

**Verbundprojekt:**

**Sicherheitsforschung und Monitoring-Methoden zum Anbau von Bt-Mais**

**Teilprojekt:**

**Auswirkungen von Bt-Maispollen auf die Honigbiene –  
Methodenentwicklung zu Wirkungsprüfung und  
Monitoring**

**Förderkennzeichen: 031631J**

**Schlußbericht 2004**

**zu Nr. 3.3. BNest-BMBF 98**

**Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Institut für Ernährungswissenschaften  
LB Apidologie  
Am Steiger 3  
07443 Jena**

**Projektleiter: Prof. Dr. Hans-Hinrich Kaatz  
Martin-Luther-Universität Halle  
Institut für Zoologie  
Molekulare Ökologie  
Hoher Weg 4  
06099 Halle**

**Förderungsbescheid vom 13.06.2001  
Berichtszeitraum vom 30.6.2001 – 31.12.2004**

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Kurzdarstellung .....	1
II. Eingehende Darstellung – Ergebnisse .....	5
1. Modul 1: Prüfung der Wirkung von Bt-Maispollen auf Honigbienen im Labor .....	5
2. Modul 2: Prüfung der chronischen Wirkung von Bt-Maispollen auf Honigbienen ...	17
im Freiland	
Bt 176	
Mon810	
3. Modul 3: Anbaubegleitendes Monitoring .....	39
II.4. Voraussichtlicher Nutzen .....	43
II.5. Fortschritt auf dem Gebiet bei anderen Stellen	
II.6. Veröffentlichungen	
III. Literatur .....	44
Anlagen zum Schlussbericht	
- Erfolgskontrollbericht	
-  Berichtsblatt BMBF 3831	
- Document Control Sheet BMBF 3832	

# I . Kurzdarstellung

## I.1. Aufgabenstellung

Bei zukünftig zu erwartendem großflächigen Anbau von Bt-Mais ist Sorge zu tragen, dass das gentechnische Pflanzenschutzprinzip tatsächlich nützlichsschonende Eigenschaften besitzt. Am Modell der Honigbiene, die als Bestäuber eine überragende Bedeutung im Naturhaushalt und in der Landwirtschaft hat, weil sie etwa 70% aller Blütenpflanzen bestäubt, sollen folgende Hypothesen widerlegt werden:

- 1. Der großflächige Anbau von Bt-Mais hat Auswirkungen auf wichtige phytophage Nichtziel-Organismen wie die Honigbiene.*
- 2. Die Wirkung der Bt-Endotoxine bei der Aufnahme mit dem Pollen ist stärker als die Wirkung von schon seit Jahren im Pflanzenschutz eingesetzten Bt-Präparate.*

Dazu soll im Rahmen des Fördervorhabens „Auswirkungen von Bt-Maispollen auf die Honigbiene - Methoden zu Wirkungsprüfung und Monitoring“ (FKZ BMBF 031631J) als Teil des BMBF-Verbundprojektes „Sicherheitsforschung und Monitoring-Methoden zum Anbau von Bt-Mais“ ein standardisiertes Verfahren von Langzeittests mit Labor- und Freilandversuchen entwickelt werden., das erlaubt, auch langfristige Auswirkungen von Bt-Mais auf Honigbienen-Völker zu prüfen. So können eventuell auftretende Wirkungen, die sich nicht mit einfachen Toxizitätsprüfungen erfassen lassen, wie sie bei der Zulassung von Pflanzenschutzmitteln üblich sind, vorhergesagt und damit weitreichende Störungen im Ökosystem vermieden werden, die durch ein mögliche Verminderung der Bestäuberfunktion der Honigbiene ausgelöst werden könnten. Letztendlich soll ein Methodenprüfplan zur Wirkungsprüfung und zum Monitoring von transgenen Pflanzen mit Honigbienen etabliert werden, der ggf. in zukünftige Zulassungsverfahren für transgene Pflanzen einbezogen werden kann..

## I.2. Voraussetzungen

Das Projekt wurde an den Universitäten Jena (Lehrbereich Bienenkunde) und Halle-Wittenberg (Institut für Zoologie, AG Molekulare Ökologie) durchgeführt. Beide Einrichtungen verfügen über die notwendige Infrastruktur, Versuchstiere und Expertise, da schon zuvor Pilot-Versuche an gentechnisch verändertem, herbizidresistentem Raps durchgeführt wurden. Für die Untersuchungen erforderliche Bt-Mais-Versuchsflächen wurden im Rahmen des Verbundprojektes 2001-2003 zur Verfügung gestellt. Pollen für die im Jahr 2004 durchgeführten Experimente konnten aus Anbauflächen in Sachsen-Anhalt gewonnen werden.

## I.3. Ablauf des Projektes

Die Versuche gliederten sich in drei aufeinander aufbauende Module:

1. Prüfung der Wirkung von Bt-Maispollen auf Honigbienen im Labor.
2. Prüfung der Wirkung von Bt-Maispollen auf Honigbienen im Freiland (kontrollierte Flugzeltbedingungen)
3. Anbaubegleitendes Monitoring

Im Modul 1 wurde die Wirkung von Bt-Maispollen und des Bt-Toxins an Bienen unterschiedlichen Alters geprüft. In Modul 2 wurden auf Grundlage der Ergebnisse von Modul 1 von 2001 bis 2004 Wirkungsprüfungen von Bt176 und Mon810 an freiliegenden Kleinstbienenvölkern durchgeführt. Für diese Untersuchungen standen uns auf dem Versuchsfeld bei Halle gesammelter Maispollen (Event Bt 176) und das vom Verbund-Kooperationspartner Herrn Dr. Jehle und Mitarbeitern (SLFA Neustadt) gentechnisch aus E.coli erzeugte trypsinierte Toxin aus der Maispflanze zur Verfügung.

Dabei wurden über einen sechs-wöchigen Expositionszeitraum kontinuierlich

Entwicklungsparameter der Bienenvölker gewonnen, ihre Brutpflege- und Sammelaktivität erfasst und am Ende des Versuches das Gewicht der schlüpfenden Jungbienen und ihrer Lebensdauer bestimmt. Der Versuchszeitraum erstreckte sich damit auf zwei aufeinanderfolgende Brutzyklen und trägt damit in einer Art „worst-case“-Szenario dem Aspekt biologischer Sicherheit besondere Rechnung. Maispollen steht Bienenvölkern in der Natur oft nur wenige Tage höchstens 2 Wochen als Eiweißquelle zur Verfügung. Im Modul 3 wurde in Freilandversuchen die Wirkung des natürlichen vorkommenden Bt-Pollens an freifliegenden Großvölkern am Standort bei Halle untersucht.

Das Teilprojekt wurde mit Schreiben vom 13.06.2001 bewilligt. In dem Jahr wurde auch die Arbeit am Projekt begonnen. Erst im Februar 2003 wurde die Doktorandin Ellen A. Schlüns (geb. Frank) für ein Jahr und 4 Monate eingestellt. Ferner haben die Kandidatinnen Judith Arlt und Kathrin Neumann mitgearbeitet. Bei der manuellen Ernte von Bt-Maispollen und den Freilandversuchen haben in Jena die Mitarbeiterinnen Elke Woker (Imkermeisterin) und Heide Becker (LTA) und in Halle eine Reihe von Studierenden mitgearbeitet. 2004 wurden die Experimente mit der Arbeit zu Bt Mon 810 abgeschlossen.

#### **I.4. Stand der Forschung – Zusammenfassung der Ergebnisse**

Zur Beginn des Projektes gab es nur wenige Publikationen zu negativen Wirkungen von Bt-Endotoxinen auf den Modelorganismus Honigbiene. U.a. wurde die Sammelaktivität der Bienen (Picard-Nizou et al. 1997) und die Viabilität der adulten Bienen (Vandenberg & Shimanuki 1986, Malone et al. 1999) bei hoher Dosierung beeinträchtigt.

##### *Modul 1: Prüfung der Wirkung von Bt-Maispollen auf Honigbienen im Labor*

###### **• Toxizität für adulte Honigbienen**

Das gentechnisch veränderte Bt-Toxin CryIAb (Event Nov 176) erwies selbst bei 100-fach höherer als der im Pollen natürlich vorkommenden Dosis nicht als akut toxisch für adulte Honigbienen, wenn sie diesem in einem Käfig über einen Zeitraum von 4 Tagen kontinuierlich ausgesetzt waren.

###### **• Entwicklung eines Laborassays zur Prüfung der chronischen Toxizität an Postembryonalstadien**

Für die Prüfung der chronischen Toxizität an Postembryonalstadien gibt es noch kein Standardverfahren. Die bisherigen bei der Pflanzenschutzmittel-Prüfung verwendeten Brutttests für akut toxische Toxizität sind für Fragen zur chronischen Toxizität nicht geeignet. Deshalb sollte ein neues Verfahren entwickelt werden. Erst im Verlauf des Forschungsprojekts - als Ergebnis aus den Freilandexperimenten - stellte sich heraus, dass für eine hinreichend aussagekräftige statistische Analyse der Brutpflegeaktivität mindestens 200 Brutzellen individuell verfolgt werden müssen, weil die Brutpflegeaktivität zwischen Kleinstvölkern trotz identischer Ausgangsbedingungen erheblich variiert (vgl. Modul 2). Eine Reihe von Einflußfaktoren wie Königinpräsenz, Bienenzahl, Temperatur, Wasserversorgung, Honigaufnahme und Wabengröße für die Aufzucht von 200 Larven wurde geprüft. Bisher lassen sich in Käfigen noch keine ausreichenden Zahlen an Larven aufziehen. Dagegen gelingt die Aufzucht von mehr als 200 Larven bis zum Ende ihrer Fressphase in freifliegenden Kleinstvölkern mit 300 Bienen, unabhängig davon, ob konstant hohe Umgebungstemperaturen (Brutschrank) oder tagesklimatische Schwankungen auftreten. Für die mangelnde Brutpflegeleistung in den Käfigversuchen müssen demnach weitere Faktoren verantwortlich sein. In erster Linie kommen Flug- bzw. Sammelaktivität, Defäkation und Pollenversorgung in Betracht. Sie müssen in zukünftigen Experimenten geprüft werden.

- chronische Toxizität für postembryonale Stadien der Honigbienen

Um dennoch Aussagen zur chronischen Toxizität von CryIAb auf postembryonale Stadien der Bienen treffen zu können, wurden Larven *in vitro* nach der Methode von Wittmann et al. (1981) aufgezogen. Dabei wurde der halbsynthetische Larvenfuttersaft mit dem CryIAb Toxin versetzt. Die Larven waren so während ihrer gesamten Fressphase dem Toxin ausgesetzt. Zum Vergleich wurden Larven ohne Toxin *in vitro* aufgezogen. Die Zahl überlebender Larven unterschied sich nicht zwischen den beiden Gruppen (n=540), so dass das Bt-Toxin CryIAb nicht als chronisch toxisch für Bienenlarven angesehen werden kann.

*Modul 2: Prüfung der chronischen Wirkung von Bt-Maispollen auf Honigbienen im Freiland*

Die chronische Wirkung des Toxins aus Maispflanzenpollen (Event Bt176 und Mon810) wurde in Halbfreilandversuchen an Bienenvölkern im Flugzelt in vier aufeinanderfolgenden Untersuchungsjahren geprüft. Dabei wurden Bienenvölker über einen Zeitraum von sechs Wochen verschiedenen Bt-Pollen und Toxinmengen ausgesetzt. Bei der Sorte Novartis Bt176 wurden die im Feld gesammelten Maispollen sowie Maispollen, die mit doppelter und mit 10-facher Toxinmenge versetzt wurden, untersucht. Bei der Sorte Mon810 wurde der frisch gesammelte Pollen in den Versuchen eingesetzt.

Nach Exposition mit der 10-fach höheren als der im Maispollen auftretenden Dosis an CryIAb, traten an Völkern, die durch den Befall mit dem Mikrosporidium *Nosema apis* geschwächt waren, starke Verluste auf, die bei den Bt-Völkern signifikant höher waren. Die aufgrund der Daten neu entstandene Frage, in welcher Weise durch Krankheitserreger geschwächte Bienen durch Bt-Toxine negativ beeinflusst werden, konnte in diesem Projekt nicht beantwortet werden. Dies lag vor allem daran, dass noch keine Methode existiert, mit der große Mengen an *Nosema*-Sporen für eine gezielte Inokulation ganzer Bienenvölker erzeugt werden können. Initiale Versuche mit der Arbeitsgruppe von Prof. Jacobs (Universität Gent, Belgien) zur Massenvermehrung der *Nosema in vitro* schlugen fehl. Hier muss erst eine entsprechende Technologie entwickelt werden. Sie wird Gegenstand eines eigenständigen Forschungsprojektes werden.

Bei gesunden oder mit dem Antibiotikum Fumagillin vor einer Nosematose geschützten Bienenvölkern wurden bei Exposition mit der ein- und zweifachen Dosis von Bt176 und der einfachen Dosis von Mon810 keine negativen Wirkungen beobachtet. Weder die Zahl adulter Bienen oder Entwicklungsstadien, noch die Sammel- und Brutpflegeaktivität der Völker unterschieden sich zwischen den Versuchsgruppen. Auch das Schlupfgewicht junger Bienen unterschied sich nicht. D.h., dass gesunde Bienenvölker selbst bei extremer Exposition mit Bt-Maispollen über einen Zeitraum von sechs Wochen durch das Toxin in keiner der untersuchten Vitalfunktionen Volksstärke, Sammelaktivität, Brutpflegeaktivität und Entwicklung beeinträchtigt werden.

*Modul 3: Anbau begleitendes Monitoring der Wirkung von Bt-Maispollen auf Bienenvölker*

Schließlich wurde die Entwicklung von Bienenvölkern in der Nähe von Maisfeldern im Sinne eines Monitoring verfolgt. Dazu wurden Bienenvölker 2003 in die Nähe der Bt-Mais-Versuchsflächen bei Radegast (Sachsen-Anhalt) gestellt, um ihre Entwicklung während und nach der Maisblüte unter natürlichen Bedingungen zu verfolgen. Außerdem wurde die Sammelaktivität der Bienen im Feld erfasst und der von den Völkern gesammelte Pollen quantifiziert. Die Kontrollvölker wurden an einem nahegelegenen Standort mit konventionellem Mais untersucht. An fünf Untersuchungstagen während der Maisblüte sammelten die Bienen nur zu einem sehr geringen Teil Maispollen. Er beträgt am Bt-Feld lediglich 2,3%, am Kontrollstandort 2,6% der mit Pollenfallen gewonnenen und mikroskopisch bestimmten

Pollenhöschen. Negative Effekte von Bt-Maispollen auf die Zahl der Bienen und die Entwicklung der Brut in den Völkern traten nicht auf, beide Gruppen unterscheiden sich in ihrer Entwicklung während des Spätsommers nicht. Auch die Überwinterungsfähigkeit und die Frühjahrsentwicklung der Bienenvölker beider Gruppen unterschieden sich nicht.

### **Fazit**

Generell kann aufgrund der Ergebnisse der Halbfreiland und Freilandversuche eine chronisch toxische Wirkung von Bt-Mais der Sorten NovBt176 und Mon810 auf gesunde Honigbienenvölker nicht nachgewiesen werden. Berücksichtigt man dazu noch die gegenüber den herkömmlichen, gesetzlich vorgeschriebenen Pflanzenschutzmittelprüfungen wesentlich erhöhten Stichprobenzahlen und die extremen 6-wöchigen Expositionen mit den Bt-Toxinen, dann kann eine toxische Wirkung auf gesunde Bienen unter natürlichen Bedingungen nach den erfolgten umfangreichen Untersuchungen mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden. Dieses zentrale Ergebnis wird noch dadurch untermauert, dass Honigbienen selbst in den ostdeutschen Agrarräumen mit großen Maisschlägen nur wenig Maispollen sammeln, wenn andere Pflanzen als Pollenquellen zur Verfügung stehen. In unseren Untersuchungen betrug der Anteil an Maispollen unter 5% des gesammelten Pollens. Selbst dann, wenn Bienenvölker ausschließlich Pollen der o.a. GV-Maispflanzen sammeln würden, wie es in den Zeltversuchen simuliert wurde, kann mit der durch die Stichprobenzahl bedingten Power ausgeschlossen werden, dass sich Bt-Maispollen der Sorten Mon810 und Novartis Bt176 negativ auf gesunde Bienenvölker auswirken.

Die eingangs aufgestellte Hypothese, dass der großflächige Anbau von Bt-Mais Auswirkungen auf wichtige phytophage Nichtziel-Organismen wie die Honigbiene habe, kann durch das vorliegende Datenmaterial nicht gestützt werden. Auch die Hypothese, dass die Wirkung der Bt-Endotoxine bei der Aufnahme mit dem Pollen stärker ist als die Wirkung von schon seit Jahren im Pflanzenschutz eingesetzten Bt-Präparate, trifft angesichts der fehlenden Wirkung von Bt-Toxinen auf gesunde Bienenvölker nicht zu.

## **I. 5 Kooperationen**

Das Projekt wurde als Teilprojekt des Verbundprojektes „Sicherheitsforschung und Monitoring-Methoden zum Anbau von Bt-Mais“ durchgeführt, an dem neben der RWTH Aachen (Prof. Schuphan, Lehrstuhl für Biologie V) als Projektkoordinator, die Biologische Bundesanstalt mit ihren Instituten in Darmstadt und Braunschweig, das MPI für chemische Ökologie, die Universitäten Göttingen, München, Trier, München, und die Bayrische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau (LBP) beteiligt waren. Als ausgesprochen verlässlicher Servicepartner stand die AG Jehle der SFLA Rheinland-Pfalz zur Verfügung und lieferte stets prompt die gewünschten Mengen an Bt-Toxinen. Über die halbjährlichen Koordinationstreffen hinaus, die ein wesentliches, ja unverzichtbares Element für notwendige technische Absprachen und für einen erforderlichen Gedankenaustausch darstellen, und auf denen es auch gelang, die jeweiligen Ansätze kritisch zu beleuchten, ergaben sich auch kleinere Phasen konkreter Zusammenarbeit mit Kooperationspartnern unseres Verbundes, die ursprünglich nicht mit eingeplant waren. Bei uns insbesondere mit der AG Einspanier (Weihenstephan) und der AG Lang (LBP). Für die initialen Versuche zur Gewinnung von Sporen des *Microsporidium Nosema apis* kooperierten wir außerdem mit Prof. F. Jacobs (Universität Gent, Belgien)

## II. Eingehende Darstellung der Ergebnisse

### II. 1. Modul 1:

#### *Prüfung der Wirkung von Bt-Maispollen auf Honigbienen im Labor.*

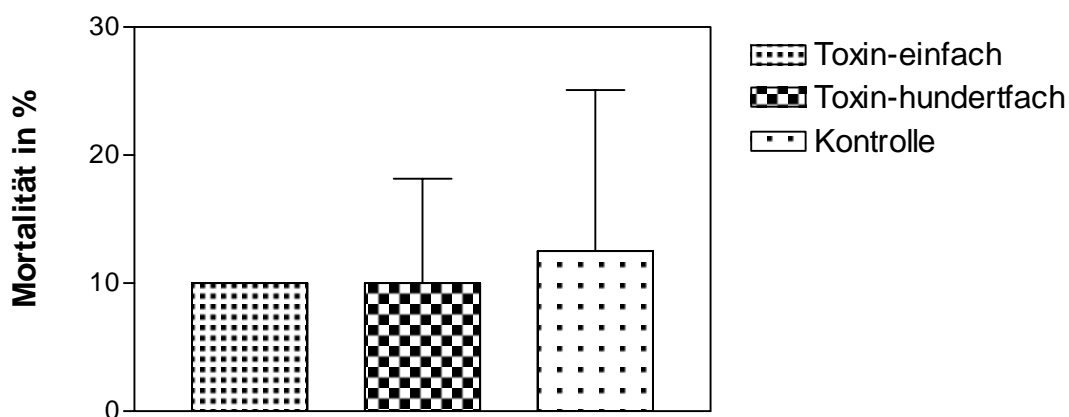
Ziel des Moduls 1 ist es die chronische Toxizität des Bt-Toxins CryIAb auf postembryonale und adulte Stadien der Honigbiene im Labor abschätzen zu können. Dazu soll ein Verfahren entwickelt werden, dass die Aufzucht vielen Larven im Labor erlaubt.

### II. 1.1. Toxizität des CryIAb für adulte Honigbienen

Zunächst wurden Käfigversuche im Labor mit adulten Bienen durchgeführt, denen Bt-Maispollen nebst Zuckerwasser für vier Tage als Nahrung zur Verfügung stand. Z.T. wurde der Maispollen zusätzlich mit höheren Dosen an Bt-CryIAb-Toxin versetzt. Mit diesem Experimenten sollte vorab geprüft werden, ob sich das Toxin in hohen Dosen auf die Lebensfähigkeit und das Futteraufnahmeverhalten der Bienen auswirkt. Zudem waren diese Experimente Voraussetzung für die Freilandversuche.

#### *Altersstadien*

Bei der Auswahl der adulten Bienen für den Käfigversuch wurden letztlich altersdefinierte Jungbienen (0-1 Tag) verwendet. In einer Serie von Versuchen hatte sich herausgestellt, dass 1. zufällig ausgewählte Bienen aus einem Volk ebenso wie 2. die Gruppe der Sammlerinnen, und damit der älteren Bienen, und 3. die Gruppe der Brutpflegenden Ammenbienen, und damit der jüngeren bis ca. 14 Tage alten Bienen, bisweilen eine Mortalität aufwiesen, die über dem von der OECD akzeptierten Grenzwert von 10% in den unbehandelten Kontrollen lagen (vgl. Abb. 1). Diese erhöhte Mortalität der Versuchsgruppen erklärte sich aus der gegenüber dem OECD-Test um das Doppelte verlängerten Versuchsdauer. Dabei starben die Bienen verstärkt während der letzten beiden Versuchstage.



