

Universität Hohenheim

Landesanstalt für Bienenkunde

Institut für Phytomedizin

Fachgebiet: Angewandte Entomologie

Prof. Dr. Dr. Claus P. W. Zebitz

**Pflanzenschutzmittelrückstände im
gehöselten Pollen der Honigbiene
(*Apis mellifera* L.) - Auswirkungen einer
feldrealistischen Pflanzenschutzmittel-
mischung auf Stockbienen und den Larven-
futtersaft**

Kumulative Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Agrarwissenschaften (Dr. sc. agr.)

vorgelegt der Fakultät Agrarwissenschaften von

H. Franziska Böhme

aus Altenburg

September 2017

Datum der Annahme der schriftlichen Dissertation:	11.10.2017
Datum der mündlichen Prüfung:	18.12.2017
Berichterstatter, 1. Prüfer:	Prof. Dr. Dr. Claus P. W. Zebitz
Mitberichterstatter, 2. Prüfer:	PD Dr. Peter Rosenkranz
3. Prüfer:	Prof. Dr. Martin Hasselmann
Leiter des Kolloquiums:	Prof. Dr. Stefan Böttinger
Dekan der Fakultät Agrarwissenschaften:	Prof. Dr. Ralf T. Vögele

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Ziele der Arbeit	8
2	Veröffentlichungen	10
2.1	Veröffentlichung 1: Pesticide residue survey of pollen loads collected by honeybees (<i>Apis mellifera</i>) in daily intervals at three agricultural sites in South Germany	10
2.2	Veröffentlichung 2: Chronic exposure of honeybees, <i>Apis mellifera</i> (Hymenoptera: Apidae), to a pesticide mixture in realistic field exposure rates	12
2.3	Veröffentlichung 3: From field to food – will pesticide-contaminated pollen diet lead to a contamination of royal jelly?	14
2.4	Veröffentlichung 4: From field to food II – will pesticide-contaminated pollen diet lead to a contamination of worker jelly?	16
	Veröffentlichung 4 - Anhang	36
3	Allgemeine Diskussion und Schlussfolgerungen	39
4	Zusammenfassung	50
4.1	Zusammenfassung	50
4.2	Summary	54
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	57
	Danksagungen	67
	Eidesstattliche Versicherung	69
	Belehrung	70

1 Einleitung

Pflanzenschutz (PS) stellt schon seit früher Geschichte einen wichtigen Aspekt für die Menschen dar. Anfangs lag der Fokus jedoch nur auf dem Vorratsschutz. Mit Beginn der neolithischen Lebensweise und dem Beginn des Ackerbaus, rückte der Schutz der Kulturpflanzen in den Vordergrund [1]. Bereits im Alten Testament gibt es Hinweise auf tierische Schädlinge sowie Pflanzenkrankheiten, i.e. Rost [2]. Jedoch konnte die Ursache von Krankheiten erst im Laufe der Neuzeit, v.a. mit der Entwicklung des Mikroskops, geklärt werden. Bis dahin behalf man sich mit natürlichen Stoffen als Pflanzenschutzmittel (PSM) wie Salpeter, Schwefel, Arsen, Knoblauchauszügen oder Kalk [3]. Natürlich vorkommende Substanzen finden, neben Nützlingen, auch heute noch im biologischen PS Anwendung.

Der Durchbruch der chemischen PSM setzte mit der Industrialisierung der Landwirtschaft im Zuge der industriellen Revolution ein [4]. Das erste synthetische Insektizid (Antinonin) wurde 1892 von der Firma Bayer in Deutschland entwickelt [5]. Aktuell sind in der Europäischen Union (EU) 493 aktive Substanzen zugelassen [5], von denen 272 in PSM in Deutschland zugelassen sind [5]. Der weltweite Umsatz von PSM lag 2016 bei 45,08 Milliarden Euro, davon für Deutschland im selben Jahr bei 1,415 Milliarden Euro [5]. Jedoch liegt der eigentliche Nutzen/Mehrwert, der durch PSM erzielt wird, weitaus höher. Noleppa [6] stellt mehrere direkte und indirekte Nutzen vor, die gesamtgesellschaftliche Vorteile mit sich bringen. Zum Beispiel zeigt er, dass Agrarprodukte zu erschwinglichen Preisen angeboten werden können, wenn durch konventionelle Landwirtschaft Quantität und Qualität der Produkte erhöht werden. Dadurch kann ebenfalls die Wirtschaftskraft steigen und es können Arbeitsplätze geschaffen werden. Andernfalls würden Ernteerträge je nach Kultur, Sorte oder Region durch Unkräuter, Krankheiten und Schädlinge um 50 - 80 % vermindert werden (Abb. 1) [6–8]. Besonders im Angesicht einer stetig wachsenden Weltbevölkerung ist man auf hohe Erträge und Qualität der Ernteprodukte angewiesen [9].

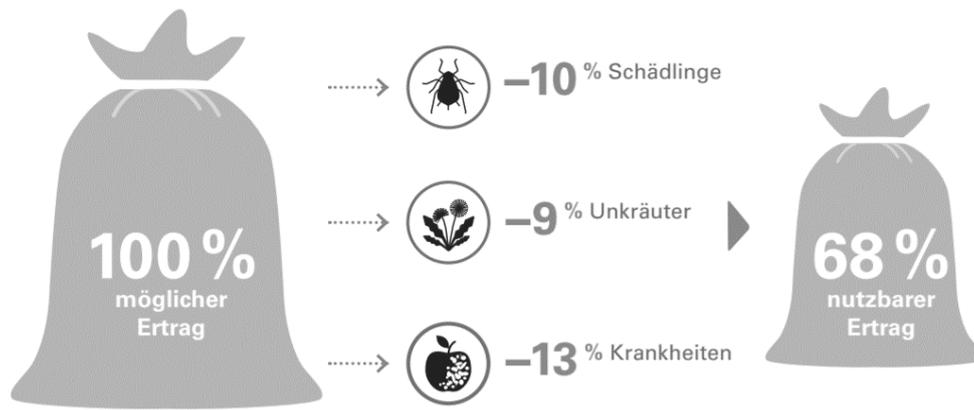


Abbildung 1: Ertragsminderung durch Schädlinge, Unkräuter oder Krankheiten führen zu einer reduzierten nutzbaren Erntemenge [6].

Folglich kommen PSM weltweit zahlreich zum Einsatz und verunreinigen Luft, Oberflächen, Boden und Gewässer. Sie können durch direkte Spritzmaßnahmen oder indirekt durch Saatgutbehandlungen auf Nicht-Ziel-Pflanzen oder ins Wasser abdriften oder aus dem Boden ins Grundwasser ausgewaschen werden [7]. Auf diese Weise können PSM auch mit Nicht-Ziel-Organismen in Kontakt treten [10]. An erster Stelle sind direkte Aufnahmerouten zu nennen. Dazu gehören wirkstoffhaltige Stäube, die beim Säen von behandeltem Saatgut entstehen und sich auf blühenden Pflanzen niedersetzen [11]. Ebenso die Wirkstoffaufnahme durch kontaminierte Pfützen, die als Wasserquelle dienen [12]. Sammelnde Insekten können während der Nektar- oder Pollenaufnahme direkt von Sprühapplikationen getroffen werden oder durch belaufen von wirkstoffhaltigen Pflanzenoberflächen Wirkstoff aufnehmen [13, 14]. Es wurde gezeigt, dass Wirkstoffe durch die ausgeprägte Vaskularisierung direkt über die Flügel aufgenommen und mit Hilfe der Hämolymphe verteilt werden [15]. Besonders bei Wirkstoffen mit systemischen Eigenschaften stellt das Sammeln von kontaminiertem Nektar, Pollen oder Guttationstropfen indirekte Aufnahmewege dar (Abb. 2) [16–20].

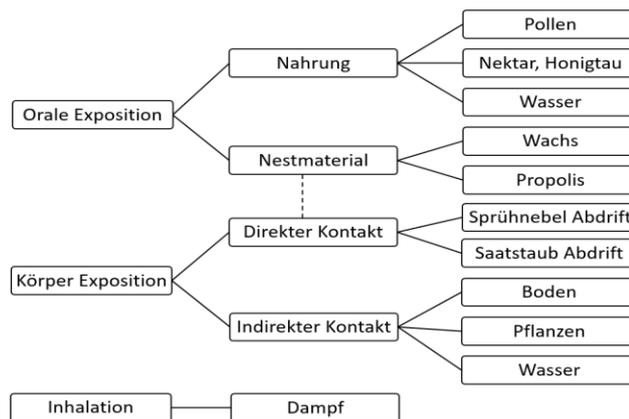


Abbildung 2: Mögliche Expositionswege von Nicht-Ziel-Organismen, wie z.B. Honigbienen, zu Pflanzenschutzmitteln [21].

Folglich wurden Rückstände von verschiedenen PSM auch in Völkern der Honigbiene (*Apis mellifera* L.) gefunden. So waren neben Honig, Wachs und Propolis, auch Pollen und daraus gefertigtes Bienenbrot nachweislich mit PSM belastet [22–24]. Der stete Kontakt zu, und die orale Aufnahme von PSM stehen weltweit im Verdacht für erhöhte Bienenverluste verantwortlich zu sein [25]. Seit dem Winter 2006/2007 wird in den USA diskutiert, ob PSM eine Ursache für das dort beobachtete „colony collapse disorder“ sind, einem rasanten Verlust von adulten Bienen ohne erhöhten Bientotenfall [26]. Auch in Deutschland gibt es die Überlegung, ob PSM Auslöser für erhöhte Winterverluste sind. Um diese Hypothese zu untersuchen, hat man vor über zehn Jahren das Deutsche Bienenmonitoring ins Leben gerufen [27]. Im Zuge dessen werden zweimal im Jahr Bienenbrotproben gezogen und auf Rückstände von PSM untersucht. Bienenbrot stellt fermentierte Pollenhöschen dar, die mit Drüsensekreten und Honig in einzelnen Wabenzellen von Arbeiterinnen gemischt werden [28]. Dadurch ist Bienenbrot immer eine Mischung aus einer Vielzahl von Pollenhöschen unterschiedlicher Pflanzen. Folglich kann die Analyse von Bienenbrot auf Rückstände von PSM nur eine ungefähre Abschätzung der wahren Belastung sein, da die Konzentration von stark belasteten Pollenhöschen durch unkontaminierte Pollenhöschen verdünnt wird. Hinzu kommt, dass PSM Applikationen von der Kultur, der Witterung und dem Befallsdruck von Schädlingen und Krankheitserregern abhängen und Honigbienen als Schönwettersammler zwischen unterschiedlich attraktiven Pflanzen unterscheiden. Letztendlich variieren Pollenhöschen in Zusammensetzung und Konzentration der PSM. Daher ist die Untersuchung

von einzelnen Bienenbrotproben während des Jahres nicht geeignet, um detaillierte Informationen über den zeitlichen Verlauf des Kontakts der Honigbiene zu PSM im Laufe der ackerbaulich aktiven Phase zu erhalten.

Von bisherigen Analysen ist bekannt, dass Honigbienen einem Gemisch verschiedener PSM und entsprechend unterschiedlichen aktiven Substanzen ausgesetzt sind [23, 24]. Viele Studien zielen jedoch nur auf die Untersuchung von Auswirkungen/Nebenwirkungen einzelner Substanzen ab. Beispielsweise ist bekannt, dass selbst subletale Konzentrationen von Wirkstoffen Auswirkungen auf Bienen haben können, i.e. eingeschränkte Lern- oder Gedächtnisleistung, verändertes Sammel- und Heimfindevermögen, Auswirkungen auf Wachstum, Entwicklung, Fruchtbarkeit, Genexpression oder Überlebensfähigkeit [29–36]. Mögliche additive oder synergistische Effekte die von Tankmischungen oder Kombinationen von Wirkstoffen ausgehen, die einzeln gesehen nicht bienenschädlich sind, werden bislang zu wenig untersucht. Synergistische Effekte treten zum Beispiel auf, wenn Ergosterol-Biosynthese hemmende Fungizide und Pyrethroide bzw. Neonikotinoide zusammen aufgenommen werden [37–39]. Additive Effekte wurden beobachtet bei der Kombination von Neonikotinoiden und Pyrethroiden [40].

Zum anderen kann man aus den Untersuchungen den Schluss ziehen, dass die Belastung mit PSM chronisch ist, wenn die Honig- oder Pollenvorräte kontaminiert sind. Jedoch befassen sich nur wenige Untersuchungen mit den Auswirkungen der chronischen Pestizidaufnahme, von denen viele nur Laborstudien durchführen [41, 42]. Die Ergebnisse von Labor- bzw. Käfigversuchen sind jedoch nur mit Abstrichen auf das Freiland oder auf die Volksebene übertragbar. Besonders präimaginale Stadien und Ammenbienen mit hohem Pollenverbrauch würden längere Zeit mit dieser Verunreinigung Kontakt haben [43–45]. Pollen ist die wichtigste Protein- und Stickstoffquelle für Honigbienen [46]. Zum einen wird der Pollen benötigt, damit die frisch geschlüpften Bienen ihre finale Körperkomposition erlangen, zum Beispiel die Ausbildung der Futtersaftdrüsen im Kopf der Arbeiterinnen [45, 47]. Zum anderen wird eine erhebliche Menge Pollen von den Ammenbienen benötigt, um daraus den Futtersaft für die Larven herzustellen [44, 45, 48]. Gelée Royale nimmt dabei eine wichtige Rolle ein, da es sowohl an alle Larven in den ersten drei Lebenstagen, als auch der erwachsenen Königin ein Leben lang verfüttert wird [46]. Arbeiter- und Drohnenlarven bekommen ab dem dritten Tag einen modifizierten Larvenfuttersaft, dem auch Pollen zugesetzt wird [49]. Eine mögli-

che Kontamination der Pollenvorräte mit PSM könnte somit weitreichende Folgen haben, die die Entwicklung und Fitness der Königin ebenso beeinträchtigen könnten, wie die der Arbeiterinnen. Das könnte sich letztendlich negativ auf die Stärke, die Vitalität und das Wohlergehen des ganzen Bienenvolkes auswirken.

1.1 Ziele der Arbeit

Viele der bisherigen Rückstandsuntersuchungen beschäftigen sich mit Bienenbrotproben, die nur allgemeine Aussagen über die reale Belastung von Pollen mit PSM zulassen. Daher sollten in der vorliegenden Dissertation Mischproben von Pollenhöschchen einzelner Tage untersucht werden. Dafür wurden mit Hilfe von Pollenfallen in den Jahren 2012 - 2016 an drei landwirtschaftlich unterschiedlich genutzten Standorten in Baden-Württemberg gehöselte Pollen an hunderten Tagen im Laufe der ackerbaulich aktiven Zeit gesammelt. Diese Proben wurden auf Rückstände von PSM untersucht. Damit soll ein genaueres Bild über den zeitlichen Kontakt, die Höhe der Kontamination, sowie das zeitgleiche Auftreten verschiedener aktiver Substanzen dargestellt werden. Eine genauere Untersuchung einzelner Proben, die in farblich sortierte Pollenfraktionen unterteilt wurden, soll darüber hinaus Aufschluss über Wirkstoffe geben, die durch einzelne Pflanzenarten eingetragen werden.

Studien zu Auswirkungen von PSM auf die Honigbiene beschäftigen sich in vielen Fällen nur mit einzelnen Untersuchungspunkten. Zum Beispiel werden nur Effekte auf kognitive Fähigkeiten oder die Genregulation untersucht. Außerdem sind viele Versuchsdesigns nicht feldnah, da nur einzelne Wirkstoffe untersucht werden, die Konzentrationen in Fütterungsversuchen nicht feldrealistisch gewählt werden oder die Versuche im Labor stattfinden. In Agrarregionen besteht jedoch ein chronischer Kontakt von verschiedenen PSM zur Honigbiene, wenn die Honig- oder Pollenvorräte kontaminiert sind. Daher sollte in einem Freilandversuch getestet werden, wie sich die im Feld gefundene Rückstandssituation auf einzelne Honigbienen auswirkt. Eine feldrealistische Mischung verschiedener PSM wurde mit einem Pollen-Honig Gemisch freifliegenden Honigbienenvölkern über einen längeren Zeitraum angeboten. Die Entwicklung und Überlebensrate der gefütterten Bienen wurde beobachtet.

Die letzten beiden Versuche zielen darauf ab, das Schicksal von PSM im Bienenstock zu verfolgen. Besonders das Frühjahr ist eine kritische Zeit, in der sich der Landwirt um die Gesundheit der Pflanzen kümmern muss. Zur gleichen Zeit werden im Bienenvolk

neue Königinnen angezogen und die Arbeiterinnenzahl vervielfacht. Pollen übernimmt in der Ernährung der Ammenbienen und Larven eine wichtige Aufgabe. Rückstandsanalysen zeigten jedoch, dass Pollen und Bienenbrot mit PSM belastet sein können. Um herauszufinden, ob Wirkstoffe aus der Pollenquelle in den Larvenfuttersaft wandern, wurde eine Königinnenzucht angesetzt. Gleichzeitig wurde ein PSM-Gemisch in hohen Konzentrationen in einem Pollen-Honig Gemisch verfüttert. Das Gelée Royale aus den Zellen der Königinnenlarven wurde entfernt und auf Rückstände untersucht. Arbeiterinnenlarven erhalten jedoch nach drei Tagen einen modifizierten Larvenfuttersaft, dem auch Pollen zugesetzt wird. Daher wurde in einem ähnlichen Versuch nach Fütterung eines hochkonzentrierten PSM-Gemischs der Arbeiterinnenfuttersaft geerntet und ebenfalls auf Rückstände untersucht.

Die Untersuchungen sollen helfen, die Konfrontation der Honigbiene mit PSM im Feld besser einzuschätzen, und eine Gefahrenabschätzung für Honigbienen abzugeben zu können.

