Versuchszeitraum

Im Versuchszeitraum lag der durchschnittliche pH-Wert des Mitteldarms in der Oxalsäure behandelten Testgruppe zwischen 6,05 ($\pm 0,29$) an Tag 3 und 6,26 ($\pm 0,42$) an Tag 16. Die durchschnittlichen pH-Werte der Betasäuren behandelten Bienen variierten zwischen 6,04 ($\pm 0,19$; Tag 3) und 6,27 ($\pm 0,14$; Tag 26). In der Kontrollgruppe wurde ein minimaler durchschnittlicher pH-Wert von 5,87 ($\pm 0,39$) an Tag 3 gemessen, der maximale Wert erreichte 6,26 ($\pm 0,06$) am 16. Versuchstag. An Tag 35 waren keine Bienen der Oxalsäuregruppe vorhanden, die pH-Werte der Gruppe Betasäuren sind zu diesem Zeitpunkt etwas niedriger als die pH-Werte der Kontrollgruppe (Tabelle 3-4). Zu keinem der Versuchszeitpunkte wurde ein signifikanter

Ergebnisse

Unterschied in den durchschnittlichen pH-Werten des Mitteldarms in den drei Gruppen ermittelt (t-Test, $p \geq 0,05$).

Der durchschnittliche pH-Wert des Enddarms lag in der Oxalsäuregruppe zwischen 4,64 ($\pm 0,23$) an Tag 16 und 5,48 ($\pm 0,11$) an Tag 13. In der Gruppe der mit Betasäuren behandelten Bienen wurden pH-Werte zwischen 4,83 ($\pm 0,20$) am 3.Tag und 5,71 ($\pm 0,50$) am 16. Tag ermittelt. In der Kontrollgruppe lagen die pH-Werte zwischen 4,81 ($\pm 0,29$; 3. Tag) und 5,21 ($\pm 0,36$; 13. Tag). Am 16. Tag nach der Behandlung unterscheiden sich die pH-Werte der mit Oxalsäure behandelten Gruppe signifikant zur Gruppe Betasäuren (t-Test, $p = 0,02$) sowie zur Kontrollgruppe (t-Test, $p = 0,03$). An Tag 35 waren keine Bienen der Oxalsäuregruppe vorhanden, die pH-Werte der Gruppe Betasäuren sind zu diesem signifikant niedriger als die pH-Werte der Kontrollgruppe (t-Test, $p = 0,03$; Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4: Durchschnittliche pH-Werte des Mitteldarms und Enddarms von Nosema positiven Einzelbienen im Versuchszeitraum bis 35 Tage nach der Behandlung mit Oxalsäure bzw. Betasäuren. Unterschiedliche kleine Buchstaben beschreiben einen signifikanten Unterschied im Vergleich der durchschnittlichen pH-Werte zu den Versuchszeitpunkten (t-Test, $p \leq 0,05$).

Gruppe	Mitteldarm pH-Wert (Mittelwert \pm SD, $n \leq 5$)					Enddarm pH-Wert (Mittelwert \pm SD, $n \leq 5$)				
	Tage nach Behandlung					Tage nach Behandlung				
	3	13	16	26	35	3	13	16	26	35
Oxalsäure	6,05 (0,29)	6,16 (0,06)	6,26 (0,42)	6,06 (0,20)	-	4,91 (0,28)	5,48 (0,11)	4,64 ^a (0,23)	5,10 (0,54)	-
Betasäuren	6,04 (0,19)	6,11 (0,18)	6,19 (0,26)	6,27 (0,14)	6,08 (0,24)	4,83 (0,20)	5,24 (0,17)	5,71 ^b (0,50)	5,51 (0,51)	4,83 ^a (0,23)
Kontrollen	5,87 (0,39)	5,87 (0,66)	6,26 (0,06)	6,07 (0,30)	6,16 (0,11)	4,81 (0,29)	5,24 (0,36)	5,21 ^b (0,30)	5,21 (0,63)	5,27 ^b (0,30)

3.2.3 Feldversuch: Vergleich der Befallsentwicklung von *Nosema* spp. nach Behandlung von Bienenvölkern mit Oxuvar® und HopGuard®

Die Infektion der Ableger mit *Nosema* Sporen war in 2 Testvölkern und der positiven Kontrolle erfolgreich (Tabelle 3-5). Die Negativkontrolle blieb über den Versuchszeitraum erwartungsgemäß ohne Befall. Durch den Vergleich der *Nosema* positiven Proben und der anschließenden Auszählung mithilfe der Zählkammer lassen sich die qualitativen Bestimmungen auch quantitativ einteilen: ein schwacher Befall zählt eine Sporenmenge $\leq 10.000.000$ Sporen/Biene; der mittlere Befall resultiert in

Ergebnisse

einer Sporenmenge zwischen 10.000.000 bis 55.000.000 Sporen/Biene; Bienen mit starkem Befall haben eine Belastung von $\geq 55.000.000$ Sporen (Tabelle 9-15).

Über den Versuchszeitraum zeigte Ableger 10 (negative Kontrolle) keine Infektion, hingegen wurde im Ableger 23a (positive Kontrolle) am 12. und 18. Versuchstag eine Infektion mit anteilig 15 bzw. 10% der beprobten Bienen festgestellt (Tabelle 3-5).

Oxuvor® und HopGuard®

Für die Testgruppe Oxuvor® (Ableger 23) lag am 25. Tag nach der Behandlung ein mittlerer Befall in 5% der Bienenproben vor. An den vorherigen Versuchszeitpunkten konnte in keiner Bienenprobe ein Befall ermittelt werden.

Tabelle 3-5: Prozentualer Anteil erkrankter Bienen in den Versuchsvölkern

Ableger Nr.	Gruppe	Anteil infizierter Bienen [%]					
		vor Inoculation	vor Beh. OX/HG	6 Tage	12 Tage	18 Tage	25 Tage
				Nach Behandlung			
1.1	Test/HG	25	15	10	20	10	45
3.1	Test/HG	0	0	0	0	0	0
23	Test/OX	0	0	0	0	0	5
10	Kontrolle/neg	0	0	0	0	0	0
23a	Kontrolle/pos.	0	0	0	15	10	0

Ableger 1.1 der Testgruppe HopGuard® zeigte als einziges Volk Veränderungen im Befallsgrad nach der Behandlung. Bei Ableger 3.1 wurde zu keinem der Probenahmen ein Befall mit *Nosema* spp. diagnostiziert.

Volk 1.1 startete mit einem schwachen bis mittleren Befallsgrad (Abbildung 3-18) von durchschnittlich $24.730.000 \pm 11.027.726,42$ Sporen/Biene; am Tag der Behandlung lag dieser Wert bei $10.716.666,67 \pm 575.181,13$ Sporen/Biene und einem Anteil von 15% infizierter Bienen. Am 6. Tag nach der Behandlung mit HopGuard® ist das Verhältnis von durchschnittlicher Sporenmenge ($15.650.000 \pm 14.212.846,30$ Sporen/Biene) und dem Anteil infizierter Bienen (10%) ausgeglichen und es besteht kein signifikanter Unterschied zur Sporenbelastung des Behandlungstages (Mann-Whitney-Rang-Summen-Test, $p = 1,000$). An den folgenden Versuchstagen erhöhte sich die durchschnittliche Menge auf $59.700.000 \pm 25.803.423,55$ bzw. $61.000.000 \pm 3.181.980,52$ Sporen/Biene (12. und 18. Tag nach Behandlung) bei abnehmender

Ergebnisse

Anzahl infizierter Individuen (20% und 10%). Am 25. Tag nach der Behandlung reduzierte sich der durchschnittliche Befallsgrad signifikant auf $14.005.555,56 \pm 9.622.416,68$ Sporen/Biene (t-Test, $p \leq 0,001$), wobei der Anteil infizierter Arbeiterinnen auf 45% stieg.

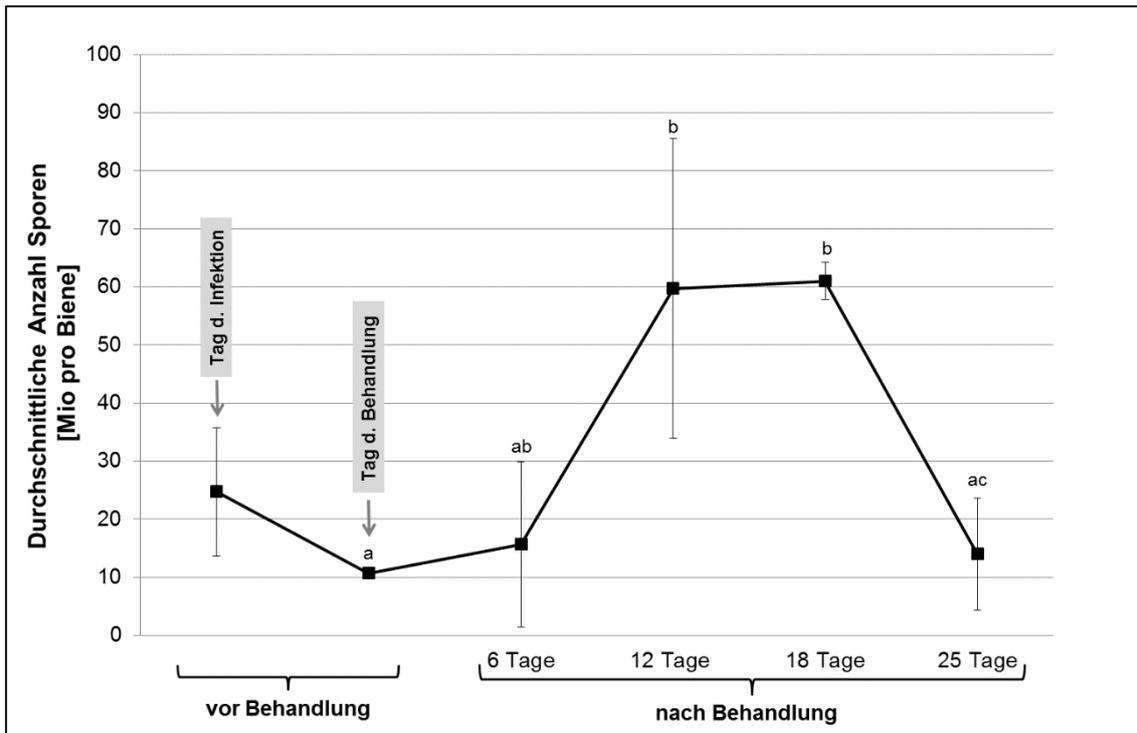


Abbildung 3-18: Vergleich der durchschnittlichen Sporenbelastung (\pm SD) mit dem prozentualen Anteil infizierter Bienen für Ableger Nr. 1.1 nach Behandlung mit HopGuard®. Unterschiedliche kleine Buchstaben beschreiben einen signifikanten Unterschied im Vergleich der durchschnittlichen Sporenmenge an den Versuchszeitpunkten (t-Test, $p \leq 0,05$).

4. DISKUSSION

TEIL 1

4.1 Einfluss der Wirkstoffe Oxalsäure und Betasäuren auf *A. mellifera*

4.1.1 Verträglichkeit von Oxalsäure nach Behandlung von Einzelbienen in dermalen und oraler Applikation

Die Toxizität von Oxalsäure unterscheidet sich nach dermalen bzw. oraler Applikation stark. Das Verfüttern ist für Bienen sehr viel toxischer als der Kontakt über die Kutikula. Die in der Praxis verwendete 3,5%-ige Oxalsäurelösung entspricht in den hier vorgestellten Versuchen einer Einzeldosis von 175µg Oxalsäure/Biene und wurde nach dermalen Applikation über den Zeitraum von 72 Stunden gut vertragen. Dagegen führte eine Dosis von 100µg Oxalsäure/Biene, oral appliziert, zu sehr hohem Totenfall. Die in der imkerlichen Praxis verwendete dermale Applikationsform des Träufelns wird mit einem Sicherheitsfaktor der 0,5-fachen im Volk applizierten Einzeldosis pro Biene gut vertragen. Oxalsäure wird in Zuckerwasser gelöst und anschließend in Bienenvölker geträufelt. Bienen werden durch Putzen des Körpers oder des Wabenmaterials geringe Mengen der Säure oral aufnehmen. Es ist davon auszugehen, dass diese Mengen unter der hier dargestellten Signifikanzschwelle von 50µg Oxalsäure/Biene nach oraler Applikation liegen. Höher konzentrierte Oxalsäurelösungen oder mehrmalige Behandlungen von Bienenvölkern führen zu starken Bienenverlusten (Rademacher und Harz, 2006). Dabei spielt eine akute Kontaktgiftwirkung wie von Aliano et al. (2006) beschrieben, eine wesentliche Rolle, allerdings wurden die behandelten Bienen vor der Applikation mit CO₂ betäubt und auch Aceton als Lösungsmittel verwendet. Somit ist ein kombinatorischer Effekt nicht auszuschließen.

Gregorc et al. (2004) zeigten klinische Veränderungen an Larven nach einer Sprühapplikation mit Oxalsäure, es kam zum Zelltod bis hin zu Nekrosen. Auch Hatjina und Haristos (2005) haben Brutschädigungen nach Oxalsäurebehandlung beschrieben. In der imkerlichen Praxis ist die Behandlung mit Oxalsäure in Bienenvölkern nur für die brutfreie Periode zugelassen. Dies beruht allerdings weniger auf den toxikologischen Effekten, sondern daran, dass Oxalsäure nicht auf *V. destructor* in verdeckelten Brutzellen wirkt.

Auswirkungen einer Oxalsäurebehandlung wurden von Martin-Hernandez et al. (2007) und Nozal et al. (2003) beschrieben. Es wurde Oxalsäure in Organen und der Hämolymphe nachgewiesen sowie pathologische Veränderungen wie z.B. der Rückbildung des Rectalgewebes, der Malphigischen Gefäße und des Ventriculus beobachtet. Bei den Experimenten von Nanetti et al. (2003a) mit C¹⁴ markierter

Diskussion

Oxalsäure und dermalen Applikation auf der Ebene des Bienenvolkes wurde der markierte Kohlenstoff in abdominalen Strukturen von Einzelbienen detektiert. Daraus kann geschlossen werden, dass die Substanz, wenn auch in geringen Mengen, in die Einzelbiene gelangt.

Veränderungen, die aus einer Oxalsäurebehandlung resultieren und pH-Wert Verschiebungen zur Folge haben, werden unter 4.1.3. diskutiert.