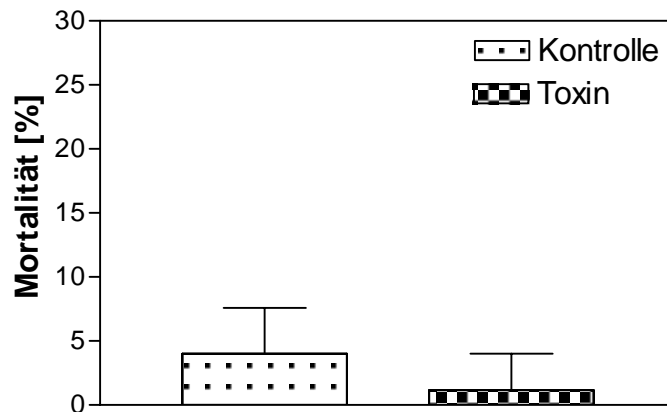
**Abb.1 Wirkung von *Bacillus thuringiensis* Toxin CryIAb auf die Mortalität von Stockbienen**

Durchschnittliche Mortalität  $\pm$  SD in Prozent im Käfigversuch bei Fütterung mit dem Futterteig-Pollen-Gemisch 2:1 mit bzw. ohne Toxin; n = 4 Käfige mit je 10 Bienen; kein signifikanter Unterschied im U-Test,  $p > 0,05$ .

#### *Toxinwirkung*

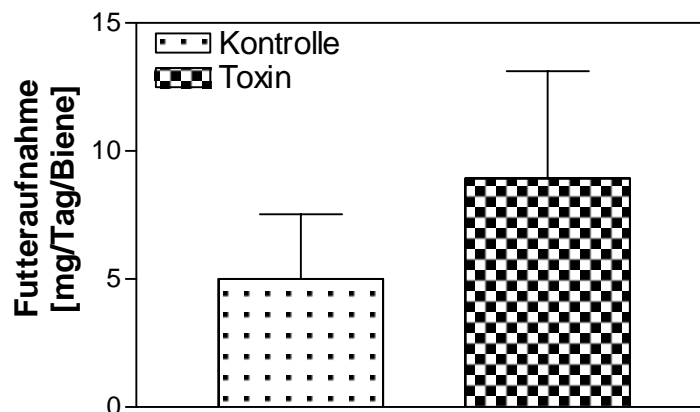
Selbst bei Toxinapplikationen, die um das 100-fache über der im Maispollen vorkommenden und von Herrn Jehle gemessenen Konzentration liegen, ist nach einer Exposition über vier Tage weder eine erhöhte Mortalität (Abb. 2) noch ein verändertes Futteraufnahmeverhalten der Jungbienen hinsichtlich Pollenkonsum und der Aufnahme von Zuckerlösung nachweisbar (Abb.

3).



**Abb.2 Wirkung von *Bacillus thuringiensis* Toxin CryIAb auf die Mortalität von Jungbienen**

Durchschnittliche Mortalität bei Fütterung mit dem Futterteig-Pollen-Gemisch 2:1 mit bzw. ohne Toxin  $\pm$ SD in Prozent im Käfigversuch; n = 9 Käfige mit je 10 Bienen; U-Test nicht signifikant,  $\alpha=0,05$ .



**Abb.3 Wirkung von *Bacillus thuringiensis* Toxin CryIAb (100-fach) auf die Futteraufnahme von Jungbienen**

Durchschnittlicher Futterverbrauch vom Futterteig-Pollen-Gemisch 2:1 mit bzw. ohne Toxin in mg  $\pm$  SD/Tag/Biene im Käfigversuch; n = 12 Käfige mit je 10 Bienen; U-Test nicht signifikant,  $\alpha=0,05$

**Fazit:** Das gentechnisch veränderte Toxin wirkt sich bei viertägiger Exposition hinsichtlich Mortalität und Futteraufnahme nicht negativ auf Jungbienen und andere adulte Altersstadien im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe aus. Die in der Pflanze (*Bt 176*) vorkommende Menge an CryIAb kann also für adulte Bienen als akut ungefährlich angesehen werden.



## II. 1.2. Entwicklung eines Laborassays zur Toxizitätsprüfung an Kleinstvölkern

Die meisten bisherigen Untersuchungen über die Auswirkungen von genetisch veränderten Pflanzen auf die Brutentwicklung und -pflege wurden meist an größeren Völkern unter natürlichen Umweltbedingungen durchgeführt (Malone & Pham-Delégue, 2001). Laborversuche beschränkten sich darauf, die Auswirkung an einer kleinen Anzahl adulter Bienen zu untersuchen. Um Aussagen über chronische Wirkung des Toxins vor allem auf die empfindlichen Entwicklungsstadien der Honigbiene treffen zu können, wäre die Entwicklung eines einfachen Testverfahrens, bei dem die Wirkung von gentechnisch veränderten Pflanzen auf Brutentwicklung und Brutpflege im Labor untersucht werden kann, ein wesentlicher Fortschritt in der Prüfmethode. Existierende Larventests, wie das von Wittmann (1981) entwickelte *in vitro*-Verfahren mit manueller Fütterung der Larven zweimal täglich, sind als Routineverfahren für Testlabors viel zu aufwendig und kostenintensiv. Seit Mitte 2002 wurde deshalb an der Entwicklung von Brutaufzuchtmethoden im Labor, d.h. der Aufzucht von Bienenbrut in Ein-Wabeneinheiten im Brutschrank, gearbeitet. Ziel ist die Entwicklung eines standardisierten Laborassays.

Die vorliegenden Versuche mit gekäfigten Kleinstvölkern bilden die ersten Schritte zu solch einem Testverfahren und sollten die Rahmenbedingungen klären, unter denen Arbeiterinnen in der Lage sind, mindestens 200 Larven bis zum Ende der Fressphase zu pflegen, die mit der Verdeckelung der Brutzellen abschließt.

Zunächst wurden in einer Reihe von hier nicht näher ausgeführten Vorversuchen Rahmenparameter für einen Laborkäfigtest entwickelt. Insbesondere wurden initial die Faktoren Präsenz der Königin, Honigversorgung, Wasserversorgung und Wabenfläche evaluiert, deren Ergebnisse hier kurz aufgeführt werden:

### *Königin-Präsenz*

Dabei stellte sich heraus, dass Kleinstvölker mit 500 Bienen ohne Königin nur eine begrenzte Anzahl von Larven bis zur Verdeckelung pflegen – es wurden maximal 3 verdeckelte Zellen beobachtet. Gesperrte Königinnen außerhalb des Brutnestes hemmen zudem die Brutpflege der Arbeiterinnen, denn letztere sammeln sich um die Königin und vernachlässigen die Brut. Derzeit erscheint eine auf der Wabe frei bewegliche Königin unabdingbar für die Pflege von mehr als einhundert Larven zu sein. Ihr Ersatz durch einen Pheromon-Dummy kann erst nach der Analyse der Bedeutung weiterer Faktoren in Betracht gezogen werden.

### *Honigversorgung*

Der Honig wurde den Bienen *ad libitum* angeboten. Er wurde teilweise in großen Mengen in den Waben eingelagert. Gegen Ende der jeweils dreiwöchigen Versuchsphasen nahmen die Bienen in den Käfigen signifikant weniger Honig ab. Dies kann als Zeichen für eine Störung des Verhaltens der gekäfigten Bienen gedeutet werden. In dessen Folge wird dann auch die Brutpflegeaktivität beeinflusst, da in Normalvölkern bei geringem Nahrungseintrag und -fluss die Brutpflegeaktivität signifikant zurückgeht (Riessberger & Crailsheim, 1997).

### *Wasser*

Wasser wurde den Bienen wie der Honig *ad libitum* angeboten. Ein Zusammenhang zwischen Wasserabnahme und Brutpflege konnte nicht festgestellt werden, denn es gab keine signifikanten

Unterschiede zwischen Völkern mit besserer Brutpflegeaktivität und Völkern, die kaum Brutpflege aufwiesen. D.h. Wasser stellt keinen limitierenden Faktor für Brutpflege in den Käfigen dar.

### *Wabengröße*

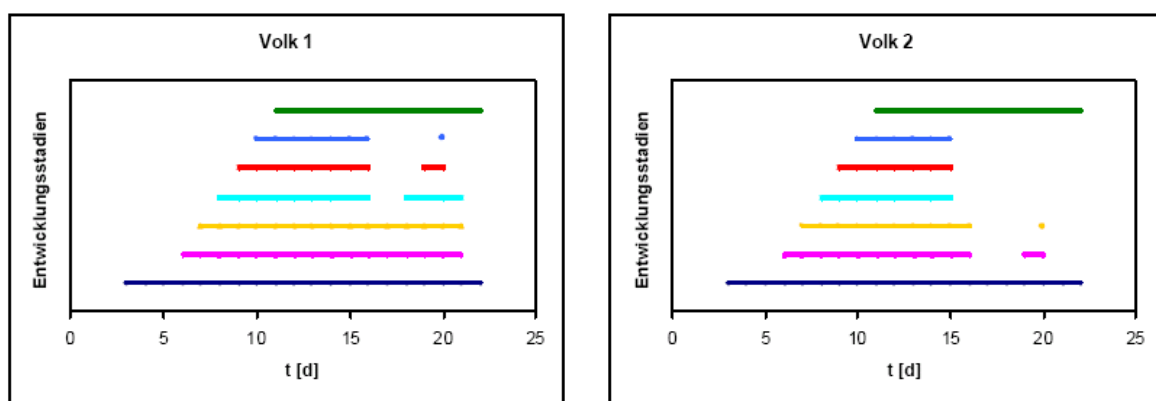
Eine Korrelation der Brutpflegeaktivität mit der Wabengröße konnte in diesen Vorversuchen nicht festgestellt werden. Allerdings muss eine Mindestfläche an Waben für eine gegebene Zahl an Bienen gewährleistet sein, sie sollte bei 500 Bienen 400 Zellen nicht unterschreiten. Bei kleinerer Wabenfläche (200 Zellen) war im Vergleich zu einer doppelt so großen Wabenfläche eine deutliche Reduktion der Brutpflegeaktivität zu verzeichnen. Zumal Arbeiterinnen bei Platzmangel Brut entfernen, damit Honig eingelagert werden kann. Oberhalb dieser Schwelle hat die Wabenfläche keinen wesentlichen Einfluß auf die Brutpflege. Diese Tatsache wird auch in einem nachfolgend beschriebenen Versuch bestätigt.

Nach den initialen Versuchen wurden weitergehende Experimente durchgeführt, mit denen weitere Faktoren für die Brutpflege im Labor evaluiert wurden.

### *Ermittlung der besten Bienenzahl für Brutpflege im Käfig*

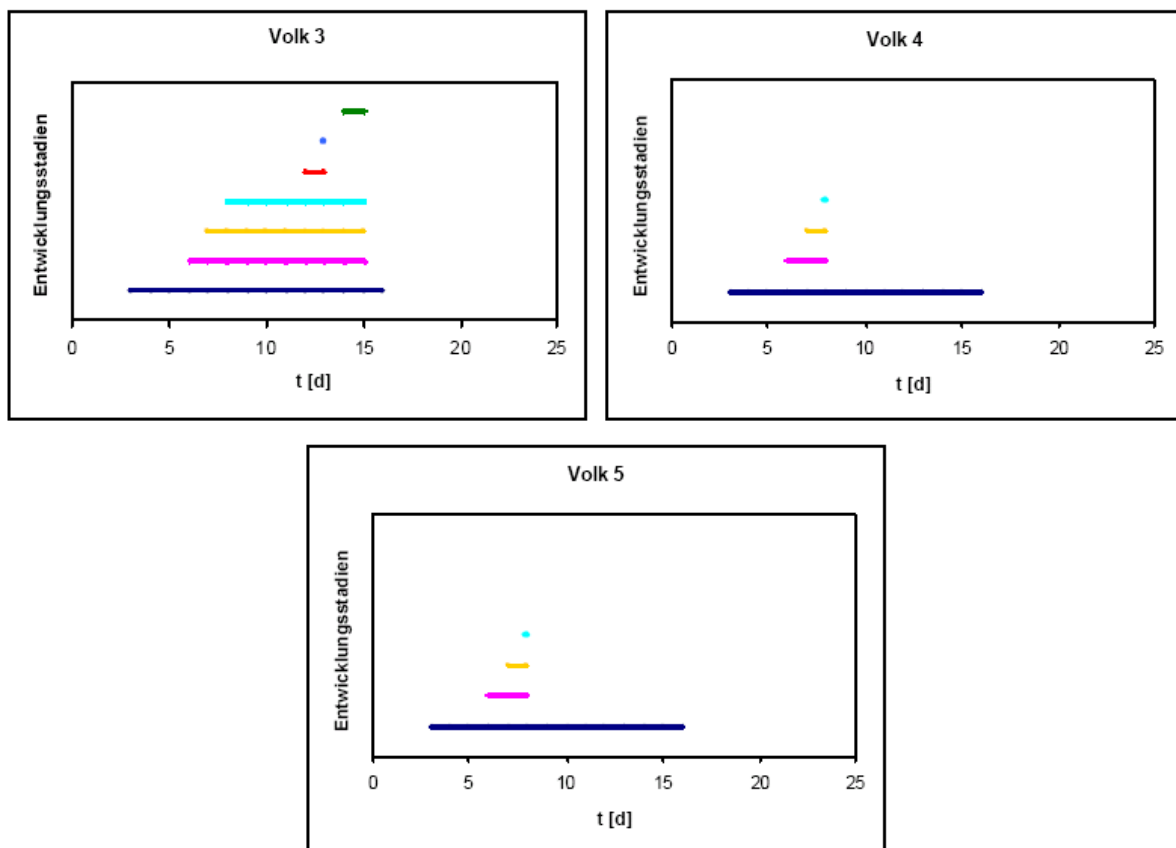
#### **Versuch 1: Brutpflege und Bienenzahl**

Zunächst wurden Kleinstvölker in Käfigen mit 100 Bienen mit denen mit 300 Bienen verglichen und über einen Zeitraum von 22 Tagen hinsichtlich ihrer Brutpflegeaktivität, der Honig- und Wasserabnahme und der Mortalität der adulten Bienen untersucht. Völker mit 100 (Abb. 4.1.) wie auch mit 300 Bienen (Abb. 4.2.) pflegen Brut bis zur Verdeckelung. Dabei überraschte, dass 300 Bienen weniger Brutzellen pflegen als 100. In den Völkern mit 100 Arbeiterinnen wurden 13 bzw. 15 Larven bis zur Verdeckelung gepflegt, in den Völkern mit 300 Bienen höchstens eine. In allen Völkern entsprach die erzielte Brutmenge nicht der gewünschten Anzahl von 200 Brutzellen, so dass überprüft werden sollte, ob eine weiter Vergrößerung der Wabe zu mehr Brutzellen führt.



**Abb. 4.1. Brutentwicklung in Kleinstvölkern mit 100 Bienen**

An 22 Versuchstagen wurde das Vorkommen der Entwicklungsstadien Ei (blau), der Larvenstadien L1 (violett), L2 (gelb), L3 (hellblau), L4 (rot) bis L5 (blau) erfasst



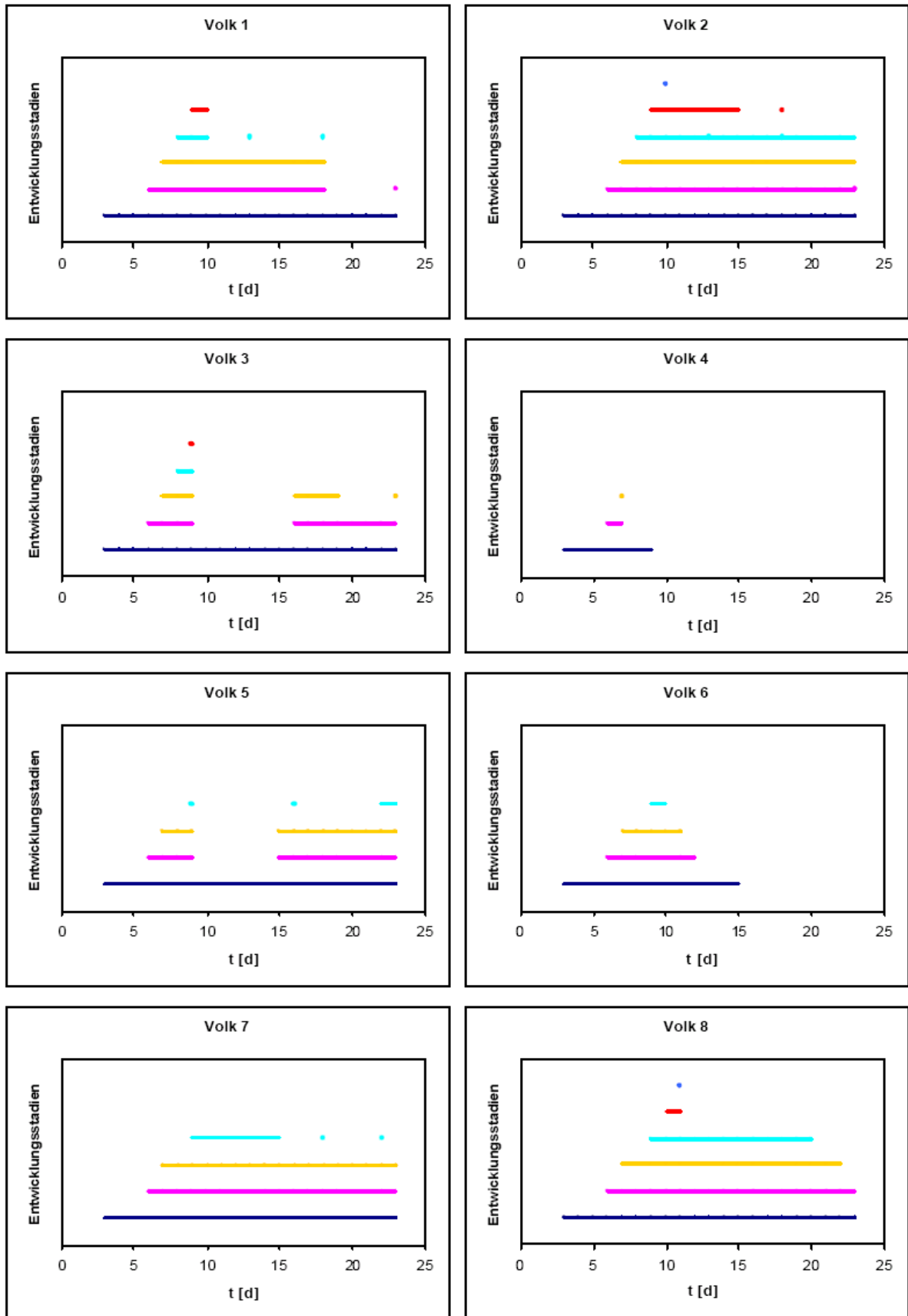
**Abb. 4.2. Brutentwicklung in Kleinstvölkern mit 300 Bienen**

An 22 Versuchstagen wurde das Vorkommen der Entwicklungsstadien Ei (blau), der Larvenstadien L1 (violett), L2 (gelb), L3 (hellblau), L4 (rot) bis L5 (blau) erfasst

## Versuch 2: Brutpflege, Bienenzahl und Wabengröße

Da die Brut in Kleinstvölkern mit 100 Bienen besser gepflegt wurde als in Völkern mit 300 Bienen, wurde geprüft, wie gut 200 Bienen im Vergleich dazu pflegen. Zusätzlich wurden Wabengrößen variiert. Zwei Versuchskäfige (Volk 1 & 2) wurden mit je 100 Bienen und einer Wabe mit ca. 688 Zellen bestückt. In vier weiteren Käfigen wurden jeweils 200 Bienen untergebracht, wobei die Völker 3 & 4 eine Wabengröße von ca. 528 Zellen aufwiesen und den Bienen der Völker 5 & 6 ca. 858 Zellen zur Verfügung standen. Außerdem wurden zwei Einwabenkäfige (Volk 7 & 8) mit je 300 Bienen und einer Wabe mit ca. 1360 Zellen aufgestellt.

Alle Völker pflegten ihre Brut, jedoch erreichte keine einzige Larve das Stadium der Verdeckelung (Abb. 5). Es waren erhebliche individuelle Schwankungen zwischen den Völkern zu verzeichnen. So waren lediglich in den Völkern 2 und 8 Larven des letzten Larvenstadiums zu beobachten. Der zuvor in Versuch 1 (und weiteren hier nicht näher ausgeführten Wiederholungsexperimenten) beobachtete Zusammenhang zwischen Zahl der Bienen und Brutpflegeaktivität war hier nicht gegeben. Faktoren wie Honig- und Wasserabnahme, Mortalität der Arbeiterinnen konnten als Determinanten ausgeschlossen werden.

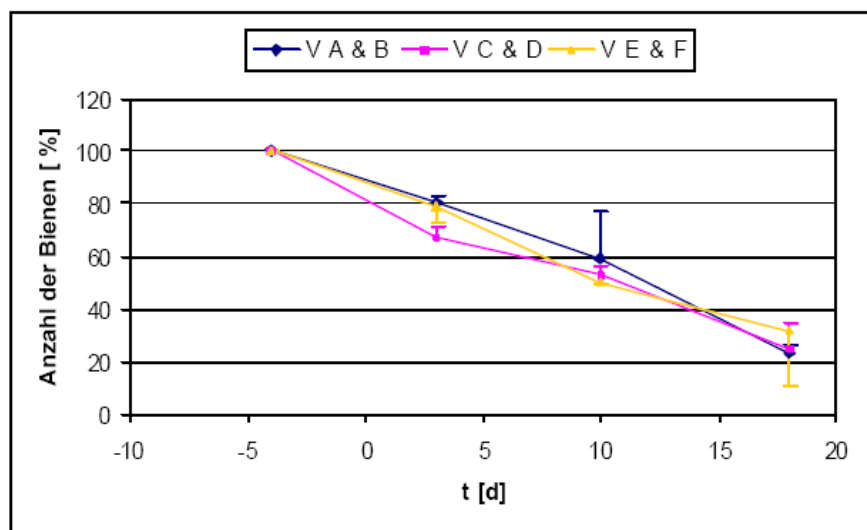


**Abb.5: Brutentwicklung in Kleinstvölkern mit 100 (Volk 1+2), 200 (3-6) und 300 (7 + 8) Bienen**  
 An 23 Versuchstagen wurde das Vorkommen der Entwicklungsstadien Ei (blau), der Larvenstadien L1 (violett), L2 (gelb), L3 (hellblau), L4 (rot) bis L5 (blau) erfasst.