2 Veröffentlichungen

2.1 Veröffentlichung 1

Pesticide residue survey of pollen loads collected by honeybees (*Apis mellifera*) in daily intervals at three agricultural sites in South Germany¹

Abstract

The pesticide pollution of corbicular pollen loads was assessed at three distinct agricultural production sites of different production intensity. The site “meadow” is extensively used and characterized by meadow, grassland and extensive orchards. The site “grain” is characterized by intensive agriculture growing small grains and maize, whereas the site “fruit” represents intensively managed orchards and vineyards. Beekeepers were asked to collect pollen daily using pollen traps from March until August in the years 2012-2016, and from 2012-2014 at the site “fruit”. From all individual pollen samples, 281 single day pollen samples were selected and subjected to a multi-pesticide residue analysis. Pesticide contaminations of pollen differed between the sites. During the five years of observation we found 73 different pesticides, of which 84 % are characterized as non-harmful to honeybees. To estimate pesticide risks for honeybees, the pollen hazard quotient (PHQ) was calculated. The concentrations of eight pesticides exceeded the relevant hazard threshold of 50. These concentrations were nevertheless considered sub-lethal without posing acute intoxication hazard to honeybees, when the theoretical absolute pesticide uptake was taken into account. However, chronic intoxication after life-long uptake of bee-toxic pesticides cannot be excluded. We found twelve substances that are not supposed to get in contact with bees, which indicates a need for further improvement of seed treatments and increasing awareness of flowering shrubs, field margins and pesticide drift. Additionally, an in-depth analysis of nine pollen samples, divided into sub-fractions dominated by single plant species, revealed even higher concentrations in single crops for some pesticides. Hence, a standardized risk assessment of pesticide residues from field samples is not feasible, especially regarding wild pollinators. We give precise residue data of 1,205 single pesticide detections, which should be used for realistic laboratory and field tests.

¹Böhme F, Bischoff G, Zebitz CPW, Rosenkranz P, Wallner K (2018) Pesticide residue survey of pollen loads collected by honeybees (*Apis mellifera*) in daily intervals at three agricultural sites in South Germany. PLoS ONE 13(7): e0199995. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199995>

2.2 Veröffentlichung 2

Chronic exposure of honeybees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), to a pesticide mixture in realistic field exposure rates²

Abstract

Pollen might be contaminated by multiple pesticides representing a risk for long-term contamination of honeybees when collected. Standardized methodology to assess the effects of pesticide mixtures under field conditions is lacking. We conducted an experiment on chronic feeding of a diet contaminated with a field-realistic pesticide mixture on free-flying honeybee colonies. Pesticide residues in larvae and adult tagmata were detected in trace amounts. In colonies treated with a pesticide mixture, larval weight was higher and acini diameters of the hypopharyngeal glands of nurse bees were smaller than in the untreated control. Brood termination and adult lifespan did not differ between both groups. Our study offers a reproducible and applicable approach for testing effects of pesticides on bee health. As feeding of a field-realistic pesticide mixture did not elicit acute bee toxic effects, the described differences might be explained by sub-lethal effects or joint action of single compounds.

²Böhme F, Bischoff G, Zebitz CPW, Rosenkranz P, Wallner K (2017) Chronic exposure of honeybees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), to a pesticide mixture in realistic field exposure rates. *Apidologie*, 48(3):353-363. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13592-016-0479-x>

2.3 Veröffentlichung 3

From field to food – will pesticide-contaminated pollen diet lead to a contamination of royal jelly?³

Abstract

The contamination of bee products, e.g., bee bread, by pesticides is an increasing problem of beekeeping in rural areas. Bee bread is used by nurse bees to produce larval food. However, the fate of pesticides originating from the pollen during this process is unknown. Over the entire period of queen rearing, adult honeybees in queenless mini-hives were fed with a pollen-honey diet containing a cocktail of 13 commonly used pesticides in high concentrations (34–920 µg/kg). Royal jelly (RJ) harvested from queen cells was subjected to a multi-residue analysis. Seven substances were rediscovered in traces (76.5% of all detections are below 1 µg/kg) with at most 0.016% of the original pesticide concentrations of the fed diet. Considering this extraordinary low contamination of RJ, it seems unlikely that pesticides, if used according to the approved application instructions, would impair the development and health of honeybee queens. Possible reasons for the low residue levels in RJ are discussed.

³Böhme F, Bischoff G, Zebitz CPW, Rosenkranz P, Wallner K (2018) From field to food – will pesticide-contaminated pollen diet lead to a contamination of royal jelly?. *Apidologie*, 49(1):112-119. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13592-017-0533-3>

2.4 Veröffentlichung 4

From field to food II – Will pesticide-contaminated pollen diet lead to a contamination of worker jelly?⁴

Abstract

Residues of pesticides have been found in bee collected pollen and stored beebread. Pollen is the protein source for bees and hence important for nurse bees to produce larval food. However, the fate of pesticides in the pollen used for larval food production is not clarified. We conducted a feeding experiment with free-flying mini-hives of the honey bee. A mixture of 13 different substances in high concentrations (156 - 9,021 µg/kg) was offered inside the hive. During the time of feeding, worker larvae of known age were reared. At larval age three to six days, worker jelly (WJ) was harvested and subjected to a multi-residue pesticide analysis. Concentrations of the detected pesticides in the WJ increased with larval age and ranged from 2.9 - 871 µg/kg for three to six days old larvae, depending on the pesticide. The amount of pesticides significantly correlates with the amount of pollen grains in the worker jelly with increasing larval age from 41 - 4,654 pollen/mg WJ. Thus, we hypothesize the addition of pollen to the WJ to be responsible for the pesticide residues in the WJ. For the first time, this study shows the real pesticide exposition of honey bee larvae to pesticides by larval food. Our results should help to better evaluate the concentrations found in the field and to conduct field realistic feeding experiments, which may be used for risk assessments or pesticide approval.

Keywords: Larval food, brood, pollen count, sub-lethal pesticide concentrations

⁴Böhme F, Bischoff G, Zebitz CPW, Rosenkranz P, Wallner K. From field to food II – Will pesticide-contaminated pollen diet lead to a contamination of worker jelly? Submitted to Journal of Apicultural Research, manuscript nr. TJAR-2017-0228R1.

Introduction

Honey bees (*Apis mellifera*) are eusocial insects forming colonies with up to 50,000 individuals. The maintenance of such entities throughout the season requires a huge turnover of brood. The development of honey bee larvae can be divided into a feeding phase of five to six days followed by a period within the sealed brood cell where metamorphosis and final ontogenetic development takes place (Haydak, 1943). During the feeding phase over five larval instars the larval weight increases hundredfold, depending on sex and caste. The main source for larval food is jelly, produced in the hypopharyngeal glands of nurse bees (Crailsheim, 1992). However, larval food in honey bees is not only required for the enormous growth of the larvae but also involved in female caste determination. As a peculiarity in eusocial insects, the quality and quantity of food after the second larval instar is decisive for the development to worker and queen, respectively (Dietz & Lambremont, 1970). Both, queens and workers hatch from fertilized eggs, but worker larvae receive about 135-143 feedings during their larval development (Brouwers, Ebert, & Beetsma, 1987; Lindauer, 1952). In contrast, queen larvae are fed 10 times as much (about 1500 feedings), which, however, are of shorter duration than for worker larvae (< 50 s) (Brouwers et al., 1987; Jung-Hoffmann, 1966; Lindauer, 1952). Additionally, worker larvae older than three days receive pollen grains and further ingredients from the honey sac of the nurse bees, which turns the food yellowish (Jung-Hoffmann, 1966). This is called worker jelly (WJ) in contrast to royal jelly (RJ), which is a pure product of the hypopharyngeal and mandibular glands containing none or only traces of pollen grains (Haydak, 1943; Planta, 1888).

Wang et al (2016) found significant differences in the chemical composition of RJ and WJ already for two days old larvae. RJ has a lower moisture content, yet higher amounts of proteins and fructose and glucose in comparison to WJ. Even though the overall amount of sugars is lower in WJ the content is increasing with larval age indicating a higher supply with honey from the honey sac.

The differences of WJ and RJ is not only a crucial trigger for caste differentiation but might also have impact on the contamination of larval food with pesticides. Residues of agricultural crop protection chemicals have been found in collected goods of foraging honey bees (nectar, pollen, guttation water) as well as inside the bee hive, e.g. bee bread (Reetz et al., 2015; Roszko, Kamińska, Szymczyk, & Jędrzejczak, 2016; Traynor et al.,

2016). As pollen is an important ingredient to produce larval food (Knecht & Kaatz, 1990) a contamination with pesticides could entail severe consequences on the colonies health and fitness. For the pollution of larval food with these residues there are principally two routes, (i) the incorporation of compounds into the hypopharyngeal gland and a transfer into the hypopharyngeal gland secretions or (ii) the addition of contaminated pollen to the modified worker jelly. So far, little is known about the dislocation of pesticides into brood food. A possible contamination of RJ by contaminated nectar or contaminated pollen was investigated in only few studies (Böhme, Bischoff, Zebitz, Rosenkranz, & Wallner, 2017b; Davis & Shuel, 1988; DeGrandi-Hoffman, Chen, & Simonds, 2013; Wittmann, 1982). For example, Böhme et al. (2017) found in most proofs not even 1 µg/kg of substances in RJ, after feeding a pollen diet with a cocktail of pesticides in high concentrations (up to 920 µg/kg). This corresponds to only 0.016 % of the original pesticide concentrations of the consumed diet. However, such investigations have not been undertaken for effects of pesticides on WJ. This is probably due to the low amounts of WJ in cells of worker larvae (Planta, 1888). However, as the regulatory authorities for the registration of pesticides are looking to mandate tests on the toxicity of pesticides on honey bee brood (EFSA, 2013), detailed information on the concentrations of pesticides reaching the larvae via food are indispensable.

We hypothesize that potential residues of pesticides in WJ mainly originate from the amount of contaminated pollen incorporated into the larval food and that, in general, the contamination of WJ is higher compared to RJ as published recently by Böhme et al. (2017). To test this hypothesis, we conducted a feeding experiment with a pollen-honey diet with known pesticide content. WJ was harvested and a multi-residue analysis was performed. We want to use the here presented results to scrutinize the widespread practice and interpretations of *in vitro* pesticide feeding studies on larval honey bees.

Materials and Methods

Bee colonies and experimental design

Twenty colonies were set up at the beginning of May 2015 with three brood frames, one food frame, two empty frames, about 3,500 bees and one mature queen cell in polystyrene mini hives (29×29×32 cm LWH), placed at a yard of the Apicultural State Institute in Stuttgart-Hohenheim. Three weeks later, when sister queens started egg laying, frames were replaced by residue free, and freshly drawn empty combs. Queens were confined to an empty comb at 8 pm for 24 hours (start of the experiment = day 1) to obtain larvae of defined age. We had to remove one colony from the experiment, as one queen did not oviposit. Sampling took place always at 8 am at any observation date, causing an age difference of ± 12 h of larvae.

On day three of the experiment each colony was offered a sixty-gram package of a pollen-honey diet. The colonies were randomly assigned to either the control or the pesticides group. The pesticides (Table 1) are commonly found compounds in pollen pellets collected in intensively used agricultural areas (Böhme, Bischoff, Zebitz, Rosenkranz, & Wallner, 2017a). The control pollen-honey diet was without any additives. Every second day a new sixty-gram diet package was offered. The exact amount of consumed pollen-honey diet was assessed daily using a portable balance (MyWeigh, Palmscale 8) (Table 2). To avoid dilution of the pesticides by pollen collected and brought in by foragers, a pollen trap was installed at the entrance of the colonies. Pollen pellets stripped off the legs of foraging bees were collected in a tray at the bottom of the colonies and stored in the freezer at -20 °C until later palynological study and analysis of pesticide residues.

Table 1. Trade names of the commercial products, pesticide class and final concentrations of the substances used in the pollen-honey diet.

Active ingredient	Pesticide class ^a	Trade name (a.i. g/l or g/kg)	Concentration in the pollen-honey diet ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Acetamiprid	I	Mospilan [®] (200 g/kg)	9,021.8
Azoxystrobin	F	Ortiva [®] (250 g/l)	835.4
Boscalid	F	Cantus Gold [®] (200 g/l)	653.7
Dimethenamid-P	H	Spectrum [®] (720 g/l)	908.5
Dimoxystrobin	F	Cantus Gold [®] (200 g/l)	595.4
Methiocarb	I	Mesuro [®] (500 g/l)	1,115.2
Prosulfocarb	H	Boxer [®] (800 g/l)	731.1
Prothioconazole	F	Proline [®] (250 g/l)	156.1
Pyraclostrobin	F	F500 [®] (250 g/l)	772.6
Tau-Fluvalinate	I	Mavrik [®] (240 g/l)	469.5
Tebuconazole	F	Matador [®] (225 g/l)	2,552.6
Thiacloprid	I	Biscaya [®] (240 g/l)	445.5
Triadimenol	F	Matador [®] (75 g/l)	935.5

^a I = insecticide, F = fungicide, H = herbicide

Table 2. Average uptake of pollen-honey diet ($\text{g} \pm \text{SEM}$) per colony for each treatment until WJ harvest at different larval ages.

Larval age (d)	Treatment group	Average Food uptake ($\text{g} \pm \text{SEM}$) until WJ harvest
3	Control	87.6 ± 3.8
	Pesticides	94.8 ± 2.0
4	Control	117.3 ± 9.9
	Pesticides	117.7 ± 13.2
5	Control	166.3 ± 4.3
	Pesticides	153.7 ± 3.0
6	Control	169.0 ± 13.8
	Pesticides	150.1 ± 12.2

The artificial pollen-honey diet was prepared as a mixture of pesticide-free commercially available willow pollen pellets (Andreas Bock, Ökologische Imkerei, Mertingen, Germany), finely ground with a centrifugal mill and mixed with creamy honey (harvested at the Apicultural State Institute in spring 2014), in a kneading machine at a ratio of 40:60 % w/w. The test-pesticides (commercial products in their respective formulation) were diluted in tap water 1:100, added to the honey in the necessary amounts to achieve the final concentration in the pollen diet, and thoroughly homogenized before mixing with the pollen (Table 1).

Handling of worker jelly

Each colony was sampled only once. Worker jelly was taken at larval age three to six days from the previously marked frames in the laboratory. Generally, at each sampling day two control colonies and three pesticide colonies were used; except for the first date, as we were one replication short, only two pesticide colonies were sampled. Cell walls and larvae of 20 cells were removed to receive a hollow (Figure 1). Five millilitres of water were poured into the pit to wash out the jelly with a brush size two (Figure 2). This washing fluid was used for further washing steps to concentrate the dissolved jelly of 64 - 179 cells of each colony, depending on the number of available larvae. Three ml of this suspension were used for pesticide residue analysis and two ml for pollen analysis. Until each analysis, the samples were deep-frozen and stored at -20 °C. In addition, the amount of worker jelly was assessed in 19-21 further cells of each frame. Larvae were removed and the food on the bottom of the cell was collected with a brush and weighed on a precision balance (Denver Instrument, TB 215D).

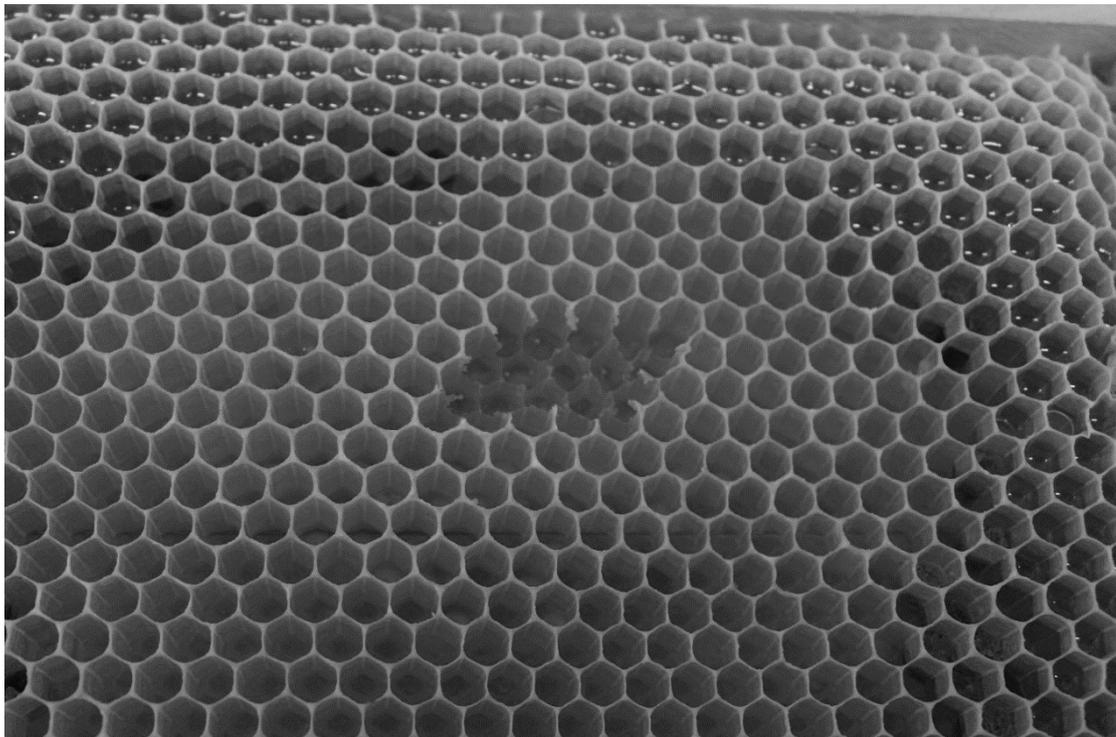


Figure 1. Cell walls and larvae of 20 adjacent cells, of larvae of known age, were removed in order to receive a pit, after they were fed pesticides for 3, 4, 5, or 6 days.