4.1.2 Verträglichkeit von Betasäuren nach Behandlung von Einzelbienen in dermalen und oraler Applikation

Die Ergebnisse der Kästchenversuche haben gezeigt, dass Betasäuren in einer aufsteigenden Dosisreihe nach dermalen Applikation von Bienen gut toleriert werden. Es ergibt sich ein 2-facher Sicherheitsfaktor bei Berücksichtigung der minimalen Dosis (25µg), die benötigt wird, um $\geq 90\%$ Milbensterblichkeit zu erreichen (Rademacher et al., 2015). Die orale Applikation von Betasäuren ist weniger gut verträglich. Bereits 50µg/Biene führte zu erhöhtem Totenfall, der im weiteren Verlauf dosisabhängig anstieg. Bei der Anwendung im Volk kommen die Bienen über Belaufen von Streifen mit dem Wirkstoff in Kontakt. Die orale Aufnahme ist höchstwahrscheinlich gering, lässt sich aber durch das Zerfressen der Streifen nicht ausschließen. Es wurden bis zu 16µg Betasäuren auf Einzelbienen nach einer Behandlung im Bienenvolk nachgewiesen (Beddie 2011, pers. Mitteilung).

Rademacher et al. (2015) konnten auch zeigen, dass Arbeiterinnen bis zu 150µg Betasäuren gut vertragen, wenn die Bienen nach der Behandlung Kontakt mit unbehandelten Individuen haben. Behandelte Bienen können hohe Dosierungen vertragen, angenommen sie verteilen die Substanz in kurzer Zeit und reduzieren somit sukzessiv die Dosis. Dieser Verteilungsmechanismus wurde mithilfe von Computertomographie behandelter Bienenvölker dargestellt (Rademacher et al., 2012).

4.1.3 Physiologische pH-Werte als Standard

Der physiologische pH-Wert der Honigblase von *A. mellifera* liegt im sauren pH-Bereich und unterliegt Schwankungen, die durch unterschiedliche Nektarquellen bedingt werden (Chapman, 1998) und ist natürlicherweise hoch variabel. Die signifikanten Unterschiede im Vergleich der pH-Werte der Kontrollgruppen (im Labor mit Futterteig gefüttert) und den Bienen für die Standardbestimmung (mit Futtervorrat aus dem Volk) spiegeln diese Situation wider.

Der pH-Wert des Ventriculus ist sehr stabil mit geringer Varianz. Dies unterstreicht die starke Pufferkapazität des Mitteldarms. Intrazelluläre Puffer von Insekten sind bisher

Diskussion

wenig untersucht, es sind aber höchstwahrscheinlich Proteine, Phosphate und organische Säuren beteiligt (Harrison, 2001).

Im Gegensatz dazu ist der physiologische pH-Wert des Rectums wesentlich saurer, was sich auf die intensive Resorption von Wasser über die Rektalpapillen und den Sekretionsprozessen in den Malpighischen Gefäßen zurückführen lässt (Chapman, 1998).

Der pH-Wert der Hämolymphe der Honigbiene nähert sich einem neutralen Wert an und liegt in einem Bereich, der für Insekten (pH-Wert von 6,4 – 6,8) als normal (Chapman, 1998) beschrieben wurde. Bienen, die über 72 Stunden im Labor gehalten wurden, zeigen diesen Effekt, die Annäherung an einen pH-Wert von 7 stärker als Bienen, die direkt dem Volk entnommen wurden. Die Haltung der Bienen in Käfigen bedingt anscheinend eine Stresssituation, die sich im Laufe des Versuchszeitraumes auf den pH-Wert mit potentiellen Abweichungen vom Normbereich auswirken könnte. Bei derartigen Abweichungen ist nach Chapman (1998) eine starke Pufferkapazität gegeben, die sich im Zeitrahmen von 72 Stunden nicht gezeigt hat.

Harrison (2001) geht davon aus, dass die Regulation der Säure-Base-Homöostase durch Puffer, den CO₂ Partialdruck sowie Exkretionsprozesse gesteuert werden. Die von Diehl (2009) gemessenen pH-Werte für Bienen, die direkt einem Volk entnommen wurden, liegen im Wesentlichen unter den hier eingemessenen Standards. Lediglich bei dem pH-Wert des Rectums sind die Abweichungen gering. Die Unterschiede wurden höchstwahrscheinlich durch die Messmethoden (Indikatorpapier vs. Elektrode), im Falle der Honigblase aber auch durch verschiedene Futter hervorgerufen.

4.1.4 pH-Werte nach Oxalsäurebehandlung

Die Behandlung der Arbeiterinnen mit Oxalsäure erfolgte in Dosen, die für die Bienen auch über den Versuchszeitraum von 72 Stunden verträglich waren. Im Bereich bis zu 50µg/Biene nach oraler und bis zu 250µg/Biene nach dermalen Applikation wurden gute Verträglichkeiten gezeigt. Die pH-Werte des Honigblaseninhaltes variierten nach oraler wie auch dermalen Applikation der Säure sehr stark. Der geringere pH-Wert 24 Stunden nach oraler Behandlung zeigt, dass Oxalsäure aufgenommen wurde. Im weiteren Zeitverlauf blieb der pH-Wert niedrig, da der Honigblaseninhalt bis zu 3 Tage in der Honigblase verbleiben kann (Droege, 1993), wobei Pollen bereits 60 Minuten nach der Aufnahme in den Mitteldarm wandert.

Der pH-Wert des Mitteldarms wies signifikante Unterschiede 48 Stunden nach oraler Behandlung und 72 Stunden nach dermalen Behandlung auf. Diese Unterschiede könnten durch die langsamere Penetration der Säure durch die Cuticula nach dermalen

Diskussion

Applikation verursacht worden sein. Nach oraler Applikation gelangte die Säure schneller in den Mitteldarm. Auch der pH-Wert des Rectums veränderte sich. Oxalsäure, die durch den Verdauungstrakt wandert und auch über die Cuticula in die Biene einzudringen scheint, verändert demnach das pH-Spektrum des Mittel- und Enddarms.

Der durchschnittliche pH-Wert der Hämolymphe war bereits 24 Stunden nach oraler Applikation von Oxalsäure signifikant verringert sowie 72 Stunden nach dermalen Applikation. Die Pufferkapazität war möglicherweise bereits erschöpft. Eine weitere Erklärung für die verzögerte pH-Wert Reduktion ist vermutlich das langsame Durchdringen der Säure durch die Kutikula. Diehl (2009) zeigte ebenfalls pH-Wert Veränderungen nach dermalen Applikation von Oxalsäure, konnte diese aber nicht analytisch nachweisen. Es wurde vermutet, dass Oxalsäure nicht unmetabolisiert durch die Kutikula diffundiert sondern Protonen der Oxalsäure durch die Natrium/Kalium Ionenpumpe oder über Ansetzen an das Chitinmolekül in die Hämolymphe (Springer, 2009 pers. Mitteilung) eindringen.

Nanetti (2003a) konnte nach Verabreichung von C¹⁴ markierter Oxalsäure im Bienenvolk über Träufelapplikation Oxalsäure bzw. den radioaktiven Kohlenstoff in den inneren Organen bis zu 6 Tage nach der Behandlung radiographisch nachweisen. Möglicherweise wurde dabei nicht Oxalsäure sondern Ameisensäure als Stoffwechselprodukt nachgewiesen (Nanetti 2008). Nozal et al. (2003) war es möglich, über HPLC Spuren von Oxalsäure im Verdauungssystem, den Malpighischen Gefäßen und der Hämolymphe zu erfassen. Dass eine Oxalsäurebehandlung zu einer Übersäuerung der Einzelbiene führt und damit Organschäden (z.B. Nekrosen) verursacht, haben Gregorc et al. (2004) und Milani (2001) nach Applikation höherer Dosen nachgewiesen. Mit den Ergebnissen aus diesen Versuchen kann eine verstärkte Azidität in den einzelnen Abschnitten des Verdauungstraktes und der Hämolymphe als Ursache bestätigt werden. Diese erhöhte Azidität kann zu Verätzungen in den einzelnen Darmabschnitten führen, ein Schwellenwert ist aus diesen Versuchen mit geringer Dosis jedoch nicht ablesbar.

4.1.5 pH-Werte nach Betasäurenbehandlung

Die Behandlung der Arbeiterinnen mit Betasäuren erfolgte in Dosen, die von Bienen gut toleriert werden. Der pH-Wert des Honigblaseninhaltes lag zu allen Versuchszeitpunkten über dem Wert der Kontrollen, was bei der Verabreichung einer alkalischen Lösung zu erwarten war. Nach 48 Stunden Versuchszeit konnte bei oraler und dermalen Applikation der Betasäuren ein Unterschied zur Kontrollgruppe gezeigt werden. Der erhöhte pH-Wert zeigt, dass auch Betasäuren oral aufgenommen wurden.

Diskussion

Der pH-Wert des Mitteldarms war 24 Stunden nach oraler Behandlung signifikant erhöht. Es ist anzunehmen, dass die Betasäuren durch die orale Aufnahme schnell in den Mitteldarm gelangten. Auch der pH-Wert des Rectums erhöhte sich in diesem Versuchszeitraum. Betasäuren scheinen wie auch Oxalsäure den Verdauungstrakt und auch die Cuticula zu passieren, was zu Erhöhungen des pH-Wertes des Mittel- und Enddarms führt. Es bleibt zu klären, welche Mechanismen in diesem Fall eine Rolle spielen, da es sich bei Betasäuren um wesentlich komplexere Moleküle handelt als bei Oxalsäure.

Oxalsäure und Betasäuren verursachen nach der Applikation von Dosen, die sich im Vorfeld als bienenverträglich erweisen haben, Veränderungen im Bereich der pH-Werte des Verdauungssystems und der Hämolymphe. Es ergeben sich Verschiebungen des pH-Wertes zu höherer Azidität im Falle der Oxalsäure und stärkerer Neutralität bei Betasäuren. Es ist beschrieben, dass der pH-Wert des Mitteldarms die Funktion von Pestiziden sowie den Infektionserfolg von Pathogenen beeinflusst (Harrison, 2001). Dies würde auch einen Einfluss auf die Entwicklung des Darmmilieus und im speziellen *Nosema* spp. möglich machen. Mechanismen, die den extrazellulären Säure-Base-Haushalt von Insekten kontrollieren, sind die Pufferkapazität der körpereigenen Flüssigkeiten, der Gasaustausch durch indirektes Eingreifen in den internen CO₂ Partialdruck sowie ionische Säure-Base-Transporte speziell im hormonal gesteuerten Exkretionstransport (Harrison, 2001).

TEIL 2

4.2 Einfluss der Wirkstoffe Oxalsäure und Betasäuren auf *Nosema* spp.

4.2.1 Künstliche Infektion von Arbeiterinnen mit *Nosema* spp. unter Laborbedingungen

Im Versuchszeitraum wurde nach der künstlichen Infektion mit *Nosema* Sporen kein Befall festgestellt. Eine Vermehrung des Erregers hat in den infizierten Bienen nicht stattgefunden, obwohl das applizierte Inoculum nach den Vorgaben von Fries et al. (2013) hergestellt wurde. Es wurden frische Sporen aus einem infizierten Flugraumvolk verwendet, die Sporensuspension wurde durch Filtrieren und Zentrifugieren von großen Gewebepartikeln befreit und am Tag der Herstellung verabreicht. Durch eine Hungerphase von 3 Stunden vor der Fütterung des Inoculums wurde sichergestellt, dass jedes Versuchstier die Sporensuspension schnell und restlos aufnimmt. Die Standardmethode zur Herstellung der Sporensuspension beinhaltet jedoch keine Auftrocknung des Inoculums. Allerdings beschreibt Olsen et al. (1986) das Auftrocknen einer Sporensuspension als notwendige Bedingung für eine erfolgreiche Sporenkeimung in Experimenten mit *N. apis*. Die Ergebnisse der künstlichen Infektion

Diskussion

wurden dennoch in diese Arbeit mit aufgenommen, da die Standardmethode nach Fries et al. möglicherweise einer Überprüfung bedarf. Bei der Herstellung der Sporensuspensionen für den Feldversuch wurde nach der Filtration und Zentrifugation eine Auftrocknung der Lösung vorgenommen.

4.2.2 Vergleich der Befallsentwicklung von *Nosema* spp. nach Behandlung von Einzelbienen mit den Wirkstoffen Oxalsäure und Betasäuren

Die Entwicklung des *Nosema* Befalls an natürlich infizierten Bienen wurde nach der Behandlung mit den varroaziden Wirkstoffen Oxalsäure und Betasäuren beobachtet. Der Anteil erkrankter Bienen war am 3. Tag nach der Behandlung in beiden Versuchsgruppen reduziert, in der mit Oxalsäure behandelten Gruppe auch signifikant. Am 8. Tag nach der Behandlung der Einzelbienen konnte in der Betasäuren Gruppe weiterhin ein verringerter Anteil (60%) ermittelt werden. In der Oxalsäure Gruppe erreichte der Anteil erkrankter Bienen 100%. Im weiteren Verlauf waren alle Bienenproben mit *Nosema* Sporen befallen.

Betrachtet man die Sporenbelastung, sind die signifikant niedrigen Sporenmengen in beiden Testgruppen am 8. Tag nach der Varroazidbehandlung im Vergleich zur Kontrolle auffallend. Diese Beobachtung deckt sich mit der verringerten Anzahl Sporen im Feldversuch.

Auch Nanetti et al. (2015) zeigten in Laborversuchen, dass eine orale Applikation von Oxalsäure die Wachstumsrate von *N. ceranae* nach künstlicher Infektion von Bienen über einen Zeitraum von 8 Tagen beeinträchtigte. Bei einer Oxalsäureapplikation im Bienenvolk zur Behandlung der Nosemose ist es möglich, dass ein verzögerter Effekt entsteht, ähnlich der Wirkungskurve von Oxalsäure gegen *V. destructor*. Über einen Zeitraum von bis zu 10 Tagen steigt hier die Wirksamkeit der Oxalsäure langsam an (Rademacher et al., 2015).