### Versuch 3: Ermittlung der optimalen Bienenzahl für ca. 200 Brutzellen – Experimente mit freifliegenden Kleinstvölkern

Da insgesamt das Ziel von 200 verdeckelten Brutzellen in den Käfigexperimenten verfehlt und die Einflussfaktoren noch nicht identifiziert waren, wurde versucht, anhand im Freiland stehender, freifliegender Kleinstvölker die minimale Zahl an Bienen zu ermitteln, die für diese Brutpflegeleistung erforderlich sind. Für diesen Versuchsansatz wurden Kleinstkästchen aus Styropor (Kirchhainer Begattungskästchen, KBK) verwendet und mit zwei kleinen Waben mit insgesamt 1280 Zellen bestückt und mit je 700 Bienen (Volk A & B), 500 Bienen (Volk C & D) bzw. 300 Bienen (Volk E & F) nebst Königin versehen. Nach drei, zehn und 18 Tagen wurden die Zahl der Bienen und der Brutzellen erfasst.

Die Anzahl der adulten Bienen nimmt innerhalb der drei Wochen in allen Völkern kontinuierlich ab (vgl. Abb. 6). In den ersten Tagen variieren die Zahlen der Bienen in den Versuchsvölkern stärker, ab zehn Tagen unterscheiden sich die Völker darin kaum. Trotz dieser Variation sind alle hier verwendeten Völkergößen im Prinzip in der Lage sind, 200 Brutzellen zu pflegen (vgl. Tab 1), weil in mindestens einem Volk der Versuchsgruppen mehr als 200 verdeckelte Brutzellen vorkommen. Die durchschnittliche Brutpflegeleistung der Bienen, ausgedrückt in Zahl der verdeckelten Zellen/Biene und Tag, lag bei  $0,05 \pm 0,03$ . Schon 300 Bienen können somit innerhalb von drei Wochen 200 Zellen älterer Brut pflegen. Diese Zahlen liegen damit deutlich über denen der Versuche mit gekäfigten Bienen.



**Abb.6 Abnahme der Bienenzahl in Kleinstvölkern**

Während der Versuchsdauer wurden adulten Bienen in den Völkern mit 700 Bienen (A&B), 500 Bienen (C&D) und 300 Bienen (E&F) gezählt

**Tab.1. Brutpflegeleistung von Völkern mit unterschiedlicher Bienenzahl**

Bienen/Volk	Zahl gedeckelter Zellen, Volk 1	Zahl gedeckelter Zellen, Volk 2
700	58	340
500	120	190
300	90	266

#### Versuch 4 – Einfluss der Wabengröße im Freiland – Vergleich von Zwei- mit Einwabenvölkern

Der erste Freilandversuch erfolgte mit Zwei-Wabenvölkern. Da für die Beobachtung von Käfigvölkern ein Blick auf die Wabenfläche gewährleistet werden muss, sind folglich zwei Waben hintereinandergereiht sehr ungünstig für die Betrachtung. Deshalb sollte in diesem Versuch überprüft werden, ob Unterschiede zwischen Ein- und Zwei-Wabenvölkern in der Brutpflege bestehen.

Dazu wurden vier Kleinstvölker in Zweiwaben-KBK mit einer Wabengröße von insgesamt ca. 1280 Zellen und vier weitere in Kästchen nur mit einer Wabe von ca. 2044 Zellen untergebracht. Die Mortalität der adulten Bienen (vgl. Abb. 7) war in beiden Versuchsgruppen gleich (U-Test,  $\alpha = 0,05$ ). In allen Völkern herrschte eine konstante Brutpflegeaktivität, die auch als Zahl gedeckelter Brutzellen pro Bienen und Tag ausgedrückt werden kann. Sie betrug in den Zweiwabenvölkern  $0,18 \pm 0,04$ , in den Einwabenvölkern  $0,22 \pm 0,01$ . Bezogen auf die dreiwöchige Untersuchungsperiode zog jede adulte Biene mehr als 2,5 Larven bis zur Verdeckelung auf (Zweiwaben  $2,5 \pm 0,9$ , Einwabenvölker  $3,1 \pm 0,2$ ). Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind statistisch nicht signifikant (U-Test,  $\alpha = 0,05$ ). D.h. dass Völker mit nur einer Wabe ihre Bienen nicht schlechter pflegen als solche mit zwei Waben. Damit übertreffen die Arbeiterinnen der Kleinstvölker dieses Versuchs die des Versuchs in der Brutpflegeleistung um das dreifache.

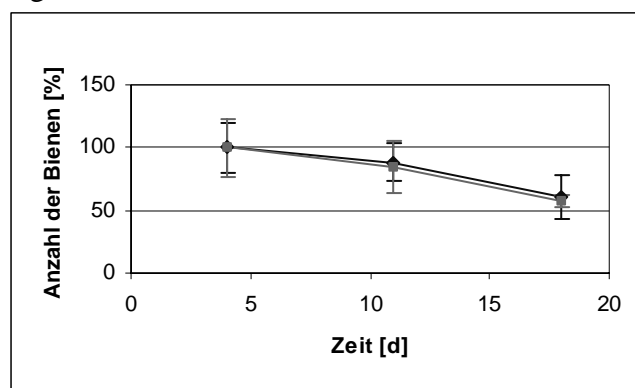


Abb.7: Abnahme der Bienenzahlen in Ein- (blau) und Zweiwabenkästchen (violett)

#### Versuch 5 – Einfluss konstanter Temperatur auf Brutpflege

Alle bisher untersuchten Freilandvölker pflegten ihre Brut und erreichten die gewünschte Anzahl von mindestens 200 Zellen älterer Brutstadien ohne Probleme. Die mangelnde Brutpflege der vorangegangenen Käfigversuche dürfte deshalb durch die Haltungsbedingungen im Brutschrank bedingt sein. Eine der potentiellen ökologischen Fehlfaktoren könnte die konstant hohe Temperatur sein. Deshalb wurde untersucht, ob konstante Temperaturen von 33°C die Brutpflege beeinflussen. Vier KBK mit zwei Waben und etwa 300 Bienen wurden in einen Brutschrank mit Öffnung ins Freiland getestet. Bienenzahl und Brutentwicklung wurden am ersten, vierten, neunten und 16. Tag erfasst.

Die Anzahl der Arbeiterinnen nahm innerhalb der ersten neun Tage um durchschnittlich 46 % ab und blieb dann konstant (Abb. 8). Die Brut wurde in allen vier Völkern kontinuierlich gepflegt. Schon am Tag 9 waren die ersten verdeckelten Zellen vorhanden. Nach 16 Tagen waren im Mittel 560 Brutzellen von durchschnittlich fast 200 Bienen aufgezogen worden (vgl. Tab. 2). Die

Zahl gedeckelter Brutzellen/Tag unterscheidet sich mit  $0,18 \pm 0,01$  nicht von dem Wert unter natürlich schwankenden Umgebungstemperaturen mit  $0,18 \pm 0,04$  (Versuch 4). D.h. konstante Temperaturen wirken sich unter den gegebenen Bedingungen weder negativ noch positiv auf die Pflege der Brut aus.

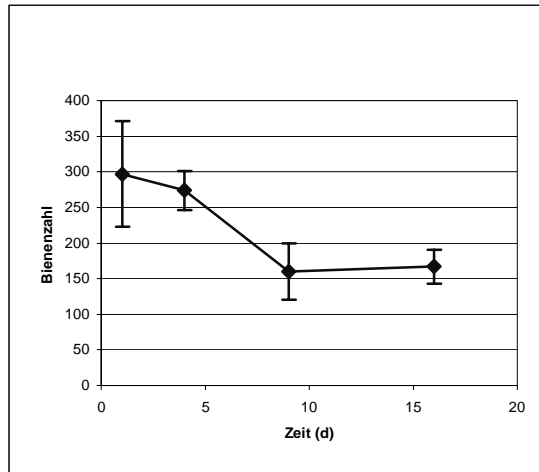


Abb. 8: Zahl der Bienen pro Volk während des Versuchsverlaufs.  $n=4$ ,  $x \pm s.d.$

Tab. 2: Brutpflegeleistung der Bienen

	Zahl gedeckelter Zellen nach 16 Tg.	Ø Bienenzahl	Zahl gedeckelter Brutzellen/Biene	Zahl gedeckelter Brutzellen/Biene/Tag
Mittw. $\pm$ s.d.	560 $\pm$ 113	195 $\pm$ 40	2,88 $\pm$ 0,16	0,18 $\pm$ 0,01

### Fazit

In freifliegenden Kleinstvölkern mit 300 Bienen gelingt die Aufzucht von mehr als 200 Larven bis zum Ende ihrer Fressphase. Eine konstante Temperatur von 33°C im Brutschrank kann als negativer Einflussfaktor auf die Brutpflege ausgeschlossen werden. Damit sind als potentielle Einflussfaktoren auf die Brutpflege wie Königinpräsenz, Bienenzahl, Temperatur, Wasserversorgung, Honigaufnahme und Wabengröße erfasst worden. Für die mangelnde Brutpflegeleistung in den Käfigen müssen demnach weitere Faktoren verantwortlich sein. Als weitere Faktoren kommen in Betracht: Flug- bzw. Sammelaktivität, Defäkation, Pollenversorgung, und nicht zu vergessen die Saisonalität der Brutpflegeaktivität.

### Flugaktivität

Offenbar wirkt sich die Möglichkeit, dass die Bienen während des Versuches ausfliegen können, wesentlich auf den Brutpflegetherfolg aus. Wie aus dem Vergleich mit den Käfigversuchen ersichtlich und wie die Literatur (Riessberger & Crailsheim, 1997; Schmickl & Crailsheim, 2002) anhand Untersuchungen während Schlechtwetterperioden bestätigt, scheint das Verhindertsein am Ausflug dramatische Konsequenzen für die Brutpflege zu haben. Dieser Einflussfaktor wurde in den Käfigversuchen bislang unterschätzt.

### *Defäkation*

Jungbienen behalten den aufgenommenen Pollen solange in ihrem Enddarm, bis sie das erste Mal ausfliegen. Ihre ersten Orientierungsflüge etwa am 8. Lebenstag werden immer auch zum Abkoten genutzt. Ältere Bienen benötigen das tägliche Abkoten (Schmickl & Crailsheim, 2002). Ihr Fehlen im Käfig kann sich folglich auch auf das Brutpflegeverhalten auswirken.

### *Pollen*

Für die Brutaufzucht ist Pollen als Hauptproteinlieferant von enormer Bedeutung (Herbert & Schimanuki, 1982/83, Hellmich & Rothenbuhler 1986;; Schmickl & Crailsheim 2002). Der Pollen wurde zwar *ad libitum* angeboten, dennoch ist es gut möglich, dass die Versorgung nicht ausreichte. Schmickl & Crailsheim (2002) fanden heraus, dass die Häufigkeit der Brutpflege mit der Pollenmenge und der Menge der offenen Brut korreliert, was bedeutet, dass je mehr Pollen/Larve verfügbar ist, die Pflege von jungen Larven (L1-3) ansteigt. Ältere Larven (L4) sind hingegen nicht von der Pollenmenge abhängig, da sie bei Pollenknappheit den jüngeren Larven vorgezogen werden. Allerdings widersprechen die publizierten Ergebnisse den in den Käfigen gewonnenen. Dort pflegten gekäfigte Arbeiterinnen ältere Larven nicht eher als junge, folglich müssen hier andere Faktoren von Bedeutung sein.

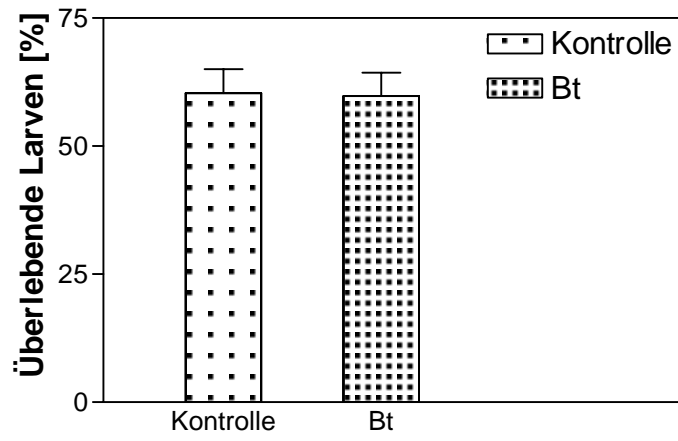
Weiterhin befand sich der angebotene Pollen außerhalb des „Brutnestes“. Dieser hat eine weitaus niedrigere Anziehungskraft auf Ammenbienen als Pollen, der in Brutnestnähe eingelagert ist (Doull, 1974). Möglicherweise ist ein Anbieten von Pollen auf der Wabe effizienter.

In Zukunft müssen die o.a. Faktoren in weiteren Experimenten abgeklärt werden.

### **II.1.3. Chronische Toxizität für postembryonale Stadien der Honigbienen**

Um dennoch Aussagen zur chronischen Toxizität von CryIAb auf postembryonale Stadien der Bienen treffen zu können, wurden Larven *in vitro* nach der Methode von Wittmann (1981) aufgezogen. Dabei wurde der halbsynthetische Larvenfuttersaft, der sich aus Gelee Royale, Hefeextrakt, Zuckern und Wasser zusammensetzt, mit dem CryIAb-Toxin versetzt. Die Dosis entsprach der im Pollen gemessenen Menge. Die Larven waren so während ihrer gesamten Fressphase dem Toxin ausgesetzt und damit wesentlich länger als unter natürlichen Bedingungen im Bienenvolk, da normalerweise erst die Larven des vierten Stadiums neben den proteinhaltigen Sekreten der Hypopharynxdrüsen von Ammenbienen auch Pollen als Nahrung erhalten. Verglichen wurden je 60 mit CryIAb-Zusatz gefütterte Larven mit 60 Larven ohne Bt-Toxin als Kontrolle. Die Larven stammten immer aus identischen Ursprungsvölkern und wurden zweimal täglich mit der o.a. Diät gefüttert. 5-6 Tage nach Beginn des Versuchs wurden die Larven in neue Gefäße überführt und dort bis zur Verpuppung und zum Imaginalschlupf weiter aufgezogen. Die Mortalität der Larven wurde in insgesamt 9 Ansätzen a 2 x 60 Larven verglichen (n = 9, je 2 x 540 Tiere). Die Zahl überlebender Larven betrug 60,4% bei den Kontrollen und 59,8% bei der Bt-Gruppe (Abb. 9). Die Unterschiede sind weder im parameterfreien Mann-Whitney-U-Test noch winkeltransformierten t-Test noch im paarweisen Vorzeichen-Test bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  signifikant voneinander unterschieden. D.h., dass das Bt-Toxin CryIAb nicht chronisch toxisch für Bienenlarven ist (vgl. Abb.9).





**Abb. 9** Überlebende Larven nach Exposition zu Bt-Toxin *in vitro*  
Je 9 Ansätze a 60 Larven wurden verglichen

## **II.2. Modul 2:**

### ***Prüfung der chronischen Wirkung von Bt-Maispollen auf Honigbienen im Freiland***

#### *Vorbemerkung*

Die Ergebnisse zur Toxizität des CryIAb (vgl. II.1.1.) wurden für die Untersuchungen zur chronischen Toxizität im Freiland herangezogen. Da die 100-fache Dosis keine Auswirkungen auf Mortalität und Futteraufnahme der adulten Bienen hatte, haben wir für die ersten Zeltversuche die 10-fache Konzentration eingesetzt, um einerseits realistischere Konzentrationen zu testen und andererseits einen genügenden Sicherheitsabstand gegenüber der tatsächlich im Pollen der Pflanze vorkommenden Konzentration zu haben. Die Erwartung aufgrund der Toxizitätsvorversuche war, dass diese Konzentration nicht nur bei adulten Bienen sondern auch bei den Brutstadien keine Wirkung ausüben würde und wir deshalb alle niedrigeren Konzentrationen nicht mehr prüfen müssten.

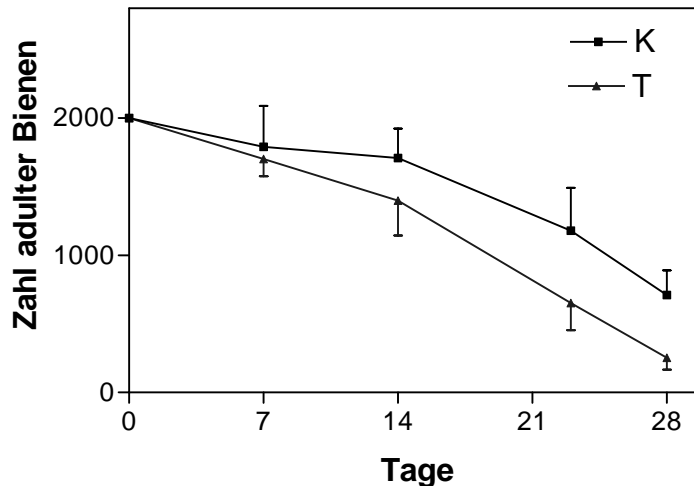
#### **II.2.1. Erste Freilandversuchsreihe**

Um die Wirkung des *Bacillus thuringiensis* Toxins CryIAb auf Bienenvölker zu testen, wurden zunächst je acht Völker in Flugzelten auf einem Versuchsfeld aufgestellt. Die Völker wurden hinsichtlich Sammelaktivität (Pollen, Zuckerlösung), Brutpflegeaktivität und Bienenzahl beobachtet. Zur Vereinfachung wird die Kontrollgruppe mit K sowie die Toxin-Versuchsgruppe mit T bezeichnet.

##### II.2.1.1. Entwicklung der Zahl adulter Bienen/Volk

Um eventuell auftretende Unterschiede bei der Mortalität von K und T festzustellen, wurden wöchentlich die Bienenzahlen je Volk bestimmt. Diese war in den ersten 14 Tagen in beiden Gruppen gleich (*Abb. 10*). Am Tag 23 haben die Bienenzahlen in beiden Versuchsgruppen sehr stark abgenommen. Die T-Völker sind signifikant schwächer als die K-Völker. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich vor und in den Völkern erschreckend viele tote Bienen, bei den K-Völkern durchschnittlich  $55 \pm 26$ , bei den T-Völkern  $170 \pm 134$ .

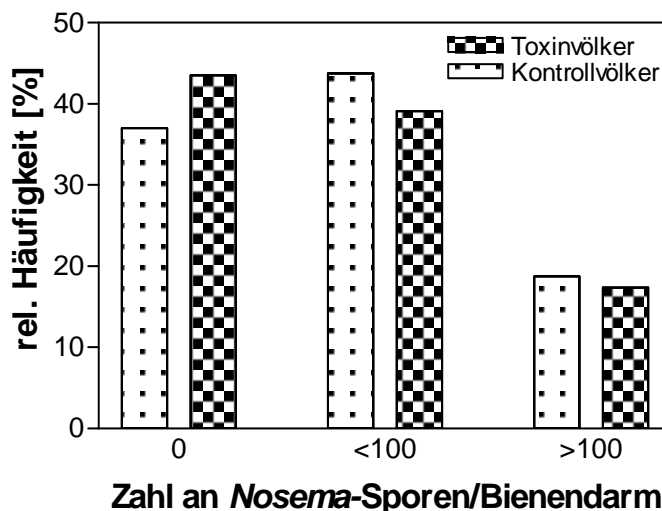
Der signifikante Unterschied in der Zahl adulter Bienen verstärkt sich, am 28. Tag beträgt die durchschnittliche Bienenzahl der K-Gruppe 710/Volk, die der T-Völker stattdessen nur noch 252/Volk. Auf Grund dieser geringen Zahl adulter Bienen wurde dieser Versuch vorzeitig nach vier Wochen abgebrochen.



**Abb.10** Anzahl adulter Bienen/Volk  
n = 8 Völker; signifikant unterschiedlich am 23. und 28. Tag nach U-Test,  $\alpha=0,05$

### Infektion mit dem Mikrosporidium *Nosema apis*

Die große Zahl toter oder sterbender Bienen vor den Völkern und weitere Anzeichen wie aufgetriebene Abdomina und ein unruhiger Sitz der Bienen auf den Waben wiesen auf einen Befall der Völker mit dem Mikrosporidium *Nosema apis* (Zander und Böttcher 1984, Ritter 1994) hin. Um die Ursache des massiven Totenfalls in den Völkern zu ergründen, wurden die Därme von 4-10 der toten Bienen/Volk stichprobenhaft im Labor präpariert und mikroskopisch auf *Nosema*-Sporen untersucht. Schon die erste Biene hatte mehr als 100 Sporen des Erregers der Darmkrankheit Nosematose im Darmpräparat. Daraufhin wurden alle anderen Tiere auch auf den Erreger hin untersucht. Bei etwa 40% der Proben konnten keine Sporen im Darm nachgewiesen werden, bei etwa 40% waren weniger als 100 Sporen, bei ca. 20% mehr als 100 Sporen im Darm vorhanden (Abb.11). Kontroll- und Toxinvölker unterschieden sich in der Nachweishäufigkeit des Erregers nicht ( $\chi^2$ -Test  $p \leq 0,05$ ). Außerdem waren in den Därmen der toten Bienen auffällig viele Hefen als Mikroorganismen vertreten, die als Stresssymptome bei Bienen bekannt sind (Gilliam 1977).