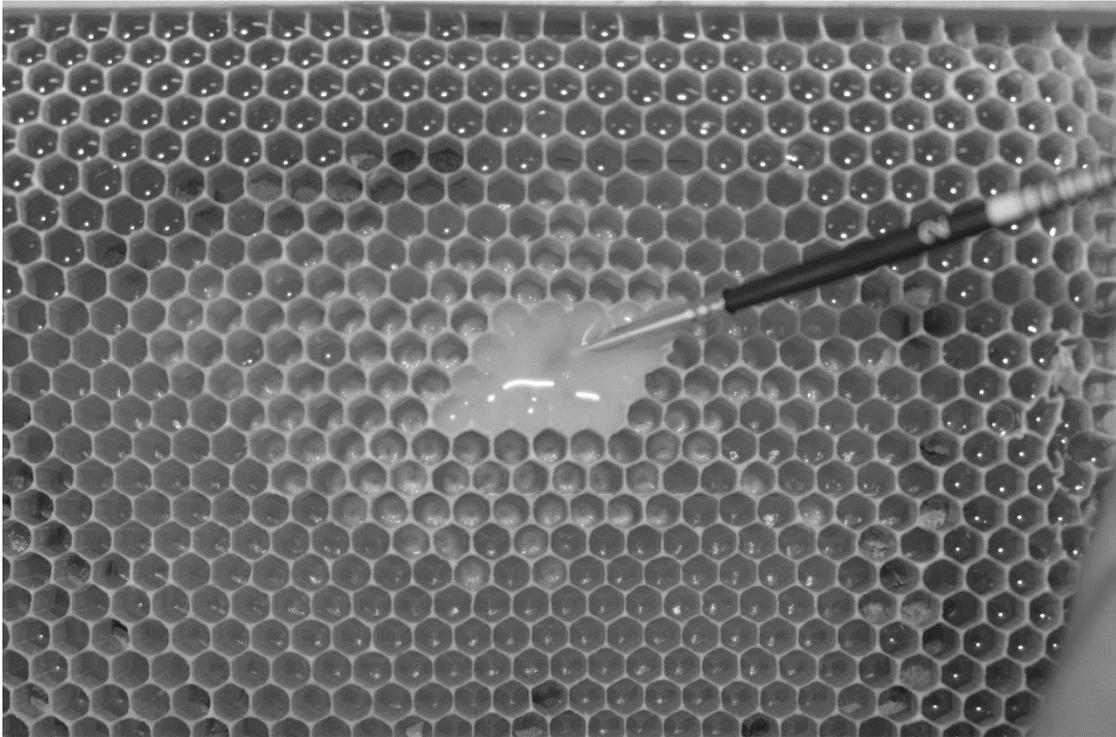


Figure 2. Water is filled into the pit. A paintbrush is used to dissolve the WJ in the water and is taken up with a pipette thereafter. This step was repeated for as much larvae as possible on the same frame in order to concentrate the WJ in the water to receive a WJ suspension.

In order to count the number of pollen grains in the WJ and to determine their botanical origin, the WJ suspension was prepared according the method described by Dimou, Goras, & Thrasyvoulou (2007) for RJ. Half a gram of WJ suspension and 10 ml KOH (2.5 % w/w) were thoroughly stirred and centrifuged (10 min, 3,000 rpm). The pellet was washed in 10 ml distilled water and once again centrifuged under the same conditions. The supernatant was discarded and the dry sediment was dissolved in ethanol and vortexed. A drop was spread on a microscopic slide, left to dry and embedded with Kaiser's glycerol gelatine and a cover glass. Palynological analysis was performed at the honey-laboratory at the Apicultural State Institute. Another drop was applied on a hemocytometer ("Thomakammer") and pollen grains were counted. The concentration of pollen grains was determined and used to calculate the amount of pollen grains per larval cell and per milligram of WJ.

Pesticide residue analysis

Samples of WJ were stored under -20 °C in the Apicultural State Institute until shipping on carbon dioxide snow to the Institute for Bee Protection of the Julius Kühn-Institute (JKI), where a multi-pesticide residue analysis was performed (as described by Böhme

et al., 2017a). In addition, a sample of the pollen-honey diet of each treatment group was analysed as well, to determine the exact pesticide load (Table 1) and to calculate the amount of active ingredients (a.i.) circulating in the colonies (Table 3). Pollen pellets collected in the pollen traps on the experimental colonies were sent to LUFA Speyer for residue analysis. This laboratory performs a multi-residue method (QuEChERS) following Anastassiades, Lehotay, Stajnbaher, & Schenck (2003).

Table 3. Calculated amount of pesticide intake ($\mu\text{g} \pm \text{SEM}$) into colonies with the pollen-honey diet until WJ harvest.

Larval age (d)	Acetamiprid	Azoxystrobin	Boscalid	Dimethenamid-P	Dimoxystrobin	Methiocarb	Prosulfocarb	Prothioconazole-desthio	Pyraclostrobin	Tau-Fluvalinate	Tebuconazole	Thiacloprid	Triadimenol
3	855.3 ± 18.3	79.2 ± 1.7	62.0 ± 1.3	86.1 ± 1.8	56.5 ± 1.2	105.7 ± 2.2	69.3 ± 1.5	14.8 ± 0.3	73.3 ± 1.5	44.5 ± 0.9	242.0 ± 5.1	42.2 ± 0.9	88.7 ± 1.9
4	1,061.4 ± 119.5	98.3 ± 11.1	76.9 ± 8.7	106.9 ± 12.0	70.1 ± 7.9	131.2 ± 14.8	86.0 ± 9.7	18.4 ± 2.1	90.9 ± 10.2	55.2 ± 6.2	300.3 ± 33.8	52.4 ± 5.9	110.1 ± 12.4
5	1,386.2 ± 26.9	128.4 ± 2.5	100.4 ± 2.0	139.6 ± 2.7	91.5 ± 1.8	171.4 ± 3.3	112.3 ± 2.2	24.0 ± 0.5	118.7 ± 2.3	72.1 ± 1.4	392.2 ± 7.6	68.5 ± 1.3	143.7 ± 2.8
6	1,353.8 ± 110.0	125.4 ± 10.2	98.1 ± 8.0	136.3 ± 11.1	89.4 ± 7.3	167.3 ± 13.6	109.7 ± 8.9	23.4 ± 1.9	115.9 ± 9.4	70.5 ± 5.7	383.1 ± 31.1	66.9 ± 5.4	140.4 ± 11.4

Pesticide evaluation in WJ

The concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$) of the WJ suspension, as measured by the JKI, was used to calculate the concentration of the pesticides per kilogram of WJ in two steps.

$$\text{pg a.i./cell} = \frac{((A+(B*C))*D)}{B} * 1,000 \quad (1)$$

A = volume of washing fluid (5 ml)

B = number of cells per colony (64 - 179 cells)

C = average amount of WJ per cell in the respective colony (1.8 - 10.7 mg)

D = pesticide concentration in WJ suspension ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

$$\mu\text{g a.i./kg WJ} = \frac{\text{pg a.i./cell}}{C*1,000} \quad (2)$$

Statistical analysis

To identify any correlation between the pesticide concentrations detected in the WJ and the amount of pollen grains in the WJ, a linear regression analysis was conducted using the software package JMP® 11.1.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). After the dismissal of one outlier (pollen count of one colony in the pesticides group of larval age 5) all residuals were normally distributed.

Results

Palynological analyses

The pollen-honey diet offered to the experimental colonies consists of 99 % *Salix* ssp. pollen. Traces of *Caryophyllaceae*, *Pyrus* group and *Populus* were found.

Only very few pollen grains were found in the WJ samples with the youngest larvae (three days old, and two of the pesticides treated colonies of four days old larvae), yet *Salix* ssp. has been identified in all of them. The dominating pollen species identified in all WJ samples was *Salix* ssp. (29.5-67 %), except in two controls (one colony of five and six days old larvae), where *Brassica* sp. pollen dominated (37.5 and 34 %), followed by pollen of the *Rubus* group and *Salix* ssp. pollen as third most frequent pollen. The second and third most frequently identified pollen species found in WJ belonged to *Brassica* sp. and the *Rubus* group, which were collected outside the hives by foraging bees (S1).

Worker jelly: quantity and pollen count

The average quantity of WJ in each cell increased from 2.0 mg WJ in the cells of three days old larvae to 7.0 mg for older larvae (Table 4). The number of pollen grains also increased with increasing age of the larvae from 102.9 - 29,533.7 pollen/cell accounting for 40.9 - 4,653.5 pollen/mg WJ, respectively (Table 4).

Tabelle 4. Average quantity of WJ in each worker cell (mg ± SEM) and average number of pollen grains per ml WJ suspension, per cell or per mg WJ.

Larval age (d)	Treatment group	WJ per cell (mg ± SEM)	Pollen grains per ml ± SEM	Pollen grains per cell ± SEM	Pollen grains per mg WJ
3	Control	2.2 ± 0.2	7,500.0 ± 2,393.6	102.9 ± 72.7	40.9 ± 29.0
	Pesticides	2.0 ± 0.2	3,333.3 ± 1,800.2	220.1 ± 12.8	108.6 ± 1.7
4	Control	5.3 ± 0.4	63,888.9 ± 22,098.8	1,525.2 ± 897.7	318.8 ± 194.9
	Pesticides	5.1 ± 0.4	50,000.0 ± 14,337.2	2,230.0 ± 1,801.8	281.5 ± 224.8
5	Control	5.8 ± 0.3	542,222.2 ± 32,179.6	13,896.8 ± 2,193.0	2,362.2 ± 319.6
	Pesticides	7.0 ± 0.4	489,166.7 ± 41,840.6	15,946.2 ± 1,892.5	2,701.1 ± 790.8
6	Control	6.6 ± 0.5	619,444.4 ± 51,095.8	29,533.7 ± 2,348.7	4,653.5 ± 336.5
	Pesticides	6.2 ± 0.4	833,333.3 ± 38,520.1	22,179.8 ± 1,227.6	3,948.1 ± 644.8

Pesticide Residues

The control pollen-honey diet showed small amounts of azoxystrobin (1.47 µg/kg), prosulfocarb (4.86 µg/kg), and thiacloprid (11.58 µg/kg). In all experimental colonies, including the controls, the trapped pollen showed a contamination of totally eight different pesticides (*acetamiprid*, *azoxystrobin*, *boscalid*, methiocarb-sulfon, metazachlor, pendimethalin, *tau-fluvalinate*, *tebuconazole*) in concentrations of 1.3-169.4 µg/kg. Five of which were the same pesticides as used in our experiment (in italics) (S1).

Residue analysis of WJ suspension revealed a pesticide contamination with 12 out of 13 substances offered to the honey bees at all four larval ages (Table 5). In the WJ suspension of three days old larvae, only six pesticides were detected, in four days old larvae already ten substances were detectable. Twelve different pesticides were found in the WJ suspension of five and six days old larvae. The level of pesticide contamination started with concentrations of 2.9 - 99.5 µg/kg in the WJ suspension of the youngest

larvae and increased to 21.7 - 871.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in oldest larvae shortly before capping. Concentrations of a.i. increased steadily with larval age. A linear regression revealed a significant correlation between the increasing amount of pollen per mg WJ and the increasing pesticide concentrations. After excluding an outlier from the regression analysis all twelve (including methiocarb) detected pesticides showed a significant positive linear correlation (Table 5).

Table 5. Concentration of detected pesticides per kg WJ ($\mu\text{g}/\text{kg} \pm \text{SEM}$). Concentrations have been calculated according to the formula in the section materials and methods, based on the concentration measured in the WJ suspension. A linear regression of $\mu\text{g a.i./kg WJ}$ by pollen grains per mg WJ was conducted, r^2 and p are given; in brackets: one outlier (pollen count of one colony in the pesticides group of larval age 5) has not been considered for regression analysis.

Larval age (d)	Treatment	Acetamiprid	Azoxystrobin	Boscalid	Dimethenamid-P	Dimoxystrobin	Methiocard	Prosulfocarb	Prothioconazol-desthio	Pyraclostrobin	Tau-Fluvalinat	Tebuconazol	Thiacloprid	Triadimenol
3	Control	n.n.	2.7 (± 1.2)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2.6 (± 0.2)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2.3 (± 0.5)	n.n.
	Pesticides	99.5 (± 29.0)	3.7 (± 1.3)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	5.1 (± 0.1)	n.n.	2.9 (± 0.5)	<8.9	n.n.	6.0 (± 0.9)	n.n.
4	Control	n.n.	1.3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3.3	n.n.	n.n.	<3.1	n.n.	1.0	n.n.
	Pesticides	192.4 (± 68.7)	3.6 (± 2.3)	4.8	3.8	3.1 (± 1.5)	n.n.	3.5 (± 0.6)	n.n.	5.6 (± 2.1)	14.9 (± 5.3)	20.6	7.7 (± 2.4)	n.n.
5	Control	4.7 (± 1.2)	6.9 (± 0.5)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0.8 (± 0.0)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1.2 (± 0.2)	n.n.
	Pesticides	606.3 (± 102.7)	31.5 (± 3.9)	14.4 (± 1.5)	8.8 (± 0.8)	15.2 (± 1.9)	8.2 (± 0.8)	10.9 (± 0.9)	n.n.	21.5 (± 2.3)	48.5 (± 6.8)	55.5 (± 4.2)	27.0 (± 4.4)	25.7 (± 3.6)
6	Control	4.4 (± 0.1)	6.2 (± 0.6)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0.7 (± 0.0)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1.5 (± 0.2)	n.n.
	Pesticides	871.0 (± 65.0)	76.9 (± 13.0)	37.3 (± 6.0)	21.7 (± 3.2)	35.0 (± 4.3)	26.6 (± 4.7)	24.8 (± 2.7)	n.n.	47.5 (± 5.9)	65.7 (± 1.9)	125.3 (± 14.8)	45.6 (± 4.5)	51.8 (± 4.7)
r^2		0.7355 (0.8546)	0.7801 (0.9907)	0.5982 (0.9934)	0.5961 (0.9881)	0.7186 (0.9791)	0.4683 (0.9816)	0.7435 (0.9658)	-	0.7768 (0.9805)	0.7086 (0.7879)	0.6109 (0.9735)	0.7942 (0.9358)	0.9414 (0.9414)
p		0.0007 (0.0001)	0.0003 (<0.0001)	0.0414 (<0.0001)	0.0419 (<0.0001)	0.0078 (<0.0001)	0.1337 (0.0011)	0.0013 (<0.0001)	-	0.0007 (<0.0001)	0.0044 (0.0033)	0.0379 (0.0003)	0.0002 (<0.0001)	0.0061 (0.0061)

In addition, the WJ suspension of the control revealed pesticide residues of five substances in concentrations of 1.0 - 6.9 µg/kg for younger and older larvae respectively. However, there is not a constant increase of concentration in these WJ samples.

The only substance not detectable in all WJ samples was prothioconazole, as measured by its metabolite prothioconazole-desthio (Liu et al., 2017).

The percentage of pesticides potentially transferred from the offered food to WJ ranged between 0.0009 – 0.0058 %, 0.0001 – 0.0398 %, 0.0037 – 0.0917 %, and 0.0061 – 0.1478 % for 3, 4, 5, and 6 days old larvae, respectively.

Discussion

This is the first study to show a direct relation between a pesticide contaminated pollen source and pesticide residues in worker jelly (WJ). We were able to prove a significant correlation between the number of pollen incorporated into the larval food and the amount of pesticides found in the WJ, thus matching our hypothesis. Furthermore, the concentrations of the used pesticides increased from three to six days old larvae up to 20 times, depending on the respective compound. During the first days only half of the fed substances were detectable in low concentrations in the WJ. However, in five and six days old larvae 12 out of 13 substances were found. The potential transfer of pesticides from the contaminated food into the WJ is maximal 0.15 % the amount of a.i. circulating in the colonies.

Very young larvae receive only few pollens (Planta, 1888), which has been shown in our experiment for three days old larvae. This may be due to the fact, that the WJ of very young worker larvae is similar to RJ. Böhme et al. (2017b) conducted a similar feeding experiment aiming towards residue analysis of RJ after feeding of highly contaminated pollen. Even though they did not count pollen grains in the RJ, the incorporation of certain compounds from the food into the RJ was not more than 0,016 % in their experiment. The potential transfer rate of pesticides into RJ and WJ was similar in three to four days old larvae and ten times more for WJ to 5-6 days old larvae, due to the pollen containing modified jelly fed to worker and drone larvae older than three days (Haydak, 1943; 1970; Köhler, 1922; Nelson & Sturtevant, 1924; Planta, 1888; Simpson, 1955). In the WJ of six days old larvae, a maximum of 4,653.5 pollen grains per milligram of WJ were found, which corroborates literature data of 10 – 3,000 pollen grains

per mg WJ for three to six days old worker larvae (Matsuka, Watabe, & Takeuchi, 1973).

With increasing larval age, the sugars deriving from nectar in the honey-sac increase in the larval food of workers (Brouwers et al., 1987; Jung-Hoffmann, 1966; Shuel & Dixon, 1959; Simpson, 1955; Wang et al., 2016)). As the honey-sac contains not only nectar but also pollen, possibly contaminated pollen is increasingly co-transferred with the nectar (Crailsheim et al., 1992; Davis & Shuel, 1988; Simpson, 1955; Soehngen & Jay, 1973).

Figuring this, our hypothesis is still valid, yet the cause has changed. Therefore, adding pollen to the food of older larvae is not exclusively responsible for increased pesticide concentrations. Another way of uptake may be seen by the sugars added to the larval food from honey-sacs filled with contaminated nectar collected in the field.

With increasing larval age, a larva is fed generally more often, with larger amounts of food, and the feeding durations increase, too (Brouwers et al., 1987; Crailsheim, 1992; Dietz & Lambremont, 1970; Lindauer, 1952). According with this, the quantity of WJ we measured in each worker cell increased with larval age. We determined 2 mg for three days old larvae, similar to the 1.6 mg found in less than four days old larvae (Planta, 1888). The food a larva receives is also directly ingested from the jelly or directly transferred orally by the nurse bees (Asencot & Lensky, 1984). Hence, the totalised quantity of directly measured WJ per cell over the complete observation period does not represent neither the real amount of food per day nor the real total amount of ca. 300 mg food a larva receives by several feedings per day (Dietz & Lambremont, 1970; Lindauer, 1952).

Microscopic pollen analyses of the WJ suspensions showed, that the nurse bees have consumed the offered pollen-honey diet to produce larval food. However, they were not exclusively consuming our artificial bee bread. The palynological analysis revealed that they added also pollen collected by foraging honey bees. Despite the fact that we attached a pollen grid at the hive entrance, which kept away most of the incoming pollen, a small amount still may have been brought into the colonies. Foraging bees were collecting pollen of *Brassica* sp., the *Rubus* group and other plants, which were flowering in the area around the apiary at the time of the experiment. Still, we assume the newly collected pollen pellets were deposited in the hive before they have taken by the nurse

bees. Planta (1888) figured out, nurse bees feed on stored bee bread inside the hive and not on single pollen loads taken over from foragers, which may explain the pollen mixture found in the WJ. Probably this additional pollen is responsible for some of the pesticides found in the WJ of the control colonies. For example, acetamiprid was none of the substances the control pollen-honey diet was contaminated with, although residues of this a.i. were found in the WJ. As acetamiprid is hydrophilic, incoming contaminated pollen is likely accompanied by acetamiprid-contaminated nectar as well.

The contamination of the control pollen-honey diet with low concentrations of pesticides probably derived from the polyfloral honey we used, containing oilseed rape components. Although this honey was considered pesticide free, it contained a reasonable proportion of these typical rapeseed pesticides. The negligible pesticide contamination of the control diet and the little increase of pesticide concentrations in the control colonies indicate the almost complete removal of pollen loads by the pollen grid. The low pesticide contamination may be taken as inevitable background noise.