Die durchschnittlichen pH-Werte des Mitteldarms *Nosema* positiver, behandelter Einzelbienen liegen weit unter dem etablierten Standard pH-Wert von 6,55. Die pH-Werte des Enddarms liegen dagegen annähernd im Bereich des Standards (pH-Wert 5,04). Die Anzahl Sporen pro Biene und der pH-Wert des Mitteldarms korrelieren nicht miteinander. Ein Effekt konnte zwar beobachtet werden, ist aber nicht ursächlich auf den pH-Wert des Mitteldarms zurückzuführen. Borchert (1974) beschreibt, dass in den pH-Werten gesunder und erkrankter Bienen keine Unterschiede gefunden wurden. Bailey (1955) geht davon aus, dass die Keimung von *N. apis* nicht durch Veränderungen im pH-Wert oder durch den osmotischen Druck hervorgerufen wird. Dagegen beschreibt Weiss (2001), dass bei vielen Microsporidia u.a. pH-Wert Verschiebungen die Keimung begünstigen. Ob es tatsächlich einen kausalen

Diskussion

Zusammenhang zwischen der Keimung und dem pH-Wert des Mitteldarms gibt, kann hier nicht abschließend beurteilt werden. Bei der Behandlung mit Betasäuren zeigte sich eine Tendenz zur Reduzierung der Sporenmenge, die weiter zu untersuchen wäre, wobei Bienen aus einem unbelasteten Volk infiziert und zu gleichen Zeitpunkten behandelt werden sollten. Bei den hier gezeigten Stichproben ist die Varianz in der Sporenbelastung von Biene zu Biene nach natürlicher Infektion sehr groß.

4.2.3 Feldversuch: Vergleich der Befallsentwicklung von *Nosema* spp. nach Behandlung von Bienenvölkern mit Oxuvar® und HopGuard®

Die Behandlung der fünf Ableger mit Oxuvar® und HopGuard® wurde entsprechend den Empfehlungen zur Behandlung der Varroose im Herbst/Winter durchgeführt (AG der Institute für Bienenforschung, 2007; Rademacher et al., 2015). Die Infektion mit *Nosema* Sporen war allerdings nicht ausreichend, um eine Befallsentwicklung in allen Völkern zu beschreiben. Lediglich ein Ableger, der bereits vor der Infektion positiv getestet wurde, konnte betrachtet werden.

Die Ableger wurden unter gleichen Bedingungen etabliert, allerdings entwickelte sich bei zwei Völkern deutlich weniger Brut, da die jungen Königinnen vermutlich nicht gleich stark in Einlage gingen. Dies führte zu einer beträchtlichen Reduktion der Arbeiterinnenpopulation und zum Zusammenbruch dieser Völker vor dem Start des Versuches. Eine Verstärkung mit Brutwaben aus anderen Völkern hätte eine Veränderung der angestrebten genetischen Ähnlichkeit der Versuchsvölker, wie von Fries et al. (2013) verlangt, zur Folge gehabt. Auch aufgrund der jahreszeitlichen Abhängigkeit musste mit der vorhandenen Anzahl an Ablegern gearbeitet werden.

In der Praxis kann eine Nosemainfektion diagnostiziert werden, wenn z.B. in den Kotflecken auf den Waben oder am Flugloch der Erreger nachzuweisen ist. Eine prophylaktische Behandlung der Nosemose ist nicht sinnvoll. Die Befallsentwicklung im Ableger 1.1 mit HopGuard® Behandlung zeigte eine Reduktion des Befalls am 6. Tag nach dem Einhängen der HopGuard® Streifen, im Versuch mit Einzelbienen wurde dieser Effekt am 8. Tag beobachtet. Sowohl die durchschnittliche Sporenbelastung als auch der Anteil erkrankter Bienen war stark reduziert. Im weiteren Verlauf erhöhte sich die Sporenbelastung signifikant, auch der Anteil erkrankter Bienen stieg an. Am 25. Tag nach der Behandlung lag bei 45% der Bienen eine schwache Sporenbelastung vor. Die Bienen kommen mit dem Wirkstoff Betasäuren über Belaufen der Streifen in Kontakt. Durch den intensiven Putztrieb ist auch eine orale Aufnahme geringer Dosen denkbar. Die Wirksamkeit gegen *V. destructor* tritt bei HopGuard® schnell ein, innerhalb der ersten 24 Stunden nach einer Behandlung ist ein Wirkungsgrad von über 60% erreicht (Rademacher et al., 2015). Die pH-Werte des Mitteldarms sind nach

Diskussion

Betasäurenapplikation bereits nach 24 Stunden erhöht. Es ist zu vermuten, dass innerhalb der ersten drei Tage nach der Behandlung die Keimungsfähigkeit von *Nosema* spp. gestört wird, was zu einer reduzierten Belastung der Bienen im folgenden *Nosema* Entwicklungszyklus führt. Die Verbreitung des Erregers im Bienenvolk konnte zwar nicht gestoppt werden, aber die Befallsentwicklung wurde verlangsamt. Diese Ergebnisse geben erste Hinweise auf eine Abschwächung des Befalls unter dem Einfluss von Betasäuren.

In Feldversuchen von Nanetti et al. (2015) wurde eine reduzierte Verbreitung von *N. ceranae* nach zweimaliger Oxalsäure-Träufelbehandlung gezeigt, wobei unbehandelte Völker zum einen weniger gut auswinteren und auch eine stärkere Sporenbelastung aufwiesen. Die Nutzung von Oxalsäure zur Behandlung der Nosemose Typ C wird von den Autoren in Betracht gezogen.

Auch wenn in meinen Feldversuchen die Infektion nicht in allen Völkern etabliert werden konnte und aufgrund von Ausfällen nicht ausgleichende Verluste in der Anzahl verfügbarer Völker auftraten, halte ich eine klinische Prüfung mit mindestens je 30 Bienenvölkern an verschiedenen Standorten für aussichtsreich, um die Hinweise aus dieser Arbeit zu bestätigen. Diese Studie kann an die Richtlinien der Prüfung von Varroaziden angelehnt sein und würde die Basis für eine Indikationserweiterung von Tierarzneimitteln mit den Wirkstoffen Oxalsäure und Hopfenbetasäuren darstellen (EMA, 2010).

4.3 Subletale Effekte von Varroaziden

Die beobachteten Effekte der varroaziden Wirkstoffe Oxalsäure und Betasäuren auf den pH-Wert treten bei behandelten Bienen auf, die in der Regel die Einzelbehandlung äußerlich unbeschadet überleben. Diese Effekte gelten als subletal, da sie nicht zwingend den Tod des Individuums hervorrufen.

Subletale Effekte anderer Pestizide, der Neonicotinoide, werden verstärkt als Ursache für das Bienensterben angesehen. Bienen werden durch eine chronische Vergiftung am Nervensystem geschädigt, es kommt zur Desorientierung und zum Verlust des Heimfindervermögens (Fischer et al., 2014; Henry et al., 2012). Einen Zusammenhang zwischen dem Einfluss von Neonicotinoiden und der Schädlichkeit des Flügeldeformationsvirus (DWV) konnten Di Prisco et al. (2013) nachweisen. So ist die starke Virulenz auf eine Aufhebung der Immunantwort mit einer dosisabhängigen ansteigenden Replikation des DWV-Genoms zurückzuführen. Zudem bestehen Zusammenhänge zwischen der Schwächung von Bienenvölkern, die mit *Nosema* spp. infiziert und gleichzeitig geringsten Mengen an Neonicotinoiden ausgesetzt sind (Alaux et al., 2010).

Diskussion

Auch aufgrund der hier gezeigten subletalen Effekte der Behandlungen mit Wirkstoffen aus Varroaziden sollte eine Erweiterung der Prüfvorschriften für die Zulassung von sowohl Bienenmedikamenten als auch Pflanzenschutzmitteln in Betracht gezogen werden. Chronische und subletale Effekte sowie Interaktionen zwischen Pestiziden und Pathogenen finden bisher nur geringe oder gar keine Berücksichtigung.

5. SCHLUSSFOLGERUNG

Nebenwirkungen der beiden varroaziden Wirkstoffe Oxalsäure und Betasäuren auf physiologischer Ebene werden bereits durch die Verabreichung subletaler Dosen erreicht. Diese eigentlich unerwünschten Nebenwirkungen können dazu führen, dass das Wachstum der Mikrosporidien *Nosema* spp. für kurze Zeit gehemmt wird. Diese Wachstumshemmung würde die Infektion des einzelnen Bienenvolkes zwar nicht gänzlich verhindern, bei rechtzeitiger Diagnose wäre es dem Imker aber möglich, durch den Austausch des kontaminierten Wabenmaterials und Einhängen zusätzlicher Pollenwaben die Frühjahrsentwicklung des Bienenvolkes zu stärken und so Verluste weitgehend zu verhindern. Inwiefern eine mehrfache Anwendung eventuell auch bei möglicher Brutaktivität effektiv ist, bleibt abzuwarten. Sollten sich die Hinweise aus dieser Arbeit durch weitere Versuche bestätigen, wäre eine Erweiterung der Indikation für Oxalsäure ad us vet. und HopGuard® denkbar. Eine Zulassung wäre dringend notwendig und hätte einen hohen Stellenwert, da in Europa derzeit kein Medikament zur Behandlung der Nosemose verfügbar ist.

6. ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY

Diese Arbeit untersucht den Einfluss der Varroaziden Wirkstoffe Oxalsäuredihydrat und Hopfenbetasäuren auf die Honigbiene *Apis mellifera* sowie den Erregern der Nosemose, *Nosema apis* und *Nosema ceranae*. Der Erhalt der Honigbiene ist von enormer ökologischer und ökonomischer Bedeutung, dabei ist heute eine Behandlung der Bienenvölker von *A. mellifera* mit Medikamenten alternativlos. Der Befall der Völker mit der parasitischen Milbe *Varroa destructor* führt ohne Medikation innerhalb kürzester Zeit zum Zusammenbruch. Die Varroazide Oxalsäure und Betasäuren sind hochwirksam in der Behandlung der Varroose. Zum einen sind die Effekte auf die einzelne Honigbiene (pH-Werte der Darmabschnitte und Hämolymphe) in niedrigen subletalen Dosen bisher unzureichend untersucht, zum anderen besteht die Vermutung, dass der Einsatz organischer Säuren das Auftreten der Nosemose reduziert.

Die Verträglichkeit von Oxalsäure an der Einzelbiene wurde für die dermale und orale Behandlung dargestellt. Eine aufsteigende Dosisreihe wurde für die dermale (175µg, 212,5µg, 250µg, 375µg und 500µg/Biene) und orale (10µg, 50µg, 75µg, 80µg und 100µg/Biene) Applikation geprüft. Für den Wirkstoff Betasäuren wurde ebenfalls eine Untersuchung mit aufsteigender Dosisreihe zur Einstufung der Toxizität nach dermalen (6µg, 12,5µg, 25µg, 37,5µg und 50µg/Biene) und oraler (50µg, 75µg und 100µg/Biene) Applikation durchgeführt. In Intervallen von 24, 48 und 72 Stunden nach der Behandlung wurde für beide Wirkstoffe die Bienenmortalität dokumentiert.

Eine dermale Applikation von Oxalsäure wurde von den Bienen bis zu einer Dosis von 212,5µg gut vertragen. Im weiteren Verlauf kommt es zu einem Anstieg des Bientotenfalls, der in den höchsten Dosierungen 25% übersteigt. Die orale Applikation wurde weniger gut vertragen, es kommt zu einem dosisabhängigen Bientotenfall, der bei 100µg/Biene 55% erreicht. Betasäuren erreichten in einer Dosis von bis zu 50µg/Biene nach dermalen Applikation sehr gute Verträglichkeit. Die orale Verabreichung führte in allen getesteten Dosen zu erhöhtem Bientotenfall.

Bienen wurden im Labor gehalten und individuell oral und dermal mit subletalen Dosen der Wirkstoffe Oxalsäure und Betasäuren behandelt. In Intervallen von 24 Stunden erfolgte die Messung der pH-Werte für die Abschnitte des Verdauungssystems (Honigblase, Mitteldarm, Enddarm) und der Hämolymphe. Zur Bestimmung des natürlichen pH-Wertes wurden die einzelnen Teile direkt nach der Entnahme von Bienen aus dem Volk gemessen. Aus diesen Werten ergab sich ein physiologischer Standard pH-Wert.

Zusammenfassung/Summary

Für die einzelnen Abschnitte des Verdauungssystems und der Hämolymphe der Honigbiene *A. mellifera* wurden die physiologischen pH-Werte als Standard ermittelt: Honigblase pH 5,21; Mitteldarm pH 6,55; Enddarm pH 5,04; Hämolymphe pH 6,72. Die Behandlung von Einzelbienen mit Oxalsäure führte im Zeitverlauf zu verringerten pH-Werten des Inhalts der Honigblase, des Mitteldarms (signifikant nach 48 und 72 Stunden), des Enddarms (signifikant nach 48 und 72 Stunden) sowie der Hämolymphe (signifikant nach 24 und 72 Stunden). Die Behandlung von Einzelbienen mit Betasäuren führte im Zeitverlauf zu erhöhten pH-Werten des Inhalts der Honigblase (signifikant nach 48 Stunden), des Mitteldarms (signifikant nach 24 Stunden), des Enddarms (signifikant nach 24 Stunden) und signifikant veränderten pH-Werten der Hämolymphe (nach 24 und 72 Stunden).

Die Entwicklung des Befalls von Einzelbienen mit den Erregern der Nosemose (*Nosema* spp.) wurde unter der individuellen Applikation mit Oxalsäure bzw. Betasäuren über einen Zeitraum von 35 Tagen im Labor betrachtet. Im Feldversuch erfolgte an Ablegern eine Infektion mit *Nosema* und verzögerter Behandlung mit den Präparaten Oxuvar® (Wirkstoff: Oxalsäure) und HopGuard® (Wirkstoff: Betasäuren). Über einen Zeitraum von 25 Tagen wurde der Befallsgrad anhand der Sporenmenge in Bienenproben ermittelt.

Die Applikation von Oxalsäure und Betasäuren an *Nosema* erkrankten Bienen führte zu einer Reduktion der Sporenbelastung am 8. Tag nach der Behandlung in beiden Testgruppen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. In einem Volk wurde nach der Behandlung mit HopGuard® eine vorübergehende Hemmung des *Nosema* Wachstums erreicht.

Die Behandlung von Einzelbienen mit Oxalsäure und Betasäuren führt zu Veränderungen des pH-Wertes der Abschnitte des Verdauungssystems und der Hämolymphe. Die Verschiebungen des pH-Wertes zu höherer Azidität nach Oxalsäureapplikation wurden bestätigt. Es kann dabei zu einer Übersäuerung der Darmabschnitte und Schädigungen der Gewebe kommen. Weiterhin erscheint es möglich, die Vermehrung der Mikrosporidien *Nosema* spp. zu reduzieren. Diese Wachstumseinschränkung kann zwar eine Ausbreitung im Bienenvolk nicht verhindern, sie würde es dem Imker bei frühzeitigem Erkennen aber ermöglichen, entsprechende Gegenmaßnahmen zu ergreifen.