**Abb. 11** Vorkommen von Sporen des Mikrosporidiums *Nosema apis* in Därmen von sterbenden und toten Bienen.  
4 - 10 Bienen/Volk aus mit Bt gefütterten Bienenvölkern und Kontrollbienenvölkern.

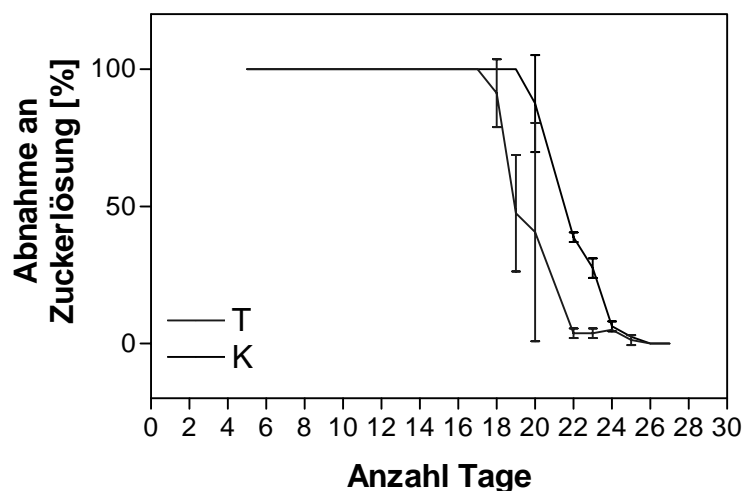
Die Schwächung der Bienenvölker ist also durch das Auftreten von *Nosema apis* in den Bienenvölkern zu erklären, dabei werden die Toxinvölker signifikant stärker durch den Erreger dezimiert. Eine ähnliche Wechselwirkung zwischen Mikrosporidienbefall und Bt-Toxin wurde jüngst für die Mortalität des Maiszünslers *Ostrinia nubilalis* beschrieben (Pierce et al., 2001).

Bei den kürzeren Experimenten im Käfig (vgl. II.1.) wären Wirkungen von *Nosema apis* nicht erkennbar, weil die Zeit zwischen Infektion und Auftreten von Symptomen zu lang ist.

### II.2.1.2. Sammelaktivität der Bienen

#### *Abnahme an Zuckerlösung*

Die Abnahme an in den Versuchszelten ad libitum bereitgestellter Zuckerlösung wurde als Maß für die Sammelaktivität verwendet und täglich erfasst. Sie verlief bis zum 17. Tag in beiden Gruppen gleich (Abb.12). Beide Versuchsgruppen nahmen in diesem Zeitraum täglich 100% der angebotenen Zuckerlösung ab. Ein Rückgang der Sammelaktivität stellte sich zunächst bei den T-Völkern (Tag 18) und zwei Tage verzögert auch bei den K-Völkern ein. Kurz vor Abbruch des Versuchs stellten alle Völker ihre Sammelaktivität ein.



**Abb. 12** Abnahme an Zuckerlösung/Versuchszelt  
Versuch I, n = je 8 Völker

#### *Pollensammelaktivität*

Während der ersten Versuchstage wurden die Bienen mit Pollenwaben versorgt. Erst 10 Tage nach Versuchsbeginn wurde Pollen in Schalen zum Sammeln außerhalb des Bienenstocks angeboten. Die Pollenabnahme verlief anfangs in beiden Gruppen nahezu konstant (Abb.13). Nach 18 Tagen nahm die Pollen-Sammelaktivität der T-Gruppe rapide ab, drei Tage später folgten die Kontrollvölker. Ab dem 22. (T) bzw. 23. Tag (K) wurde kein Pollen mehr gesammelt.

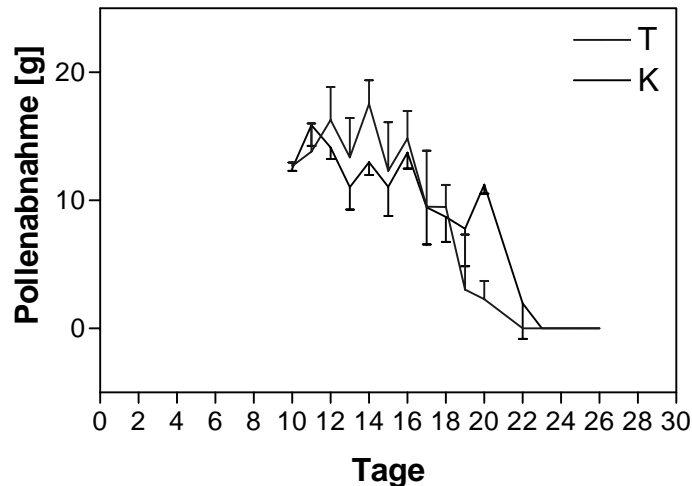


Abb.13 Pollenabnahme/Versuchszelt  
Versuch I; n = 8 Völker

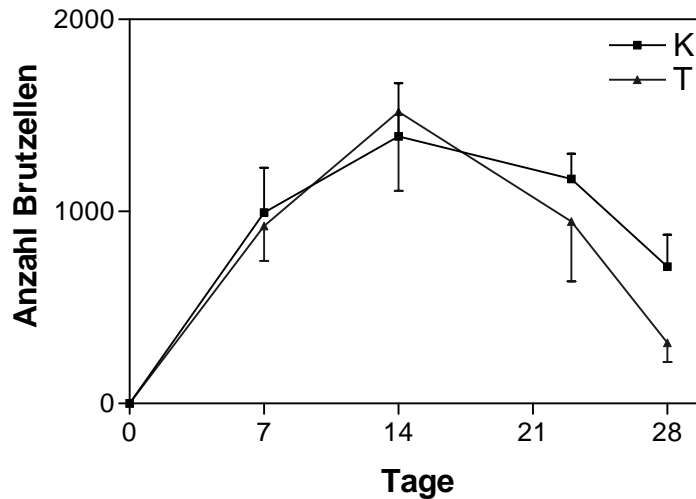
**Fazit:** Die Sammelaktivität für Zucker und Pollen sinkt in den T-Völkern gleichermaßen ab Tag 18, die K-Völker folgen diesem Trend 2-3 Tage später. Obwohl Nektar und Pollen von unterschiedlichen Bienen einer Population gesammelt werden (Stanley and Linskens 1985) und deren Aktivität im Volk verschieden reguliert wird (Seeley 1994), werden beide Verhaltensweisen im gleichen Zeitfenster reduziert. Pollen wird von den Bienen nur bei Bedarf gesammelt, dagegen Zuckerlösung solange, bis die dafür vorgesehenen Zellen gefüllt sind. Die zeitliche Koinzidenz der Verhaltensänderungen kann als ein Indiz für eine Störung der normalen Entwicklung der Bienenvölker gewertet werden und dürfte Folge der *Nosema*-Infektion sein.

### II.2.1.3. Brutpflegeaktivität

Die Brutpflegeaktivität wurde durch wöchentliche Bonitierung erfasst. Dabei wurde die Gesamtzahl der Brutzellen photographisch dokumentiert und anschließend ausgewertet und die Entwicklung einzelner Brutstadien anhand von 100 Brutzellen/Volk individuell verfolgt.

#### *A Gesamte Brutpflegeaktivität*

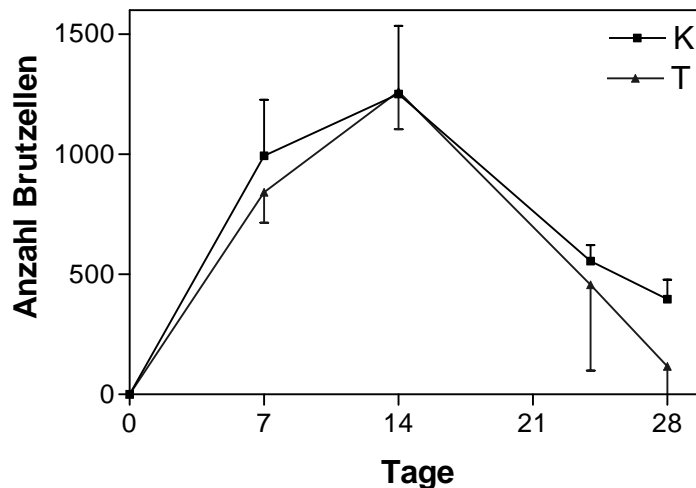
Die durchschnittliche Anzahl aller Brutzellen weist in den ersten 14 Versuchstagen bei T und K keine wesentlichen Unterschiede auf (Abb.14). Sie erreicht nach 14 Tagen in beiden Versuchsgruppen ihren Höhepunkt, bei K mit  $1391 \pm 276$  Zellen/Volk und bei T mit  $1520 \pm 357$  Zellen/Volk. Nach 23 Tagen beginnt sich die Anzahl der Brutzellen in beiden Gruppen schlagartig zu verringern. Am 28. Tag besitzen die K-Völker noch  $713 \pm 167$  Brutzellen/Volk, während der Wert bei T auf signifikant niedrigere Werte von  $315 \pm 86$  Brutzellen/Volk abgesunken ist.



**Abb.14** Gesamtzahl an Brutzellen/Volk  
 Versuch I; n = 8 Bienenvölker; signifikant unterschiedlich  
 am 28. Tag nach U-Test,  $\alpha=0,05$

### B Offene Brut

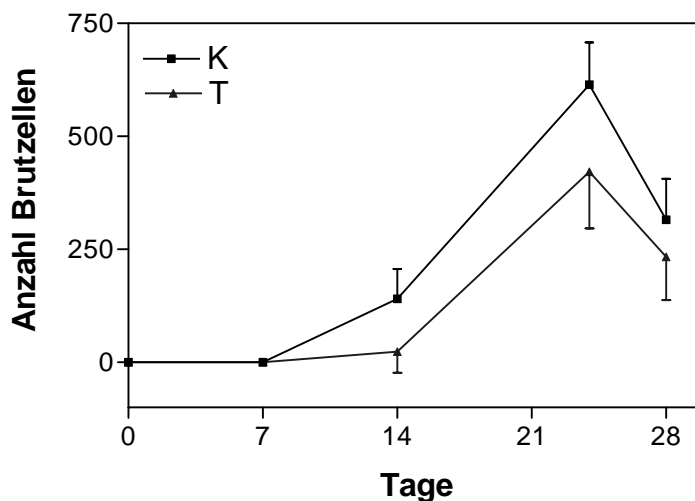
Bei der offenen Brut (Eier und Larven) kommt es zu einer relativ ähnlichen Entwicklung bei K und T (Abb. 15). In beiden Versuchsgruppen nimmt die Zahl offener Brutzellen bis zum 14. Tag zu und geht dann drastisch zurück. Am 28. Versuchstag besaßen die K-Völker durchschnittlich  $397 \pm 81$  Zellen offene Brut, während es bei T mit  $82 \pm 111$  Zellen signifikant weniger waren. Zwei Völker der T-Gruppe hatten sogar keine offene Brut mehr.



**Abb.15** Offene Brutzellen/Volk  
 Versuch I; n = 8 Bienenvölker; signifikant unterschiedlich am 28. Tag nach U-Test,  $p<0,05$

### C Verdeckelte Brut

Verdeckelte Brut, d.h. Larven in der Spinnphase und Puppen, trat erst am 14. Versuchstag auf. An diesem Tag hatten die T-Völker signifikant weniger. Die Zahl der Brutzellen nahm bis zum nächsten Beobachtungstag deutlich zu und war am 28. Tag in beiden Gruppen signifikant gesunken (U-Test,  $\alpha=0,05$ ). Wenngleich die T-Völker im Durchschnitt weniger verdeckelte Brut hatten, so unterschieden sich die Vergleichsgruppen am 23. und 28. Tag nicht.



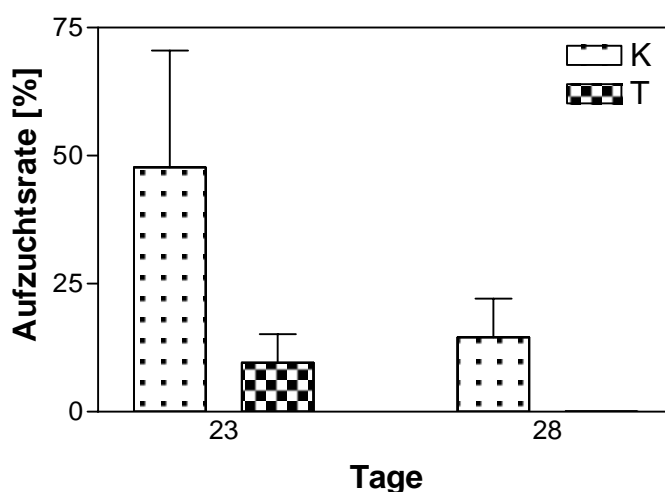
**Abb.16** Verdeckelte Brut/Volk

Versuch I; n = 8 Bienenvölker; signifikant unterschiedlich nur am 14. Tag nach U-Test,  $p < 0,05$

#### *D Aufzucht einzelner Brutstadien*

Die Aufzuchtsraten der Brutstadien wurde anhand von 100 markierten Brutzellen bestimmt, um Informationen über die einzelnen Tätigkeiten in der Brutpflege der Bienenvölker zu erhalten. Dazu wurden Eier, Larvenstadien und verdeckelte Brut über die Zeit erfasst.

Die Zahl der **Eier**, die nach 7 Tagen als Larven wiedergefunden wurden, wurde als Aufzuchtsrate der Eier definiert. An Tag 23. wurden bei K-Völkern durchschnittlich 47,7% der Eier aufgezogen, stattdessen waren es bei T nur 9,6% und damit signifikant weniger. Nach 28 Versuchstagen betrug die mittlere Aufzuchtsrate bei K noch 14,5%, bei T wurden dagegen keine Eier mehr aufgezogen.

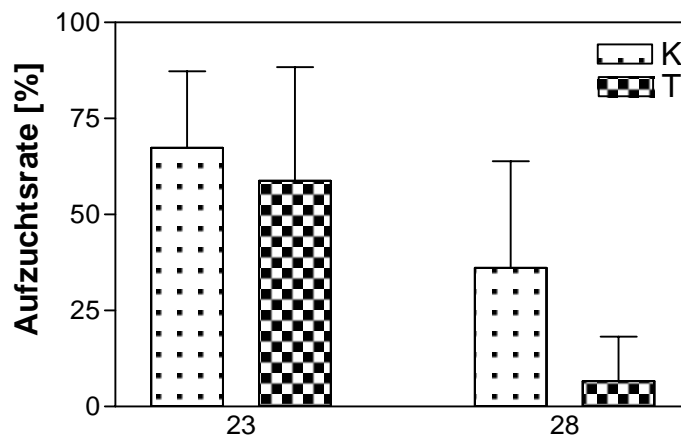


**Abb.17** Aufzuchtsrate der Eier

Versuch I; n = 8 Völker, signifikant unterschiedlich am 23. und 28. Tag nach U-Test,  $\alpha = 0,05$

Bei der Erfassung der Aufzuchtsrate der **Larven**, wurden alle Larvenstadien zusammengefasst. Für eine differenziertere Darstellung, z.B. einer Einteilung in die Larvenstadien L1-L3 und L4-L5, fehlten aufgrund der großen Unterschiede zwischen den Völkern und ihrer geringen Brutpflegeleistung ausreichende Datenmengen. Hier muss in Zukunft die Zahl individuell

verfolgter Brutzellen erhöht werden. Wie bei Eiern ist die Aufzuchtssrate bei Larven am 23. Tag mit 58,8% bei T und 67,4% bei K wesentlich höher als die nach vier Wochen mit 36,1% bei K und nur 6,7% bei T (Abb. 18).



**Abb.18** Aufzuchtssrate der Larven

Versuch I; n = 8 Völker, nicht signifikant unterschiedlich nach U-Test,  $p < 0,05$

Die Überlebensrate der **verdeckelten Brut** liegt mit über 80% in beiden Gruppen deutlich über den Werten für Eier und Larven. Sie unterscheidet sich auch zwischen den Vergleichsgruppen nicht signifikant. D.h. dass T- und K- Völker, wie schon aus Abb. 16 erkennbar, die bis zum Verdeckeln aufgezogenen Larven gleichermaßen weiterpflegen.

### **Fazit**

Die Ammenbienen der T-Völker versorgten in der dritten Versuchswoche weniger Eier als die K-Völker und in der darauffolgenden Woche auch die schon herangewachsenen Larven in geringerem Maße als die der K-Völker. Der wesentliche Unterschied in der Brutpflegeaktivität der Versuchsvölker liegt somit in der aktuellen Ammenpflege von Larven. Einmal bis zum Ende ihrer Fressphase versorgte Larven müssen nur noch gewärmt werden - wie das gesamte Zentrum eines Bienenvolks. Diese Pflegeleistung schafften beide Vergleichsgruppen offenbar gleichermaßen.

#### II.2.1.4. Abgeleitete Parameter

Aus den demographischen Daten der Bienenvölker können eine Reihe von Parametern abgeleitet werden, die Aufschluss über den Zustand der Bienenvölker geben (Bühlmann, 1976). So werden in der Regel

- der Anteil der Brut an der Gesamtpopulation als Maß für das Brutgeschehen und das kurzfristige Entwicklungspotential eines Bienenvolkes genutzt,
- die Anzahl pflegebedürftiger Brutzellen/100 Bienen als Maß für die Pflegebelastung eines Bienenvolkes verwendet,
- der Anteil offener Brut an der Gesamtbrut als Maß für die Volksentwicklung genutzt,
- die „Bientage“ errechnet, d.h. die Summe der täglichen Zahl adulter Bienen in einem Intervall, die Rückschlüsse auf das Leistungspotential eines Volkes erlauben.
- der Zuwachs und die Bientage/Zuwachs erfasst.

Die Analyse der Daten, die hier nicht im Einzelnen aufgeführt werden, ergibt, dass sich der Anteil der Brut an der Gesamtpopulation zwischen den Gruppen nicht unterscheidet. Beide



Gruppen produzieren also in gleichem Verhältnis Nachwuchs. Dies ist nicht allzu überraschend, da für beide Gruppen die gleichen klimatischen Bedingungen und Nahrungsangebote herrschen. Die beobachtete Nosematose wirkt sich hier nicht erkennbar aus.

Die Pflegebelastung der Bienenvölker bleibt in allen Völkern über drei Wochen gleich, erst in der letzten Versuchswoche sinkt sie in den T-Völkern stärker, weil deutlich weniger Larven von den Bienen aufgezogen werden. Das Leistungspotential, an der Anzahl Bienentage erfasst, sinkt in beiden Vergleichsgruppen, in der dritten und vierten Woche vor allem bei den T-Völkern signifikant stärker als in der Kontrolle. Dies ist die Folge des stärkeren Verlustes an adulten Bienen.

### **Zusammenfassung**

Die erste für sechs Wochen geplante Versuchsreihe musste nach vier Wochen abgebrochen werden, weil in den Bienenvölkern eine Infektion durch das Mikrosporidium *Nosema apis* ausbrach. Der Darmparasit führte zum Tod vieler adulter Bienen. Die mit der 10-fachen der im Pollen vorkommenden CryIAb-Menge gefütterten Bienenvölker waren statistisch signifikant stärker betroffen als die Kontrollvölker. Krankheitsbedingt stellten die Bienen ihre Sammelaktivität ein - dabei alle Toxinvölker früher als die Kontrollvölker. Die Brutpflegeaktivität insbesondere der jungen Larven durch Ammenbienen wurde stark reduziert, bei den mit Toxin behandelten Völkern stärker als in den Kontrollvölkern. Verdeckelte Zellen wurden in beiden Völkern jedoch in gleichem Maß weiter gepflegt.

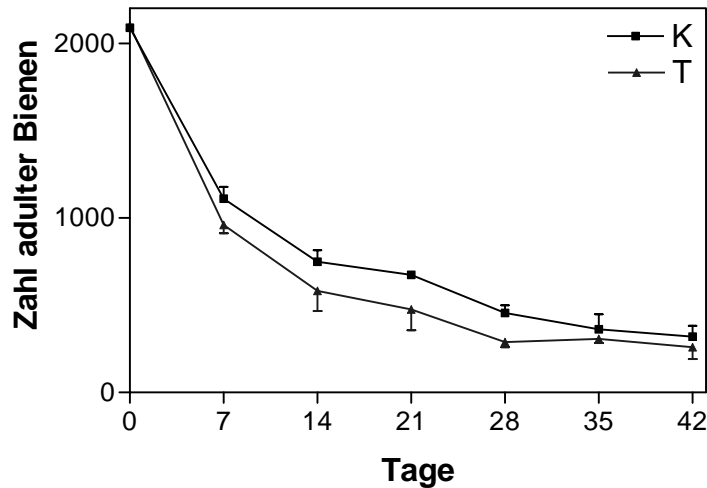
Die signifikanten Unterschiede in Auftreten und Wirkung der Darmkrankheit spricht für eine Wechselwirkung von Toxin und Pathogen auf die Honigbiene. Dies war überraschend und bisher noch nicht beschrieben worden. Lediglich die Arbeit von Pierce et al. (2001) beschrieb eine erhöhte Mortalität des Maiszünslers bei Auftreten einer Mikrosporidieninfektion. Der zugrundeliegende Wirkungsmechanismus und der funktionelle Zusammenhang zwischen Darmparasiten und Toxin, die beide auf die Epithelzellen des Darms als Zielzellen wirken, ist unbekannt.

## **II.2.2. Zweite Freilandversuchsreihe zur Prüfung der chronischen Toxizität von Bt-Toxin**

Nach dem Abbruch des ersten Halbfreilandversuches wegen der *Nosema*-Infektion wurde 2002 ein neuer Versuch gestartet. Zur Verhinderung eines erneuten *Nosema*-Befalls wurden die Bienen prophylaktisch von Beginn an medikamentös mit dem Antibiotikum Fumidil B (Wirkstoff Fumagillin, keine Zulassung in BRD) behandelt, um einen Verlust adulter Bienen durch die Krankheit zu verhindern. Die Toxin-Völker wurden wie im ersten Versuch mit der 10-fachen Menge an CryIAb behandelt. Außerdem wurden die Bienenvölker aus Jungbienen (sog. single-cohort-colonies) zusammengestellt, um eventuelle Unterschiede im Altersaufbau der Bienenvölker auszuschließen.