Multiplying the amount of food needed to raise a honey bee (Dietz & Lambremont, 1979) of 149.8 mg for three to six days old larvae with the respective concentrations of a.i. found for larvae of this age in our experiment, results in totally 0.002-0.11 µg for the different pesticides.

As confirmed LD₅₀ for honey bee larvae are lacking, only the LD₅₀ for adult honey bees can be considered to estimate the toxic risk of pesticides. As a consequence, the most toxic substance in our experiment (methiocarb) must be regarded sub-lethal because the concentration calculated was less than one tenth the LD₅₀ for adult honey bees (Mullin et al., 2010).

Concentrations of pesticides found in RJ are lower in comparison to those in WJ (Böhme et al., 2017b). Even though queen larvae are fed ten times as much as worker larvae and receive RJ during their entire life as adult queens, they still receive only sub-lethal amounts of the pesticides. Thus, no direct intoxications or acute side-effects may be expected, especially regarding queen breeding. However, this still raises concerns about sub-lethal effects on development, fitness, vitality, or fecundity of workers as well as of queens, even though workers are by trend more at risk to potential negative side-effects by pesticides than queens.

The concentrations of pesticides in the pollen-honey diet offered to the experimental colonies in our experiment were higher than concentrations found in the fields and represent therefore worst-case concentrations (Böhme et al. 2017a). Pesticide concentrations in the field change with crop protection activity, and pollen loads are always mixtures of contaminated and uncontaminated plant species (Böhme et al., submitted). Even though we offered the cocktail of highly concentrated pesticides chronically, the amount of pesticides reaching the WJ is low.

Comparing previous studies on larval feeding experiments, unrealistic high pesticide concentrations were used and were also not considering changing pesticide confrontations during larval development (Aupinel et al., 2005, 2007, 2009; Hendriksma, Härtel, & Steffan-Dewenter, 2011). In consequence, the effects by pesticides on bee brood may be overestimated, not representing real field conditions. Hence, risk assessment studies of pesticides aiming towards effect on honey bee brood should be revised to achieve liable information and LD₅₀ or ED₅₀ for larvae.

Acknowledgements

The authors are grateful to Kerstin Jänicke and Hartmut Nowak for their help with the residue analysis at the Julius Kühn-Institute in Berlin. The authors thank Dr. Dieter Martens for his contribution to the residue analysis at LUFA Speyer. Special thanks to Dr. Dr. Helmut Horn for the palynological analysis.

References

- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Stajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86, 412–431.
- Asencot, M., & Lensky, Y. (1984). Juvenile hormone induction of “queenliness” on female honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae reared on worker jelly and on stored royal jelly. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 78B, 109–117.
- Aupinel, P., Fortini, D., Dufour, H., Tasei, J. N., Michaud, B., Odoux, J. F., & Pham-Delègue, M. H. (2005). Improvement of artificial feeding in a standard *in vitro* method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bulletin of Insectology*, 58, 107–111.

- Aupinel, P., Fortini, D., Michaud, B., Marolleau, F., Tasei, J.-N., & Odoux, J.-F. (2007). Toxicity of dimethoate and fenoxycarb to honey bee brood (*Apis mellifera*), using a new *in vitro* standardized feeding method. *Pest Management Science*, 63, 1090–1094.
- Aupinel, P., Fortini, D., Michaud, B., Medrzycki, P., Padovani, E., Przygoda, D., ... Tasei, J.-N. (2009). Honey bee brood ring-test: method for testing pesticide toxicity on honeybee brood in laboratory conditions. *Hazards of pesticides to bees – 10th International Symposium of the ICP-Bee Protection Group, Julius-Kühn-Archiv*, Vol. 423, pp. 96–102.
- Böhme, F., Bischoff, G., Zebitz, C. P., Rosenkranz, P., & Wallner, K. (2017a). Chronic exposure of honeybees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), to a pesticide mixture in realistic field exposure rates. *Apidologie*, 48, 353–363.
- Böhme, F., Bischoff, G., Zebitz, C. P., Rosenkranz, P., & Wallner, K. (2017b). From field to food — will pesticide-contaminated pollen diet lead to a contamination of royal jelly? *Apidologie*. Advance online publication. DOI: 10.1007/s13592-017-0533-3
- Brouwers, E. V. M., Ebert, R., & Beetsma, J. (1987). Behavioral and physiological aspects of nurse bees in relation to the composition of larval food during caste differentiation in the honeybee. *Journal of Apicultural Research*, 26, 11–23.
- Crailsheim, K. (1992). The flow of jelly within a honeybee colony. *Journal of Comparative Physiology B*, 162, 681–689.
- Crailsheim, K., Schneider, L. H. W., Hrassnigg, N., Bühlmann, G., Brosch, U., Gmeinhauer, R., & Schöffman, B. (1992). Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): Dependence on individual age and function. *Journal of Insect Physiology*, 38, 409–419.
- Davis, A. R., & Shuel, R. W. (1988). Distribution of ¹⁴C-labelled carbofuran and dimethoate in Royal Jelly, queen larvae and nurse honeybees. *Apidologie*, 1, 37–50.
- DeGrandi-Hoffman, G., Chen, Y., & Simonds, R. (2013). The effects of pesticides on queen rearing and virus titers in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Insects*, 4, 71–89.
- Dietz, A., & Lambremont, E. N. (1970). Caste determination in honey bees. II. Food consumption of individual honey bee larvae, determined with P-labeled royal jelly. *Annals of the Entomological Society of America*, 63, 1342–1345.

- Dimou, M., Goras, G., & Thrasylvoulou, A. (2007). Pollen analysis as a means to determine the geographical origin of royal jelly. *Grana*, 46, 118–122.
- EFSA (2013). Guidance on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). *EFSA Journal*, 11(7), 3295.
- Haydak, M. H. (1943). Larval Food and Development of Castes in the Honeybee. *Journal of Economic Entomology*, 36, 778–792.
- Haydak, M. H. (1970). Honey bee nutrition. *Annual Review of Entomology*, 15, 143–156.
- Hendriksma, H. P., Härtel, S., & Steffan-Dewenter, I. (2011). Honey bee risk assessment: New approaches for *in vitro* larvae rearing and data analyses. *Methods in Ecology and Evolution*, 2, 509–517.
- Jung-Hoffmann, I. (1966). Die Determination von Königin und Arbeiterin der Honigbiene. *Zeitung für Bienenforschung*, 8, 296–322.
- Knecht, D., & Kaatz, H. H. (1990). Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees. *Apidologie*, 21, 457–468.
- Köhler, A. (1922). Neue Untersuchungen über den Futtersaft der Bienen. *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft*, 27, 105–107.
- Lindauer, M. (1952). Ein Beitrag zur Frage der Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 299–345.
- Liu, H., Yao, G., Liu, X., Liu, C., Zhan, J., Liu, D., ... Zhou, Z. (2017). Approach for pesticide residue analysis for metabolite prothioconazole-desthio in animal origin food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 2481–2487.
- Matsuka, M., Watabe, N., & Takeuchi, K. (1973). Analysis of the food of larval drone honeybees. *Journal of Apicultural Research*, 12, 3–7.
- Mullin, C. A., Frazier, M., Frazier, J. L., Ashcraft, S., Simonds, R., vanEngelsdorp, D., & Pettis, J. S. (2010). High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PloS One*, 5(3), e9754.
- Nelson, J. A., & Sturtevant, A. P. (1924). The rate of growth of the honeybee larvae. *U.S.D.A. Department Bulletin*, 1222, 1–24.

- von Planta, A. (1888). Über den Futtersaft der Bienen. *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 12, 327–354.
- Reetz, J. E., Schulz, W., Seitz, W., Spitteller, M., Zühlke, S., Armbruster, W., & Wallner, K. (2015). Uptake of neonicotinoid insecticides by water-foraging honey bees (Hymenoptera: Apidae) through guttation fluid of winter oilseed rape. *Journal of Economic Entomology*, 109, 31-40.
- Roszko, M. Ł., Kamińska, M., Szymczyk, K., & Jędrzejczak, R. (2016). Levels of selected persistent organic pollutants (PCB, PBDE) and pesticides in honey bee pollen sampled in Poland. *Plos One*, 11(12), 1–22.
- Shuel, R. W., & Dixon, S. E. (1959). Studies in the mode of action of royal jelly in honeybee development II. Respiration of newly emerged larvae on various substrates. *Canadian Journal of Zoology*, 37, 803–813.
- Simpson, J. (1955). The significance of the presence of pollen in the food of worker larvae of the honey-bee. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 96, 117–120.
- Soehngen, U., & Jay, S. C. (1973). Studies on the honey-sac contents and pollen loads of honeybees 1. Honey-sac contents of bees in the hive. *Journal of Apicultural Research*, 12, 65–73.
- Traynor, K. S., Pettis, J. S., Tarpy, D. R., Mullin, C. A., Frazier, J. L., Frazier, M., & vanEngelsdorp, D. (2016). Inhive pesticide exposome: Assessing risks to migratory honey bees from inhive pesticide contamination in the Eastern United States. *Nature Scientific Reports*, 6(33207), 1–16.
- Wang, Y., Ma, L., Zhang, W., Cui, X., Wang, H., & Xu, B. (2016). Comparison of the nutrient composition of royal jelly and worker jelly of honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 47, 48–56.
- Wittmann, D. (1982). Tracer-Versuche zur Passage von Insektiziden durch Ammenbienen als Basis für die Abschätzung von Intoxikationswegen der Bienenbrut. *Apidologie*, 13, 328–330.

Supplementary Material

Table 1. Pollen analysis of pollen grains in the WJ revealed *Salix* ssp. pollen, originating from the offered pollen-honey diet, as dominating plant species. Pollen samples collected in the pollen traps from the experimental colonies the day before and at the day the WJ was taken from the colonies shows the range of different plant species the colonies were foraging on. *Brassica* sp. was the plant most frequently collected from. Pesticide residue analysis of these samples revealed a pesticide contamination of incoming pollen with eight different substances in concentrations of 1.3 - 169.4 µg/kg.

Larval age (d)	Treatment	Dominating pollen type in WJ (second, third most pollen)	Trapped pollen from the day before WJ harvest		Trapped pollen from the day of the WJ harvest	
			Dominating pollen (second, third most pollen)	Residue analysis: a.i. (µg/kg)	Dominating pollen (second, third most pollen)	Residue analysis: a.i. (µg/kg)
3	C 1	<i>Salix</i> ssp. (<i>Rubus</i> group, <i>Ligustrum</i>)	<i>Cornus</i> (<i>Viburnum</i> , <i>Quercus</i>)	< LOD	<i>Rubus</i> group (<i>Gleditsia</i> , <i>Cornus</i>)	< LOD
	C 2	<i>Cornus</i> (<i>Brassica</i> sp., <i>Achillea</i> L.)	<i>Viburnum</i> (<i>Achillea</i> L., <i>Cornus</i>)	Acetamiprid (3.5) Azoxystrobin (9.2) Boscalid (2.1)	<i>Brassica</i> sp. (<i>Rubus</i> group, <i>Bistorta</i>)	Acetamiprid (95.5) Azoxystrobin (286.5) Boscalid (80.8) Pendimethalin (44.7)
	P 1	<i>Salix</i> ssp.	<i>Achillea</i> L. (<i>Taraxacum</i> , <i>Cornus</i>)	Acetamiprid (13.5) Azoxystrobin (11.7) Boscalid (3.2) Pendimethalin (2.3)	<i>Gleditsia</i> (<i>Achillea</i> L., <i>Trifolium</i>)	-
	P 2	<i>Salix</i> ssp. (<i>Viburnum</i> , <i>Cornus</i>)	<i>Quercus</i> (<i>Cornus</i> , <i>Taraxacum</i>)	Acetamiprid (19.2)	<i>Cornus</i> (<i>Taraxacum</i> , <i>Quercus</i>)	Acetamiprid (13.2)
4	C 1	<i>Salix</i> ssp. (<i>Brassica</i> sp., <i>Rubus</i> group)	<i>Brassica</i> sp. (<i>Taraxacum</i> , <i>Paracantha</i>)	Acetamiprid (15.8) Azoxystrobin (41.0) Boscalid (11.9) Pendimethalin (6.6)	<i>Brassica</i> sp. (<i>Rubus</i> group, <i>Taraxacum</i>)	Acetamiprid (55.8) Azoxystrobin (169.4) Boscalid (47.0) Pendimethalin (18.2)
	C 2	<i>Salix</i> ssp. (<i>Brassica</i> sp., <i>Rubus</i> group)	<i>Brassica</i> sp. (<i>Viburnum</i> , <i>Vitis vinifera</i>)	Acetamiprid (16.7) Azoxystrobin (37.7) Boscalid (9.8) Methiocarb-sulfon (5.9) Pendimethalin (7.5)	<i>Brassica</i> sp. (<i>Viburnum</i> , <i>Vitis vinifera</i>)	Acetamiprid (53.4) Azoxystrobin (114.1) Boscalid (35.8) Pendimethalin (19.5)

	P 1	<i>Salix</i> ssp.	<i>Sambucus</i> (<i>Achillea</i> L., <i>Taraxacum</i>)	Acetamiprid (11.9)	<i>Taraxacum</i> (<i>Achillea</i> L., <i>Gleditsia</i>)	Acetamiprid (12.4)
	P 2	<i>Salix</i> ssp., <i>Brassica</i> sp.	<i>Brassica</i> sp. (<i>Deutzia</i> , <i>Quercus</i>)	Acetamiprid (60.3) Azoxystrobin (117.4) Boscalid (24.8) Pendimethalin (18.6)	<i>Brassica</i> sp. (<i>Rubus</i> group, <i>Sinapis</i> sp.)	Acetamiprid (74.5) Azoxystrobin (153.8) Boscalid (40.1) Pendimethalin (18.8)
	P 3	<i>Salix</i> ssp. (<i>Rubus</i> group, <i>Gleditsia</i>)	<i>Quercus</i> (<i>Viburnum</i> , <i>Liriodendron tulipifera</i>)	Acetamiprid (18.5) Azoxystrobin (4.1) Metazachlor (3.4)	<i>Quercus</i> (<i>Brassica</i> sp., <i>Taraxacum</i>)	Acetamiprid (27.8) Azoxystrobin (35.1) Boscalid (9.3) Pendimethalin (4.6) Tebuconazole (2.5)
5	C 1	<i>Salix</i> ssp. (<i>Rubus</i> group, <i>Vicia faba</i>)	<i>Brassica</i> sp. (<i>Rubus</i> group, <i>Cornus</i>)	Acetamiprid (49.7) Azoxystrobin (144.5) Boscalid (39.8) Pendimethalin (16.2)	<i>Rubus</i> group (<i>Brassica</i> sp., <i>Pyrinae</i> sp.)	Acetamiprid (39.0) Azoxystrobin (66.8) Boscalid (18.9) Pendimethalin (11.8)
	C 2	<i>Brassica</i> sp. (<i>Rubus</i> group, <i>Salix</i> ssp.)	<i>Brassica</i> sp. (<i>Cornus</i> , <i>Rubus</i> group)	Acetamiprid (70.5) Azoxystrobin (158.1) Boscalid (40.5) Pendimethalin (18.9)	<i>Brassica</i> sp. (<i>Taraxacum</i> , <i>Gleditsia</i>)	Acetamiprid (103.8) Azoxystrobin (92.1) Boscalid (32.5) Pendimethalin (22.4)
	P 1	<i>Salix</i> ssp. (<i>Aruncus</i> , <i>Rubus</i> group)	<i>Rubus</i> group (<i>Fraxinus ornus</i> , <i>Gleditsia</i>)	Acetamiprid (7.2) Metazachlor (4.1)	<i>Tamarix</i> sp. (<i>Gleditsia</i> , <i>Rubus</i> group)	Acetamiprid (15.4) Azoxystrobin (1.3) Picaridin (3.3)
	P 2	<i>Salix</i> ssp. (<i>Rubus</i> group, <i>Brassica</i> sp.)	<i>Brassica</i> sp. (<i>Rubus</i> group, <i>Cornus</i>)	Acetamiprid (52.6) Azoxystrobin (141.4) Boscalid (32.5) Pendimethalin (11.0)	<i>Brassica</i> sp. (<i>Rubus</i> group, <i>Rosa</i> sp.)	Acetamiprid (48.1) Azoxystrobin (58.2) Boscalid (17.8) Pendimethalin (9.4)
	P 3	<i>Salix</i> ssp. (<i>Rubus</i> group, <i>Brassica</i> sp.)	<i>Brassica</i> sp. (<i>Rubus</i> group, <i>Cornus</i>)	Acetamiprid (48.9) Azoxystrobin (84.4) Boscalid (16.2) Pendimethalin (7.7) Tebuconazole (2.3)	<i>Brassica</i> sp. (<i>Rubus</i> group, <i>Liriodendron tulipifera</i>)	Acetamiprid (101.1) Azoxystrobin (91.6) Boscalid (26.5) Pendimethalin (18.7)
6	C 1	<i>Salix</i> ssp. (<i>Brassica</i> sp., <i>Rubus</i> group)	<i>Brassica</i> sp. (<i>Gleditsia</i> , <i>Rubus</i> group)	Acetamiprid (68.3) Azoxystrobin (156.7)	<i>Brassica</i> sp. (<i>Aruncus</i> , <i>Rubus</i> group)	Acetamiprid (85.8) Azoxystrobin (70.2)

				Boscalid (38.4) Pendimethalin (18.4)		Boscalid (24.6) Pendimethalin (14.4)
	C 2	<i>Brassica</i> sp. (<i>Rubus</i> group, <i>Salix</i> ssp.)	<i>Rubus</i> group (<i>Gleditsia</i> , <i>Brassica</i> sp.)	Acetamiprid (12.4) Azoxystrobin (32.5) Boscalid (7.7) Pendimethalin (4.5)	<i>Brassica</i> sp. (<i>Rubus</i> group, <i>Gleditsia</i>)	Acetamiprid (77.6) Azoxystrobin (76.2) Boscalid (26.6) Pendimethalin (19.5)
	P 1	<i>Salix</i> ssp. (<i>Brassica</i> sp., <i>Vicia</i> <i>faba</i>)	<i>Brassica</i> sp. (<i>Rubus</i> group, <i>Phacelia</i>)	Acetamiprid (36.8) Azoxystrobin (58.0) Boscalid (15.6) Pendimethalin (9.4)	<i>Brassica</i> sp. (<i>Rosa</i> sp., <i>Aruncus</i>)	Acetamiprid (117.6) Azoxystrobin (132.5) Boscalid (48.2) Pendimethalin (25.0)
	P 2	<i>Salix</i> ssp. (<i>Rubus</i> group, <i>Brassica</i> sp.)	<i>Brassica</i> sp. (<i>Rosa</i> sp., <i>Rubus</i> group)	Acetamiprid (52.9) Azoxystrobin (133.9) Boscalid (38.6) Pendimethalin (13.9)	<i>Brassica</i> sp. (<i>Rosa</i> sp., <i>Filipendula</i>)	Acetamiprid (54.1) Azoxystrobin (71.3) Boscalid (24.4) Pendimethalin (13.1)
	P 3	<i>Salix</i> ssp. (<i>Vicia faba</i> , <i>Rubus</i> group)	<i>Brassica</i> sp. (<i>Rubus</i> group, <i>Gleditsia</i>)	Acetamiprid (49.1) Azoxystrobin (98.1) Boscalid (25.9) Pendimethalin (11.0)	<i>Vicia faba</i> (<i>Brassica</i> sp., <i>Rosa</i> sp.)	Acetamiprid (45.3) Azoxystrobin (20.2) Boscalid (6.8) Pendimethalin (4.1) Tau-Fluvalinate (2.1) Tebuconazole (5.7)