Zusammenfassung/Summary

This study examines the effects of the varroacidal active ingredients oxalic acid dihydrate and hop beta acids on the honeybee *Apis mellifera* and the pathogens causing Nosemosis, *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. The conservation of the honeybee has exceptional ecological and economic importance and the treatment of honeybee colonies with veterinary medicines is essential. Colony infestation with the parasitic mite *Varroa destructor* causes colony collapse within 2 -3 years unless the colonies are treated regularly. The varroacides oxalic acid and beta acids are highly effective but the effect on the individual honeybee (e.g. pH-value of parts of the intestine and hemolymph) in low sublethal doses has not been studied sufficiently. There is also the assumption that the use of organic acids to combat Varroosis will reduce the prevalence of Nosemosis in honeybee colonies.

The tolerance of oxalic acid is described for the dermal and oral application on individually treated honeybees. A dose-response was tested for the following doses: 175µg, 212,5µg, 250µg, 375µg and 500µg/bee after dermal application; 10µg, 50µg, 75µg, 80µg and 100µg/bee after oral application. Beta acid were also tested in a dose-dependent study: 6µg, 12,5µg, 25µg, 37,5µg and 50µg/bee after dermal application; 50µg, 75µg and 100µg/bee after oral application. The bee mortality was monitored in intervals of 24, 48 and 72 hours.

The dermal application of oxalic acid was well tolerated in a dose up to 212,5µg/bee. Increased bee mortality was documented exceeding 25% in the highest doses. The oral application was not very well tolerated. It resulted in a dose-dependent mortality with a peak at 55% when applying 100µg oxalic acid/bee. Beta acids showed low bee toxicity in doses up to 50µg/bee after dermal application. The oral application of beta acids caused increased bee mortality in all tested dosages.

Honeybees kept in the laboratory were treated individually (oral and dermal) with sublethal doses of oxalic acid and beta acids. The pH-value measurement of the intestinal parts (crop, ventriculus, rectum) and hemolymph was conducted in 24 hour intervals. To define the physiological pH-value ("standard") of the organs, honeybees were analysed subsequently to the sampling of the colony.

The physiological pH-values of the honeybee intestinal parts and hemolymph were derived as a standard: crop pH 5.21, ventriculus pH 6.55, rectum pH 5.04, hemolymph pH 6.72. The treatment with oxalic acid resulted in reduced pH-values of the contents of the crop, the ventriculus (significantly at 48 and 72 hours), the rectum (significantly at 48 and 72 hours) and the hemolymph (significantly at 24 and 72 hours). The treatment with beta acids resulted in increased pH-values of the contents of the crop (significantly

Zusammenfassung/Summary

at 48 hours), the ventriculus (significantly at 24 hours), the rectum (significantly at 24 hours) and significantly changed pH-values of the hemolymph (at 24 and 72 hours).

The infection level of honeybees with *Nosema* spp. was observed in the laboratory for 35 days after the treatment with oxalic acid and beta acids. In a field experiment nucleus colonies were infected with *Nosema* spores and treated with the products Oxuvar® (active ingredient: oxalic acid) and HopGuard® (active ingredient: beta acids). The infection level was observed for 25 days by means of individual bee sampling.

The application of oxalic acid and beta acids to *Nosema* diseased bees resulted in a reduced count 8 days post treatment in both test groups compared to the untreated control group. One colony treated with HopGuard® indicated a temporary inhibition of *Nosema* infection.

The individual treatment of honeybees with oxalic acid and beta acids changed the pH-value of the intestinal parts and the hemolymph. The shift towards stronger acidity after oxalic acid treatment confirms that damage to the epithelial tissue and organs is caused by hyperacidity.

There is evidence that the growth of the microsporidia *Nosema* spp. is inhibited; while not preventing the *Nosema* dispersal in the colony completely it would allow the beekeeper to introduce appropriate remedial measures.

7. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Pflüger und Herrn Professor Menzel für die Begutachtung meiner Dissertation. Sie ermöglichten es mir, in der angewandten Bienenforschung zu promovieren.

Liebe Eva, danke - für alles.

Und dann sind da noch viele Weggefährten und Freunde, Ihr alle habt mich auf besondere Weise unterstützt, und ich sage danke.

Ich danke meinen Eltern und meinen Geschwistern, meiner Familie.

Lieber Ray, danke für Deine unglaubliche Geduld und Unterstützung, meine Kinder haben immer wieder dafür gesorgt, dass ich mich auch mit anderen Dingen beschäftigt habe und das war gut so.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- ALAUX C, BRUNET H-L, DUSAUBAT C, MONDET F, TCHAMITCHAN S, COUSIN M, BRILLARD J, BALDY A, BELZUNCES L, LE CONTE Y (2010) Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). Environmental Microbiology 12, 774 – 762.
- ALIANO N P, ELLIS M D, SIEGFRIED B D (2006) Acute contact toxicity of oxalic acid to *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and their *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) hosts in laboratory bioassays. Journal of Economic Entomology 99, 1579 - 1582.
- ARBEITSGEMEINSCHAFT DER INSTITUTE FÜR BIENENFORSCHUNG E.V. (2007) Varroa unter Kontrolle. Deutscher Landwirtschaftsverlag, München.
- BAILEY L (1955) The infection of the ventriculus of the adult honeybee by *Nosema apis* (Zander). Parasitology 45, 86 - 94.
- BIGNELL D E, HEATH L A F (1985) Electropositive redox state of the fifth-instar larval gut of *Apis mellifera*. Journal of Apicultural Research 24, 211 - 213.
- BORCHERT A (1974) Schädigungen der Bienenzucht durch Krankheiten, Vergiftungen und Schädlinge der Honigbiene. S. Hirzel Verlag, Leipzig.
- CANTWELL G E (1970) Standard methods for counting *Nosema* spores. American Bee Journal 110, 222 - 223.
- CHAPMAN R F (1998) The insects: structure and function. 4th edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- COLOSS (2009) Conclusions, Proc. Workshop “Nosema disease: lack of knowledge and work standardization” (COST Action FA0803) Guadalajara, <http://www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceedings-online> [online: aufgerufen am 25.06.2015].
- COSTA C, LODESANI M, MAISTRELLO L (2010) Effect of thymol and resveratrol administered with candy or syrup on the development of *Nosema ceranae* and on the longevity of honeybees (*Apis mellifera* L.) in laboratory conditions. Apidologie 41, 141 – 150.
- DADE H A (1977) Anatomy and dissection of the honeybee. Bee Research Association Publications. London.

Literaturverzeichnis

- DEGRANDI-HOFFMAN G, AHUMADA F, PROBASCO G, SCHANTZ L (2012) The effect of beta acids from hops (*Humulus lupulus*) on mortality of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Experimental and Applied Acarology* 58, 407 – 421.
- DEUTSCHER IMKERBUND (2015) Runder Tisch Varroa am 8. Mai 2015. Landesanstalt für Bienenkunde Stuttgart – Hohenheim.
- DIEHL M (2009) Subletale Wirkungen von Oxalsäure auf *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae): Pharmakodynamik. Diplomarbeit, Institut für Biologie/Neurobiologie, Freie Universität Berlin.
- DI PRISCO G, CAVALIERE V, ANNOSCIA D, VARRICCHIO P, CAPRIO E, NAZZI F, GARGIOLO G, PENNACCHIO F (2013) Neonicotinoid clothianidin diversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, DOI: 10.1073/PNAS1314923110.
- DROEGE G (1993) Die Honigbiene von A bis Z. Ein lexikalisches Fachbuch. Deutscher Landwirtschaftsverlag. Berlin.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY (2010) Guideline on veterinary medicinal products controlling *Varroa destructor* parasitosis in bees. EMA/CVMP/EWP/459883/2008 [online]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/11/WC500099137.pdf. [online: aufgerufen am 18. September 2014].
- FAUCON J P, DRAJNUDEL P, FLECHE C (1996) Varroose: mise en évidence de la résistance du parasite aux acaricides par la méthode de <détermination du temp létal moyen>. *Apidologie* 27, 105 - 110.
- FENOY S, RUEDA C, HIGES M, MARTIN-HERNANDEZ R, DEL AGUILA C (2009) High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 6886 – 6889.
- FISCHER J, MÜLLER T, SPATZ A-K, GREGGERS U, GRÜNEWALD B, MENZEL R (2014) Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in Honeybees. *PloS ONE* 9 (3): e91364. Doi:101371/journal.pone.0091364.
- FORSGREN E, FRIES I (2010) Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Veterinary Parasitology* 170, 212 – 217.

Literaturverzeichnis

- FRIES I, FENG F, DA SILVA A, SLEMENDA SB, PIENIAZEK NJ (1996) *Nosema ceranae* n. spp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology* 32, 356 – 365.
- FRIES I, MARTIN R, MEANA A, GARCIA-PALENCIA P, HIGES M (2006) Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. *Journal of Apicultural Research* 45, 230 – 233.
- FRIES I, CHAUZAT M-P, CHEN Y-P, DOUBLET V, GENERSCH E, GISDER S, HIGES M, MCMAHON D P, MARTIN-HERNANDEZ R, NATSOPOULOU M, PAXTON R J, TANNER GINA, WEBSTER T C, WILLIAMS G R (2013) Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research* 52, DOI 10.3896/IBRA.1.52.1.14.
- GALLAI N, SALLES J-M, SETTELE J, VAISSIÈRE B E (2008) Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline, *Ecological Economics* 68, 810 – 821.
- GENERSCH E, VON DER OHE W, KAATZ H, SCHROEDER A, OTTEN C, BÜCHLER R, BERG S, RITTER W, MÜHLEN W, GISDER S, MEIXNER M, LIEBIG G, ROSENKRANZ P (2010) The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* 41, 332 – 352.
- GISDER S, MÖCKEL N, LINDE A, 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. *Environmental Microbiology* 13, 404 – 413.
- GREGORC A, POGAËNIK A, BOWEN ID (2004) Cell death in honeybee (*Apis mellifera*) larvae treated with oxalic acid. *Apidologie* 35, 453-460.
- HARRISON J F (2001) Insect acid-base physiology. *Annual Reviews of Entomology*, 46, 221 – 250.
- HATJINA F, HARISTOS L (2005) Indirect effects of oxalic acid administration by trickling method on bee brood. *Journal of Apicultural Research* 44, 172 - 174.

Literaturverzeichnis

- HENRY M, BEGUIN M, REQUIER F, ROLLIN O, ODOUX J F, AUPINEL P, APTEL J, TCHAMITCHIAN S, DECOURTYE A (2012) A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336: 348 – 350.
- HÄNEL H (1983) Effect of JHIII on the reproduction of *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* 14, 137 - 142.
- HIGES M, MARTIN-HERNANDEZ R, BOTIAS C, GARRIDO BAILON E, GONZALEZ-PORTO A V, BARRIOS L, DEL NOZAL M J, BERNAL J L, JIMENEZ J J, PALENCIA P G, MEANA A (2008) How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology* 10, 2659 – 2669.
- HIGES M, MARTIN-HERNANDEZ R, MEANA A (2010) *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* 41, 375 – 392.
- HUANG W, JIANG J, CHEN Y, WANG C (2007) A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* 38, 30 – 37.
- IMDORF A, BUEHLMANN G, GERIG L, KILCHENMANN V, WILLE H (1987) Überprüfung der Schätzmethode zur Ermittlung der Brutfläche und der Anzahl Arbeiterinnen in freifliegenden Bienenvölkern. *Apidologie* 18, 137 - 146.
- KLEE J, BESANA A, GENERSCH E, GISDER S, NANETTI A, TAM DQ, CHINH TX, PUERTA F, KRYGER P, MESSAGE D, HATJINA F, KORPELA S, FRIES I, PAXTON R (2007) Widespread dispersal of the microsporidium *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* 96, 1 – 10.
- KLEIN A-M, VAISSIERE B E, CANE J H, STEFFAN-DEWENTER I, CUNNINGHAM SA, KREMEN C, TSCHARNTKE T (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B – Biological Sciences* 274, 303 – 313.
- KRYGER P (2009) Rare *Nosema* infections in Denmark. *Proceedings of the Workshop “Nosema disease: lack of knowledge and work standardization” (COST Action FA0803)* Guadalajara, <http://www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceedings-online> [online: aufgerufen am 29.06.2015].
- LE CONTE Y, ELLIS M, RITTER W (2010) *Varroa* mites and honey bee health: can *Varroa* explain part of the colony losses? *Apidologie* 41, 353 - 363.

Literaturverzeichnis

- MAISTRELLO L, LODESANI M, COSTA C, LEONARDI F, MARANI G, CALDON M, MUTINELLI F, GRANATO A (2008) Screening of natural compounds for the control of Nosema disease in honeybees (*Apis mellifera*), *Apidologie* 39, 436–445.
- MARTIN-HERNANDEZ R, HIGES M, PEREZ JL, NOZAL MJ, GOMEZ L, MEANA A (2007) Short term negative effect of oxalic acid in *Apis mellifera iberiensis*. *Spanish Journal of Agricultural Research* 5, 474-480.
- MILANI N (1995) The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud to pyrethroids: a laboratory assay. *Apidologie* 26, 415 - 429.
- MILANI N (2001) Activity of oxalic and citric acids on the mite *Varroa destructor* in laboratory assays. *Apidologie* 32, 127 – 138.
- MORITZ R F A, DE MIRANDA J, FRIES I, LE CONTE Y, NEUMANN P, PAXTON R J (2010) Research strategies to improve honeybee health in Europe. *Apidologie* 41, 227 - 242.
- NANETTI A (2003a) Pharmakodynamik der Oxalsäure in Honigbienenvölkern. Ständige Kommission für Bienenpathologie. Apimondia Foundation. <http://www.apimondiafoundation.org/foundation/files/164g.pdf> [online: aufgerufen am 29.06.2015].
- NANETTI A, BÜCHLER R, CHARRIÈRE J D, FRIES I, HELLEND S, IMDORF A, KORPELA S, KRISTIANSEN P (2003b) Oxalic acid treatments for Varroa control (Review). *Apiacta* 38, 81 - 87.
- NANETTI A (2008) The role of oxalate-decarboxylase in the metabolism of oxalic acid in *Apis mellifera*. Proceedings of the Third European Conference of Apidology, Belfast, United Kingdom, September 2008.
- NANETTI A, RODRIGUEZ-GARCIA C, MEANA A, MARTIN-HERNANDEZ R, HIGES M (2015) Effect of oxalic acid on *Nosema ceranae* infection. DOI: 10.1016/j.rvsc.2015.08.003.
- NATSOPOULOU M E, MCMAHON D P, PAXTON R J (2015) Parasites modulate within-colony activity and accelerate the temporal polyethism schedule of a social insect, the honey bee. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. DOI: 10.1007/s00265-015-2019-5.
- NOZAL M J, BERNAL J L, GÓMEZ L A, HIGES M, MEANA A (2003) Determination of oxalic acid and other organic acids in honey and in some anatomic structures of bees. *Apidologie* 34, 181 - 188.