### **II.2.2.1. Entwicklung der Zahl adulter Bienen**

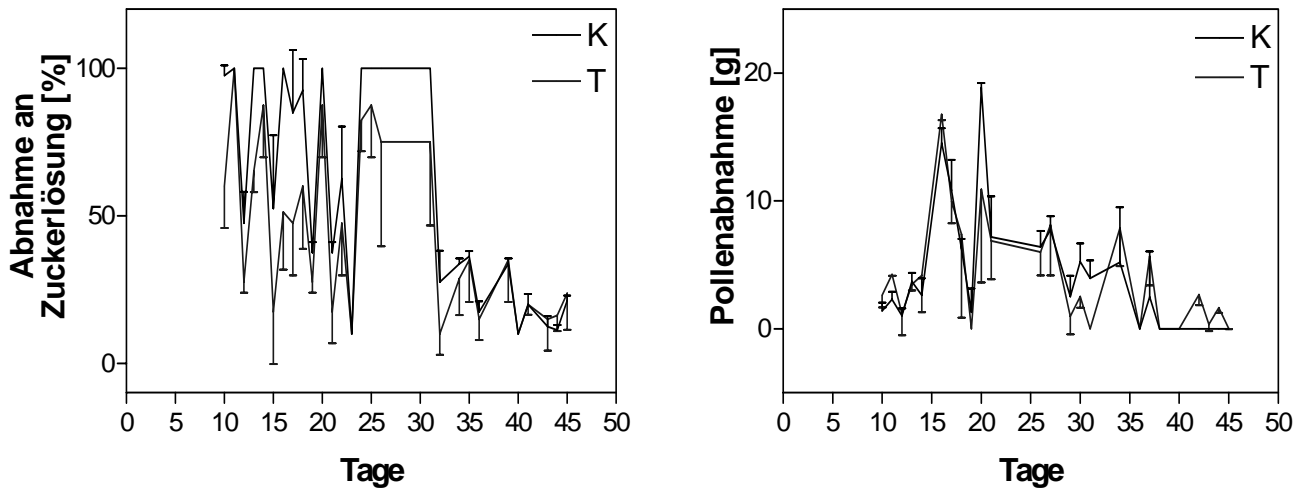
Die Anzahl adulter Bienen hatte in beiden Versuchsgruppen schon nach einer Woche dramatisch abgenommen (Abb.19). Toxin-Völker (T) enthielten signifikant weniger Bienen als die Kontrollvölker (K). Auch in den nächsten drei Wochen nahmen die Bienenzahlen immer weiter ab und waren bei T stets signifikant niedriger als bei K. Erst in der fünften und sechsten Woche unterschieden sich die Werte nicht mehr signifikant voneinander. Die Zahl adulter Bienen erreichte in der sechsten Woche in der Kontrollgruppe einen Wert von  $320 \pm 63$  Bienen/Volk, in den T-Völkern befanden sich durchschnittlich noch  $260 \pm 59$  Bienen.



**Abb. 19** Anzahl adulter Bienen/Volk ± SD in Versuch II  
 n = 8 Völker; signifikant unterschiedlich am 7., 14., 21. und 28. Tag nach U-Test,  $p > 0,05$

### II.2.2.2. Sammelaktivität

Die Sammelaktivität der Völker begann erst am 10. Versuchstag, da die Dressur der Jungbienen auf Zuckerlösung mehr Zeit in Anspruch nahm als bei den älteren Bienen und die Transition von der Stockbiene zur Sammlerin einige Tage in Anspruch nimmt. Die Abnahme an Zuckerlösung zeigt bei T und K die gleichen Tendenzen, wobei die Sammelaktivität der K-Gruppe meist höher war als die der T-Gruppe (Abb. 20). Nach 32 Tagen fällt die Zuckerlösaufnahme in beiden Versuchsgruppen stark ab. Die gravierenden Schwankungen von Tag zu Tag sind auf die Wetterbedingungen zurückzuführen. Dies gilt in gleicher Weise für das Pollensammelverhalten (Abb. 20). Beide Vergleichsgruppen unterscheiden sich im Sammelverhalten nicht.



**Abb. 20** Sammelaktivität der Bienenvölker in Versuch II  
 Abnahme an Zuckerlösung/Zelt/Tag ± SD und Pollen in g/Tag/Zelt  
 n = 4 Zelte mit je 2 Bienenvölkern

### II.2.2.3. Brutpflegeaktivität

#### Gesamte Brut

Nach der ersten Woche besaßen die K-Völker durchschnittlich  $1005 \pm 347$  Zellen Brut und die T-Völker  $1210 \pm 492$  Zellen (Abb.21). In der dritten Woche sank die Zahl der Brutzellen um ca. 40% und blieb dann für die restliche Versuchszeit konstant. Die durchschnittliche Anzahl der Brutzellen beider Versuchsgruppen unterschied sich in keiner der sechs Wochen signifikant.

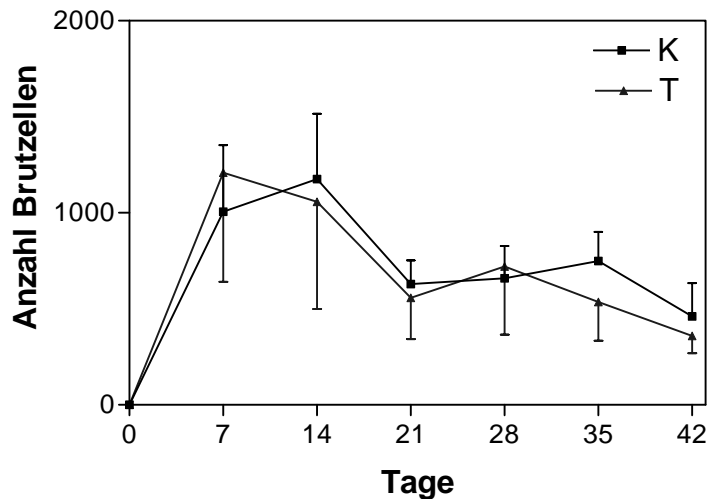


Abb.21 Brut/Volk  $\pm$  SD

Versuch II; n = 8 Völker; nicht signifikant unterschiedlich nach U-Test,  $p < 0,05$

Die Entwicklung der Anzahl *offener Brutzellen* verlief in beiden Versuchsgruppen ähnlich und unterschied sich nicht signifikant (ohne Abb.). Der Entwicklungsverlauf war dem der gesamten Brut sehr ähnlich.

Die Zahl der *verdeckelten Brutzellen* stieg in beiden Gruppen bis zum 28. Versuchstag an (Abb. 22). Sie erreichte dort mit  $203 \pm 53$  (K-Völker) bzw.  $157 \pm 36$  (T-Völker) ihren Höhepunkt. Die Zahl produzierter Zellen reichte allerdings nicht aus, um die Verluste an Adultbienen auszugleichen. Danach fiel sie kontinuierlich bis auf unter 100 Zellen/Volk ab. In den T-Völkern wurden durchschnittlich 25% weniger adulte Bienen aufgezogen, signifikante Unterschiede ergaben sich nur am 21. und 42. Tag.

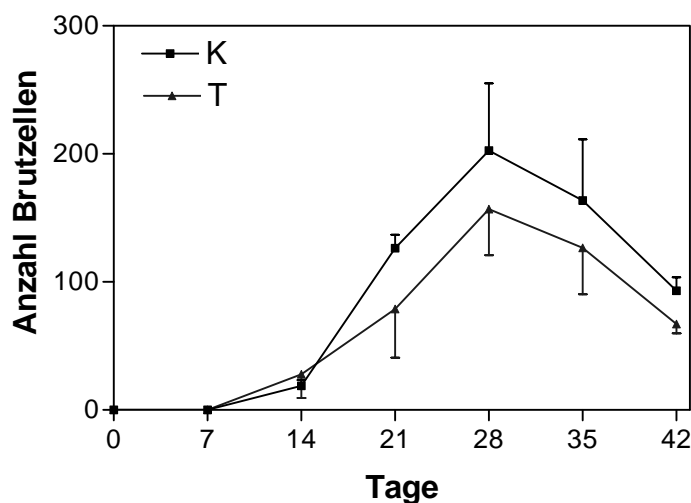


Abb.22 Verdeckelte Brut  $\pm$  SD

Versuch II; n = 8 Völker; signifikant unterschiedlich am 21. und 42. Tag nach U-Test,  $p < 0,05$

#### II.2.2.4. Aufzuchtssrate der Brut

Die Aufzuchtssrate der *Eier* war wegen der großen individuellen Schwankungen innerhalb der Völkergruppen in keiner der Wochen signifikant verschieden (Abb.23). Sie lag mit 10,8% (min.) und 29,8% (max.) generell recht niedrig.

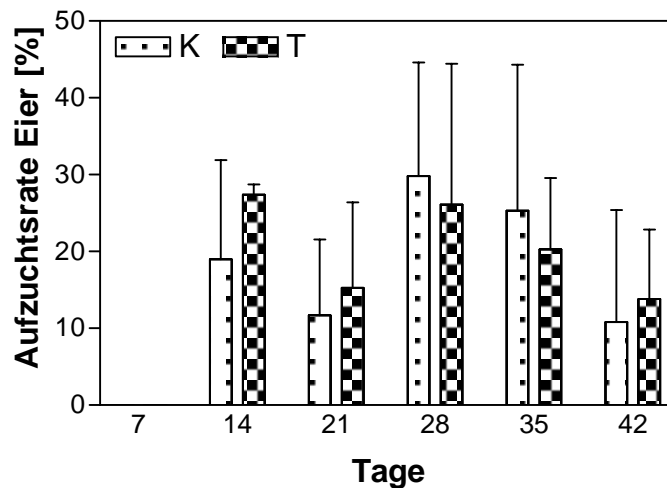


Abb.23 Aufzuchtssrate der Eier  $\pm$  SD

Versuch II; n = 8 Völker; nicht signifikant verschieden nach U-Test;  $p < 0,05$

Bei der Aufzuchtssrate von *Larven* unterschieden sich die jüngeren Larvenstadien L1-L3 von den älteren L4-L5. Sie wurden deshalb getrennt ausgewertet.

Die Aufzuchtssrate der Larvenstadien L1-L3 unterschied sich zwischen beiden Versuchsgruppen nur am 21. Tag signifikant voneinander (Abb. 24). In dieser dritten Woche zogen die Bienen bei K durchschnittlich 40 % der Larven L1-L3 auf, bei T waren es nur 7,2 %.

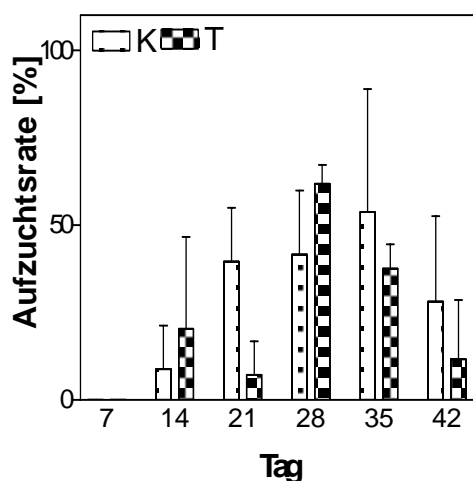


Abb.24 Aufzuchtssrate Larven L1-L3  $\pm$  SD

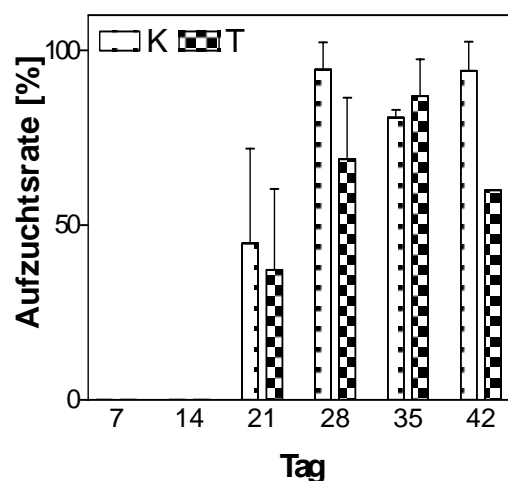


Abb.25 Aufzuchtssrate Larven L4-L5  $\pm$  SD

Die Aufzuchtssraten der älteren Larven waren an allen Untersuchungstagen deutlich höher als die der jungen Larven L1-L3 (Abb.25). Sie unterschieden sich aufgrund der großen Variabilität nicht

zwischen den Vergleichsgruppen. Der Signifikanztest konnte am 42. Tag nicht angewendet werden, weil nur zwei T-Völker die für einen Vergleich ausreichende Menge an älteren Larvenstadien vorweisen konnten.

Die Aufzuchttrate der *verdeckelten Brut* konnte erstmalig nach 3 Wochen bestimmt werden, da die Bienen in der zweiten Woche noch keine Brutzellen verdeckelt hatten. Während die verdeckelten Zellen in der dritten Woche kaum gepflegt wurden (K: 11 % und T: 16,6 %), überlebten in den folgenden drei Wochen nahezu alle verdeckelten Brutzellen. Deren Aufzuchtraten lagen zwischen 89,6% und 100%. Die Werte unterschieden sich in beiden Versuchsgruppen nicht signifikant (U-Test,  $p < 0,05$ ).

### Fazit

Die Aufzuchttrate der Brut steigt mit fortgeschrittenerem Entwicklungsstadium an. Lässt die Brutpflegeleistung in den Völkern nach, werden nur noch wenige bzw. verstärkt die älteren Larven aufgezogen. Die Pflegeleistung wird nun insbesondere zum Erwärmen der verdeckelten Brut genutzt, die zu 89,6% (min.) bis 100% weitergepflegt wird. Die Brutpflegeaktivität unterscheidet sich zwischen Toxin- und Kontrollvölkern nicht. Der einzigen Ausnahme am 21. Tag, an dem in K-Völkern mehr Brutzellen des Larvenstadiums L1 bis L3 aufgezogen wurden, wird wegen des singulären Ereignisses keine Bedeutung zugemessen, zumal dieses Phänomen im ersten Feldversuch nicht auftrat. Generell kann man konstatieren, dass die Aufzuchtraten in diesem Versuch besser sind als im ersten Versuch. Die Unterschiede dürften auf die Wirkung der Nosematose zurückzuführen sein.

### II.2.2.5. Schlupfgewicht

Das Schlupfgewicht hat sich in Voruntersuchungen als ein sehr selektiver Parameter in der Wirkungsprüfung herausgestellt. Es ist zudem ein Maß für die Vitalität der Bienen. Untergewichtige Bienen haben eine geringere Lebenserwartung. Für die Ermittlung der Schlupfgewichte wurden bei K 64 und bei T 35 frisch geschlüpfte Bienen gewogen. Bei schlüpfenden Bienen konnte zum Teil Befall durch die parasitische Milbe *Varroa destructor* beobachtet werden. Deshalb wurden die Bienen bei der Bestimmung des Schlupfgewichts in vier Gruppen eingeteilt: die Kontrollgruppe, die Kontrollgruppe mit Varroabefall, die Toxingruppe, sowie die Toxingruppe mit Varroabefall (Tab. 3).

Die Gewichte der frisch geschlüpfte Bienen waren bei Varroabefall unabhängig von ihrer Herkunft aus T- oder K-Völkern um mehr als 13% signifikant niedriger. Dagegen unterschieden sie sich zwischen den beiden Versuchsgruppen nicht signifikant voneinander. Das bedeutet, dass die Bienen nicht durch das Bt-Toxin in ihrer Gewichtsentwicklung beeinträchtigt werden. Die deutlichen Gewichtsverluste der Brutstadien werden lediglich durch die Parasitierung hervorgerufen. Offenbar werden diejenigen Larven, die sich weiter bis zum adulten Tier entwickeln, nicht vom Bt-Toxin beeinflusst.

**Tab.3** Vergleich der Schlupfgewichte der Bienen aus Kontrolle und Toxin-Völkern

	<i>n</i>	<i>x in mg</i>	<i>s</i>	<i>v</i>
<b>K</b>	31	110,3 <sup>a</sup>	4,5	4,1 %
<b>T</b>	32	111,8 <sup>a</sup>	8	7,2 %
<b>K + Varroa</b>	33	95,6 <sup>b</sup>	7,4	7,7 %
<b>T + Varroa</b>	3	98,8 <sup>b</sup>	5	5,1 %

*n* = Stichprobenzahl, *x* = Mittelwert, *s* = Standardabweichung, *v* = Varianz; *a*, *b* signifikant unterschiedlich nach U-Test bzw. *t*-Test,  $p \leq 0,05$

### II.2.2.6. Lebensdauer

Um die Lebensdauer der adulten Bienen zu erfassen, wurden 104 Bienen der K-Gruppe und 85 Bienen der T-Versuchsgruppe am Tag ihres Schlupfes aus der Brutzelle markiert und alle zusammen mit einer Königin in einem Versuchskäfig im Brutschrank untergebracht. Die Bienen erhielten nun keinen transgenen Pollen mehr, sondern lediglich Futterteig aus einem Honig-Zucker-Gemisch und im Freiland gesammelten Pollen verschiedener Pflanzen in der Wabe. Das durchschnittliche Lebensalter von T unterschied sich mit  $27 \pm 3$  d im t-Test ( $\alpha=0,05$ ) nicht signifikant von dem der Kontrollgruppen-Bienen mit  $26 \pm 3$  K-Gruppe. Auch die Verteilung der Lebensalter beider Versuchsgruppen unterscheidet sich nicht (Abb.26).

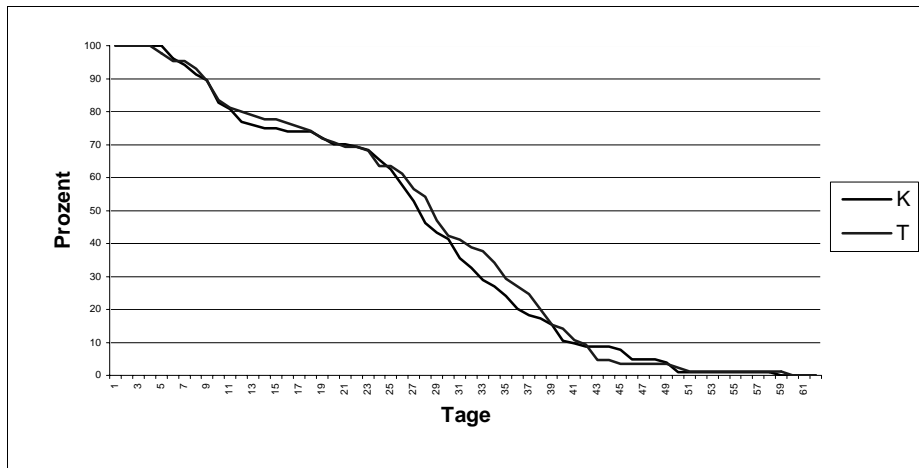


Abb.26 Lebensdauer der adulten Bienen im Vergleich Versuch II;  $n_K = 104$  Bienen,  $n_T = 85$  Bienen

### II.2.2.7. Abgeleitete Parameter

Der Brutanteil an der Gesamtpopulation unterscheidet sich zwischen T und K nicht signifikant (Abb.27). Er bleibt über einen Beobachtungszeitraum relativ konstant und liegt bei K zwischen  $47,9 \% \pm 5,5 \%$  und  $67,2 \% \pm 7,3 \%$ , bei T zwischen  $52,7 \% \pm 13,7 \%$  und  $67,1 \% \pm 15,8 \%$ .

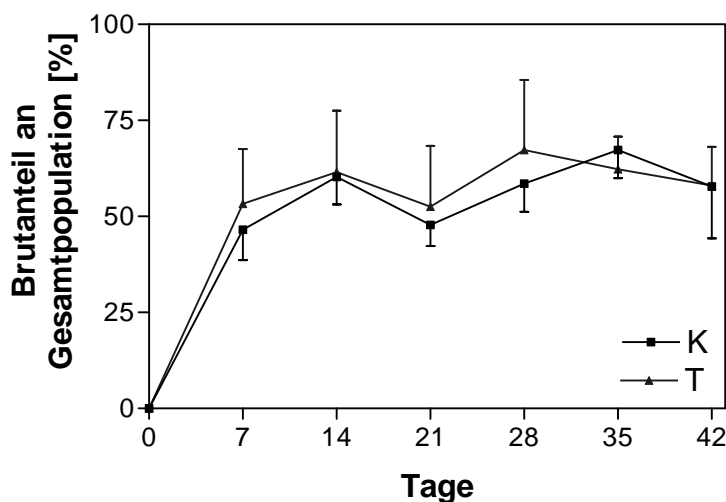
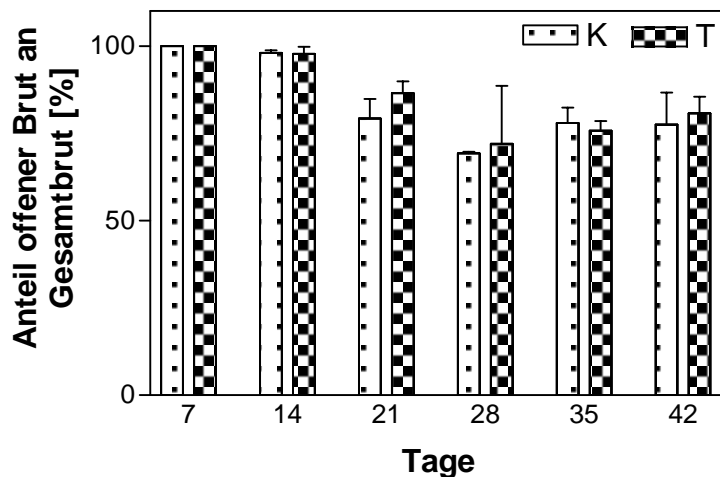


Abb.27 Brutanteil an der Gesamtpopulation/Volk  $\pm$  SD Versuch II;  $n = 8$  Völker, nicht signifikant unterschiedlich nach U-Test,  $p < 0,05$

Idealerweise sollte der *Anteil offener Brut an der Gesamtbrut* 43 % und der Anteil an verdeckelter Brut 57 % betragen, da die Entwicklung der offenen Arbeiterinnenbrut 9 Tage und die der verdeckelten 12 Tage dauert. Im gesamten Versuchszeitraum war der Anteil an offener Brut jedoch wesentlich höher (Abb. 22). Dies ist auf eine gleichmäßige Legeleistung der Königin und eine niedrige Aufzuchtsrate der Eier und Larven zurückzuführen.