3 Allgemeine Diskussion und Schlussfolgerungen

Mehr als die Hälfte der Fläche Deutschlands ist landwirtschaftlich genutzt und ca. 94 % davon werden konventionell bewirtschaftet [50]. 2015 wurden in Deutschland durchschnittlich circa sieben Kilogramm PSM pro Hektar aufgewendet, um Kulturpflanzen vor Unkräutern, Schädlingen und Krankheiten zu schützen [50, 51]. Würde man in Deutschland auf PSM verzichten und vollständig auf ökologischen Landbau umsteigen, würden pro Jahr 35,7 Mio. Tonnen Lebensmittel (Getreide, Raps, Kartoffeln, Zuckerrüben) fehlen. Deutschland müsste in der Folge Grundnahrungsmittel importieren, anstatt sie wie bisher zu exportieren. In anderen Ländern müssten für die deutsche Bevölkerung zusätzlich 6,5 Mio. Hektar Ackerflächen zur Verfügung gestellt werden. Dies hätte schlussendlich weitreichende Folgen für die weltweite Biodiversität und das Klima. Man müsste auch auf die positiven Einflüsse auf die inländische Wirtschaft verzichten und den damit verbundenen gesamtwirtschaftlichen Wohlstand [6, 7]. In den kommenden Jahrzehnten wird das Ziel einer nachhaltigen Produktion bei gleichzeitiger Produktivitätssteigerung noch viel wichtiger werden. Es gilt eine steigende Weltbevölkerung von 9 - 10 Milliarden Menschen im Jahr 2050 mit Nahrungsmitteln zu versorgen [9]. Hinzu kommen veränderte Ernährungsgewohnheiten in Entwicklungsländern hin zu mehr tierischen Lebensmitteln, eine steigende Produktion von Biokraftstoffen und generell hohe Verluste von Agrarprodukten in der Lebensmittelherstellung und beim Konsumenten. Die zur Verfügung stehende Anbaufläche ist jedoch limitiert und die Erträge müssen gemäß den Leitlinien des integrierten PS optimiert werden. Chemischer PS ist mitunter nur eine Säule des integrierten PS. Stresstolerante ertragreiche Kulturen, verbesserte Anbau- und Applikationstechniken, neue technische Innovationen, Precision Farming, gentechnisch veränderte Pflanzen, Schädlingsforschung, eine Reduktion der nach-Ernte-Verluste, und biologischer PS sollten dabei weiter in den Vordergrund rücken, um chemischen PS zu reduzieren [52]. Jedoch wird der chemische PS weiterhin unverzichtbar sein, um den Herausforderungen der Zukunft zu begegnen. Entsprechend ist in den letzten Jahren ein Anstieg von verkauften Präparaten im Inland (Abb. 3), sowie in Europa (Abb. 4), zu verzeichnen [51, 53]. Weltweit ist seit einigen Jahren ein leichter Rückgang der verwendeten PSM Menge zu beobachten (Abb. 4) [53]. Da der Anbau von gentechnisch veränderten Pflanzen einen reduzierten Einsatz von PSM zur Folge hat, könnte der weltweit steigende Anbau solcher Pflanzen die Erklärung für den weltweit sinkenden Einsatz von PSM sein (Abb. 3) [54, 55].

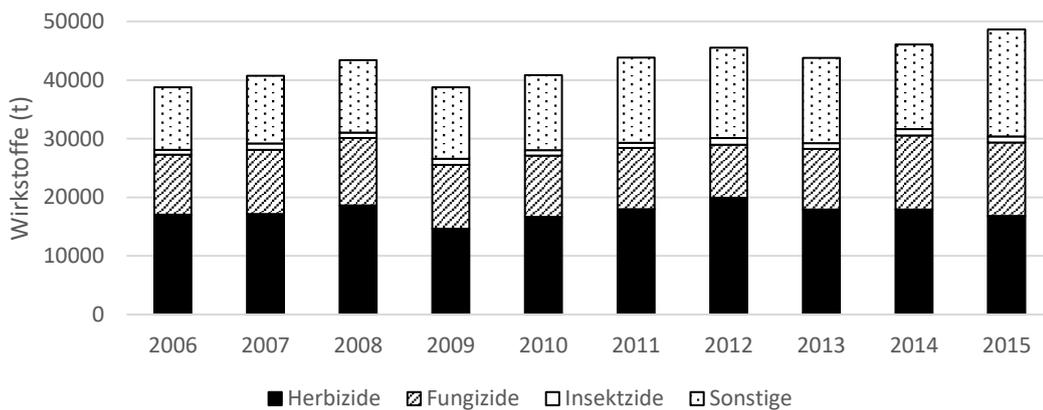


Abbildung 3: Inlandsabsatz von PSM Wirkstoffen (t); Entwicklung 2006-2015 (Herbizide einschließlich Safener; Insektizide einschließlich Akarizide und Synergisten; Sonstige: inerte Gase und andere) [51].

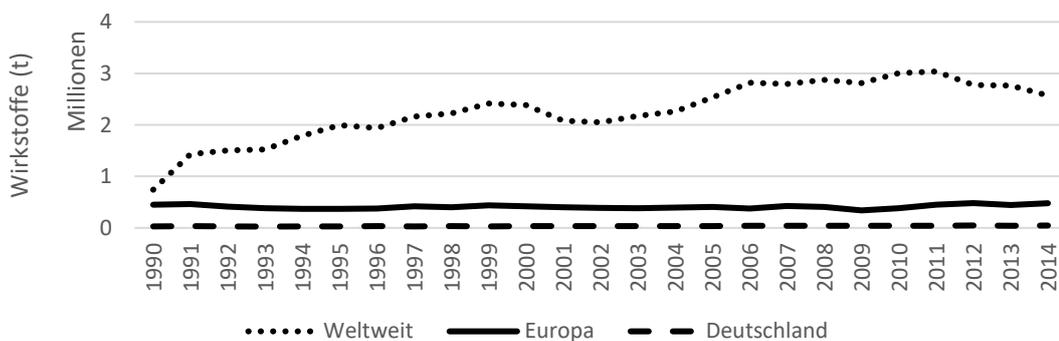


Abbildung 4: Wirkstoffverbrauch von PSM (Millionen t) im Agrarsektor für Pflanzen und Saatgut. Trend für Deutschland, Europa und die Welt von 1990-2014 [53].

PSM treffen jedoch nicht nur den Zielorganismus. Luft, Oberflächen- und Grundwasser, Böden und Sedimente können durch PSM verunreinigt werden und sich anreichern. 2 - 25 % der ausgebrachten Mittel können dabei durch Drift in der Umwelt verteilt werden und treffen auch Nicht-Ziel Vegetation und Nicht-Ziel Organismen [7]. Eine Verunreinigung oder Anreicherung von Wirkstoffen in Böden und Sedimenten kann Auswirkungen auf Bodenorganismen, wie z.B. Mikroorganismen, Regenwürmer oder Bodenarthropoden haben [56]. Auch Amphibien, Säuge- oder Vogeltierarten können direkt und indirekt von PSM beeinträchtigt werden, besonders, wenn aufgrund von PS Maßnahmen die Nahrungsgrundlagen verringert werden [57]. Jedoch leisten viele wildlebende Tierarten und vor allem terrestrische Arthropoden wichtige Ökosystemdienstleistungen, wie z.B. Bestäubungsleistungen [56]. Neben Wildbienen und anderen Insekten sei die Honigbiene als wichtigster Bestäuber genannt [58].

Honigbienen werden schon seit Jahrzehnten als Bioindikatoren für Schwermetalle, Radioaktivität und Xenobiotika eingesetzt. Auf ihren bis zu zehn Kilometer weiten Flügen um den Bienenstock, sammeln sie Nektar und Pollen von Blüten, Harze von verschiedenen Bäumen, Honigtau von Läusen und Wasser aus Pfützen und Bewässerungsgräben. Dabei lagern sich auch in der Luft schwebende Partikel und Stäube im Haarkleid der Biene ab. Bienen können auf zweierlei Weisen den Kontakt anzeigen. Zum einen, durch einen erhöhten Bientotenfall und zum anderen durch Rückstände in Honig, Pollen, Wachs, Propolis, und Bienen- und Larvengewebe [22, 59, 60].

Die Belastung der Honigbiene mit PSM wurde in zahlreichen Untersuchungen mit Hilfe von Rückstandsuntersuchungen von Pollen und Bienenbrot ermittelt. Die Rückstandsanalyse von Bienenbrot ist ein gängiges Mittel in Überwachungsstudien, da die Proben ohne zusätzliche Vorrichtungen entnommen werden können und in ausreichender Menge vorliegen [24, 27, 61–64]. Jedoch können die Ergebnisse, die mit diesen Analysen gewonnen werden, nur zur ersten Einschätzung dienen, um einen Überblick über den Kontakt von Honigbienen zu PSM zu bekommen. Sammlerinnen bringen Pollenhöschen in den Bienenstock, wo Stockbienen die Pollenhöschen in der Nähe des Brutnestes in Zellen füllen. Mehrere Pollenhöschen werden übereinandergestapelt und mit Speicheldrüsensekreten und Nektar oder Honig versetzt. Dabei werden Mikroorganismen aus dem Honigmagen mit übertragen [65, 66]. Durch die eintretende Gärung konserviert, kann Bienenbrot über Monate haltbar gemacht werden. Daher deckt das Beprobieren von Bienenbrot unweigerlich eine Zeitspanne von Tagen bis Monaten ab. Somit geht in die Rückstandsanalyse eine Mischung von Pollenhöschen unterschiedlicher pflanzlicher Herkunft und unterschiedlicher Pestizidbelastung ein. Unbelastete Pollenhöschen verdünnen dabei die Konzentrationen der hochbelasteten Pollenhöschen. Hinzu kommt, dass sich einige PSM im sauren Milieu des Bienenbrotes abbauen [66, 67].

Um ein genaueres Bild der Pestizidbelastung durch Pollen zu erhalten, sind das Absammeln von Pollenhöschen von heimkehrenden Sammlerinnen, z.B. mit Hilfe von Pollenfallen, ein geeignetes Mittel (**Veröffentlichung 1**) [20, 61, 68–72]. Je nach Aufbau des Versuchs lassen sich so Rückschlüsse auf die Belastung mit PSM durch bestimmte Kulturen oder an bestimmten Tagen ziehen. In vielen Untersuchungen werden jedoch nur einzelne Proben im Laufe des Jahres oder nach einzelnen PS Maßnahmen gezogen. Außerdem werden die Proben in vielen Fällen wegen geringer Menge oder hohem finanzi-

ellen Aufwand gepoolt. Aus diesem Grund kann man aus den meisten bisherigen Studien keine detaillierten Werte über die tatsächliche Belastung mit PSM, oder dem zeitlichen Auftreten im Laufe des Jahres ablesen. Somit war das Ziel unserer ersten Untersuchung, die tagaktuelle Belastung von Bienenvölkern mit PSM aufzuzeigen: die Variabilität der Konzentrationen der PSM und deren Zusammensetzung im Verlauf der landwirtschaftlich aktiven Phase. Unsere Studie ist die erste, die über mehrere Jahre, an verschiedenen Standorten genaue Angaben zu Konzentrationen von PSM von einzelnen Tagen im Laufe der bienenaktiven Saison macht (**Veröffentlichung 1**). Mit Hilfe dieser Ergebnisse möchten wir Landwirten, Imkern und Wissenschaftlern ein Datenpaket an die Hand geben, die heutige landwirtschaftliche Praxis einzuschätzen und feldrealistische Versuche durchführen zu können.

Zu den wichtigsten Ergebnissen unserer 281 Rückstandsuntersuchungen gehört, dass sich die drei untersuchten Standorte erheblich in Quantität und Qualität der gefundenen Wirkstoffe unterscheiden. Der erste Standort, der von 2012 - 2016 untersucht wurde, ist als Streuobststandort charakterisiert durch einen hohen Anteil an Wiesen, Weiden und Obstbäumen. In der vergleichenden Untersuchung wurden 24 verschiedene Wirkstoffe in 56 % der Proben mit Maximalkonzentrationen von 290 µg/kg detektiert. Der zweite Standort ist ein intensiver Getreidestandort, mit vielen Körnergetreidearten, Winterraps und Mais für die Biogasgewinnung. Nur 13 % der Proben waren rückstandsfrei. In den fünf Jahren wurden insgesamt 36 verschiedene Wirkstoffe in Konzentrationen bis zu 1.496 µg/kg gefunden. Nur drei Jahre, von 2012 - 2014, wurde der dritte Standort untersucht. Neben Getreidearten ist dieser Standort zusätzlich mit einem hohen Anteil an Dauerkulturen wie Wein, Stein- Kern- und Beerenobst charakterisiert. Alle Proben waren mit insgesamt 58 verschiedenen Wirkstoffen belastet. Die höchste gemessene Konzentration lag bei 7.178 µg/kg.

Insgesamt wurden in 80 % aller Proben 73 verschiedene Wirkstoffe gefunden, von denen 31 Wirkstoffe systemische Eigenschaften aufzeigen. Mehr als die Hälfte davon gehört zur Gruppe der Fungizide. Der häufigste gefundene Wirkstoff ist jedoch das Insektizid Thiacloprid. Aufgrund ihrer Zulassung gab es eine hohe Wahrscheinlichkeit 84 % der hier detektierten Wirkstoffe im Pollen zu finden, zu denen auch Thiacloprid und die Mehrheit der Fungizide zählen.

Sind PSM-Wirkstoffe in den Zonen der EU von der Europäischen Kommission zugelassen, können die Länder, unter Beachtung des PS Gesetzes und der darin verankerten

Bienenschutzverordnung PSM zulassen. PSM werden als bienengefährlich oder nicht bienengefährlich eingeordnet. Wirkstoffe in PSM in Deutschland, die als B4 (nicht bienengefährlich) kategorisiert sind, dürfen, da keine akute Gefahr ausgeht, direkt in die Blüte appliziert werden. Nach Ende des Bienenfluges dürfen bienengefährliche PSM angewendet werden, die als B2 kategorisiert sind, da sie dann nicht mehr bienenschädlich sind. Somit ist es wahrscheinlich, Wirkstoffe von PSM im Pollen zu finden, die als B2 oder B4 eingeteilt sind. PSM, die als B1 (bienengefährlich) kategorisiert sind, sollten nicht im Pollen oder anderen Bienenmatrizen gefunden werden, da durch die Gefährlichkeit der Wirkstoffe ein Kontakt zu Bienen ausgeschlossen werden sollte. B3 bedeutet, dass dieses per se für Bienen gefährliche PSM Bienen nicht gefährdet, da es aufgrund der zugelassenen Anwendungsvorschrift nicht mit Bienen in Kontakt tritt; beispielsweise als Saatgutbeizungen oder bei Anwendungen in Lager- oder Gewächshäusern [73].

In unserer langjährigen Untersuchung wurden in den Proben an allen drei Standorten insgesamt zwölf verschiedene Wirkstoffe gemessen, die entweder nicht als PSM zugelassen sind und nicht im Pollen auftauchen sollten oder aufgrund ihrer Toxizität und Zulassung nicht mit Bienen in Kontakt treten sollten. Zum Beispiel Methiocarb, Fuberidazol oder Pencycuron sind Wirkstoffe, die bei der Saatgutbehandlung eingesetzt werden [74]. Bei der Aussaat kann es jedoch zum Abrieb der Beize kommen. Dieser wirkstoffhaltige Staub kann durch Drift auf blühende Pflanzen verlagert werden, wo er zusammen mit dem Pollen eingesammelt werden kann [11, 75, 76]. Daraus lässt sich schließen, dass trotz der Vorkommnisse im Rheintal 2008, wo Bienen durch Clothianidin-belastete Saatgutstäube vergiftet wurden, noch immer Optimierung beim Aussaatprozess nötig ist. Auch ein Kontakt zu den bienengefährlichen Wirkstoffen Clothianidin, Dimethoat, Fenoxycarb und Imidacloprid, die in unseren Proben gefunden wurden, sollte nicht stattfinden. Jedoch ist jeder Wirkstoff in der vergleichenden Untersuchung nur ein bis maximal drei Mal detektiert worden. Das lässt darauf schließen, dass keine großflächigen Applikationen oder Fehlanwendungen in bieneninteressanten Kulturen stattgefunden haben. Stattdessen sollten diese Messergebnisse dazu genutzt werden, den Blick für blühenden Unterwuchs, Ackerbegleitkräuter oder Drift noch weiter zu schärfen. Ein weiteres Indiz für Drift geben die Rückstände von PSM in den Pollenfraktionen von beispielsweise Baumarten wie Ahorn, Robinie oder Kastanie.

Außerdem erkennt man in unserer Studie, dass alle gemessenen Konzentrationen, selbst an den intensiveren Standorten und trotz der gelegentlich detektierten bienengefährlichen Wirkstoffe, subletal sind. Subletal sind Konzentrationen, wenn sie kleiner sind als ein Zehntel des LD₅₀ Wertes (letale Dosis bei der 50 % der Versuchstiere im Laborversuch sterben) und somit nicht zum direkten Tod führen. Der tatsächliche Wirkstoffkonsum ist jedoch abhängig von der individuellen Pollenaufnahmemenge der einzelnen Biene [24].