Literaturverzeichnis

- OLSON P E, RICE W A, LIU T P (1986) In vitro germination of *Nosema apis* spores under conditions favorable for the generation and maintenance of sporoplasms. *Journal of Invertebrate Pathology* 47, 65 - 73.
- OTTEN C (2012) Winterverluste waren überdurchschnittlich. *Deutsches Bienenjournal* 6, 5.
- POHORECKA K (2004) Laboratory studies on the effect of standardized *Artemisia absinthium* L. extract on *Nosema apis* infection in the worker *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Science* 48, 131 – 136.
- PORRINI MP, FERNÁNDEZ N J, GARRIDO P M, GENDE L B, MEDICI S K, EGUARAS M J (2011) In vivo evaluation of antiparasitic activity of plant extracts on *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Apidologie* 42, 700 – 707.
- RADEMACHER E (1990) Die Varroatose der Bienen: Geschichte-Diagnose-Therapie. Verlag Schelzky und Jeep, Berlin.
- RADEMACHER E (2006) Oxalsäure als Tierarzneimittel zur Bekämpfung der Varroose legal einsetzbar. *ADIZ/die Biene/Imkerfreund* 2, 9.
- RADEMACHER E, HARZ M (2006) Oxalic acid for the control of varroosis in honey bee colonies – a review. *Apidologie* 37, 98 - 120.
- RADEMACHER E, HARZ M (2009) Oxalic acids: Toxicology on *Apis mellifera*, in: Association of Institutes for Bee Research, Report of the 56th Seminar. *Apidologie* 40, 651 – 669.
- RADEMACHER E, HARZ M (2011) Application study: hop acids to control varroosis - laboratory trials, in: Association of Institutes for Bee Research, Report of the 58th Seminar. *Apidologie* 42, 771 - 796.
- RADEMACHER E, FAHLBERG A, HARZ M (2012) Untersuchungen zur Verteilung von Oxalsäure im Bienenvolk von *Apis mellifera* durch Computertomographie. Posterpräsentation zur 59. Tagung der Institute für Bienenforschung, Bonn, 27. – 29. März 2012.
- RADEMACHER E, HARZ M, SCHNEIDER S (2015) The development of HopGuard® as a winter treatment against *Varroa destructor* in colonies of *Apis mellifera*. *Apidologie*, DOI: 10.1007/s13592-015-0363-0.
- SCHNEIDER S (2015) Subletale Wirkungen von Oxalsäure in Kombination mit Zuckerwasser oder Glycerin auf *Apis mellifera*: Untersuchung der Toxizität, der

Literaturverzeichnis

Pharmakodynamik, des Verhaltens und der Lebensdauer, sowie der Rückstände auf Bienen und Beutenmaterial. Dissertation am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie, Freie Universität Berlin.

- SCHULZ A (1984) Reproduktion und Populationsentwicklung der parasitischen Milbe *Varroa jacobsoni* OUD. in Abhängigkeit vom Brutzyklus ihres Wirtes *Apis mellifera* L. *Apidologie* 15, 401 - 420.
- SINA M, ALASTAIR G, FARMER M, ANDERSEN R, ANDERSON O, BARTA J, BOWSER S, BRUGEROLLE G, FENSOME R, FREDERICQ S, JAMES T, KARPOV S, KUGRENS P, KRUG J, LANE C, LEWIS L, LODGE J, LYNN D, MANN D, MACCOURT R, MENDOZA L, MOESTRUP O, MOZLEY S, NERAD T, SHEARER C, SMIRNOV A, SPIEGEL F, TAYLOR M (2005) The New Higher level classification of Eukaryotes with emphasis on the taxonomy of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52, 399–451.
- SPREAFICO M, EÖRDEGH F R, BERNADINELLI I, COLOMBO M (2001) First detection of strains of *Varroa destructor* resistant to coumaphos. Results of laboratory tests and field trials. *Apidologie* 32, 49 – 55.
- STOKSTAD E (2007) The case of the empty hives. *Science* 316, 970–972.
- THOMPSON H M (2003) Behavioural effects of pesticides in bees - Their potential for use in risk assessment. *Ecotoxicology* 12, 317 – 330.
- THOMPSON H M, BROWN M A, BALL R F, BEW M H (2002) First report of *Varroa destructor* resistance to pyrethroids in the UK. *Apidologie* 33, 357 - 366.
- UNDEEN A H, EPSKY N D (1990) In vitro and in vivo germination of *Nosema locustae* (Microspora: Nosematidae) spores. *Journal of Invertebrate Pathology* 56, 371 - 379.
- VAN DER ZEE R, BRODSCHNEIDER R, BRUSBARDIS V, CHARRIÈRE J-D, CHLEBO R, COFFEY M F, DAHLE B, DRAZIC M M, KAUKO L, KRETAVICIUS J, KRISTIANSEN P, MUTINELLI F, OTTEN C, PETERSON M, RAUDMETS A, SANTRAC V, SEPPÄLÄ A, SOROKER V, TOPOLSKA G, VEJSNÆS F, GRAY A (2014) Results of international standardised beekeeper surveys of colony losses for winter 2012-2013: analysis of winter loss rates and mixed effects modelling of risk factors for winter loss. *Journal of Apicultural Research* 53, 19 - 34.

Literaturverzeichnis

VANENGELSDORP D, EVANS J D, SAEGERMAN C, MULLIN C, HAUBRUGE E, NGUYEN B K, FRAZIER M, FRAZIER J, COX-FOSTER DIANA, CHEN Y, UNDERWOOD R, TARPY D R, PETTIS J S (2009) Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. PLoS ONE 4 (8): e6481. doi:10.1371/journal.pone.0006481.

ZANDER E (1909) Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. Münchener Bienenzeitung 31, 196 – 204.

Erfolgte Publikationen

RADEMACHER E, HARZ M, SCHNEIDER S (2015) The development of HopGuard® as a winter treatment against *Varroa destructor* in colonies of *Apis mellifera*. Apidologie, DOI: 10.1007/s13592-015-0363-0.

Inhaltliche Aspekte zur Prüfung der Verträglichkeit von Betasäuren wurden aus dieser Publikation übernommen. Diese Inhalte wurden von mir während der Dissertationszeit im Rahmen eines Arbeitsverhältnisses an der FU Berlin bearbeitet, ausgewertet und als Bericht verfasst. Die Publikation liegt dieser Dissertation als Sonderdruck bei.

HARZ M, RADEMACHER E (2014) The physiological pH of the bee's intestine after treatment with oxalic acid – impact on the development of the gut parasite *Nosema ceranae*. In: Proceedings of the Sixth European Conference of Apidology, Murcia, Spain, 9 – 11th September 2014.

9. ANHANG - ROHDATEN

Tabelle 9-1: Bienentoxizität nach dermaler und oraler Oxalsäureapplikation

Konz. in %	Dosis / Biene in µg	n	Totenfall nach			Totenfall gesamt	Totenfall in %
			24 Stunden	48 Stunden	72 Stunden		
Kontrolle	0	165	4	1	1	6	3,6
3,5	175	60	0	1	1	2	3,3
4,25	212,5	60	0	0	4	4	6,7
5,0	250	120	6	2	9	17	14,2
7,5	375	60	5	0	11	16	26,7
10,0	500	60	1	4	9	14	23,3
Kontrolle	0	165	2	0	3	5	3,0
0,1	10	50 ^a	1	2	0	3	6,0
0,5	50	60	0	3	1	4	6,7
0,75	75	60	1	3	3	7	11,7
0,8	80	90	11	4	5	20	22,2
1,0	100	70	4	18	17	39	55,7

^a 10 Bienen (1 Kästchen) wurden von der Analyse ausgeschlossen, da aufgrund von Futtermangel 100% Totenfall auftrat.

Tabelle 9-2: Bienentoxizität nach dermaler und oraler Betasäurenapplikation

Konz. in %	Dosis / Biene in µg	n	Totenfall nach			Totenfall gesamt	Totenfall in %
			24 Stunden	48 Stunden	72 Stunden		
Kontrolle	0	60	0	1	0	1	1,67
0,125	6	60	1	0	0	1	1,67
0,25	12,5	60	0	0	1	1	1,67
0,50	25	60	0	3	0	3	5,00
0,75	37,5	60	2	1	0	3	5,00
1,00	50	60	1	2	0	3	5,00
Kontrolle	0	300	2	10	12	24	9,2
0,50	50	120	25	9	6	40	13,3
0,75	75	100	10	4	6	20	16,7
1,00	100	260	47	7	1	55	55,0

Anhang - Rohdaten

Tabelle 9-3: Natürliche pH-Werte - Standard

pH-Wert									
Anzahl	Honig- blase	Ventri- culus	Rectum	Hämo- lymphe	Anzahl	Honig- blase	Ventri- culus	Rectum	Hämo- lymphe
1	4	6,09	4,68	6,45	42		6,76		
2	4,06	6,18	4,68	6,48	43		6,77		
3	4,25	6,18	4,7	6,52	44		6,81		
4	4,43	6,26	4,72	6,55	MW	5,21	6,50	5,07	6,72
5	4,64	6,33	4,72	6,58	STABW	0,60	0,16	0,26	0,15
6	4,72	6,36	4,8	6,62					
7	4,77	6,37	4,82	6,63					
8	4,85	6,38	4,84	6,64					
9	4,93	6,4	4,85	6,64					
10	4,94	6,4	4,88	6,65					
11	4,99	6,4	4,89	6,65					
12	5,12	6,41	4,89	6,67					
13	5,12	6,41	4,95	6,67					
14	5,13	6,42	4,97	6,68					
15	5,21	6,45	4,99	6,68					
16	5,35	6,45	4,99	6,68					
17	5,39	6,45	4,99	6,72					
18	5,4	6,47	5	6,73					
19	5,47	6,51	5,03	6,75					
20	5,48	6,51	5,05	6,75					
21	5,57	6,51	5,06	6,76					
22	5,74	6,51	5,07	6,8					
23	5,81	6,52	5,07	6,8					
24	5,84	6,52	5,08	6,8					
25	5,86	6,53	5,1	6,85					
26	5,89	6,54	5,1	6,87					
27	5,94	6,54	5,13	6,87					
28	6,02	6,55	5,14	6,99					
29	6,28	6,57	5,14	6,99					
30		6,57	5,15	7,1					
31		6,59	5,2						
32		6,6	5,21						
33		6,6	5,23						
34		6,6	5,28						
35		6,61	5,41						
36		6,61	5,42						
37		6,63	5,45						
38		6,63	5,46						
39		6,69	5,48						
40		6,71	5,64						
41		6,71	5,68						

Anhang - Rohdaten

Tabelle 9-4: pH-Werte der Kontrollgruppe nach 24 Stunden

pH-Wert									
Anzahl	Honig- blase	Ventri- culus	Rectum	Hämo- lymphe	Anzahl	Honig- blase	Ventri- culus	Rectum	Hämo- lymphe
1	4,07	6,08	4,3	6,61	42		6,59	5,05	
2	4,13	6,21	4,46	6,66	43		6,59	5,06	
3	4,23	6,25	4,55	6,75	44		6,6	5,07	
4	4,26	6,29	4,57	6,83	45		6,61	5,09	
5	4,37	6,31	4,76	6,84	46		6,61	5,09	
6	4,37	6,32	4,76	6,88	47		6,62	5,09	
7	4,37	6,33	4,76	6,95	48		6,62	5,15	
8	4,4	6,34	4,77	6,98	49		6,62	5,17	
9	4,45	6,35	4,8	6,99	50		6,62	5,19	
10	4,46	6,36	4,81	7	51		6,64	5,22	
11	4,58	6,38	4,81	7,02	52		6,64	5,24	
12	4,64	6,38	4,83	7,04	53		6,66	5,24	
13	4,66	6,38	4,84	7,07	54		6,67	5,25	
14	4,67	6,4	4,84	7,08	55		6,69	5,28	
15	4,7	6,4	4,84	7,11	56		6,71	5,28	
16	4,73	6,41	4,84	7,13	57		6,71	5,3	
17	4,8	6,41	4,84	7,14	58		6,72	5,31	
18	4,82	6,42	4,86	7,18	59		6,72	5,37	
19	4,84	6,43	4,87	7,2	60		6,79	5,47	
20	4,86	6,43	4,88	7,2	61		6,85	5,52	
21	4,94	6,44	4,89		62		6,86	5,56	
22	4,97	6,44	4,91		63		6,88	5,57	
23	4,98	6,44	4,91		64		6,92	5,64	
24	5,07	6,45	4,92		65		6,95	5,7	
25	5,08	6,46	4,93		66		6,98	5,81	
26	5,15	6,46	4,93		67		7	5,82	
27	5,22	6,48	4,94		68		7,05	5,93	
28	5,27	6,49	4,94		MW	4,86	6,55	5,08	6,98
29	5,3	6,5	4,94		STABW	0,46	0,20	0,36	0,17
30	5,31	6,51	4,95						
31	5,31	6,52	4,98						
32	5,45	6,53	4,98						
33	5,53	6,53	4,98						
34	5,57	6,54	4,98						
35	5,67	6,55	5						
36	5,85	6,55	5						
37		6,56	5						
38		6,57	5,01						
39		6,57	5,02						
40		6,58	5,03						
41		6,58	5,04						