Am 21. Versuchstag besitzt T mit  $79,2 \pm 5,2$  Zellen/Volk signifikant mehr offene Brutzellen als K, die  $86,6 \pm 3,1$  Zellen/Volk aufwiesen. An den anderen Versuchstagen traten keine signifikanten Unterschiede hervor.



**Abb.22** Anteil der offenen Brut an der Gesamtbrut/Volk  $\pm$  SD  
Versuch II; n = 8 Völker; signifikant unterschiedlich am 21. Tag nach U-Test,  $p < 0,05$

### *Fazit Brutpflegeaktivität*

Sowohl beim Brutanteil an der Gesamtpopulation als auch beim Anteil offener Brut an der Gesamtzahl der Brut ergeben sich zwischen K und T keine signifikanten Unterschiede. Der Brutanteil bleibt in beiden Versuchsgruppen über den gesamten Versuchszeitraum relativ konstant. Die Brutpflegeaktivität ist also in beiden Testgruppen gleich. Vergleicht man das Verhältnis zwischen offener und verdeckelter Brut wird bei T und K deutlich, dass die Eier und Larven einen wesentlich höheren Anteil einnehmen. Einem optimalen Prozentsatz von 57 % verdeckelter Brut, kann in keiner der sechs Wochen entsprochen werden. Während die Königin eine gute Legeleistung vollbringt, ist die Aufzuchtsrate der Eier und Larven geringer als unter normalen Volksbedingungen. Allerdings unterscheiden sich beide Vergleichsgruppen darin nicht. Der Grund für die schlechten Pflegeleistungen bei der offenen Brut kann in beiden Versuchsgruppen in der zu geringen Anzahl adulter Bienen liegen.

### *Fazit Versuch 2:*

Wenn ein Ausbruch der Nosematose durch prophylaktische Antibiotika-Behandlung verhindert wird, zeigen Toxin-Völker das gleiche Sammel- und Brutpflegeverhalten wie die Kontrollvölker. Weder Lebensdauer noch Schlupfgewicht der adulten Bienen, die nur als Larven dem Bt-Toxin ausgesetzt waren, werden durch das Bt-Toxin beeinflusst. Die Ergebnisse der Halbfreilandversuche belegen, dass die Larven der Bienen vom Toxin in ihrer Entwicklung unbeeinflusst bleiben. Berücksichtigt man, dass nur die älteren Larvenstadien (L4 und L5) mit Pollenbeimengungen in ihrer Nahrung gefüttert werden, alle jüngeren Stadien jedoch

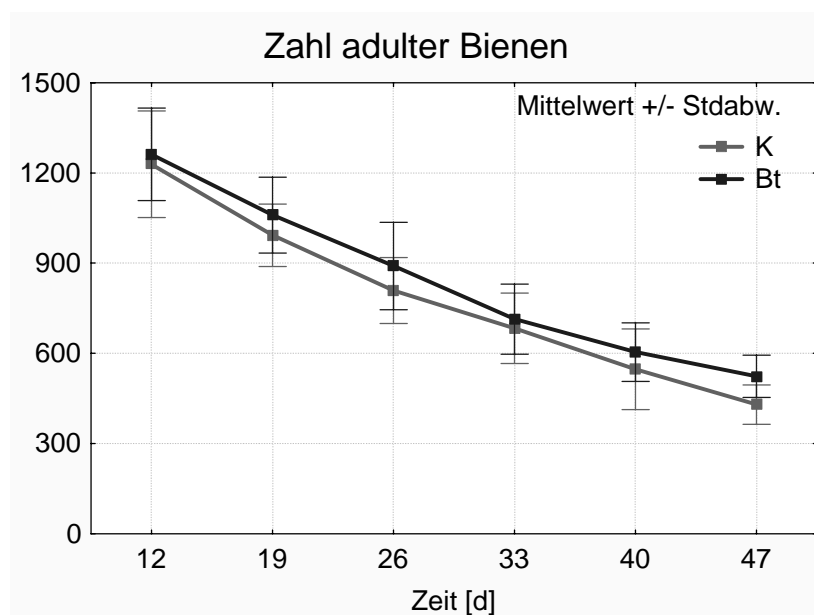
ausschließlich Sekrete der Futtersaftdrüsen erhalten, dann ist dieses Ergebnis nicht überraschend. Eine Toxin-Wirkung ist unter natürlichen Bedingungen daher eher auf der Seite der adulten Bienen zu erwarten. In der Tat sinkt die Zahl adulter Bienen in den Toxin-Völkern in den ersten vier Wochen stärker ab als in den Kontrollvölkern. Möglicherweise wird bei chronischer Exposition mit der zehnfachen der im Pollen vorkommenden CryIAb-Dosis die Lebensdauer der exponierten adulten Bienen beeinträchtigt. Ein Wirkmechanismus ist bei Bienen nicht bekannt.

### **II.2.3. Dritte Freilandversuchsreihe zur Prüfung der chronischen Toxizität von Bt-Toxin mit Pollen von Bt176-Maispflanzen**

Im Versuchsjahr 2003 wurde aufgrund der Vorarbeiten mit der 10-fach erhöhten Bt-Konzentration (vgl. II.2.2.) geprüft, ob chronische Effekte auf adulte Bienen bei der natürlichen Bt-Konzentration im Maispollen auftreten. Dazu wurden wiederum Halbfreilandversuche in freistehenden Versuchszelten aus Gaze (4 x 6 x 2,5 m) mit Kleinvölkern (Mini-Plus-Magazine) über einen Zeitraum von sechs Wochen durchgeführt. Die Völker wurden täglich mit Zuckerlösung gefüttert und erhielten zweimal am Tag Bt-Pollen. Kontrollvölker erhielten Bt-freien Pollen. Kontinuierlich wurden Sammelaktivität (Pollen, Zuckerlösung), Brutpflegeaktivität und Bienenzahl und Zahl der Brutzellen erfasst. Nach Abschluß des Experimentes wurden als Endpunkt-Analysen Schlupfgewicht und Lebensdauer der Bienen bestimmt.

#### **II.2.3.1. Entwicklung der Zahl adulter Bienen/Volk**

Um eventuell auftretende Unterschiede in der Mortalität zwischen Kontrolle (K) und Bt-Toxingruppe (Bt) festzustellen, wurden wöchentlich die Bienenzahlen je Volk nach der Liebefelder Schätzmethode bestimmt. Über den Versuchszeitraum von sechs Wochen unterschieden sich die Volksstärken in den Vergleichsgruppen (Abb. 23) nicht statistisch signifikant (ANOVA mit Messwiederholungen,  $N_1=N_2=9$ ;  $P>0,05$ ). D.h. Das Bt-Toxin wirkt sich nicht negativ auf die Zahl adulter Bienen aus.



**Abb. 23** Anzahl adulter Bienen/Volk während des Versuchszeitraums, n=9



### II.2.3.2. Sammelaktivität der Bienen

Als ein Maß für die Sammelaktivität der Bienenvölker wurde die Abnahme der in den Versuchszelten *ad libitum* bereitgestellten 50%-igen Zuckerlösung und die Abnahme des täglich zweimal angebotenen Pollens genutzt.

Die Abnahme an Zuckerwasser verlief in den beiden Versuchsgruppen bemerkenswert gleich (Abb. 24). Zu Versuchsbeginn nahmen alle Völker das Zuckerwasser gleichermaßen ab. Die Höchstmengen wurden jedoch im Verlauf des Versuchs reduziert, um zu verhindern, dass sich die Bienen angesichts eines zu üppigen Futterangebots beim Sammeln unnötig aufreiben. Dies hängt damit zusammen, dass Honigbienen beim Nektarsammeln bedarfsunabhängig bis an die Maximalkapazität von Ressourcen sammeln. Pollen wird hingegen nur soviel gesammelt, bis der augenblickliche Bedarf gedeckt ist. Dementsprechend lagern Bienenvölker große Honigreserven aber nur kleine Pollenreserven. Es gegen Ende des Versuchszeitraum sammeln die Bienen witterungsbedingt (Regen, niedrigere Temperaturen) weniger Zuckerlösung. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind nicht signifikant (ANOVA mit Messwiederholungen,  $p > 0,05$ ).

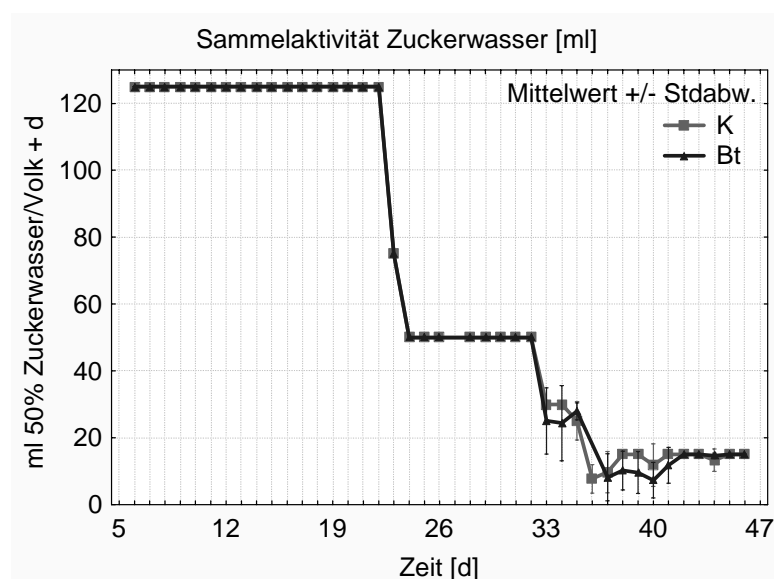


Abb. 24 Sammelaktivität gemessen an der Abnahme an Zuckerlösung/Versuchszelt

Die Pollensammelaktivität der Völker (Abb. 25) schwankt während des Versuchszeitraumes stark.. Maximal wurden 10 g Pollen/Tag und Volk gesammelt, des öfteren wurden weniger als 1 g/Tag und Volk gesammelt. Das Sammelmuster ähnelt sich in beiden Versuchsgruppen (ANOVA mit Messwiederholungen,  $p > 0,05$ ) außerordentlich. Trotz des täglich gleichbleibenden Angebots sinkt die Pollensammelaktivität während des Versuchszeitraumes. Dies ist sicherlich dem reduzierten Bedarf anzulasten, denn vor allem für junge Arbeiterinnen und für die Aufzucht von Brut wird viel Pollen benötigt (Riessberger & Crailsheim, 1997). Da sich zudem Alterstruktur und Brutpflegeaktivität in allen Völkern ähneln, spiegelt das Muster der Pollensammelaktivität vor allem auch den Einfluß klimatischer Bedingungen wider, die auf alle Versuchsvölker gleichermaßen wirken.

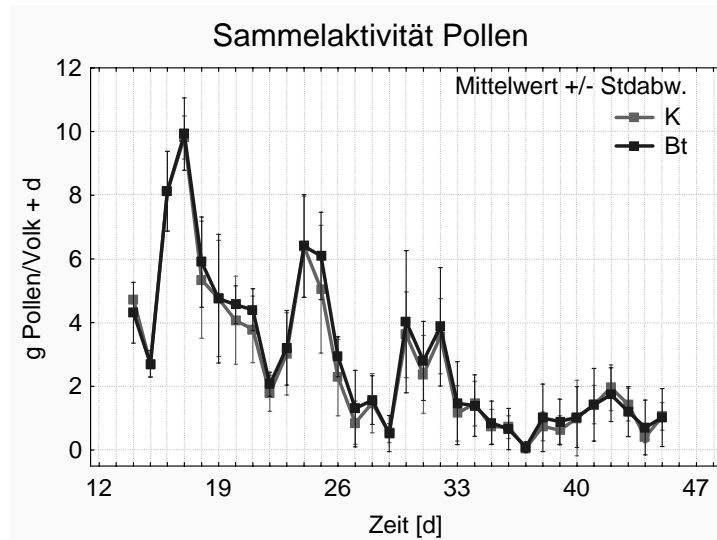


Abb. 25 Sammelaktivität gemessen an der Pollenabnahme/Versuchszelt

**Fazit:**

**Die Sammelaktivität für Zuckerwasser und Pollen unterscheidet sich zwischen den Kontrollvölkern und den Bt-exponierten Völkern nicht. Die gleichverlaufenden Muster der Sammelaktivität sind in erster Linie durch klimatische Faktoren bedingt.**

II.2.3.3. Brutpflegeaktivität

Die Brutpflegeaktivität wurde durch wöchentliche Bonitierung erfasst. Dabei wurde die Gesamtzahl der Brutzellen photographisch dokumentiert und anschließend ausgewertet. Außerdem wurde die Entwicklung einzelner Brutstadien anhand von etwa 200 Brutzellen/Volk individuell im wöchentlichen Turnus verfolgt.

Die Zahl offener Brutzellen, d.h. Zellen mit Eiern oder Larven, nahm zu Beginn des Versuchs stark zu, erreichte nach 2 Wochen ihren Höhepunkt und nahm dann kontinuierlich ab (Abb. 26). In beiden Versuchgruppen verlief diese Entwicklung gleich. Es sind keine Unterschiede nachweisbar (ANOVA mit Messwiederholungen,  $n_1=n_2=9$ ,  $p > 0,05$ ). Obwohl es sich um Geschwisterköniginnen in den Völkern handelte und die Arbeiterinnen einem Pool entnommen worden waren, entwickelten sich die einzelnen Völker sehr unterschiedlich. Dementsprechend liegt der Variationskoeffizient bei den offenen Brutzellen in den Bt-Völkern zwischen 0,84 und 0,97 und bei den Kontrollvölkern zwischen 0,54 und 1,05. Ganz offensichtlich ist dieser Parameter für einen scharfen Vergleich eher weniger geeignet.

Betrachtet man die Zahl der von den Arbeiterinnen verdeckelten Brutzellen (Abb. 27), so ergibt sich in der Tendenz das gleiche Bild: Statistisch unterscheiden sich die beiden Vergleichsgruppen nicht (ANOVA mit Messwiederholungen,  $n_1=n_2=9$ ,  $p > 0,09$ ), die Zahl der Zellen steigt während der ersten Versuchshälfte und nimmt dann in der zweiten ab, dabei schwanken sie Zahlen zwischen den einzelnen Völkern deutlich, wie es an den Variationskoeffizienten für die Kontrollvölker zwischen 0,58 und 1,01 und für die Bt-Völker sogar 0,84 und 2,38 erkennbar wird. Auch dieser Parameter scheint für einen scharfen Vergleich eher ungeeignet.

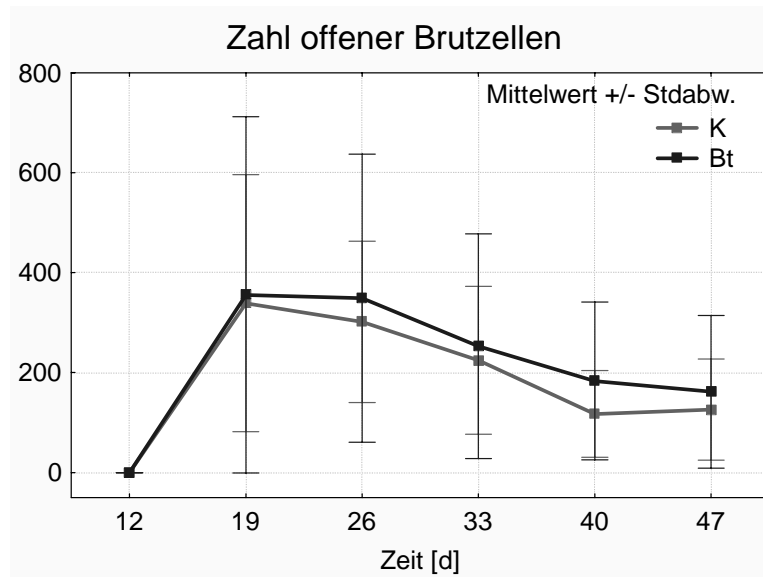


Abb. 26 Zahl an Eiern und Larven in den Kleinvölkern ( $n_1=n_2=9$ )

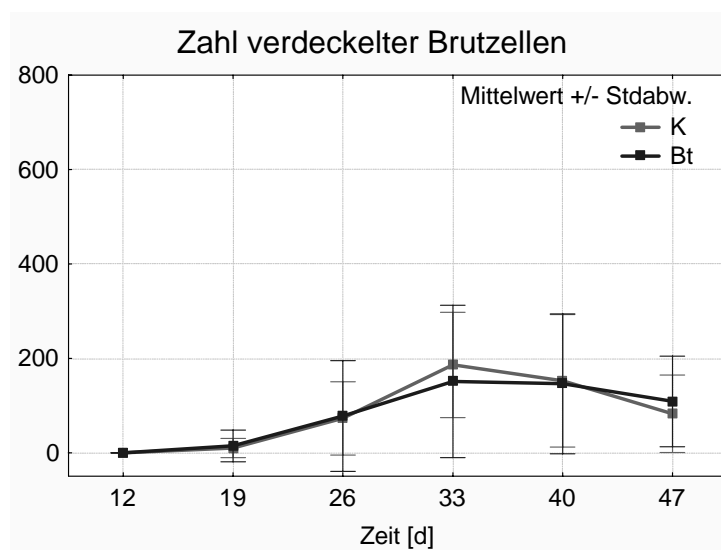
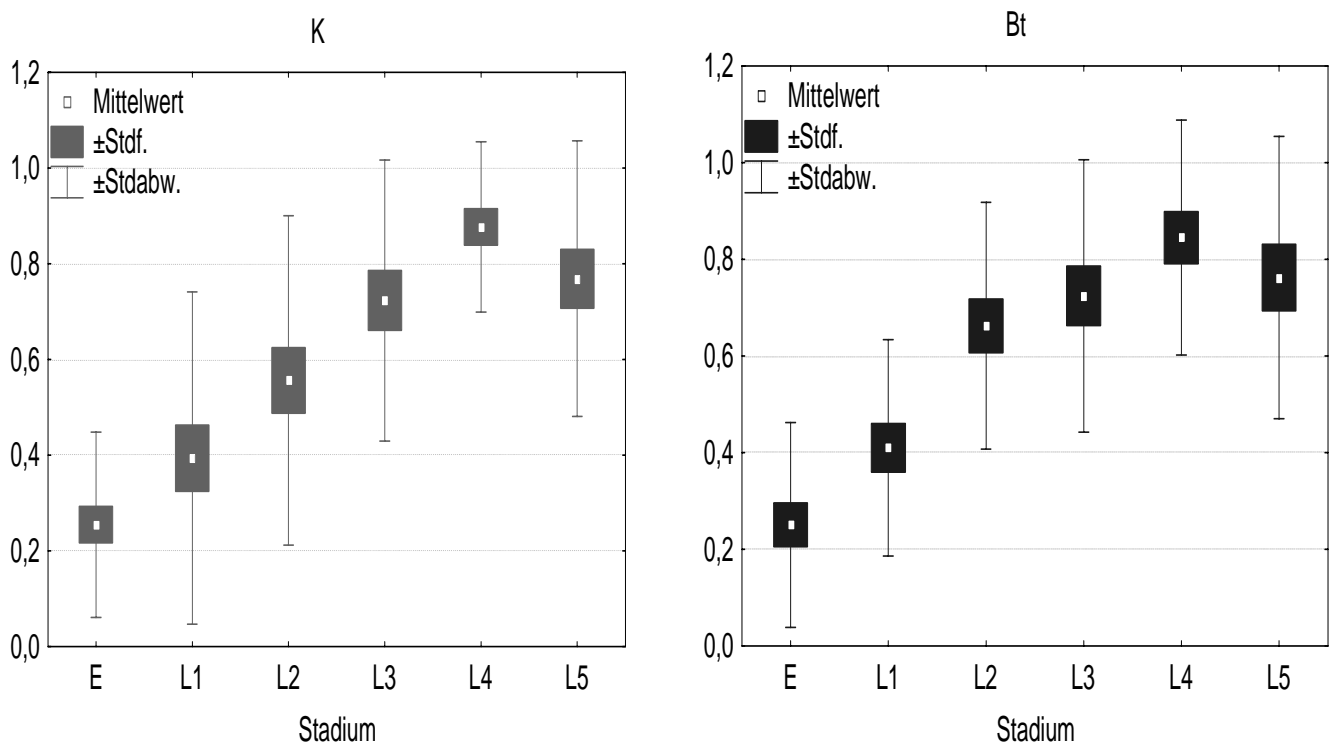


Abb. 27 Zahl an verdeckelten Brutzellen (Puppenstadien) in den Kleinvölkern ( $n_1=n_2=9$ )

Neben der Gesamtzahl an gepflegter Brut wurden auch pro Volk etwa 200 einzelne Brutzellen wöchentlich in ihrer Entwicklung verfolgt. Dabei zeigt sich, dass Eier und Larven in beiden Versuchsgruppen in Abhängigkeit von ihrem Entwicklungsstadium unterschiedlich gut gepflegt werden (Abb. 28) (Kruskal-Wallis-ANOVA,  $p < 0,05$ ). Eier werden lediglich zu 25% von den Arbeiterinnen weitergepflegt, die jüngsten Larvenstadien (L1) zu 40%, L2-Larven zu ca. 60%, L3-Larven zu über 70% und die größten Larven (L4 und L5) zu mehr als 80%. Vergleicht man die Brutpflege einzelner Stadien zwischen Bt- und Kontrollvölkern, so unterscheiden sie sich bei paarweise Vergleichen nicht (Kolmogorov-Smirnov-Test,  $p > 0,05$  für alle Stadien). D.h.

unabhängig von der Präsenz des Toxins werden die Brutstadien in allen Völkern auf gleiche Weise gepflegt: Jüngere Stadien werden schlechter, ältere vor allem die L4- und L5-Stadien werden zu über 80% weiter gepflegt. D.h. je mehr von den Arbeiterinnen in die Brutpflege investiert wurde, desto eher werden sie Larven weitergepflegt, je jünger die Stadien sind, desto eher werden sie kannibalisiert. Dies trifft besonders für die Eier zu. Die Variationskoeffizienten schwanken in den Kontrollen zwischen 0,19 und 0,79 und bei den Bt-Völkern zwischen 0,29 und 0,82. Sie sind im Mittel deutlich niedriger als die bei den Brutzellzahlen. Für einen schärferen Vergleich der Völker ist letzterer Parameter zweifelsohne besser geeignet als die reine Zahl der Brutzellen.