Die Auswirkungen von verschiedenen Wirkstoffen in subletalen Konzentrationen auf Honigbienen ist gut untersucht worden. Besonders die Untersuchung der Insektizide nimmt dabei eine wichtige Rolle ein. Es ist bekannt, dass kognitive Fähigkeiten, wie Lernverhalten, Gedächtnisleistung, Heimfindevermögen oder Flugverhalten [29, 34, 77–80], ebenso verändert werden wie soziale Interaktionen [81, 82]. Auch sind biochemische Veränderungen, Effekte auf Wachstum und Entwicklung oder Veränderungen der Genexpressionen beobachtet worden [21, 31, 36, 83–85]. Obwohl die meisten Effekte bei Arbeiterinnen untersucht wurden, sind auch negative Auswirkungen auf die Königin bekannt, z.B. reduzierte Überlebensfähigkeit von Spermien [86] oder verminderte Fruchtbarkeit [35].

Viele der beobachteten Effekte werden noch verstärkt, wenn der Kontakt zu den PSM chronisch erfolgt [32, 33, 35, 87]. In unserer Untersuchung stellte sich heraus, dass die einzelnen Proben unterschiedlich stark mit Rückständen kontaminiert sind. Es gibt wenige Tage oder Monate mit Spitzenbelastungen, die Indizien für PS-Maßnahmen liefern. Jedoch gab es in der Mehrheit der Proben einen regelmäßigen Wirkstoffstrom ins Volk, wenn auch in niedrigeren Konzentrationen. Da Bienenbrot den Pollen konserviert, soll er dem Volk über einen längeren Zeitraum zur Verfügung stehen. Somit kann es zu einer chronischen Belastung der Honigbienenvölker mit PSM kommen.

Außerdem ist in unserer Studie deutlich geworden, dass zwar die gemessenen Konzentrationen subletal sind, jedoch immer Mischungen von bis zu 44 verschiedenen Wirkstoffen in einzelnen Proben gefunden werden. Problematisch kann es sein, wenn Wirkstoffe aufeinandertreffen, von denen man weiß, dass sie synergistische oder additive Wirkungen entfalten. Das kann im Voraus durch Anwendungsbeschränkungen bei Tankmischungen unterbunden werden, bei denen bestimmte PSM in Kombination die Auflage B2 oder B1 erhalten. Synergistische Wirkungen kennt man von Ergosterol-Biosynthese hemmenden Fungiziden, die auf Pyrethroide oder Neonikotinoide treffen

[37–39]. Additive Effekte treten ein, wenn Insektizide aus verschiedenen Gruppen aufeinandertreffen, z.B. Neonikotinoide und Pyrethroide [40].

Typische Ergosterol-Biosynthese Hemmer, die an allen drei Standorten auftraten sind Metconazol, Tebuconazol oder Prothioconazol-desthio, der Metabolit von Prothioconazol. Ebenso finden wir an allen Standorten Pyrethroide, z.B. tau-Fluvalinat oder Etofenprox. Das regelmäßig vorkommende Thiacloprid wird neben Acetamiprid oder Clothianidin den Neonikotinoiden zugeordnet. Man erkennt, dass trotz Anwendungsaufgaben Kombinationen von Wirkstoffen im Bienenvolk auftreten, die schädliche Wirkungen entfalten können, obwohl die einzelnen PSM als nicht bienengefährlich eingestuft sind. Eine Ursache für das gleichzeitige Auftreten ist unter anderem die Mischung von Pollen unterschiedlicher pflanzlicher Herkunft mit unterschiedlicher PSM Belastung.

Aufgrund der Vielzahl der unterschiedlichen zugelassenen Wirkstoffe, ergibt sich jedoch eine unüberschaubare Anzahl an denkbaren Wirkstoffkombinationen, die es unmöglich macht, jede Mischung auf Nebenwirkungen zu untersuchen. Ein erster methodischer Ansatz besteht daher darin, sich an Rückstandsdaten aus dem Feld zu orientieren, um Versuche mit feldrealistischen Mischungen durchzuführen. Daher haben wir die Ergebnisse unserer oben beschriebenen Pollenanalyse als Datengrundlage für einen feldnahen Versuch herangezogen. Das Ziel war nicht nur feldrealistische Konzentrationen und Mischungen in einem Fütterungsversuch zu testen, sondern einen feldrealistischen Versuch durchzuführen. Deswegen war uns darüber hinaus auch wichtig freifliegende Honigbienenvölker zu nutzen, die mit subletalen Konzentrationen kontaminiertes Futter über einen längeren Zeitraum erhalten (**Veröffentlichung 2**).

Es wurde ein künstliches Bienenbrot (Pollen-Honig Gemisch) hergestellt und mit zwölf Wirkstoffen in Feldkonzentrationen versetzt. Dieses Futter wurde altersmarkierten Bienen in zwei Lebensphasen angeboten: im Larvenstadium und direkt nach dem Schlupf zur Adulthood. Es konnte gezeigt werden, dass die Larven der Pestizidgruppe zwar ein signifikant höheres Frischgewicht haben, die Larvenmortalität im Vergleich zur Kontrollgruppe aber nicht signifikant erhöht ist. Ähnliche Effekte zeigten sich auch im Adultstadium. Während die Größe der Futtersaftdrüsen von Ammenbienen in der Pestizidgruppe signifikant kleiner waren, ist die mittlere Überlebensdauer der pestizidgefütterten Bienen mit zwei Tagen Unterschied nicht signifikant kürzer. Obwohl die Bienen in kritischen Entwicklungsphasen, besonders gleich nach Schlupf aus dem Ei, chro-

nisch über zwei Wochen mit einer Mischung von einem Dutzend verschiedener Wirkstoffe (darunter dem bienengefährlichen Wirkstoff Methiocarb) gefüttert wurden, zeigten sich keine extremen Effekte oder akuten Vergiftungserscheinungen. Auch können wir nicht davon ausgehen, dass sich Brutentwicklung oder Volksstärke kurzfristig negativ verändern würden.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse kommt die Überlegung auf, ob die Ammenbienen, die das angebotene kontaminierte Futter fressen und die Larven füttern, eine Filterrolle einnehmen, sodass die Larven keinen Wirkstoffkontakt haben. Um dieser Frage nachzugehen, haben wir zwei Versuche durchgeführt.

Eine ähnliche Wirkstoffmischung wie im vorherigen Versuch, jedoch in hohen Konzentrationen, wurde in einem Pollen-Honig-Gemisch während einer Königinnenzucht an freifliegende Honigbienenvölker verfüttert (**Veröffentlichung 3**). Das Gelée Royale (GR), das den Larven von den Ammenbienen gefüttert wurde, wurde entnommen und auf mögliche PSM Rückstände untersucht. Sieben der 13 gefütterten Wirkstoffe konnten in Spurenkonzentrationen im GR wiedergefunden werden. Mehr als dreiviertel aller Detektionen lag unter 1 µg/kg. Die gefütterten Konzentrationen waren bewusst höher gewählt als im Feld gemessen wurden. Trotzdem sind nur maximal 0,016 % der im Volk zirkulierenden Wirkstoffmenge im GR detektiert worden. Überträgt man dieses Ergebnis auf die durchschnittlich im Feld gefundenen Konzentrationen, können wir nicht von einem Risiko ausgehen, dass Königinnenlarven oder junge Arbeiterinnen- oder Drohnenlarven vergiftet oder akut geschädigt werden.

Arbeiterinnen- und Drohnenlarven, die älter als drei Tage sind, bekommen jedoch ein verändertes Larvenfutter, dem Pollen zugesetzt werden kann [49]. Daher stellt sich die Frage, ob kontaminierter Pollen, der von den Ammenbienen genutzt wird um Arbeiterinnenfuttersaft herzustellen, andere Auswirkungen haben kann. Daher haben wir in einem weiteren Versuch, nach Fütterung von hohen Konzentrationen eines Wirkstoffgemischs, Arbeiterinnenfuttersaft unterschiedlich alter Larven entnommen und auf mögliche Rückstände untersucht (**Veröffentlichung 4**, eingereicht). Es zeigte sich, dass von 13 gefütterten Wirkstoffen, sechs bei den jüngeren und zwölf bei den älteren Larven im Futtersaft wiedergefunden wurden. Die detektierten Wirkstoffkonzentrationen stiegen bei den drei- bis sechstagealten Larven stetig, bis maximal 871,0 µg/kg je nach Wirkstoff, an. Eine Zählung der Pollenkörner im Futtersaft ergab, dass auch deren Anzahl

mit ansteigendem Larvenalter zunahm. Somit korreliert die ansteigende Pestizidkonzentration positiv mit der Erhöhung der Pollenzahl.

Je älter eine Larve wird, desto mehr Zucker, bzw. Nektar aus dem Honigmagen wird dem Drüsensekret aus den Futtersaft- und Mandibeldrüsen zugesetzt [49, 88–91]. Da der Honigmagen neben Nektar auch Pollen enthält, gelangen bei jeder Nektarzugabe auch Pollenkörner in den Larvenfuttersaft [44, 88, 92–94].

Eine Verunreinigung des Larvenfuttersafts mit maximal 871,0 µg/kg klingt viel, jedoch muss bedacht werden, dass wir für unseren Versuch, unrealistisch hohe Ausgangskonzentrationen von PSM dem Pollenfutter beigemischt haben. Hinzu kommt die geringe Gesamtfuttermenge, die eine Arbeiterin als Larve verzehren würde. Bei ca. 150 mg Futtersaft für eine Arbeiterin [95] wären das, basierend auf unseren Rückstandswerten, zwischen 0,002 - 0,11 µg für die verschiedenen Wirkstoffe. Auch für den giftigsten Wirkstoff Methiocarb sind das subletale Konzentrationen, die keine direkten Vergiftungen erwarten lassen.

Die Konzentrationen der PSM, die im GR gefunden wurden, sind im Vergleich zu den Konzentrationen im Arbeiterinnenfuttersaft niedriger. Jedoch bekommt die Königinnenlarve häufiger und mehr Futter als die Arbeiterinnenlarven; ca. 1,5 g GR [46, 49, 90, 96]. Dennoch ist zu bezweifeln, dass die konsumierten Wirkstoffmengen der Grund für gescheiterte Königinnenzuchten sind. Hinzu kommt, dass die Königin ihr durchschnittlich 1-3 Jahre langes Leben täglich mit dem Drüsensekret der Ammenbienen gefüttert wird [97–99]. Wenn man grob berechnet, dass eine Königin am Tag 1.500 – 2.000 Eier legen kann [100], bei einem durchschnittlichen Eigewicht von 0,17 mg [101], dann müsste eine mittelschwere Königin von 200 mg ihr Körpergewicht an Nahrung zu sich nehmen, um nicht abzunehmen [102]. Doch selbst dann wird eine Königin nicht so viel fressen können, dass die Rückstände im GR direkte akute Schäden bei ihr verursachen könnten. Die gefressenen Wirkstoffmengen werden immer subletal bleiben, besonders gemessen an den Konzentrationen die im Pollen im Feld durchschnittlich gefunden werden.

Solange Landwirte nicht grob fahrlässig handeln, sich an Applikationsvorschriften halten und es nicht zu Fehlanwendungen kommt, kann man aufgrund unserer Datenlage davon ausgehen, dass es im Feld nicht zu akuten bzw. kurzfristigen Schädigungen der Honigbiene kommt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass es einen steten Kontakt zu PSM

gibt, wenn auch in subletalen Konzentrationen. In unserem ersten Versuch konnten wir nach chronischer Fütterung eines feldrealistischen PSM-Cocktails subletale Effekte nachweisen. Es ist nicht auszuschließen, dass diese Effekte durch unterschwellige Konzentrationen, die von Ammenbienen an Larven in sehr kritischen Entwicklungsstadien verfüttert werden, verursacht werden. Mit unserem Versuch kann ebenfalls nicht abgeschätzt werden, ob die Veränderung der Futtersaftdrüsen langfristig Nebenwirkung auf die Brutpflege oder die Zusammensetzung des Larvenfuttersafts hat. Auch sollte in weiterführenden Versuchen gezeigt werden, ob die chronische Belastung der Königin nicht auch zu Leistungseinschränkungen ihrerseits führen kann.

Nichtsdestotrotz ist der Nachweis subletaler Effekte im Freiland bei der Honigbiene ein schwieriges Unterfangen. Konzentrationen die in Laborversuchen Effekte erzielten, zeigten in anderen Studien keine Wirkung im Freiland. Hinzu kommen Parasiten und Krankheitserreger, Witterung und die Qualität der Nährstoffe die im Freiland Einfluss auf das Volk nehmen. Eindeutige Effekte zu sehen ist nicht leicht und auch nicht einfach auf einzelne Ursachen zurück zu führen [21]. Die Honigbiene ist ein eusoziales Lebewesen, was als Superorganismus leichter Stressfaktoren tolerieren und den Verlust einzelner Bienen abfedern kann. Solitär lebende Individuen andererseits, z.B. Wildbienen, die alleine für ihre Nachkommen verantwortlich sind, werden von Stressoren stärker benachteiligt [103]. Der Flugradius vieler Wildbienen beträgt nur wenige hundert Meter wodurch sie auf die Pflanzen in der Umgebung angewiesen sind. Kommt es durch Lebensraum-Fragmentierung oder intensive Landwirtschaft zur Pflanzenarmut, werden die Wildbienen gezwungen in landwirtschaftlich genutzten Flächen zu sammeln, um ihre Eier/Nachkommen zu verproviantieren [104]. Diese Larven treten nun ohne Ammenbiene, die das Futter zubereiten, direkt mit den PSM, die sich im Pollen oder Nektar befinden, in Kontakt. Da viele Wildbienenarten mono- oder oligolektische Arten sind, sammeln sie nur von bestimmten Pflanzen [105]. Wie wir in der Rückstandsuntersuchung der Pollenhöschen jedoch zeigen konnten, können die Konzentration von PSM in Pollenfraktionen, die von einzelnen Pflanzenarten dominiert sind, im Vergleich zur Mischprobe noch höher ausfallen (**Veröffentlichung 1**). Es ist in diesem Fall nicht ausgeschlossen, dass aufgrund der geringeren Pufferkapazität solitär lebender Individuen, im Vergleich zur weniger anfälligeren Honigbiene, stärkere oder sogar artbedrohende Effekte auftreten können. Nicht umsonst wird gefordert, für die Risikobewertung von Umweltstressoren, beispielsweise von Pestiziden, andere nicht-*Apis* Arten mit zu berücksichtigen. Weitreichende und längerfristige Versuche und Untersuchungen müssen

angestrebt werden, damit auch in Zukunft die von Insekten und anderen Lebewesen bereitgestellten Ökosystemservices geschützt werden können [103].

4 Zusammenfassung

4.1 Zusammenfassung

Pflanzenschutzmittel (PSM) kommen weltweit zum Einsatz und verunreinigen Luft, Oberflächen, Böden und Gewässer. Sie können durch direkte Spritzmaßnahmen oder indirekt durch Saatgutbehandlungen abdriften oder ausgewaschen werden und treten auf diese Weise mit Nicht-Ziel-Pflanzen und Nicht-Ziel-Organismen (NZO) in Kontakt. Die Honigbiene (*Apis mellifera* L.) hat als NZO durch ihre Bestäubungsleistung und ihre Bienenprodukte eine große Bedeutung für den Menschen. Auf ihren bis zu zehn Kilometer weiten Flügen um den Bienenstock sammeln sie Nektar, Pollen, Wasser, Honigtau und Baumharze. Die Proteine aus dem Pollen sind wichtig für die Ernährung und Entwicklung von Larven und Adulten. Pollen wird von den Bienen als Bienenbrot eingelagert, konserviert und besteht aus Hunderten von Pollenhöschen, die über einen längeren Zeitraum von unterschiedlichen Pflanzen gesammelt wurden. Rückstandsanalysen von Bienenbrot finden häufig Anwendung, um den Kontakt von Bienen zu PSM aus dem Feld einschätzen zu können. Jedoch deckt die Analyse einer Bienenbrotprobe häufig ein größeres Zeitfenster ab und es kann durch unkontaminierte Pollenhöschen zu Verdünnungseffekten kommen. Somit können die erzielten Ergebnisse nur eine Abschätzung über die wahre Belastung des Pollens mit PSM geben.

Aus diesem Grund haben wir in den Jahren 2012 - 2016 an drei landwirtschaftlich unterschiedlich genutzten Standorten in Baden-Württemberg von Imkern in der landwirtschaftlich aktiven Hochzeit (Frühjahr/Sommer) täglich mit Hilfe von Pollenfallen Pollenhöschen sammeln lassen. Es sollten tagesaktuelle Konzentrationen und Kombinationen von PSM im Pollen im Verlauf der Saison dargestellt werden. Proben von 281 Tagen wurden auf 282 verschiedene Wirkstoffe untersucht (**Veröffentlichung 1**). Es stellten sich große qualitative und quantitative Unterschiede der Kontamination mit PSM zwischen den Standorten heraus. Der Streuobststandort nahe Göppingen war am geringsten mit PSM belastet. In 5 Jahren wurden nur 24 verschiedene Wirkstoffe in 56 % der Proben mit bis zu 300 µg/kg gefunden. Der intensivere Standort in Ertingen ist durch Anbau von Getreide und Mais für die Biogasproduktion gekennzeichnet. 13 % der Proben waren nicht belastet; die übrigen waren mit insgesamt 37 verschiedenen Wirkstoffen mit Maximalkonzentrationen bis zu 1.500 µg/kg kontaminiert. Der Standort mit dem intensivsten Pflanzenschutz aufkommen war in Heilbronn und von Dauerkulturen wie

Wein- und Obstbau geprägt. Die höchste gemessene Konzentration lag bei 7.178 µg/kg. Alle Proben dieses Standorts waren mit bis zu 58 verschiedenen Wirkstoffen belastet.

Insgesamt wurden mehr als 70 verschiedene Wirkstoffe in dieser vergleichenden Untersuchung gefunden. Aufgrund ihrer Zulassung war die Wahrscheinlichkeit hoch, 84 % der hier detektierten Wirkstoffe im Pollen zu finden. Zwölf gefundene Substanzen sind jedoch entweder nicht als PSM zugelassen und sollten nicht im Pollen gefunden werden, oder sollten aufgrund ihrer Bienengefährlichkeit keinen Kontakt zu Bienen haben. Wir schließen daraus, dass es weiterer Optimierung im Aussaatprozess bedarf, um insektizidhaltige Feinstäube zu vermeiden. Außerdem folgern wir, dass blühendem Unterwuchs, Ackerrandbegrünung oder Blüten in der näheren Umgebung weitere Beachtung geschenkt werden sollte. Denn es werden nach wie vor über Abdrift von Spritzbrühe Nicht-Ziel-Pflanzen getroffen. Jedoch kann aufgrund der detektierten Konzentrationen in den Pollenproben nicht von Fehlanwendungen im Versuchszeitraum ausgegangen werden. Selbst von den bienengefährlich eingestuften Insektiziden sind keine akuten Vergiftungserscheinungen bei Honigbienen zu erwarten. Die Konzentrationen der Wirkstoffe befinden sich im für Honigbienen subletalen Bereich. Jedoch gibt es über den gesamten Beobachtungszeitraum eine Kombination verschiedener Wirkstoffe in den Proben. Es ist nicht bekannt, wie sich diese Cocktails aus verschiedenen Wirkstoffen in subletalen Konzentrationen bei chronischer Aufnahme auf Bienen auswirken.