Anhang - Rohdaten

Tabelle 9-5: pH-Werte der Kontrollgruppe nach 48 Stunden

pH-Wert									
Anzahl	Honig- blase	Ventri- culus	Rectum	Hämo- lymphe	Anzahl	Honig- blase	Ventri- culus	Rectum	Hämo- lymphe
1	3,39	5,97	4,64		42	5,22	6,68	5,13	
2	3,96	6,09	4,67	6,56	43	5,22	6,68	5,15	
3	4,11	6,17	4,68	6,6	44	5,23	6,69	5,15	
4	4,19	6,22	4,7	6,63	45	5,24	6,7	5,17	
5	4,29	6,23	4,72	6,63	46	5,28	6,71	5,17	
6	4,32	6,3	4,73	6,67	47	5,31	6,72	5,17	
7	4,32	6,33	4,75	6,77	48	5,34	6,74	5,2	
8	4,34	6,33	4,76	6,8	49	5,38	6,74	5,2	
9	4,36	6,34	4,76	6,82	50	5,39	6,75	5,22	
10	4,36	6,34	4,77	6,85	51	5,46	6,77	5,22	
11	4,38	6,35	4,81	6,87	52	5,65	6,81	5,23	
12	4,38	6,36	4,82	6,9	53		6,85	5,35	
13	4,39	6,38	4,86	6,93	54		6,88	5,4	
14	4,44	6,39	4,89	6,97	55		6,94	5,41	
15	4,46	6,4	4,89	7,05	56		6,98	5,45	
16	4,58	6,41	4,9	7,06	57			5,46	
17	4,63	6,42	4,94	7,07	58			5,56	
18	4,65	6,43	4,94	7,08	59			5,56	
19	4,69	6,45	4,97	7,09	60			5,82	
20	4,75	6,5	4,97	7,11	MW	4,81	6,55	5,06	6,96
21	4,79	6,51	4,97	7,22	STABW	0,44	0,21	0,24	0,26
22	4,8	6,51	4,99	7,28					
23	4,83	6,54	5	7,3					
24	4,85	6,56	5,02	7,36					
25	4,87	6,56	5,04	7,49					
26	4,88	6,57	5,04						
27	4,88	6,58	5,05						
28	4,91	6,58	5,06						
29	4,93	6,58	5,06						
30	4,94	6,6	5,07						
31	4,96	6,63	5,07						
32	4,98	6,64	5,07						
33	4,99	6,64	5,09						
34	5	6,65	5,09						
35	5,05	6,65	5,09						
36	5,06	6,66	5,09						
37	5,07	6,66	5,1						
38	5,07	6,67	5,1						
39	5,08	6,67	5,11						
40	5,16	6,67	5,11						
41	5,22	6,67	5,12						

Anhang - Rohdaten

Tabelle 9-6: pH-Werte der Kontrollgruppe nach 72 Stunden

pH-Wert									
Anzahl	Honig- blase	Ventri- culus	Rectum	Hämo- lymphe	Anzahl	Honig- blase	Ventri- culus	Rectum	Hämo- lymphe
1	3,88	6,19	4,28	6,75	42		6,62	5,15	
2	3,9	6,25	4,39	7	43		6,63	5,16	
3	3,9	6,25	4,53	7,08	44		6,63	5,16	
4	3,91	6,33	4,58	7,11	45		6,65	5,19	
5	3,91	6,33	4,69	7,23	46		6,68	5,2	
6	3,94	6,35	4,71	7,29	47		6,69	5,22	
7	4,06	6,36	4,72	7,33	48		6,7	5,23	
8	4,17	6,37	4,74	7,35	49		6,71	5,23	
9	4,98	6,38	4,75	7,4	50		6,71	5,26	
10	5,09	6,39	4,75		51		6,75	5,26	
11	5,27	6,42	4,77		52		6,75	5,28	
12	5,46	6,43	4,82		53		6,77	5,36	
13	5,66	6,45	4,82		54		6,81	5,37	
14	5,83	6,45	4,85		55		6,85	5,39	
15	5,85	6,47	4,86		56		6,87	5,52	
16	5,9	6,48	4,88		57		6,98		
17	5,91	6,48	4,88		MW	4,99	6,55	4,99	7,17
18	5,95	6,49	4,89		STABW	0,92	0,16	0,24	0,21
19	6	6,5	4,93						
20	6,32	6,5	4,94						
21		6,5	4,95						
22		6,5	4,97						
23		6,51	4,98						
24		6,51	4,98						
25		6,52	5						
26		6,55	5,01						
27		6,55	5,02						
28		6,56	5,02						
29		6,58	5,02						
30		6,58	5,03						
31		6,58	5,05						
32		6,58	5,06						
33		6,58	5,06						
34		6,59	5,06						
35		6,59	5,06						
36		6,6	5,07						
37		6,6	5,08						
38		6,61	5,08						
39		6,61	5,13						
40		6,62	5,14						
41		6,62	5,15						

Anhang - Rohdaten

Tabelle 9-7: pH-Werte der Testgruppe Oxalsäure

pH-Wert									
24 Stunden (oral)					48 Stunden (oral)				
Anzahl	Honig- blase	Ventri- culus	Rectum	Hämo- lymphe	Anzahl	Honig- blase	Ventri- culus	Rectum	Hämo- lymphe
1	3,83	6,54	4,71	6,09	1	4,28	7,14	4,4	6,61
2	5,01	6,5	4,95	6,43	2	4,34	6,4	4,9	6,39
3	4,66	6,36	5,05	6,27	3	4,26	6,29	4,76	6,96
4	4,09	6,38	5,07	6,92	4	4,3	6,65	4,7	7,06
5	5,08	6,43	4,99	6,84	5	4,93	6,19	5,11	6,79
6	4,21	6,72	5,37	6,92	6	4,77	6,34	4,54	6,87
7	4,39	5,63	4,53	7,03	7	4,49	6,27	4,63	6,86
8	5,13	6,47	5,04	6,85	8	5,25	5,17	4,64	7,05
9	4,74	6,43	5,5	6,89	9	5,24	6,49	4,48	6,91
10	4,4	6,24	4,97	6,84	10	4,49	6,17	4,67	
11	5	6,5	4,74	6,86	11	4,38	6,5	4,88	
12	4,6	6,58	5,97		12	4,25	6,25	4,71	
13	4,7	6,38	5,03		13	5,27	6,33	4,67	
14	4,92	6,44	4,87		14	4,85	6,6	4,72	
15		6,41	4,92		15	4,45	6,31	4,53	
16		7	5,19		16	4,4	6,24	4,92	
17		6,96	4,93		17	4,84	6,33	4,88	
18		6,63	5,04		18	4,8	6,67	4,83	
19		6,8	5,18		19		6,5	5,01	
20		6,29	5,27		20		6,02	4,82	
21		6,44	5,14		21		6,65	5,01	
22		6,39	4,87		22		6,76	4,9	
23		6,59	4,74		23		6,4	4,98	
24		6,45	4,55		24		6,19	4,77	
25		6,6	4,81		25		6,52	4,99	
26		6,22	4,75		26		6,56	4,66	
27		6,65	4,8		27		6,31		
28		6,28	4,87		28		6,29		
29		6,41	4,84		29		6,79		
30		6,55	4,99		30		6,32		
31		6,4	5,13		MW	4,64	6,39	4,77	6,83
32		6,66	5,2		STABW	0,36	0,32	0,18	0,22
33		6,57	5,21						
34		6,66	4,97						
35		6,6	4,81						
36		6,43	4,79						
37		6,98	4,78						
38			4,94						
MW	4,63	6,50	4,99	6,72					
STABW	0,40	0,24	0,27	0,31					

Anhang - Rohdaten

Fortsetzung Tabelle 9-5

pH-Wert									
72 Stunden (oral)					24 Stunden (dermal)				
Anzahl	Honigblase	Ventri- culus	Rectum	Hämo- lympe	Anzahl	Honigblase	Ventri- culus	Rectum	Hämo- lympe
1	4,18	6,84	4,78	6,51	1	5,52	6,65	5,66	7,07
2	4,01	6,74	4,93	6,55	2	4,98	6,55	4,92	7,16
3	3,95	6,14	4,79	7,22	3	4,7	6,37	5,06	7,04
4	4,3	6,73	4,95	7,29	4	4,64	6,24	5,12	6,81
5	4,22	6,36	4,52	7,23	5	5,19	6,6	5,26	6,92
6	3,98	6,48	4,81	7	6	4,73	6,64	5,04	7,05
7	4,11	6,54	4,7	7,04	7	5,07	6,54	4,96	
8	4,09	6,72	4,47	7,16	8	4,6	6,65	5,38	
9	3,88	6,36	4,75	7,12	9	5,18	6,76	5,17	
10	4,07	6,71	5,07	7	10	5,23	6,55	5,11	
11	4,81	6,89	4,88	7,1	11	4,71	6,73	5,06	
12	4,42	6,45	4,72	6,81	12	4,32	6,13	5,06	
13	5,25	6,43	4,92	6,61	13	4,9	6,35	5,28	
14	4,82	6,66	4,69		14	5,18	6,45	5,17	
15	4,62	6,7	4,99		15	4,38	6,31	4,98	
16	5,13	6,43	5,05		16	4,52		4,9	
17	4,74	6,42	4,72		17	4,17	6,41	5,06	
18	4,83	6,72	4,89		18		6,68	5,04	
19	3,99	6,55	4,77		19		6,71	5,05	
20	4,89	6,65	4,92		20		6,63	4,94	
21	4,45	6,8	4,82		21		6,36	4,96	
22	4,94	6,58	4,71		22		6,53	5	
23		6,6	5,08		23		6,22	5,25	
24		6,6	5,03		24		6,47	5,05	
25		6,64	4,88		25		6,66	5,05	
MW	4,44	6,59	4,83	6,97	26		6,35	4,8	
STABW	0,43	0,17	0,16	0,27	27		6,55	5,03	
					28		6,4	5,16	
					29		6,46	5,11	
					30		6,7	5,14	
					31		6,56	5,39	
					32		6,63	5,1	
					33		6,53	4,92	
					34		6,88	5,02	
					35		6,52	5,03	
					36		6,28	4,84	
					37		6,37	5,29	
					38		6,7	5,17	
					39		6,67	5,06	
					40		6,61	5,08	
					MW	4,82	6,52	5,09	7,01
					STABW	0,37	0,17	0,16	0,12

Anhang - Rohdaten

Fortsetzung Tabelle 9-5

pH-Wert									
48 Stunden (dermal)					72 Stunden (dermal)				
Anzahl	Honigblase	Ventriculus	Rectum	Hämolymph	Anzahl	Honigblase	Ventriculus	Rectum	Hämolymph
1	5,81	6,33	5,47	7,1	1	3,69	6,58	4,98	6,92
2	5,07	6,82	4,98	6,96	2	4,96	6,51	4,94	6,98
3	4,46	6,35	5,2	7,07	3	4,29	6,32	4,96	6,91
4	4,76	6,22	5,04	6,9	4	3,91	6,71	5,16	6,91
5	4,87	6,52	5,1	7	5	4,11	6,42	5,05	6,7
6	4,54	6,78	5,38		6	3,87	6,48	4,92	6,96
7	5,15	6,36	5,06		7	3,81	6,44	5,38	7,08
8	4,74	5,88	5,14		8	3,88	6,06	4,96	6,64
9	4,76	5,92	5,4		9	4,48	6,3	5,01	
10	4,8	6,08	4,98		10	4,16	6,75	4,98	
11	5,15	6,31	5,38		11	4,68	6,53	4,88	
12	5	6,55	5,26		12	4,53	6,37	5,08	
13	5,82	6,5	4,95		13	5,11	6,33	4,9	
14	5,1	6,42	5,12		14	5,05		5,02	
15	4,89	6,46	5,03		15	4,55	6,62	5,03	
16	5,46	6,35	5,06		16	4,65	6,6	5,02	
17		6,37	4,88		17	4,7	6,7	5,35	
18		6,03	5,24		18	4,48	6,52	5,14	
19		6,35	5,15		19	4,69	6,5	5,14	
20		6,49	4,99		20	4,56	6,5	5,04	
21		6,52	5,09		21	5,06	6,47	5,24	
22		6,64	4,81		22	4,77	6,56	5,16	
23		6,63	4,95		23	4,54	6,72	5,15	
24		6,55	5,2		24	4,71	6,5	4,95	
25		6,2	5,03		25	4,87	6,7	5,25	
26		6,2	5,48		26	4,73	6,4	5,03	
27			5,08		27	4,58	6,49	5,2	
28		6,59	5,41		28	4,28	6,47	5,28	
29		6,31	4,9		29	4,44	6,52	4,97	
30		6,37	5,33		30	4,63	6,34	5,49	
31		6,49	5,12		31		6,44	5,1	
32		6,27	4,87		32		6,48	5,1	
33		6,48	4,89		33		6,29	5,49	
34		6,51	4,97		34		6,48	5,26	
35		6,47	5,09		35		6,54	5,02	
36		6,43	5,04		36		6,45	5,43	
37		6,41	5,25		37		6,41	4,81	
38		6,82	5,21		38		6,48	5	
39		6,36	4,85		39		6,43	5,15	
40			5,01		40			5,1	
MW	5,02	6,40	5,11	7,01	MW	4,49	6,48	5,10	6,89
STABW	0,40	0,21	0,18	0,08	STABW	0,38	0,14	0,17	0,15

Anhang - Rohdaten

Tabelle 9-8: pH-Werte der Testgruppe Betasäuren

pH-Wert									
24 Stunden (oral)					48 Stunden (oral)				
Anzahl	Honig- blase	Ventri- culus	Rectum	Hämo- lymphe	Anzahl	Honig- blase	Ventri- culus	Rectum	Hämo- lymphe
1	5,52	6,99	4,97	6,86	1	5,22	6,62	5,56	7,14
2	5,48	6,54	4,92	6,58	2	5,01	6,43	5,12	7,31
3	5,49	6,92	5,15	6,61	3	5,72	6,41	4,53	7,45
4	5,37	6,69	5,43	7,16	4	5,55	6,16	5,13	7,16
5	5,49	6,64	5,17	7,08	5	5,9	6,62	4,86	6,99
6	5,61	6,72	5,5	7,08	6	4,9	6,53	5,11	6,82
7	4,43	6,82	5,88	6,72	7	4,7	6,41	5,01	
8	5,28	6,66	5,2	6,6	8	5,14	6,64	5,16	
9	4,62	6,68	4,71	6,6	9	5,24	6,39	4,92	
10	5,46	6,73	5,18		10	5,47	6,62	4,72	
11	4,5	6,33	5,56		11	5,61	6,37	5,77	
12	4,98	6,49	5,68		12	5,31	6,62	5,82	
13	4,3	6,83	4,75		13	5,45	6,77	6,03	
14	4,96	6,71	5,83		14	4,12	6,46	5,42	
15		6,96	5,16		15	5,73	6,78	4,52	
16		6,88	5,48		16	4,83	7,09	5,21	
17		7,01	5,28		17	4,62	6,66	4,96	
18		6,81	5,94		18	4,32	6,52	5,12	
19		6,62	5,69		19	5,7	6,2	5,59	
20		6,45	4,85		20	4,73	6,6	5,12	
21		6,7	6,04		21	4,74	6,46	5,8	
22		6,85	5,89		22		6,67	5,26	
23		6,61	5,66		23		6,46	5,11	
24		6,19	6,16		24		6,63	4,87	
25		6,44	4,96		25		6,74	4,46	
26		6,13	5,76		26		6,59	4,94	
MW	5,11	6,67	5,42	6,81	MW	5,14	6,56	5,16	7,15
STABW	0,47	0,23	0,42	0,24	STABW	0,49	0,19	0,41	0,22