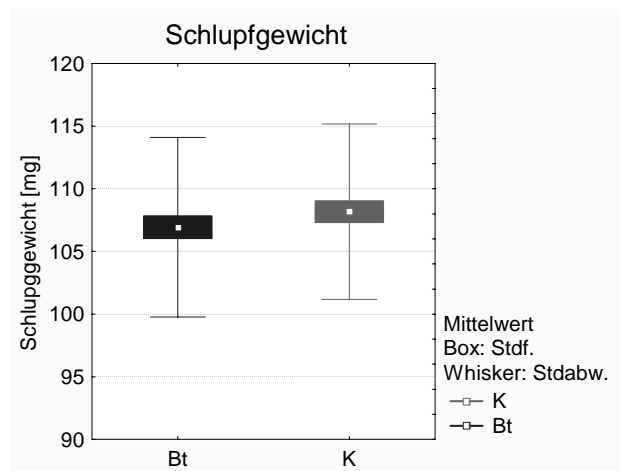
**Abb. 28 Anteil weitergepflegter Eier und Larvenstadien L1-L5.**  
**Kontrollvölker (grün):**  $n_{Ei}=878$  ,  $n_{L1}=95$  ,  $n_{L2}=111$  ,  $n_{L3}=73$  ,  $n_{L4}=91$  ,  $n_{L5}=67$   
**Bt-Völker (blau):**  $n_{Ei}=1168$  ,  $n_{L1}=124$  ,  $n_{L2}=177$  ,  $n_{L3}=101$  ,  $n_{L4}=124$  ,  $n_{L5}=90$

### Fazit

Mit fortgeschrittenerem Entwicklungsalter steigt die Aufzuchttrate der Larven an – nur etwa 25% der gelegten Eier werden bis zum Puppenstadium weitergepflegt, eine Larve des vorletzten (L4) Stadiums hat demgegenüber eine Überlebenswahrscheinlichkeit von über 85%. Dabei unterscheidet sich die Brutpflegeaktivität der Bt-Völker nicht von der der Kontrollvölker. Von den drei Untersuchungsparametern Zahl offener Zellen, Zahl verdeckelter Zellen und Analyse der Überlebenswahrscheinlichkeit einzelner Stadien ist letzterer angesichts der vergleichsweise niedrigsten Variationskoeffizienten der aussagekräftigste. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe decken sich in der Tendenz mit denen der ersten beiden.

### II.2.3.4. Schlupfgewicht

Am Ende des Versuchszeitraums wurden zwei Endpunkt-Analysen durchgeführt, die Bestimmung des Schlupfgewichtes junger Arbeiterinnen und deren Lebensdauer. Das Schlupfgewicht hat sich in Voruntersuchungen als ein sehr selektiver Parameter in der Wirkungsprüfung herausgestellt. Es ist zudem ein Maß für die Vitalität der adulten Bienen: Untergewichtige Bienen haben eine geringere Lebenserwartung als normalgewichtige. Für die Ermittlung der Schlupfgewichte wurden 64 bzw. 62 frisch geschlüpfte Bienen gewogen. Im Mittel wogen die Bienen 107 mg (Bt) bzw. 108 mg (Kontrolle) (Abb. 29). Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant. Da die Bienen in ihrem Gewicht denen anderer Untersuchungen entsprechen, entwickelten sich die Bienen offenbar normal. Das bedeutet, dass die Bienen nicht durch das Bt-Toxin in ihrer Gewichtsentwicklung beeinflusst werden.



**Abb. 29 Schlupfgewichte adulter Bienen in Kontroll- und Bt-Völkern**  
( $n_{Bt}=62$ ,  $n_K=64$ ; t-Test:  $P>0,05$ )

### II.2.3.5. Lebensdauer

Um die Lebensdauer der adulten Bienen zu erfassen, wurden 67 Bienen der Kontroll-Gruppe und 63 Bienen der Bt-Versuchsgruppe am Tag ihres Schlupfes aus der Brutzelle markiert und alle zusammen in ein Schauvolk mit Königin und anderen Arbeiterinnen eingebracht, damit sie unter exakt gleichen Bedingungen aufwachsen. Alle drei Tage wurden die Völker durch die Glasscheibe auf das Vorkommen an Bienen untersucht. Der Versuch dauerte bis zum 11.3.2004. Während dieser Zeit erhielten die Bienen keinen transgenen Pollen mehr.

Überraschenderweise unterschied sich durchschnittliche Lebensalter der Bienen aus den Bt-Völkern signifikant von denen der Kontrollvölker (24 Tage bei Bt vs. 29 bei den Kontrollvölkern, t-Test  $p<0,05$ ). Auch die Survival-Analyse (Abb. 30) mit dem log-Rank-Test wies auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen hin. Diese Ergebnisse waren insofern überraschend, weil die Überlebensstatistik 2002 selbst bei stärkerer Exposition keinerlei Unterschiede auswies. Diese Differenzen sind nicht erklärbar. Erklärungsmöglichkeiten wären eine zu geringe Stichprobenzahl, das Problem genetischer Unterschiede zwischen den Versuchsvölkern und das Problem, dass Bienen in ein Schauvolk eingefügt wurden, das sich genetisch von den Ausgangsvölkern unterscheidet. Möglicherweise wurden die fremden Bienen nicht so gut gepflegt. Angesichts der Ergebnisse aus den anderen Experimenten, insbesondere auch aus den Versuchen zur Mortalität der adulten Bienen (vgl. II.2.3.1) und der älteren

Larvenstadien (vgl. II.2.3.3.), wo sich keine Unterschiede erkennen ließen, wird diesem Ergebnis ein eher zufälliger Charakter beigemessen.

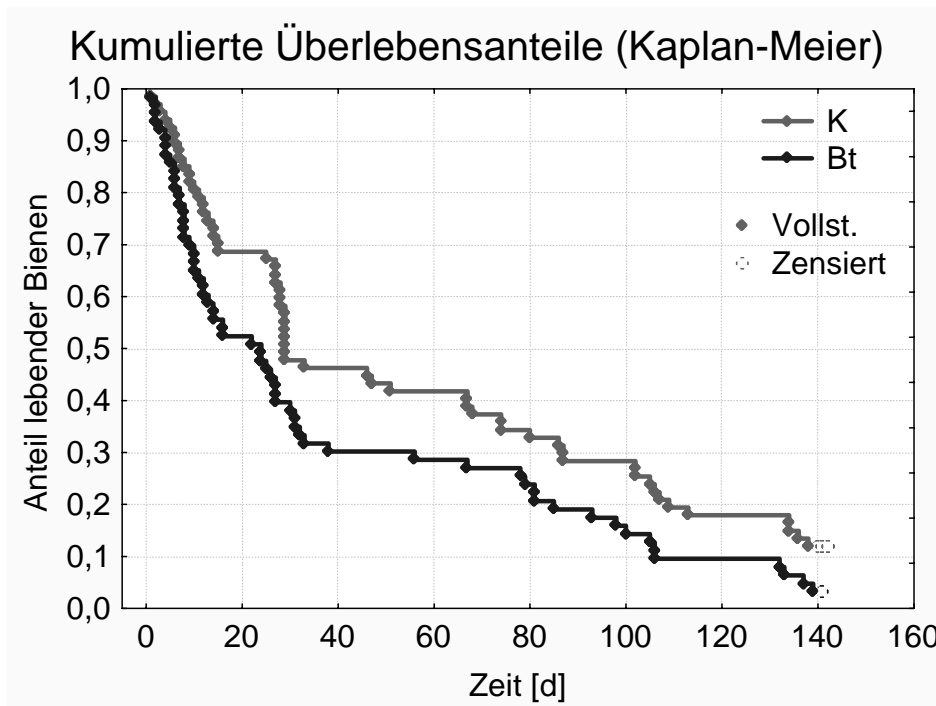


Abb. 30 Überlebensstatistik von Bienen aus Bt- und Kontrollvölkern  
( $n_{Bt}=63$   $n_K=67$ , Log-Rank-Test  $p<0,05$ )

### Zusammenfassung

Honigbienen werden weder in ihrer Sammelaktivität noch ihrer Brutpflegeleistung durch sechswöchige Exposition zu Bt-Toxin aus GV-Maispollen mit dem Event Bt 176 beeinflusst. Auch die Schlupfgewichte der Jungbienen unterscheiden sich nicht. Eine chronische Exposition über Zeiträume, die die Blühphase von Mais weit überschreiten, führt zu keiner nachteiligen Entwicklung der Bienenvölker. Das Bt-Toxin aus Maispflanzen kann demnach als für Bienen unbedenklich eingestuft werden.

Die im Jahr 2002 beobachtete Wechselwirkung von um das 10-fache erhöhten Bt-Dosen und dem Parasiten *Nosema apis* trat bei der natürlichen Exposition nicht auf. Gesunde Bienen werden offenbar nicht durch das Bt-Toxin beeinflusst. Ob dies auch für erkrankte und damit geschwächte Bienen zutrifft, konnte bisher nicht weiter untersucht werden, weil die dafür benötigten großen Mengen an *Nosema*-Sporen nicht zur Verfügung standen und ein entsprechendes Verfahren noch nicht entwickelt ist. .

#### **II.2.4. Vierte Freilandversuchsreihe zur Prüfung der chronischen Toxizität von Bt-Toxin mit Pollen von Bt176-Maispflanzen.**

Da im Pollen von Mais größere Variationen in der Expression des Bt-Gens auftreten (Stanley-Horn et al. 2001, <http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/fs006458t.htm>, Jehle pers. Mitteilung) und die gentechnische Sicherheit eine wie auch bei Pflanzenschutzmittelprüfung übliche Sicherheitsmarge der doppelten Aufwandsmenge wünschenswert macht, wurde der Pollen der Bt-Maissorte NovBt176 zusätzlich mit der einfachen im Pollen vorkommenden Dosis des Toxins behandelt und für 6 Wochen an Bienen unter Halbfreilandbedingungen verfüttert. Die Kontrollvölker bekamen Pollen der isogenen, nicht gentechnisch veränderten Sorte.

Wie in allen Versuchsreihen zuvor wurden neben der Zahl der adulten Bienen und Brutstadien auch die Sammelaktivität und Brutpflegeaktivität erfasst. Am Ende der Versuches wurde das Schlupfgewicht adulter Arbeiterinnen und deren Überlebensdauer erfasst.

Aus der erhobenen Datenmenge wird hier nur der Parameter Bienenzahl dargestellt, da sich in den anderen Versuchen an dessen Veränderungen auch eine Fülle an Veränderungen in den anderen erhobenen Parametern ablesen ließ – insbesondere ist die Zahl der Bienen wesentlich für den Umfang an Brut- und Sammelaktivität (vgl. II.2.2.). Die Zahl der Bienen nahm von initial 1900 Bienen/Volk über den gesamten Versuchszeitraum kontinuierlich ab (Abb. 31). Die Werte unterscheiden sich die Zahl der Bienen zwischen beiden Gruppen nicht (ANOVA mit Messwiederholungen,  $N_1=N_2=9$ ;  $P>0,05$ ). D.h. Das Bt-Toxin wirkt sich nicht negativ auf die Zahl adulter Bienen aus.

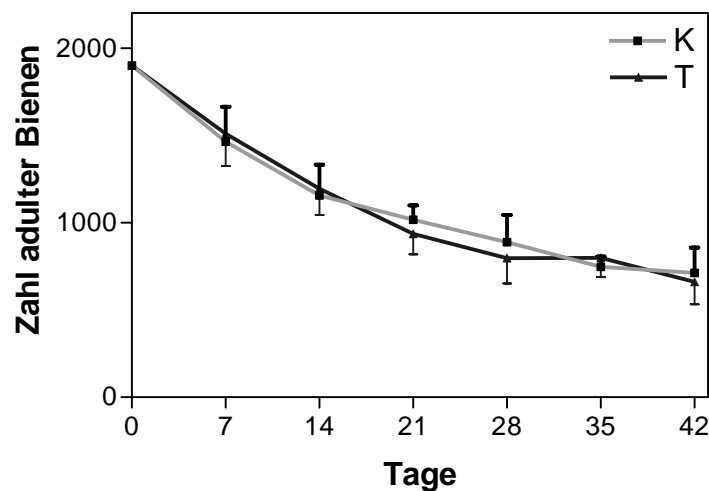


Abb. 31 Zahl adulter Bienen während des Versuchszeitraums von 6 Wochen, n=9

Der Endpunktparameter Schlupfgewicht unterscheidet sich zwischen beiden Versuchsgruppen nicht (Abb. 32). Wie schon in den Versuchen zuvor zeigen beide Gruppen Schlupfgewichte mit geringer Variation, was auf hinreichende, störungsfreie Brutpflege in den Bienenvölkern hinweist.

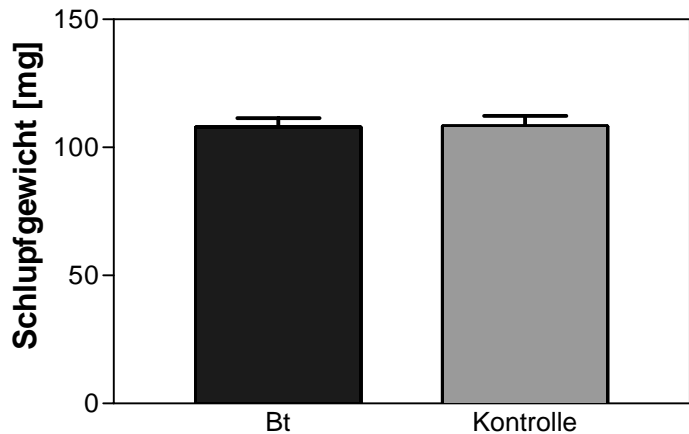


Abb. 32 Schlupfgewichte adulter Arbeiterinnen am Ende des 6-wöchigen Versuchs  
 $N_{\text{Bt}}=156$ ,  $N_{\text{Kontrolle}}=161$

### *Fazit*

**Maispollen der Sorte NovBt176 wirkt sich auch in doppelter als der natürlich vorkommenden Dosis bei langer Exposition von 6 Wochen nicht negativ auf die Entwicklung der Bienenvölker aus. Deren Sammel- und Brutpflegeaktivität unterscheidet sich nicht von denen der Kontrollvölker und auch die Überlebensdauer der Bienen ist gleich. D.h. das die doppelte Dosis des Bt-Toxins selbst unter den o.a. worst-case-Bedingungen als bienenungefährlich angesehen werden.**

### II.2.5. Fünfte Freilandversuchsreihe zur Prüfung der chronischen Toxizität von Bt-Toxin mit Pollen von Mon810-Maispflanzen

Im Jahr 2004 wurde die bisher nicht berücksichtigte Maispflanze mit dem Event Mon810 mit einem deutlich niedrigeren Gehalt an Bt-Toxin (Jehle, pers. Mitteilung) in die Versuche mit einbezogen. Der Bt-Pollen stammte von einem Anbaufeld bei Iden (Sachsen-Anhalt) und wurde neun Kleinvölkern verfüttert, die neun Kontrollvölker erhielten Maispollen ohne Bt. Über einen Zeitraum von 6 Wochen wurden wie schon bisher die Parameter Bienenzahl, Zahl offener Brutzellen, Zahl geschlossener Brutzellen, Brutpflege- und Sammelaktivität erfasst und als Endpunktbestimmungen das Schlupfgewicht adulter Arbeiterinnen und ihre Lebensdauer gemessen. Von den erhobenen Daten werden hier nur die aussagekräftigsten aufgeführt. Die Zahl adulter Bienen nimmt über den Versuchszeitraum von initial 1800 Bienen/Volk kontinuierlich ab (Abb.33). Die beiden Versuchsgruppen unterscheiden sich bezüglich dieses Parameters nicht (ANOVA mit Messwiederholungen,  $N_1=N_2=9$ ;  $P>0,05$ ). D.h., das Bt-Toxin aus Maispollen von Mon810 wirkt sich nicht negativ auf die Zahl adulter Bienen aus. Auch alle anderen Parameter zur Brutpflege wie Zahl der Eier, Larven und verdeckelten Brutzellen unterscheiden sich zwischen der Gruppen nicht. Die Pollen- und Nektarsammelaktivität unterscheidet sich zwischen den Gruppen nicht, sie reflektiert vielmehr die schon aus allen anderen Experimenten bekannte mikroklimatische Situation.



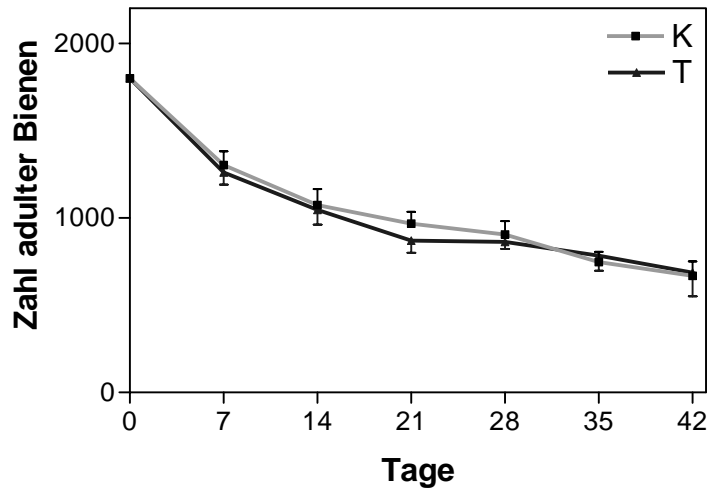


Abb. 33 Zahl adulter Bienen während des Versuchszeitraums von 6 Wochen, n=9

Das Schlupfgewicht der Bienen ist zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (t-Test,  $p < 0,05$ ) und variiert nur marginal (Abb.34). Der geringe Variationskoeffizient weist auf stabile Brutpflegebedingungen in den Völkern hin. Störungen wie z.B. eine Parasitierung durch die Varroa-Milbe wirken sich drastisch auf das Schlupfgewicht aus (vgl. II.2.2.), so dass

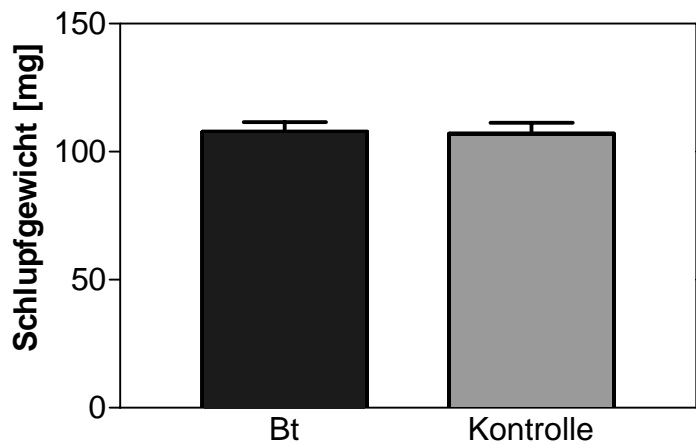


Abb.34 Schlupfgewicht adulter Arbeiterinnen am Versuchsende  
 $N_{Bt} = 126$ ,  $N_{Kontrolle} = 146$

### Fazit

**Maispollen der Sorte Mon810 wirkt sich auch bei langer Exposition von 6 Wochen nicht negativ auf die Entwicklung der Bienenvölker, ihre Sammel- und Brutpflegeaktivität und das Überleben der Bienen aus. Die transgene Maissorte kann demnach selbst unter worst-case-Bedingungen als bienenungefährlich angesehen werden.**

### III.3. Anbaubegleitendes Monitoring

Im Jahr 2003 wurden 9 Völker in unmittelbare Nähe des Bt-Maisfeldes bei Halle (Ragegast)

transportiert, neun Kontrollvölker standen an einem nahen Standort, aber außerhalb eines Radius von 5 km an einen Feld mit nicht-transgenen Mais, um eine Überlappung der Sammellareale der Völkergruppen zu vermeiden. und gleichzeitig weitestgehend gleiche klimatische Bedingungen zu gewährleisten. Im Maisfeld wurde während der Maisblüte der Bflug der Maispflanzen durch Honigbienen erfasst. Dazu wurden je 10 2 x 2 m große Parzellen stündlich über einen Zeitraum von 10 Minuten beobachtet. Dies geschah an fünf verschiedenen aufeinanderfolgenden Sonnentagen. Zudem wurde der Bflug auch an den Ackerrandstreifen erfasst.

Außerdem wurden an diesen Beobachtungstagen Pollenfallen in die Bienenvölker eingebracht, die eine durchschnittliche Effizienz von etwa 60% aufweisen. Mittels mikroskopischer Pollenanalyse wurde der Anteil an Maispollen an den Pollenhöschchen in der Falle ermittelt.