Daher haben wir einen Feldversuch mit frei fliegenden Honigbienenvölkern durchgeführt (**Veröffentlichung 2**). Mini-Plus Völker mit jeweils ca. 2.500 Bienen und Geschwisterköniginnen wurden nahe der Landesanstalt für Bienenkunde in Hohenheim etabliert. Die Königinnen wurden gekäfigt, um Bienen gleichen Alters zu erhalten, die in zwei kritischen Lebensphasen mit PSM chronisch in Kontakt kommen sollten. Nach dem Schlupf der Larven aus dem Ei und nach dem Schlupf der Adulten aus den Zellen, wurde eine Mischung von zwölf verschiedenen Wirkstoffen in feldrealistischen Konzentrationen chronisch in einem Pollen-Honig Gemisch an die Völker verfüttert. Das Larvengewicht der Gruppe, welche die PSM erhielten, war signifikant erhöht. Die Larvenmortalität unterschied sich jedoch nicht von der unbehandelten Kontrollgruppe. Auch die Futtersaftdrüsen von adulten Ammenbienen waren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant kleiner. Jedoch gab es keine Auswirkung auf die Lebenserwartung zwischen beiden Gruppen. Trotz chronischer Fütterung mit einem Gemisch an PSM,

seit dem ersten Lebenstag der Arbeiterinnenlarven scheint es keine offensichtlichen Nebenwirkungen zu geben, welche die Volksstärke oder -vitalität beeinträchtigen.

Das wirft die Frage auf, ob Ammenbienen, die hauptsächlich von dem kontaminierten Pollen-Honig Gemisch fressen, Futtersaft herstellen und die Larven füttern, als eine Art Filtersystem fungieren, sodass die Larven keinen Kontakt zu den Wirkstoffen haben. Um Näheres über das Schicksal der Wirkstoffe herauszufinden, wurde eine Königinnenzucht angesetzt (**Veröffentlichung 3**). In frei fliegende weisellose Mini-Plus Völker wurden Rähmchen mit 24 h alten Larven eingehängt und gleichzeitig ein Pollen-Honig Gemisch, welches „worst-case“ Konzentrationen eines Wirkstoffcocktails enthält, verfüttert. Das Gelée Royale (GR), das den Königinnenlarven gefüttert wurde, wurde geerntet und auf Rückstände untersucht. Lediglich die Hälfte der angebotenen Wirkstoffe konnte in niedrigen Konzentrationen (77 % lagen unter 1 µg/kg) wiedergefunden werden.

Arbeiterinnenlarven erhalten jedoch im Vergleich zu Königinnenlarven ab einem Alter von ca. drei Tagen einen veränderten Larvenfuttersaft, der Pollen enthalten kann. Somit stellt sich die Frage, ob sich die PSM aus der Pollenquelle auf diesen Futtersaft anders auswirken als auf das GR der Königinnenlarven. Für den Freilandversuch wurden Königinnen von Mini-Plus Völkern gekäfigt, um Larven gleichen Alters zu erhalten. Den Völkern wurde ein Pollen-Honig Gemisch, angereichert mit sehr hohen Konzentrationen eines Wirkstoffcocktails, verfüttert (**Veröffentlichung 4**, eingereicht). Der Larvenfuttersaft von jeweils 3 - 6 Tage alten Larven wurde entnommen und auf Rückstände untersucht. Die gemessenen Konzentrationen stiegen mit zunehmendem Larvenalter an und lagen zwischen 2,9 und 871 µg/kg für die verschiedenen Wirkstoffe und Altersstufen. Da der Anstieg der Wirkstoffkonzentrationen positiv mit der Zunahme der Pollenkörner im Futtersaft mit ansteigendem Larvenalter korreliert, konnte belegt werden, dass die Höhe der Belastung mit PSM mit der Menge des Pollens im Larvenfuttersaft zusammenhängt.

Bemessen an der maximalen Futteraufnahmemenge einer Arbeiterinnenlarve liegen jedoch selbst die höchsten gemessenen Konzentrationen im Larvenfuttersaft noch im subletalen Bereich. Doch auch bei den Königinnen, die nach dem Schlupf als Adulte noch GR bekommen, werden die lebenslang konsumierten Wirkstoffmengen im subletalen Bereich liegen. Besonders wenn man in Betracht zieht, dass wir nicht-feldrealistische

Konzentrationen für die Versuche wählten. Wahrscheinlich sind aber die subletalen Effekte die wir im ersten Versuch messen konnten, Folge eines chronischen Kontakts zu den subletalen Konzentrationen, welche die Bienen im Laufe ihres Lebens zu sich genommen haben. Auch wenn wir keine direkten akuten Vergiftungen feststellen konnten und die gemessenen Konzentrationen im subletalen Bereich liegen, können wir keine Aussagen treffen, ob es nicht langfristig zu einer Beeinträchtigung der Fitness oder des Bruterfolges von Honigbienenvölkern kommen kann. Da das Honigbienenvolk allerdings als Superorganismus leichter Stressfaktoren tolerieren und den Verlust einzelner Bienen abpuffern kann ist es schwierig, subletale Effekte auf Volksebene im Freiland zu untersuchen, bzw. nachzuweisen. Andererseits ist es wahrscheinlich, dass solitär lebende Individuen, wie z.B. viele Wildbienenarten, die alleine für ihre Nachkommen verantwortlich sind, kürzere Flugradien haben und als Larve direkt mit kontaminierten Pollenreservoirs in Kontakt treten, stärker von Stressoren, wie PSM, benachteiligt werden.

4.2 Summary

Pesticides are used worldwide and contaminate air, surfaces, soils and the aquifer. Non-target-organisms and non-target-plants may get into contact with pesticides directly via drift or indirectly via run-off, leaching or sowing dust. Due to pollination services and bee products, the honeybee (*Apis mellifera* L.) is a non-target-organism of major interest for humans. On their flights around the beehive they collect water, pollen, nectar, honeydew and tree resin. The proteins originating from the pollen are important for nutrition and development of larvae and adults. Pollen is stored and fermented inside the hive as beebread and is made of hundreds of pollen loads of different plants collected over a longer period. Pesticide residue analyses of beebread is a common tool to estimate the contact of honeybees to pesticides in the field. However, such beebread analyses cover a larger time frame and a mixture with uncontaminated pollen will dilute the maximum residue levels of certain plant pollen. Therefore, pesticide analysis of bee bread is only an approximate approach to estimate the real pesticide exposition.

Thus, pollen pellets were collected daily at three distinct sites with differences in agricultural intensity in Baden-Württemberg from 2012 - 2016 during the agronomic active season (spring/summer). We wanted to give detailed information on the daily contact to pesticides as well as changing pesticide frequencies and combinations throughout the season. 281 pollen pellet samples, each representing a single day, were analyzed for 282 active ingredients currently used in agricultural practice (**publication 1**). Huge qualitative and quantitative differences in the pesticide load between the sites were discovered. The meadow site near Göppingen was the least contaminated. In five observation years only 24 different substances were found in 56 % of the samples with concentrations up to 300 µg/kg. The more intensive site in Ertingen is characterized by grains and maize for biogas plants. Only 13 % of the samples were uncontaminated, in the remaining samples 37 substances with maximal concentrations up to 1,500 µg/kg were detected. The site with the highest occurrence of crop protection was close to Heilbronn. Permanent crops such as wine and orchards shape the landscape. The highest detected concentration was 7,178 µg/kg. All samples were contaminated with up to 58 different substances.

During the five years of observation 73 different pesticides were found. Due to admission regulations, there was a high likelihood to find 84 % of these substances in pollen. Twelve substances were found that are either not registered as plant protection products

or are not supposed to get in contact with bees. This indicates a need for further improvement of seed treatments and increasing awareness of flowering shrubs, field margins and pesticide drift. Concluding from the majority of concentrations and pesticides found, we assume no misuse of pesticides by the farmers at our three sites in the observation period, which would lead to direct intoxication. Considering LD₅₀ values, the here detected concentrations are sub-lethal for honeybees. However, at any tested site and in most of the samples a mixture of different pesticides was found. Yet, it is not known, whether there are effects caused by a combination of different pesticides in sub-lethal concentrations when consumed chronically by honeybees.

Therefore, we conducted a field experiment with free-flying honeybee colonies (**publication 2**). Mini-hives containing about 2,500 bees and sister queens were established at the Apicultural State Institute. Queens were confined to an empty frame to receive larvae of known age. These bees were intended to feed on pesticides chronically in two crucial life stages. After larvae hatched from the eggs and after adults hatched from the cells they were fed a pollen-honey diet contaminated with a cocktail of twelve different active ingredients in field-realistic concentrations. In colonies treated with a pesticide mixture, larval weight was higher and acini diameters of the hypopharyngeal glands of nurse bees were smaller than in the untreated control. However, brood termination and adult lifespan did not differ between both groups. Despite feeding a pesticide cocktail chronically starting on the first day of larval being, no obvious negative side-effects in worker bees were detected.

It raises the question, if nurse bees, which feed on the contaminated pollen-honey diet, produce larval food and feed larvae, serve as a filter system so that larvae would not come into contact with the pesticides. To determine the fate of pesticides originating from the pollen source, we started a queen rearing (**publication 3**). Frames with 24 h old larvae were hang into queenless free flying mini-hives. At the same time, the colonies were fed a pollen-honey diet containing a cocktail of 13 commonly used pesticides in high concentrations. The royal jelly (RJ) fed to the larvae by nurse bees was harvested from the queen cells and subjected to a multi-pesticide residue analysis. Seven substances were rediscovered in traces (76.5% of all detections were below 1 µg/kg).

However, worker larvae older than three days receive a modified jelly, containing pollen coloring the food yellowish. That is why we were wondering if contaminated pollen might have a different effect on the food of worker larvae. Queens of free-flying mini

hives were caged to receive larvae of known age. The colonies received a pollen-honey diet, contaminated with high concentrations of a pesticide mixture (**publication 4**, submitted). Worker jelly (WJ) was harvested on four successive days from larval age three to six and subjected to a multi-pesticide residue analysis. Pesticide concentrations increased with larval age and ranged between 2.9 and 871.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for the different substances and age groups. As the increase of substances in the WJ positively correlates with the amount of pollen grains counted in the larval food, we were able to show a direct relationship between the administered pollen in the food and the pesticide concentrations.

Considering the maximum food uptake rates of a worker larvae, even the highest concentrations found, would lead solely to sub-lethal amounts. Even for queens, who consume RJ not only as larvae but during their whole life would consume only sub-lethal pesticide concentrations. Especially considering the not-field realistic concentrations we chose for our experiments. Probably, the sub-lethal effects found in our first experiment are due to the sub-lethal concentrations worker larvae have taken up chronically during their development. Even though we did not detect acute intoxication symptoms and the concentrations in the brood food are sub-lethal, we cannot infer whether there are impairments of fitness or brood success of honeybee colonies in the long term. However, as honeybee colonies are considered as superorganisms, they are able to tolerate stressors or the loss of individuals. Therefore, the detection of sub-lethal effects on colony-level in the field is difficult. Yet, a vast problem arises with solitary living insects, for example wild bee species, which are more prone to stressors such as pesticides. Solitary insects have more restricted flight and collecting areas, get into contact with pesticides in pollen directly as larvae and have almost no buffer capacities.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- 1 Mayer K. (1959) 4500 Jahre Pflanzenschutz: Zeittafel zur Geschichte des Pflanzenschutzes und der Schädlingsbekämpfung unter besonderer Berücksichtigung der Verhältnisse in Deutschland. Stuttgart: Verlag E. Ulmer.
- 2 Trappmann W. (1949) Pflanzenschutz und Vorratsschutz. Stuttgart: Hirzel-Verlag.
- 3 Jaskolla D. (2006) Der Pflanzenschutz vom Altertum bis zur Gegenwart. Ein Leitfa-
den zur Geschichte der Phytomedizin und der Organisation des deutschen Pflanzenschutzes. abgerufen Januar 1, 2017, von https://www.julius-kuehn.de/media/JKI/Allgemein/PDF/Der_Pflanzenschutz_vom_Altertum_bis_zur_Gegenwart.pdf
- 4 Bundesinstitut für politische Bildung. (2009) Industrialisierung der Landwirtschaft -
“Ersatz von Arbeit durch Kapital.” abgerufen Juli 7, 2017, von <http://www.bpb.de/gesellschaft/umwelt/dossier-umwelt/61261/industrialisierung?p=all>
- 5 Plischke W, Meier SM, Riedl B. (2014) Von Steinkohlenteer bis zu Krebsmedika-
menten: 150 Jahre Bayer. *Chemie Unserer Zeit*, 48(2), 124–132.
- 6 Noleppa S. (2017) Der Nutzen von Pflanzenschutz - als wesentlicher Bestandteil mo-
derner Landwirtschaft in Deutschland. abgerufen Juli 7, 2017, von
http://www.iva.de/sites/default/files/benutzer/%25uid/publikationen/iva_1601_br_015_nutzen_von_pflanzenschutzmitteln_rz_20170118_web.pdf
- 7 Aktar W, Sengupta D, Chowdhury A. (2009) Impact of pesticides use in agriculture:
their benefits and hazards. *Interdiscip. Toxicol.*, 2(1), 1–12.
- 8 Oerke EC. (2006) Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.*, 144, 31–43.
- 9 Godfray HCJ. (2014) The challenge of feeding 9–10 billion people equitably and sus-
tainably. *J. Agric. Sci.*, 152, S2–S8.
- 10 Botías C, David A, Hill EM, Goulson D. (2017) Quantifying exposure of wild bum-
blebees to mixtures of agrochemicals in agricultural and urban landscapes. *Environ.
Pollut.*, 222, 73–82.
- 11 Schnier HF, Wenig G, Laubert F, Simon V, Schmuck R. (2003) Honey bee safety of
imidacloprid corn seed treatment. *Bull. Insectology*, 56(1), 73–75.

- 12 Samson-Robert O, Labrie G, Chagnon M, Fournier V. (2014) Neonicotinoid-contaminated puddles of water represent a risk of intoxication for honey bees. *PLoS One*, 9(12), 1–17.
- 13 Campos F, Atkinson J, Arnason JT, Philogène BJR, Morand P, Werstiuk NH, et al. (1988) Toxicity and toxicokinetics of 6-methoxybenzoxazolinone (MBOA) in the european corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *J. Chem. Ecol.*, 14(3), 989–1002.
- 14 Koch H, Weißer P. (1997) Exposure of honey bees during pesticide application under field conditions. *Apidologie*, 28, 439–447.
- 15 Poquet Y, Kairo G, Tchamitchian S, Brunet JL, Belzunces LP. (2015) Wings as a new route of exposure to pesticides in the honey bee. *Environ. Toxicol. Chem.*, 34(9), 1983–1988.
- 16 Girolami V, Mazzon L, Squartini A, Mori N, Marzaro M, Di Bernardo A, et al. (2009) Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees. *J. Econ. Entomol.*, 102(5), 1808–1815.
- 17 Reetz JE, Zühlke S, Spiteller M, Wallner K. (2011) Neonicotinoid insecticides translocated in guttated droplets of seed-treated maize and wheat: A threat to honeybees? *Apidologie*, 42(5), 596–606.
- 18 Bonmatin JM, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C, et al. (2015) Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 22(1), 35–67.
- 19 Botías C, David A, Horwood J, Abdul-Sada A, Nicholls E, Hill E, et al. (2015) Neonicotinoid residues in wildflowers, a potential route of chronic exposure for bees. *Environ. Sci. Technol.*, 49(21), 12731–12740.
- 20 Rolke D, Persigehl M, Peters B, Sterk G, Blenau W. (2016) Large-scale monitoring of effects of clothianidin-dressed oilseed rape seeds on pollinating insects in northern Germany: residues of clothianidin in pollen, nectar and honey. *Ecotoxicology*, 25(9), 1691–1701.
- 21 Alkassab AT, Kirchner WH. (2017) Sublethal exposure to neonicotinoids and related side effects on insect pollinators: honeybees, bumblebees, and solitary bees. *J. Plant Dis. Prot.* 124(1), 1-30.

- 22 Bogdanov S. (2006) Contaminants of bee products. *Apidologie*, 37, 1–18.
- 23 Johnson RM, Ellis MD, Mullin CA., Frazier M. (2010) Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie*, 41, 312–331.
- 24 Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, vanEngelsdorp D, et al. (2010) High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS One*, 5(3), e9754.
- 25 Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL. (2015) Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347(6229), 1255957-1255957–9.
- 26 vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, et al. (2009) Colony collapse disorder: A descriptive study. *PLoS One*, 4(8).
- 27 Genersch E, von der Ohe W, Kaatz H, Schroeder A, Otten C, Böhler R, et al. (2010) The German bee monitoring project: A long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*, 41(3), 332–352.
- 28 Matzke A, Bogdanov S. (2003) Bienenprodukte und Apitherapie. Der Schweizerische Bienenvater. Verein deutschschweizerischer und rätoromanischer Bienenfreunde, Fachschriftenverlag VDRB.
- 29 Teeters BS, Johnson RM, Ellis MD, Siegfried BD. (2012) Using video-tracking to assess sublethal effects of pesticides on honey bees (*Apis mellifera* L.). *Environ. Toxicol. Chem.*, 31(6), 1349–1354.
- 30 Beliën T, Kellers J, Heylen K, Keulemans W, Billen J, Arckens L, et al. (2009) Effects of sublethal doses of crop protection agents on honey bee (*Apis mellifera*) global colony vitality and its potential link with aberrant foraging activity. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.*, 74(1), 245–53.
- 31 Dai PL, Wang Q, Sun JH, Liu F, Wang X, Wu YY, et al. (2010) Effects of sublethal concentrations of bifenthrin and deltamethrin on fecundity, growth, and development of the honeybee *Apis mellifera ligustica*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 29(3), 644–649.
- 32 Dively GP, Embrey MS, Kamel A, Hawthorne DJ, Pettis JS. (2015) Assessment of chronic sublethal effects of imidacloprid on honey bee colony health. *PLoS One*, 10(3), 1–25.