Anhang - Rohdaten

Fortsetzung Tabelle 9-6

pH-Wert									
72 Stunden (oral)					24 Stunden (dermal)				
Anzahl	Honig- blase	Ventri- culus	Rectum	Hämo- lymphe	Anzahl	Honig- blase	Ventri- culus	Rectum	Hämo- lymphe
1	5,21	6,38	5,29	7,03	1	5,06	6,97	5,55	7,21
2	5,86	6,6	5,3	7,14	2	4,86	6,85	5,53	6,95
3	5,81	6,91	4,61	6,62	3	4,8	6,81	5,1	6,74
4	5,33	6,64	4,6	6,9	4	5,27	6,69	5	6,71
5	5,95	6,79	4,38	7,04	5	4,98	6,49	5,05	6,49
6	5,44	6,61	4,64		6	4,88	6,77	5,06	6,41
7	4,97	6,89	5,03		7	4,59	6,47	4,79	
8	5,28	6,65	5,71		8	4,73	6,55	5,27	
9	5,48	6,41	5,42		9	4,85	6,2	5,07	
10	5,9	6	4,74		10	4,37	6,65	5,03	
11	4,77	6,69	4,55		11	4,65	6,69	5,62	
12	5,05	6,75	5,2		12	5,49	6,85	5,67	
13	5,4	6,86	5		13	5,81	5,96	5,53	
14	4,67	6,77	5,42		14	4,6	6,82	4,85	
15	4,37	6,71	5,23		15	5,05	6,82	5,64	
16	5,53	6,7	5,03		16	4,88	6,57	5,9	
17	5,74	6,32	4,73		17	6,03	6,22	5,99	
18	5,44	6,35	5,61		18	5,25	6,69	4,99	
19		6,83	4,54		19	5,46	6,77	5,22	
20	5,14	6,54	5,56		20	5,33	6,63	4,73	
21	5,04	6,87	4,82		21		6,61	4,97	
22	5,23	6,54	4,99		22		6,76	6,01	
23	5,24	6,67	4,98		23		6,69	5,5	
MW	5,31	6,63	5,02	6,95	24		6,65		
STABW	0,41	0,22	0,38	0,20	MW	5,05	6,63	5,31	6,75
					STABW	0,42	0,23	0,39	0,30

Anhang - Rohdaten

Fortsetzung Tabelle 9-6

pH-Wert									
48 Stunden (dermal)					72 Stunden (dermal)				
Anzahl	Honig- blase	Ventri- culus	Rectum	Hämo- lymphe	Anzahl	Honig- blase	Ventri- culus	Rectum	Hämo- lymphe
1	4,97	6,82	5,17	7,03	1	6	6,99	4,7	7
2	4,68	6,48	5,27	7,2	2	5,3	6,97	5,03	6,92
3	5,95	6,91	4,79	7,31	3	5,27	6,84	4,8	6,64
4	5,36	6,6	5,19	7,13	4	5,41	6,93	5,32	6,93
5	5,13	6,69	5,21	7,04	5	5,55	6,36	4,62	6,88
6	5,31	6,66	5,52	7,13	6	5,49	6,66	4,87	6,85
7	5,36	6,39	5,5	7,22	7	5,61	6,51	5,05	
8	4,74	6,29	5,53	6,76	8	5,76	6,13	5,38	
9	5,6	6,84	4,55	7,08	9	5,19	6,45	5,38	
10	5,12	6,71	5,38	6,5	10	5,72	6,33	5,13	
11	5,69	6,3	5,19	6,95	11	5,3	6,38	4,81	
12	5,63	6,57	4,99		12	4,76	6,53	5,44	
13	5,46	6,5	5,08		13	5,22	6,62	4,88	
14	5,13	6,69	5,15		14	4,81	6,55	5,29	
15	4,93	6,55	5,17		15	6,27	6,6	4,94	
16	5,98	6,38	5,22		16	6,09	6,78	5,5	
17	4,33	6,35	5,73		17		6,36	5,65	
18	4,85	6,68	5,67		18		6,71	4,57	
19	5,23	6,4	4,86		19		6,9	4,67	
20	4,73	6,69	4,49		20		6,81	4,7	
21	4,2	6,43	5,1		21		6,36	4,88	
22	4,62	6,55	5,32		22		6,43	5,32	
23	5,41	6,32	4,86		23				
24	3,98	6,76	5,43		24				
25	4,2	6,5	5,03		25				
26		6,76			26				
MW	5,06	6,57	5,18	7,03	MW	5,48	6,60	5,04	6,87
STABW	0,54	0,18	0,31	0,23	STABW	0,42	0,24	0,32	0,12

Anhang - Rohdaten

Tabelle 9-9: Bienenmortalität und Infektionsgrad von Jungbienen im Labor

Gruppe	Test/Kontrolle	Kästchen	n	Tage nach der Infektion				
				3	8	13	19	26
			gesamt					
				Aufsummierte Mortalität				
	Kontrolle	1	30	0	1	2	5	10
2	Test	2	30	0	1	2	4	8
2	Test	3	30	1	4	5	10	17
				Infektionsgrad				
3	Test	4	30					
		Biene	1	0	0	0		
			2	0	0	0		
			3	0	0	0		
			4	0	0	0		
			5	0	0	0		
			6	0	0	0		
			7	0	0	0		
			8	0	0	0		
			9	0	0	0		
			10	0	0	0		
3	Test	5	30					
		Biene	1				0	0
			2				0	0
			3				0	0
			4				0	0
			5				0	0
			6				0	0
			7				0	0
			8				0	0
			9				0	0
			10				0	0

Anhang - Rohdaten

Tabelle 9-10: Nosema Befallsentwicklung im Flugraumvolk 1

Proben- nahme	01.10.	09.10.	17.10.	23.10.	29.10.	05.11.	13.11.	20.11.
Einzel- biene	vor Aufstellung	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche	6. Woche	7. Woche
1	0	0	0	1	1	1	1	3
2	0	0	0	0	0	1	2	2
3	0	0	0	0	1	1	2	1
4	0	0	0	0	1	1	2	1
5	0	0	0	0	1	1	2	3
6	0	0	0	0	1	0	2	3
7	0	0	0	0	0	1	2	3
8	0	0	0	0	0	1	2	3
9	0	0	0	0	0	1	1	2
10	0	0	0	0	1	1	1	3
11	0	0	0	0	1	0	1	3
12	0	0	0	1	1	1	2	3
13	0	0	0	2	1	1	2	3
14	0	0	0	0	1	0	1	2
15	0	0	0	0	1	1	2	3
16	0	0	0	0	0	0	1	3
17	0	0	0	0	0	1	1	3
18	0	0	0	0	0	1	1	3
19	0	0	0	0	0	1	0	3
20	0	0	0	0	1	1	0	1

0 kein Befall 1 schwacher Befall 2 mittlerer Befall 3 starker Befall

Anhang - Rohdaten

Tabelle 9-11: Daten der Populationsschätzung im Feldversuch

Versuchsgruppe:		Feldversuch Nosema			Standort:		Botanischer Garten		
Datum:	17.11.2014	Uhrzeit:	11:00		Volks-Nr.:	1.1	Zargen-Nr.:	Dreierboden	
Königin gesehen?	ja		Königinnenzellen?	nein		Varroa gesehen?	nein		
ggf. Gewicht vorher/nachher			/			Anzahl Varroa auf Windel			
Besonderheiten		keine			Verhalten		sanftmütig		
Waben-Nr.:	Bedeckte Fläche [Einheiten]				Einheiten mit Bienen	Einheiten mit Drohnenbrut			
	Arbeiterinnenbrut			Nektar			Pollen		
	Eier	Larven	Puppen						
1A				0,5	0,5	2			
1B						1			
2A				4	1	3			
2B				4	1	3			
3A				2		1			
3B				4	0,5	2			
Summe				14,5	3	12			
Anzahl Bienen						1320			
Krankheitssymptome?	nein								
Bemerkungen:	brutfrei								

Versuchsgruppe:		Feldversuch Nosema			Standort:		Botanischer Garten		
Datum:	17.11.2014	Uhrzeit:	11:20		Volks-Nr.:	1.3	Zargen-Nr.:	Dreierboden	
Königin gesehen?	nein		Königinnenzellen?	nein		Varroa gesehen?	nein		
ggf. Gewicht vorher/nachher			/			Anzahl Varroa auf Windel			
Besonderheiten		keine			Verhalten		sanftmütig		
Waben-Nr.:	Bedeckte Fläche [Einheiten]				Einheiten mit Bienen	Einheiten mit Drohnenbrut			
	Arbeiterinnenbrut			Nektar			Pollen		
	Eier	Larven	Puppen						
1A									
1B									
2A						1			
2B									
3A						1			
3B						1			
Summe				0	0	3			
Anzahl Bienen						330			
Krankheitssymptome?	nein								
Bemerkungen:	Futterwabe eingehängt. Schwaches Volk. Brutfrei.								

Anhang - Rohdaten

Fortsetzung Tabelle 9-12: Daten der Populationsschätzung im Feldversuch

Versuchsgruppe:		Feldversuch Nosema		Standort:		Botanischer Garten	
Datum:	17.11.2014	Uhrzeit:	11:40	Volks-Nr.:	2.3	Zargen-Nr.:	Dreierboden
Königin gesehen?	nein	Königinnenzellen?	nein	Varroa gesehen?	nein		
ggf. Gewicht vorher/nachher		/		Anzahl Varroa auf Windel			
Besonderheiten		keine		Verhalten		sanftmütig	
Waben-Nr.:	Bedeckte Fläche [Einheiten]					Einheiten mit Bienen	Einheiten mit Drohnenbrut
	Arbeiterinnenbrut			Nektar	Pollen		
	Eier	Larven	Puppen				
1A				1		2	
1B				3		1	
2A				4		1	
2B				3		2	
3A				4		1	
3B				4		1	
Summe				19	0	8	
Anzahl Bienen						880	
Krankheitssymptome?	nein						
Bemerkungen:	Pollenwabe eingehängt. Schwaches Volk. Brutfrei.						

Versuchsgruppe:		Feldversuch Nosema		Standort:		Botanischer Garten	
Datum:	17.11.2014	Uhrzeit:	12:00	Volks-Nr.:	3.1	Zargen-Nr.:	Dreierboden
Königin gesehen?	nein	Königinnenzellen?	nein	Varroa gesehen?	nein		
ggf. Gewicht vorher/nachher		/		Anzahl Varroa auf Windel			
Besonderheiten		keine		Verhalten		sanftmütig	
Waben-Nr.:	Bedeckte Fläche [Einheiten]					Einheiten mit Bienen	Einheiten mit Drohnenbrut
	Arbeiterinnenbrut			Nektar	Pollen		
	Eier	Larven	Puppen				
1A						4	
1B						4	
2A						4	
2B						4	
3A						4	
3B						1	
Summe				0	0	21	
Anzahl Bienen						2310	
Krankheitssymptome?	nein						
Bemerkungen:	Futterwabe mit Pollen eingehängt. Brutfrei.						

Anhang - Rohdaten

Fortsetzung Tabelle 9-13: Daten der Populationsschätzung im Feldversuch

Versuchsgruppe:		Feldversuch Nosema			Standort:		Botanischer Garten	
Datum:	17.11.2014	Uhrzeit:	12:30		Volks-Nr.:	10	Zargen-Nr.:	1 Zarger
Königin gesehen?	nein	Königinnenzellen?		nein		Varroa gesehen?	nein	
ggf. Gewicht vorher/nachher		/				Anzahl Varroa auf Windel		
Besonderheiten		keine			Verhalten		sanftmütig	
Waben-Nr.:	Bedeckte Fläche [Einheiten]					Einheiten mit Bienen	Einheiten mit Drohnenbrut	
	Arbeiterinnenbrut			Nektar	Pollen			
	Eier	Larven	Puppen					
1A						1		
1B						4		
2A						4		
2B				4		6		
3A				4		4		
3B						1		
Summe				8	0	19		
Anzahl Bienen						2090		
Krankheitssymptome?	nein							
Bemerkungen:	Futterwabe mit Pollen eingehängt. Brutfrei.							

Versuchsgruppe:		Feldversuch Nosema			Standort:		Botanischer Garten	
Datum:	17.11.2014	Uhrzeit:	13:00		Volks-Nr.:	23	Zargen-Nr.:	1 Zarger
Königin gesehen?	nein	Königinnenzellen?		nein		Varroa gesehen?	nein	
ggf. Gewicht vorher/nachher		/				Anzahl Varroa auf Windel		
Besonderheiten		keine			Verhalten		sanftmütig	
Waben-Nr.:	Bedeckte Fläche [Einheiten]					Einheiten mit Bienen	Einheiten mit Drohnenbrut	
	Arbeiterinnenbrut			Nektar	Pollen			
	Eier	Larven	Puppen					
1A				1		0,5		
1B				2		0,5		
2A				6		8		
2B				8		4		
3A				8		8		
3B				8		6		
4A				8		8		
4B				2		3		
Summe				43	0	38		
Anzahl Bienen						4180		
Krankheitssymptome?	nein							
Bemerkungen:	Futterwabe mit Pollen eingehängt. Brutfrei.							

Anhang - Rohdaten

Fortsetzung Tabelle 9-14: Daten der Populationsschätzung im Feldversuch

Versuchsgruppe:		Feldversuch Nosema		Standort:		Botanischer Garten	
Datum:	17.11.2014	Uhrzeit:	13:20	Volks-Nr.:	23a	Zargen-Nr.:	1 Zarger
Königin gesehen?	nein		Königinnenzellen?	nein		Varroa gesehen?	nein
ggf. Gewicht vorher/nachher		/			Anzahl Varroa auf Windel		
Besonderheiten		keine			Verhalten	sanftmütig	
Waben-Nr.:	Bedeckte Fläche [Einheiten]					Einheiten mit Bienen	Einheiten mit Drohnenbrut
	Arbeiterinnenbrut			Nektar	Pollen		
	Eier	Larven	Puppen				
1A				4		8	
1B				4		8	
2A				4		8	
2B				4		6	
3A				6		3	
3B				6		3	
4A				2		3	
4B				4		3	
Summe				34	0	42	
Anzahl Bienen						4620	
Krankheitssymptome?	nein						
Bemerkungen:	Futterwabe mit Pollen eingehängt. Brutfrei.						