Außerdem wurden die Bienenvölker hinsichtlich der Entwicklung ihrer Bienenzahl und ihrer Brutaktivität evaluiert. Im Frühjahr 2004 wurde zudem die Volksstärke und Überwinterungsfähigkeit der Bienenvölker nach Bt-Maispollen-Exposition untersucht.

#### *Sammelaktivität im Maisfeld*

Während der Untersuchungstage stellte sich eine deutliche Rhythmizität in der Sammelaktivität dar. Honigbienen sowie Hummeln waren nur am frühen Morgen im Maisfeld anzutreffen. Nach 10 Uhr konnte in keiner der Untersuchungsparzellen noch eine Honigbiene Pollen sammelnd angetroffen werden. Lediglich zwischen 8 und 10 Uhr fanden sich vereinzelt Honigbienen. Hummeln insbesondere *Bombus terrestris* und *Bombus lapidarius* waren auch noch bis in die Mittagszeit vereinzelt in den Parzellen anzutreffen. Dagegen waren Honigbienen, Hummeln und andere Wildbienen während des gesamten Tages an den Randstreifen der Maisfelder zu beobachten. Deren Flugaktivität wurden während der Mittagsstunden geringer und stieg am Nachmittag gegen 14:00 Uhr wieder an. In der Tagessumme lag die Sammelhäufigkeit in den Randstreifen um das 28-fache höher als im Maisfeld. Bei den Hummeln betrug das Verhältnis 13:1 – sie sind damit deutlich häufiger im Maisfeld anzutreffen als die Honigbienen.

#### *Maispollen in den Pollenfallen*

An den fünf Untersuchungstagen wurden im Durchschnitt nur  $2,3 \pm 1,6\%$  Maispollen in den Fallen der Völker am Maisversuchsfeld gefunden, in den Fallen der Kontrollvölker wurden  $2,6 \pm 2,3\%$  Maispollen gefunden. Die Sammelaktivität in den Maisfeldern ist damit ausgesprochen gering und schwankt zudem deutlich zwischen den einzelnen Bienenvölkern, obwohl sie aufgereiht nebeneinander standen.

Ein Problem in der Aussagekraft dieses Monitoring-Experimentes liegt darin, dass die Honigbienenvölker bei einem durchschnittlichen Flugradius 2,5 km etwa 20 qkm große Areale befliegen (Seeley, 1997), sich also im Versuchsfeld sowohl in den transgenen Varianten sowie in den Parzellen mit den isogenen Kontrollpflanzen und in der Mantelsaat finden lassen. Somit lag die tatsächliche Exposition zum Bt-Toxin aus Maispollen noch niedriger als aus den Prozentzahlen des Eintrags an Maispollen ersichtlich wird. Auf die Bestimmung der tatsächlich gesammelten einzelnen Bt-Sorten z.B. via sortenspezifischer PCR wurde angesichts der niedrigen Bflugzahlen und angesichts des besonderen Parzellenaufbaus, der nicht der zukünftigen Anbaupraxis entspricht, verzichtet.

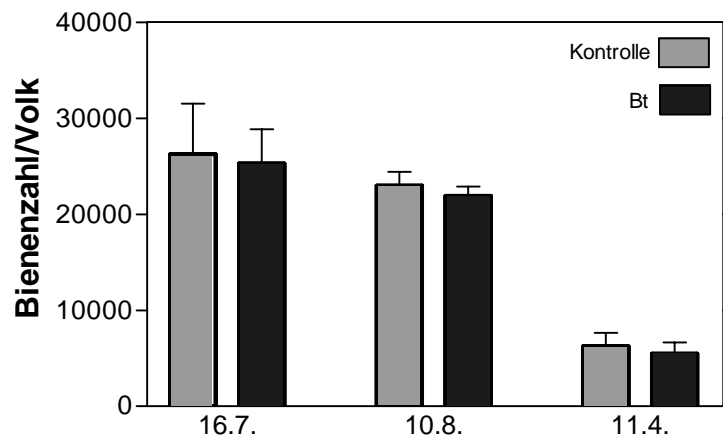
#### *Volksentwicklung und Überwinterung*

Vor Versuchsbeginn und drei Wochen nach Versuchsbeginn wurden Volksstärke und Brutfläche in den Bienenvölkern nach dem Liebefelder Schätzverfahren erfasst. Da auch die Ergebnisse der Auswinterung dieses Versuchsteils von Bedeutung sind, wurden alle Bienenvölker nach dem Versuch bei Radegast an den gleichen Überwinterungsstandort nach Halle transportiert, um sie nach der unterschiedlichen Mais-Exposition alle gleichen mikroklimatischen Bedingungen

auszusetzen. Die Völker unterschieden sich vor der Exposition nicht signifikant voneinander (t-Test,  $p < 0,05$ ). Nach drei Wochen hatte die Zahl der Bienen saison- und trachtbedingt in beiden Gruppen abgenommen (Abb. 35), trotzdem war auch hier kein signifikanter Unterschied zu erkennen (t-Test,  $p < 0,05$ ). Wenn man die jeweilige Abnahme der Bienenzahl in den Völkern als Vergleichsmaßstab nimmt, unterscheiden sich Kontroll- und Bt-Völker auch darin nicht signifikant.

### *Überwinterung*

Alle Völker wurden nach der zweiten Volksschätzung solange mit Zucker gefüttert, bis in allen Völkern eine Futtermenge von  $25 \pm 1,5$  kg/Volk am Ende der Auffütterung für die Überwinterung vorhanden war. Alle Völker wurden gleichermaßen und zum gleichen Zeitpunkt mit Ameisensäure zur Bekämpfung der Varroose behandelt und dann bis zum Frühjahr nicht mehr gestört. Im der zweiten Aprilwoche wurden die Völker bonitiert. Alle Völker hatten den Winter überstanden. Auch in der Zahl adulter Bienen nach der Auswinterung unterscheiden sich die beiden Versuchsgruppen nicht (vgl. Abb. 35). Das bedeutet, dass bei der Überwinterung von Bienenvölkern und der o.a. geringen Exposition zu Bt-Maispollen keine negativen Langzeiteffekte nachweisbar sind.



**Abb. 35 Monitoring: Entwicklung der Bienenvölker im Mais und nach der Überwinterung**  
n = 9, Mittelwert + s.d.

### ***Fazit Monitoring bei freifliegenden Bienenvölkern***

Freifliegende Bienenvölker wurden an Maisfelder während deren Blüte gestellt, um sie als Monitoren für negative Wirkungen von Bt-Toxinen zu nutzen. Es traten weder negative Effekte von Bt-Maispollen auf die Zahl der Bienen und noch die Entwicklung der Brut in freifliegenden Bienenvölkern auf. Weder in der Entwicklung der Völker im Spätsommer nach der Maisblüte noch in Überwinterungsfähigkeit und Frühjahrsentwicklung unterscheiden sich die beiden Versuchsgruppen voneinander. D.h., dass die Volksentwicklung der Bienenvölker keinerlei Hinweise auf negative Wirkungen durch das Bt-Toxin ergibt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Bienenvölker in diesem Versuch mit weniger als 3% Pollenanteil Mais nur in geringem Umfang als Trachtpflanze nutzten und somit eine Bt-Toxinexposition auch nur entsprechend gering war.

## *Zusammenfassung*

Generell kann aufgrund der Ergebnisse der Halbfreiland und Freilandversuche eine chronisch toxische Wirkung von Bt-Mais der Sorten NovBt176 und Mon810 auf gesunde Honigbienenvölker nicht nachgewiesen werden. Berücksichtigt man dazu noch die gegenüber den herkömmlichen, gesetzlich vorgeschriebenen Pflanzenschutzmittelprüfungen wesentlich erhöhten Stichprobenzahlen und die extremen 6-wöchigen Expositionen mit den Bt-Toxinen, dann kann eine toxische Wirkung auf gesunde Bienen unter natürlichen Bedingungen nach den erfolgten umfangreichen Untersuchungen mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden. Dieses zentrale Ergebnis wird noch dadurch untermauert, dass Honigbienen selbst in den ostdeutschen Agrarräumen mit großen Maisschlägen nur wenig Maispollen sammeln, wenn andere Pflanzen als Pollenquellen zur Verfügung stehen. In unseren Untersuchungen betrug der Anteil an Maispollen unter 5% des gesammelten Pollens. Selbst dann, wenn Bienenvölker ausschließlich Pollen der o.a. GV-Maispflanzen sammeln würden, wie es in den Zeltversuchen simuliert wurde, kann mit der durch die Stichprobenzahl bedingten Power ausgeschlossen werden, dass sich Bt-Maispollen der Sorten Mon810 und Novartis Bt176 negativ auf gesunde Bienenvölker auswirken.

Die eingangs aufgestellte Hypothese, dass der großflächige Anbau von Bt-Mais Auswirkungen auf wichtige phytophage Nichtziel-Organismen wie die Honigbiene habe, kann durch das vorliegende Datenmaterial nicht gestützt werden. Auch die Hypothese, dass die Wirkung der Bt-Endotoxine bei der Aufnahme mit dem Pollen stärker ist als die Wirkung von schon seit Jahren im Pflanzenschutz eingesetzten Bt-Präparate, trifft angesichts der fehlenden Wirkung von Bt-Toxinen auf gesunde Bienenvölker nicht zu.

## **II.4. Voraussichtlicher Nutzen**

Die im Schlußbericht zusammenfassend dargestellten Ergebnisse können in mehrerer Hinsicht genutzt werden:

1. Zum einen belegen die Daten, das Bt-Mais der Sorten NovBt176 und Mon810 für die Honigbiene als Nutzinsekt und bedeutendstem Bestäuber auch unter extremen „worst-case“-Szenarien wie sie hier zum Einsatz kamen und weit über das reale Mass einer „natürlichen“ Exposition hinausgehen, keine negativen Wirkungen auf gesunde Bienenvölker haben und damit nicht toxischer als vergleichbare Bt-Präparate sind. Die Ergebnisse sind sowohl für die äußerst sensiblen Imker als auch für die Öffentlichkeit generell und für politische Entscheidungen auch angesichts des Modellcharakters der Honigbiene von herausragender Bedeutung. Selbstverständlich haben die Ergebnisse auch Auswirkungen auf die Diskussion und Entscheidungen im Zusammenhang mit der Freigabe des Anbaus von Bt-Mais.
2. Es ist weiterhin davon auszugehen, dass unsere Methodenentwicklungen vor allem die detaillierten Ansätze für das Halbfreiland Eingang in zukünftige international standardisierte Prüfmethode finden. Dazu ist die bisherige Zusammenarbeit im Forschungsverbund eine wichtige Voraussetzung. In der Zwischenzeit bin ich aufgrund unserer Arbeiten in eine Kommission für Fragen der Methodenentwicklung zur Prüfung von GVP auf Honigbienen berufen worden. Die Ergebnisse werden auch in internationale Gremien und entsprechende Prüfrichtlinien (OECD) finden.
3. Die Ergebnisse zur Wirkung von Bt-Toxinen auf an Mikrosporidien erkrankte Bienen müssen in einem zukünftigen Forschungsansatz Eingang finden und dort untersucht werden. Gerade die aktuelle Diskussion subletaler Wirkungen verschiedenen Noxen findet in den im Teilprojekt gewonnenen Erkenntnissen zusätzliche Fakten.

## **II.5. Fortschritt auf dem Gebiet bei anderen Stellen**

Es sind während der Projektlaufzeit bis zur Berichterstattung keine Veröffentlichungen zum Thema erschienen, die über die gängigen Datenbanksysteme (Current Contents, Biosis, Medline, Web of Science) zugänglich sind, die die hier aufgeführten Daten tangieren oder ergänzen.

## **II. 6. Veröffentlichungen**

Über die im Projekt erzielten Ergebnisse sind zwei Manuskripte in Vorbereitung. Über die Ergebnisse wurde bislang auf Fachtagungen (IOBC) und internationalen Kongressen (Eurbee 2004, Int. Congress of Entomology 2004, Brisbane) berichtet. Auf die Förderung durch das BMBF wurde in den Zusammenfassungen und wird auch in Zukunft hingewiesen.

### III. Literatur

- ANDERSON, L.M.; DIETZ, A. (1976): Pyridoxine requirement of the honey bee (*Apis mellifera*) for brood rearing. *Apidologie* 7: 67-84.
- BACK, E. (1956): Einfluss der im Pollen enthaltenen Vitamine auf Lebensdauer, Ausbildung der Pharynxdrüsen und Brutfähigkeit der Honigbiene. *Insectes Sociaux* 3: 285-292.
- BRØDSGAARD, H.F.; BRØDSGAARD, C.J.; HANSEN, H.; LÖVEI, G.L. (2001): Analyse von Umweltrisiken durch genmodifizierte Pflanzen mit Hilfe von Bienenlarven. Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V. 48. Jahrestag in Bad Neuenahr/Ahrweiler vom 27.03.-29.03.2001. *Apidologie* 32: 453-520.
- BUJOK, B.; KLEINHENZ, M.; FUCHS, S.; TAUTZ, J. (2002): Hot spots in the bee hive. *Naturwissenschaften* 89: 299-301.
- CURE, G.; SCHMIDT, H.-W.; SCHMUCK, R. (2000): Results of a comprehensive field research program with the systemic insecticide imidacloprid (GAUCHO). In: Péliissier, C.; Belzunces, L.P. (Ed.) (2000): Hazards of pesticides to bees. *IOBC mprs Bulletin*: 23 (3).
- CZOPPELT, C.; SHARMA, G.K.; REMBOLD, H. (1980): Behaviour of honeybee colonies under controlled environmental conditions in a flight room. *Journal of Apicultural Research* 19: 232-241.
- DEPLANE, K.S.; HARBO, J.R. (1987): Effect of queenlessness on worker survival, honey gain and defence behaviour in honeybees. *Journal of Apicultural Research* 26: 37-42.
- DOULL, K.M. (1973): Relationship between pollen, broodrearing and consumption of pollen supplements by honeybees. *Apidologie* 4: 285-293.
- DOULL, K.M. (1974): Effect of distance on the attraction of pollen to honeybees in the hive. *J. Apicult. Res.* 13: 27-32.
- DROEGE, G. (1993): Die Honigbiene. Deutscher Landwirtschaftsverlag Berlin GmbH, Ehrenwirth.
- EISCHEN, F.A.; ROTHENBUHLER, W.C.; KULINCEVIC, J.M. (1983): Brood rearing associated with a range of worker- larva ratios in the honeybee. *Journal of Apicultural Research* 22: 163-168.
- EISCHEN, F.A.; ROTHENBUHLER, W.C.; KULINCEVIC, J.M. (1984): Some effects of nursing on nurse bees. *Journal of Apicultural Research* 23: 90-93.
- FREE, J.B.; RACEY, P.A. (1968): The effect of the size of honeybee colonies on food consumption, brood rearing and the longevity of bees during winter. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 11: 241-49.
- FRISCH, K. von (1993): Aus dem Leben der Bienen. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- GARY, N.E. (1992): Activities and behavior of honey bees. In: Graham, J.M (Ed.) (1992): *The hive and the honey bee*. Dadant & Sons, Hamilton: 269-372.
- GUEZ, D.; SUCHAIL, S.; MALESZKA, R.; GAUTHIER, M.; BELZUNCES, L.P. (2000): Sublethal effects of Imidacloprid on learning and memory in honeybees. In: Péliissier, C.; Belzunces, L.P. (Ed.) (2000): Hazards of pesticides to bees. *IOBC mprs Bulletin*: 23 (3).
- HARBO, J.R. (1986): Effect of population size on brood production, worker survival and honey gain in colonies of honeybees. *Journal of Apicultural Research* 25: 22-29.
- HARTFELDER, K.H. (1986): Caste differentiation in Meliponine bees - Comparative analyse of larval food under the aspect of balanced nutrition. *Apidologie* 17: 361-364.

- HARTFELDER, K.H.; ENGELS, W. (1989): The composition of larval food in stingless bees - Evaluating nutritional balance by chemosystematic methods. *Insectes Sociaux* 36: 1-14.
- HELLMICH, R.L.; ROTHENBUHLER, W.C. (1986): Relationship between different amounts of brood and the collection and use of pollen by the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie* 17: 13-20.
- HERBERT, E.W. Jr.; SHIMANUKI, H. (1982): Effect of population density and available diet on the rate of brood rearing by honey bees offered a pollen substitute. *Apidologie* 13: 21-28.
- HERBERT, E.W. Jr.; SHIMANUKI, H. (1983): Effect of Mid-season change in diet on diet consumption and brood rearing by caged honey bees. *Apidologie* 14: 119-125.
- HÜSING, J.O.; NITSCHMANN, J. (1987): *Lexikon der Bienenkunde*. Ehrenwirth Verlag, München.
- KULINCEVIC, J.M.; ROTHENBUHLER, W.C. (1973): Laboratory and field measurements of hoarding behaviour in the honeybee. *Journal of Apicultural Research* 12: 179-182.
- LEWIS, G.B.; GOUGH, H.J.; KÜNAST, C.; THOMPSON, H.M.; STEVENSON, J.H. (2000): The use of toxic standards in the honey bee acute toxicity test. In: Pélissier, C.; Belzunces, L.P. (Ed.) (2000): *Hazards of pesticides to bees*. IOBC mprs Bulletin: 23 (3): 11.
- LEWIS, L.A.; SCHNEIDER, S.S.; DEGRANDI-HOFFMAN, G. (2002): Factors influencing the selection of recipients by workers performing vibration signals in colonies of the honeybee, *Apis mellifera*. *Animal Behaviour* 63: 361-367.
- MALONE L.A., BURGESS E:P:J., STEFANOVIC D. (1999) Effects of *Bacillus thuringiensis* biopesticide formulations, and a soybean trypsin inhibitor on honey bees (*Apis mellifera* L.) survival and food consumption *Apidologie* 30: 465-474.
- MALONE, L.A.; PHAM-DELEGUE, M. (2001): Effect of transgene products on honeybees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp.). *Apidologie* 32: 287-304.
- MAURIZIO, A. (1950): The influence of pollen feeding and brood rearing on the length of life and physiological condition of the honeybee. *Bee World* 31: 9-12.
- MICHENER, C.D. (1963): *The social behaviour of the bees*. Harvard University Press: Cambridge (Mass.).
- NEUKIRCH, A. (1982): Dependence of the life span of the honeybee (*Apis mellifica*) upon flight performance and energy consumption. *Journal of Comparative Physiology* 146: 35-40.
- NEUMANN, K. (2002): Untersuchung zur Wirkungsweise von *Bacillus thuringiensis* Toxin CryIAb aus genetisch verändertem Mais auf die Honigbiene (*Apis mellifera* L.). Staatsexamenarbeit, Jena.
- PICARD-NIZOU A.L., GRISON R., OLSEN L., PIOCHE C., ARNOLD G., PHAM-DELEGUE M.H. (1997) Impact of proteins used in plant genetic engineering: Toxicity and behavioral study in the honeybee. *J. Econ. Entomol.* 90: 1710-1716.
- PIERCE CMF, SOLTER LF, WEINZIERL RA (2001) Interactions between *Nosema pyrausta* (Microsporidia : Nosematidae) and *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* in the European corn borer (Lepidoptera : Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 94, 1361-1368.
- RIESSBERGER, U.; CRAILSHEIM, K. (1997): Short-term effect of different weather conditions upon the behaviour of forager and nurse honey bees (*Apis mellifera carnica* Pollmann). *Apidologie* 28: 411-426.
- RITTER W (1994): *Bienenkrankheiten*. Verlag Eugen Ulmer & Co., Stuttgart
- ROBINSON, G.E. (1998): *Colony integration in honey bees: Genetic, endocrine and*

- social control of division of labor. *Apidologie* 29: 159-170.
- SACHS, L. (2002): *Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- SCHMICKL, T.; CRAILSHEIM, K. (2002): How honeybees (*Apis mellifera* L.) change their broodcare behaviour in response to non-foraging conditions and poor pollen conditions. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 51: 415-425.
- SCHULZ, D.J.; BARRON, A.B.; ROBINSON, G.E. (2002): A role for octopamine in honey bee division of labor. *Brain Behav. Evol.* 60: 350-359.
- SCHUR, A. (2003): <http://www.lk-wl.de/bienenkunde/2003schur.htm>
- SEELEY, T.D. (1982): Adaptive significance of age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 11: 287-293.
- SEELEY, T.D. (1997): Honigbienen. Im Mikrokosmos des Bienenstocks. Birkenhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin.
- SUCHAIL, S.; GUEZ, D.; BELZUNCES, L.P. (2000): Acute and chronic toxicity of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. In: Pélissier, C.; Belzunces, L.P. (Ed.) (2000): Hazards of pesticides to bees. IOBC mprs Bulletin: 23 (3).
- VANDENBERG J.G., SHIMANUKI H. (1986) Two commercial preparations of the beta exotoxin of *Bacillus thuringiensis* influence the mortality of caged adult honey bees. *Environ. Entomol.* 15: 166-169.
- WALLNER, K. (2000): Tests regarding the danger of the seed disinfectant, GAUCHO, for bees. In: Pélissier, C.; Belzunces, L.P. (Ed.) (2000): Hazards of pesticides to bees. IOBC mprs Bulletin: 23 (3).
- WEISS, K. (1984): Regulierung de Proteinhaushaltes im Bienenvolk (*Apis mellifera*) durch Brutkannibalismus. *Apidologie* 15: 339-354.
- WINSTON, M.L. (1987): *The biology of the honey bee*. Harvard University Press: Cambridge.
- WITTMANN, D. (1981): Determination of LC50 of Dimilin 25WP on honey bee brood using new „*Apis larvae test*“. *Z. angew. Entomol.* 92: 165-172.
- ZANDER E, BÖTTCHER FK (1984): *Krankheiten der Bienen*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

#### IV. Unterschrift

Halle, den 12.7.2005 (Hans-Hinrich Kaatz)