Anhang - Rohdaten

Tabelle 9-15: Nosema Befallsentwicklung im Ableger 1.1

Proben- nahme	27.11.	04.12.	10.12.	16.12.	22.12.	29.12.
Einzel- biene	vor Infektion	7 Tage p.i.	13 Tage p.i.	19 Tage p.i.	25 Tage p.i.	32 Tage p.i.
Sporenmenge pro Biene bei Nosema positiven Proben						
1	0	2 11.300.000	0	2 29.850.000	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	3 63.250.000	0
6	0	2 10.150.000	0	0	3 58.750.000	1 4.750.000
7	0	0	0	0	0	2 25.100.000
8	2 32.450.000	0	0	0	0	2 25.400.000
9	0	0	0	0	0	1 5.300.000
10	2 36.050.000	0	0	0	0	1 4.900.000
11	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	3 90.650.000	0	0
13	1 7.700.000	0	0	3 67.750.000	0	2 24.600.000
14	0	0	0	0	0	2 20.900.000
15	2 21.900.000	2 10.700.000	2 25.700.000	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	1 5.600.000	2 50.550.000	0	1 7.150.000
19	0	0	0	0	0	1 7.950.000
20	2 25.550.000	0	0	0	0	0

Anhang - Rohdaten

Tabelle 9-16: Nosema Befallsentwicklung im Ableger 3.1

Proben- nahme	27.11.	04.12.	10.12.	16.12.	22.12.	29.12.
Einzel- biene	vor Infektion	7 Tage p.i.	13 Tage p.i.	19 Tage p.i.	25 Tage p.i.	32 Tage p.i.
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0

Anhang - Rohdaten

Tabelle 9-17: Nosema Befallsentwicklung im Ableger 10

Proben- nahme	27.11.	04.12.	10.12.	16.12.	22.12.	29.12.
Einzel- biene	vor Infektion	7 Tage p.i.	13 Tage p.i.	19 Tage p.i.	25 Tage p.i.	32 Tage p.i.
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0

Anhang - Rohdaten

Tabelle 9-18: Nosema Befallsentwicklung im Ableger 23

Proben- nahme	27.11.	04.12.	10.12.	16.12.	22.12.	29.12.
Einzel- biene	vor Infektion	7 Tage p.i.	13 Tage p.i.	19 Tage p.i.	25 Tage p.i.	32 Tage p.i.
	Sporenmenge pro Biene bei nosema-positiven Proben					
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	2 20.600.00
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0

Anhang - Rohdaten

Tabelle 9-19: Nosema Befallsentwicklung im Ableger 23A

Proben- nahme	27.11.	04.12.	10.12.	16.12.	22.12.	29.12.
Einzel- biene	vor Infektion	7 Tage p.i.	13 Tage p.i.	19 Tage p.i.	25 Tage p.i.	32 Tage p.i.
	Sporenmenge pro Biene bei nosema-positiven Proben					
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	1 8.200.000	1 7.700.000	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	1 9.950.000	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	2 20.550.000	0	0
10	0	0	0	2 17.800.000	0	0
11	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0

Anhang - Rohdaten

Tabelle 9-20: Nosema Befallsentwicklung im Flugraumvolk 2

Proben- nahme	15.01.	22.01.	28.01.	04.02.	11.02.	19.02.	25.02.
Einzel- biene	vor Aufstellung	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche	6. Woche
1	0	0	1	0	1	2	1
2	0	0	0	1	1	1	3
3	0	0	0	0	1	1	1
4	0	0	0	0	1	2	2
5	0	0	0	1	1	1	2
6	0	0	2	0	1	2	3
7	0	0	0	0	0	1	1
8	0	0	0	0	0	1	1
9	0	0	1	0	0	2	2
10	0	0	0	1	1	1	1
11	0	0	0	1	0	1	2
12	0	0	0	0	0	2	3
13	0	0	1	1	1	2	2
14	0	0	0	1	0	0	2
15	0	0	0	1	0	2	2
16	0	0	0	0	1	1	2
17	0	0	0	1	1	0	2
18	0	0	0	1	1	1	2
19	0	0	0	0	1	1	3
20	0	0	0	1	1	1	1

0 kein Befall 1 schwacher Befall 2 mittlerer Befall 3 starker Befall

Anhang - Rohdaten

Tabelle 9-21: 3. Tag nach Behandlung: Sporenbefall und pH Werte der Einzelbienen

	Sporenbefall						pH					
	Mitteldarm			Enddarm			Mitteldarm			Enddarm		
Biene	OX	BS	KO	OX	BS	KO	OX	BS	KO	OX	BS	KO
1	0	1	1	0	0	1	6,47	5,95	5,45	5,23	4,96	4,67
2	0	0	3	0	1	3	5,99	6,28	5,95	5,05	5,07	4,74
3	0	0	1	0	0	1	5,92	5,98	5,48	4,63	4,61	4,56
4	0	1	1	0	0	2	5,83	6,17	6,25	4,72	4,85	5,31
5	-	0	1	0	1	1		5,81	6,21		4,64	4,77
6	-	-	-	3	1	1	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	0	3	1	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	1	2	1	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	0	1	1	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	1	1	0	-	-	-	-	-	-

Tabelle 9-22: 8. Tag nach Behandlung: Sporenbefall und pH Werte der Einzelbienen

	Sporenbefall						pH					
	Mitteldarm			Enddarm			Mitteldarm			Enddarm		
Biene	OX	BS	KO	OX	BS	KO	OX	BS	KO	OX	BS	KO
1	0	0	2	3	1	3	-	-	-	-	-	-
2	0	0	2	1	0	3	-	-	-	-	-	-
3	1	0	1	1	1	1	5,93	-	-	4,63	-	-
4	0	0	0	1	3	0	-	-	-	-	-	-
5	0	0	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-
6	0	1	1	3	0	2	-	6,3	-	-	5,12	-
7	0	0	1	1	0	2	-	-	-	-	-	-
8		0	0	1	0	0	-	-	-	-	-	-
9		0	0	1	2	0	-	-	-	-	-	-
10		0	1		1	1	-	-	-	-	-	-

Anhang - Rohdaten

Tabelle 9-23: 13. Tag nach Behandlung: Sporenbefall und pH Werte der Einzelbienen

Biene	Sporenbefall						pH					
	Mitteldarm			Enddarm			Mitteldarm			Enddarm		
	OX	BS	KO	OX	BS	KO	OX	BS	KO	OX	BS	KO
1	1	1	1	1	2	1	6,12	6,28	6,34	5,4	5,3	5,49
2	1	1	2	1	1	2	6,2	5,89	5,4	5,56	5,02	4,98
3	-	1	-	1	1	1	-	6,24	-	-	5,22	-
4	-	1	-	2	2	2	-	6,04	-	-	5,42	-
5	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	1	2	1	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	2	1	2	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-

Tabelle 9-24: 16. Tag nach Behandlung: Sporenbefall und pH Werte der Einzelbienen

Biene	Sporenbefall						pH					
	Mitteldarm			Enddarm			Mitteldarm			Enddarm		
	OX	BS	KO	OX	BS	KO	OX	BS	KO	OX	BS	KO
1	1	3	1	1	1	2	5,68	5,89	6,19	4,56	5,34	4,96
2	1	2	1	1	3	3	5,99	6,43	6,28	4,47	5,66	5,56
3	1	1	2	1	1	1	6,41	6,39	6,21	4,9	6,44	4,94
4	1	2	1	1	1	2	6,53	6,05	6,29	-	5,41	5,52
5	2	-	1	1	1	2	6,71	-	6,34	-	-	5,08
6	-	-	-	1	1	3	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	1	2	0	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	1	1	2	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	3	3	1	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	1	3	2	-	-	-	-	-	-

Anhang - Rohdaten

Tabelle 9-25: 26. Tag nach Behandlung: Sporenbefall und pH Werte der Einzelbienen

Biene	Sporenbefall						pH					
	Mitteldarm			Enddarm			Mitteldarm			Enddarm		
	OX	BS	KO	OX	BS	KO	OX	BS	KO	OX	BS	KO
1	3	1	1	3	1	1	6,11	6,42	5,61	5,04	5,99	4,74
2	2	1	3	2	3	3	6,24	6,18	6,25	4,73	4,87	5,68
3	1	2	3	1	2	3	5,73	6,13	6,19	4,64	5,85	5,81
4	2	2	3	3	2	2	6,18	6,34	6,21	6,01	5,34	4,6
5	2	-	-	2	1	2	6,06	-	-	5,09	-	-
6	-	-	-	2	1	3	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	3	1	2	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	2	3	1	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	2	3	3	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	1	1	3	-	-	-	-	-	-

Tabelle 9-26: 35. Tag nach Behandlung: Sporenbefall und pH Werte der Einzelbienen

Biene	Sporenbefall						pH					
	Mitteldarm			Enddarm			Mitteldarm			Enddarm		
	OX	BS	KO	OX	BS	KO	OX	BS	KO	OX	BS	KO
1	-	2	1	-	2	1	-	6,3	6,16	-	5,07	5,58
2	-	2	1	-	3	1	-	5,88	6,03	-	4,71	5,28
3	-	2	2	-	2	1	-	5,86	6,17	-	4,63	5,01
4	-	2	1	-	2	3	-	5,99	6,32	-	4,66	5,57
5	-	2	1	-	2	1	-	6,38	6,12	-	5,1	4,93
6	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	2	2	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-		2	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-		2	-	-	-	-	-	-

0 kein Befall 1 schwacher Befall 2 mittlerer Befall 3 starker Befall

Anhang - Rohdaten

Tabelle 9-27: Auszählungen der *Nosema* positiven Einzelproben nach Cantwell (1970)

Gruppe	Probe	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Summe	Anzahl Sporen/Biene
1.1 vom 16.12.2014	Biene 1	109	117	121	124	126	597	29.850.000,00
1.1 vom 16.12.2014	Biene 12	370	375	345	343	380	1813	90.650.000,00
1.1 vom 16.12.2014	Biene 13	260	287	265	287	256	1355	67.750.000,00
1.1 vom 16.12.2014	Biene 18	144	186	205	240	236	1011	50.550.000,00
10 vom 29.12.14	Biene 20	0	0	2	0	0	2	100.000,00
1.1 vom 27.11.14	Biene 8	133	146	112	123	135	649	32.450.000,00
1.1 vom 27.11.14	Biene 10	164	159	125	133	140	721	36.050.000,00
1.1 vom 27.11.14	Biene 13	26	16	31	43	38	154	7.700.000,00
1.1 vom 27.11.14	Biene 15	63	79	84	110	102	438	21.900.000,00
1.1 vom 27.11.14	Biene 20	114	105	96	102	94	511	25.550.000,00
23 vom 29.12.14	Biene 6	38	51	86	112	125	412	20.600.000,00
1.1 vom 22.12.14	Biene 5	256	196	270	278	265	1265	63.250.000,00
1.1 vom 22.12.14	Biene 6	195	245	258	243	234	1175	58.750.000,00
1.1 vom 10.12.14	Biene 15	114	106	88	98	108	514	25.700.000,00
1.1 vom 10.12.14	Biene18	15	18	24	32	23	112	5.600.000,00
1.1 vom 29.12.14	Biene 6	18	25	14	17	21	95	4.750.000,00
1.1 vom 29.12.14	Biene 7	100	78	105	109	110	502	25.100.000,00
1.1 vom 29.12.14	Biene 8	101	75	107	110	115	508	25.400.000,00
1.1 vom 29.12.14	Biene 9	15	21	18	24	28	106	5.300.000,00
1.1 vom 29.12.14	Biene 10	14	25	23	17	19	98	4.900.000,00
1.1 vom 29.12.14	Biene 13	88	94	98	110	102	492	24.600.000,00
1.1 vom 29.12.14	Biene 14	75	89	95	80	79	418	20.900.000,00
1.1 vom 29.12.14	Biene 18	23	32	35	28	25	143	7.150.000,00
1.1 vom 29.12.14	Biene 19	29	32	34	25	39	159	7.950.000,00
1.1 vom 04.12.14	Biene 1	40	36	51	47	52	226	11.300.000,00
1.1 vom 04.12.14	Biene 6	38	41	48	41	35	203	10.150.000,00
1.1 vom 04.12.14	Biene 15	35	42	47	38	52	214	10.700.000,00
23A vom 16.12.	Biene 5	28	32	28	35	41	164	8.200.000,00
23A vom 16.12.	Biene 9	74	88	91	80	78	411	20.550.000,00
23A vom 16.12.	Biene 10	68	75	78	70	65	356	17.800.000,00
23A vom 22.12.	Biene 5	28	30	35	27	34	154	7.700.000,00
23A vom 22.12.	Biene 7	38	35	42	39	45	199	9.950.000,00

Anhang - Rohdaten

Fortsetzung Tabelle 9-28

Gruppe	Probe	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Summe	Anzahl Sporen/Biene
3dBSMD	B1	11	9	13	15	10	58	2.900.000,00
3dBSMD	B4	12	10	9	11	14	56	2.800.000,00
3dKOMD	B1	13	15	10	8	7	53	2.650.000,00
3dKOMD	B2	256	248	260	241	262	1267	63.350.000,00
3dKOMD	B3	11	15	9	13	10	58	2.900.000,00
3dKOMD	B4	8	7	10	12	10	47	2.350.000,00
3dKOMD	B5	11	13	9	8	11	52	2.600.000,00
8dOXMD	B3	15	13	9	13	11	61	3.050.000,00
8dBSMD	B6	18	16	14	11	15	74	3.700.000,00
8dKOMD	B1	78	75	68	70	65	356	17.800.000,00
8dKOMD	B2	55	60	59	62	60	296	14.800.000,00
8dKOMD	B3	22	25	24	28	27	126	6.300.000,00
8dKOMD	B5	19	21	25	24	28	117	5.850.000,00
8dKOMD	B6	13	11	9	12	11	56	2.800.000,00
8dKOMD	B7	15	12	10	12	17	66	3.300.000,00
8dKOMD	B10	18	21	25	22	20	106	5.300.000,00
16dOXMD	B1	35	37	40	42	40	194	9.700.000,00
16dOXMD	B2	32	25	33	35	39	164	8.200.000,00
16dOXMD	B3	19	17	15	18	15	84	4.200.000,00
16dOXMD	B4	24	26	20	22	25	117	5.850.000,00
16dOXMD	B5	62	70	75	76	72	355	17.750.000,00
16dBSMD	B1	235	219	220	225	230	1129	56.450.000,00
16dBSMD	B2	80	85	89	92	90	436	21.800.000,00
16dBSMD	B3	35	45	39	42	38	199	9.950.000,00
16dBSMD	B4	110	108	115	120	122	575	28.750.000,00
16dKOMD	B1	8	12	15	9	10	54	2.700.000,00
16dKOMD	B2	15	17	12	10	11	65	3.250.000,00
16dKOMD	B3	48	50	59	62	55	274	13.700.000,00
16dKOMD	B4	10	15	17	12	14	68	3.400.000,00
16dKOMD	B5	25	32	36	30	39	162	8.100.000,00