- 33 De Smet L, Hatjina F, Ioannidis P, Hamamtzoglou A, Schoonvaere K, Francis F, et al. (2017) Stress indicator gene expression profiles, colony dynamics and tissue development of honey bees exposed to sub-lethal doses of imidacloprid in laboratory and field experiments. *PLoS One*, 12(2), 1–18.
- 34 Decourtye A, Devillers J, Genecque E, Le Menach K, Budzinski H, Cluzeau S, et al. (2005) Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 48, 242–250.
- 35 Wu-Smart J, Spivak M. (2016) Sub-lethal effects of dietary neonicotinoid insecticide exposure on honey bee queen fecundity and colony development. *Sci. Rep.*, 6(1), 32108.
- 36 Wu JY, Anelli CM, Sheppard WS. (2011) Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PLoS One*, 6(2).
- 37 Pillings ED, Bromley-Challenor KAC, Walker CH, Jepson PC. (1995) Mechanism of synergism between the pyrethroid insecticide and the imidazole fungicide prochloraz in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pestic. Biochem*, 51, 1–11.
- 38 Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, Roe RM. (2004) Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Prot.*, 23(5), 371–378.
- 39 Thompson HM, Fryday SL, Harkin S, Milner S. (2014) Potential impacts of synergism in honeybees (*Apis mellifera*) of exposure to neonicotinoids and sprayed fungicides in crops. *Apidologie*, 45(5), 545–553.
- 40 Gill RJ, Ramos-Rodriguez O, Raine NE. (2012) Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature*, 490(7422), 105–108.
- 41 Dechaume Moncharmont F-X, Decourtye A, Hennequet-Hantier C, Pons O, Pham-Delègue M-H. (2003) Statistical analysis of honeybee survival after chronic exposure to insecticides. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22(12), 3088–3094.
- 42 Human H, Archer CR, du Rand EE, Pirk CWW, Nicolson SW. (2014) Resistance of developing honeybee larvae during chronic exposure to dietary nicotine. *J. Insect Physiol.*, 69, 74–79.

- 43 Babendreier D, Kalberer N, Romeis J, Fluri P, Bigler F. (2004) Pollen consumption in honey bee larvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plants. *Apidologie*, 35, 293–300.
- 44 Crailsheim K, Schneider LHW, Hrassnigg N, Bühlmann G, Brosch U, Gmeinbauer R, et al. (1992) Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): Dependence on individual age and function. *J. Insect Physiol.*, 38(6), 409–419.
- 45 Knecht D, Kaatz HH. (1990) Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees. *Apidologie*, 21(5), 457–468.
- 46 Haydak MH. (1970) Honey bee nutrition. *Annu. Rev. Entomol.*, 15, 143–156.
- 47 Haydak MH. (1959) Changes with Age in Weight and Nitrogen Content of Honeybees. *Bee World*, 40(9), 225–229.
- 48 Crailsheim K. (1992) The flow of jelly within a honeybee colony. *J. Comp. Physiol. B*, 162, 681–689.
- 49 Jung-Hoffmann I. (1966) Die Determination von Königin und Arbeiterin der Honigbiene. *Zeitung für Bienenforsch.*, 8, 296–322.
- 50 Statistisches Bundesamt (2016) Statistisches Jahrbuch 2016, 19 Land- und Forstwirtschaft. abgerufen August 1, 2017, von <https://www.destatis.de/DE/Publikationen/StatistischesJahrbuch/StatistischesJahrbuch.html>
- 51 Bundesinstitut für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz (2017) Inlandsabsatz und Export von Pflanzenschutzmitteln. abgerufen August 1, 2017, von http://www.bvl.bund.de/DE/04_Pflanzenschutzmittel/01_Aufgaben/02_Zulassung-PSM/03_PSMInlandsabsatzExport/psm_PSMInlandsabsatzExport_node.html
- 52 Popp J, Peto K, Nagy J. (2013) Pesticide productivity and food security. A review. *Agron. Sustain. Dev.*, 33(1), 243–255.
- 53 Food and Agriculture Organization of the United Nations FAOSTAT. (2017) Pesticide Use. abgerufen August 1, 2017, von <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>
- 54 Statista, the statistics portal. (2017) Genetically Modified Crops - Statistics & Facts. abgerufen August 1, 2017, von <https://www.statista.com/topics/2062/genetically-modified-crops>

- 55 Klümper W, Qaim M. (2014) A meta-analysis of the impacts of genetically modified crops. *PLoS One*, 9(11).
- 56 Brühl CA, Alscher A, Hahn M, Berger G, Bethwell C, Graef F, Schmidt T. (2015) Protection of biodiversity in the risk assessment and risk management of pesticides (Plant Protection Products & Biocides) with a focus on arthropods, soil organisms and amphibians. Umweltbundesamt Texte 76/2015. abgerufen August 3, 2017, von <http://www.umweltbundesamt.de/publikationen/protection-of-biodiversity-in-the-risk-assessment>
- 57 Jahn T, Hötker H, Oppermann R, Bleil R. (2014) Protection of biodiversity of free living birds and mammals in respect of the effects of pesticides. Umweltbundesamt Texte 30/2014. abgerufen August 3, 2017, von <http://www.umweltbundesamt.de/publikationen/protection-of-biodiversity-of-free-living-birds>
- 58 Klein A-M, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, et al. (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. Biol. Sci.*, 274(1608), 303–13.
- 59 Johnson RM. (2015) Honey Bee Toxicology. *Annu. Rev. Entomol.*, 60(1), 415–434.
- 60 Celli G, Maccagnani B. (2003) Honey bees as bioindicators of environmental pollution. *Bull Insectol*, 56, 137–139.
- 61 Smodis Skerl MI, Velikonja Bolta S, Basa Cesnik H, Gregorc A. (2009) Residues of pesticides in honeybee (*Apis mellifera carnica*) bee bread and in pollen loads from treated apple orchards. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 83(3), 374–7.
- 62 Orantes-Bermejo FJ, Pajuelo AG, Megías MM, Fernández-Piñar CT. (2010) Pesticide residues in beeswax and beebread samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in Spain. Possible implications for bee losses. *J. Apic. Res.*, 48(1), 243–250.
- 63 Porrini C, Mutinelli F, Bortolotti L, Granato A, Laurenson L, Roberts K, et al. (2016) The status of honey bee health in Italy: Results from the nationwide bee monitoring network. *PLoS One*, 11(5), 1–22.
- 64 Traynor KS, Pettis JS, Tarpy DR, Mullin CA, Frazier JL, Frazier M, et al. (2016) In-hive pesticide exposome: Assessing risks to migratory honey bees from in-hive pesticide contamination in the Eastern United States. *Nat. Sci. Reports*, 6(33207), 1–16.

- 65 Vázquez A, Olofsson TC. (2009) The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *J. Apic. Res.*, 48(3), 189–195.
- 66 Herbert EW, Shimanuki H. (1978) chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. *Apidologie*, 9(1), 33–40.
- 67 Johnson RM, Percel EG. (2013) Effect of a fungicide and spray adjuvant on queen-rearing success in honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.*, 106(5), 1952–1957.
- 68 Chauzat M-P, Carpentier P, Martel A-C, Bougeard S, Cougoule N, Porta P, et al. (2009) Influence of pesticide residues on honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony health in France. *Environ. Entomol.*, 38(3), 514–23.
- 69 Chauzat M-P, Faucon J-P, Martel A-C, Lachaize J, Cougoule N, Aubert M. (2006) A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *J. Econ. Entomol.*, 99(2), 253–262.
- 70 Stoner KA, Eitzer BD. (2013) Using a hazard quotient to evaluate pesticide residues detected in pollen trapped from honey bees (*Apis mellifera*) in Connecticut. *PLoS One*, 8(10), 1–10.
- 71 Lambert O, Piroux M, Puyo S, Thorin C, L’Hostis M, Wiest L, et al. (2013) Widespread occurrence of chemical residues in beehive matrices from apiaries located in different landscapes of Western France. *PLoS One*, 8(6), 1–12.
- 72 Pettis JS, Lichtenberg EM, Andree M, Stitzinger J, Rose R. (2013) Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *PLoS One*, 8(7), 1–9.
- 73 Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. (2017) Bee protection in the authorization procedure for plant protection products. abgerufen Mai 19, 2017, von https://www.bvl.bund.de/EN/04_PlantProtectionProducts/03_Applicants/04_AuthorisationProcedure/08_Environment/ppp_bee_protection_node.html#doc8564726bodyText3
- 74 Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. (2017) Verzeichnis zugelassener Pflanzenschutzmittel. abgerufen April 26, 2017, von <https://apps2.bvl.bund.de/psm/jsp/index.jsp>

- 75 Rosenkranz P, Wallner K. (2009) The chronology of honey bee losses in the Rhine Valley during spring 2008: an example of worst case scenario. In: Proceedings of the Third European Conference of Apidology, Dublin, Ireland. pp.94–95.
- 76 Pistorius J, Bischoff G, Heimbach U, Stähler M. (2010) Bee poisoning incidents in Germany in spring 2008 caused by abrasion of active substance from treated seeds during sowing of maize. *Julius Kühn-Archiv*, 118–126.
- 77 Fischer J, Müller T, Spatz AK, Greggers U, Grünewald B, Menzel R. (2014) Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. *PLoS One*, 9(3), 1–10.
- 78 Andrione M, Vallortigara G, Antolini R, Haase A. (2016) Neonicotinoid-induced impairment of odour coding in the honeybee. *Sci. Rep.*, 6(1), 38110.
- 79 Urlacher E, Monchanin C, Rivière C, Richard FJ, Lombardi C, Michelsen-Heath S, et al. (2016) Measurements of chlorpyrifos levels in forager bees and comparison with levels that disrupt honey bee odor-mediated under laboratory conditions. *J. Chem. Ecol.*, 42(2), 127–138.
- 80 Tosi S, Burgio G, Nieh JC. (2017) A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, impairs honey bee flight ability. *Sci. Rep.*, 7(1), 1201.
- 81 Forfert N, Moritz RFA. (2017) Thiacloprid alters social interactions among honey bee workers (*Apis mellifera*). *J. Apic. Res.*, 56(4), 467–474.
- 82 Medrzycki P, Montanari R, Bortolotti L, Sabatini AG, Maini S, Porrini C. (2003) Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bee behaviour. Laboratory tests. *Bull. Insectology*, 56(1), 59–62.
- 83 Wu MC, Chang YW, Lu KH, Yang EC. (2017) Gene expression changes in honey bees induced by sublethal imidacloprid exposure during the larval stage. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 88, 12–20.
- 84 Williamson SM, Moffat C, Gomersall MAE, Saranzewa N, Connolly CN, Wright GA. (2013) Exposure to acetylcholinesterase inhibitors alters the physiology and motor function of honeybees. *Front. Physiol.*, 4, article 13, 1–10.
- 85 Brandt A, Gorenflo A, Siede R, Meixner M, Büchler R. (2016) The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.*, 86, 40–47.

- 86 Chaimanee V, Evans J, Chen Y, Jackson C, Pettis J. (2016) Sperm viability and gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) following exposure to the neonicotinoid insecticide imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos. *J Insect Physiol*, 89, 1–8.
- 87 Bryden J, Gill RJ, Mitton RAA, Raine NE, Jansen VAA. (2013) Chronic sublethal stress causes bee colony failure. *Ecol. Lett.*, 16(12), 1463–1469.
- 88 Simpson J. (1955) The significance of the presence of pollen in the food of worker larvae of the honey-bee. *Q. J. Microsc. Sci.*, 96(1), 117–120.
- 89 Shuel RW, Dixon SE. (1959) Studies in the mode of action of royal jelly in honeybee development II. Respiration of newly emerged larvae on various substrates. *Can. J. Zool.*, 37, 803–813.
- 90 Brouwers EVM, Ebert R, Beetsma J. (1987) Behavioral and physiological aspects of nurse bees in relation to the composition of larval food during caste differentiation in the honeybee. *J. Apic. Res.*, 26, 11–23.
- 91 Wang Y, Ma L, Zhang W, Cui X, Wang H, Xu B. (2016) Comparison of the nutrient composition of royal jelly and worker jelly of honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 47(1), 48–56.
- 92 Soehngen U, Jay SC. (1974) Studies on the Honey-Sac Contents and Pollen Loads of Honeybees 2. Honey-Sac Contents of Foraging Bees. *J. Apic. Res.*, 13(3), 199–206.
- 93 Soehngen U, Jay SC. (1973) Studies on the honey-sac contents and pollen loads of honeybees 1. Honey-sac contents of bees in the hive. *J. Apic. Res.*, 12(2), 65–73.
- 94 Davis AR, Shuel RW. (1988) Distribution of ¹⁴C-labelled carbofuran and dimethoate in royal jelly, queen larvae and nurse honeybees. *Apidologie*, 1, 37–50.
- 95 Dietz A, Lambremont EN. (1970) Caste determination in honey bees. II. Food consumption of individual honey bee larvae, determined with P-labeled royal jelly. 63(5), 1342–1345.
- 96 Lindauer M. (1952) Ein Beitrag zur Frage der Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Z. Vgl. Physiol.*, 34, 299–345.
- 97 Page Jr RE, Peng CY-S. (2001) Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Exp. Gerontol.*, 36(36), 695–711.

- 98 Crailsheim K. (1998) Trophallactic interactions in the adult honeybee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 29(1–2), 97–112.
- 99 Crailsheim K. (1991) Interadult feeding of jelly in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *J. Comp. Physiol. B*, 161(1), 55–60.
- 100 Remolina SC, Hughes KA. (2008) Evolution and mechanisms of long life and high fertility in queen honey bees. *Age*, 30(2–3), 177–185.
- 101 Roberts WC, Taber S. (1965) Egg-weight variance in honey bees. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, 58, 303–306.
- 102 Akyol E, Yeninar H, Kaftanoglu O, Ag A. (2008) Live weight of queen honey bees (*Apis mellifera* L.) predicts reproductive characteristics. *J Kansas Entomol Soc*, 81(2), 92–100.
- 103 Straub L, Williams GR, Pettis J, Fries I, Neumann P. (2015) Superorganism resilience: Eusociality and susceptibility of ecosystem service providing insects to stressors. *Curr. Opin. Insect Sci.*, 12, 109–112.
- 104 Tscharrntke T, Klein AM, Kruess A, Steffan-Dewenter I, Thies C. (2005) Landscape perspectives on agricultural intensification and biodiversity - ecosystem service management. *Ecol. Lett.*, 8(8), 857–874.
- 105 Thorp RW. (2000) The collection of pollen by bees. *Plant Syst. Evol.*, 222(1–4), 211–223.

Danksagungen

Besonderen Dank an Prof. Dr. Dr. Claus P.W. Zebitz für die engagierte Betreuung und Geduld bei der Auswertung und der Korrektur der Arbeit und dass er mit mir sein lang-jähriges Fachwissen und seine Lebenserfahrung geteilt hat.

PD Dr. Peter Rosenkranz danke ich für die Vergabe und die Betreuung dieser Doktorarbeit und seine wertvollen Hinweise, beim Schreiben der Manuskripte.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Klaus Wallner, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, der stets mit Rat und Tat zur Seite stand und immer einen Weg aus schwierigen Situationen wusste.

Vielen Dank an Dr. Gabriela Bischoff und ihr Team vom Julius Kühn-Institut in Berlin für die aufwändigen und hochwertigen Rückstandsanalysen, und dass sie nie müde wurde mir die Analysedetails verständlich und geduldig zu erklären.

Darüber hinaus danke ich R. Erker, H. Rosen und H. Guth, die von 2012-2016 unermüdlich täglich von ihren Honigbienenstöcken die Pollen gesammelt haben und meinwegem immer volle Kühltruhen hatten. Ebenso danke ich A. Guth, der sich immer Zeit für mich genommen hat.

Vielen lieben Dank an Dr. E. Frey, die die letzten Jahre nicht nur eine super Kollegin, sondern auch eine gute Freundin war, die mit ihrer liebevollen und hilfsbereiten Art zu jeder Zeit eine verlässliche Ansprechpartnerin war und in schwierigen Situationen half eine Lösung zu finden.

Den verschiedenen Zimmergenossen möchte ich für eine tolle Zeit danken, besonders L. Kretschmer, die es schafft, mich immer wieder aufzurichten und zu ermuntern.

Ich danke B. Gieler und S. Keller für die tolle Zeit die wir hatten, als wir in mühevoller Kleinarbeit Böden, Deckel und Wabentaschen für die Mini-Plus Völker gebaut haben.

R. Buck, D. Pfauth, Dr. E. Frey, B. Gieler und K. Wallner danke ich, weil sie mir bei imkerlichen Tätigkeiten geholfen haben und somit sicherstellten, dass meine Versuchsvölker stark und gesund waren und dadurch meine Ergebnisse stichhaltig sind.

Ich danke allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Landesanstalt, die mir die Zeit in der Anstalt versüßten. Allen voran B. Fritz, die jede noch so komplizierte Rechnung auf einen Dreisatz herunterbrechen konnte und durch ihre Freundlichkeit, Warmherzigkeit und ihren gesunden Menschenverstand eine super Kollegin ist.

Herrn Dr. Dr. H. Horn danke ich für die zahlreichen Pollenanalysen und Dr. D. Martens für die Rückstandsanalysen an der LUFA Speyer.

Ein besonderer Dank an die Gesellschaft der Freunde der Landesanstalt die die Rückstandsanalysen finanziell unterstützt haben.

Ich danke den Mitarbeitern des MLR für die Bereitstellung der Hektarangaben der angebauten Kulturpflanzen an den drei Pollensammelstandorten und den Mitarbeitern der wissenschaftlichen Werkstätten der Universität für die Anfertigung von Spezialkonstruktionen.

F. Mäckle, meinem Freund und Partner, kann ich nicht genug danken für seine Geduld, seine Unterstützung und seinen unerschütterlichen Glauben in mich.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mir diese tolle Ausbildung überhaupt erst ermöglicht haben.

Eidesstattliche Versicherung

gemäß § 8 Absatz 2 der Promotionsordnung der Universität Hohenheim zum Dr.sc.agr.

1. Bei der eingereichten Dissertation zum Thema
„Pflanzenschutzmittelrückstände im gehöselten Pollen der Honigbiene (*Apis mellifera* L.) - Auswirkungen einer feldrealistischen Pflanzenschutzmittelmischung auf Stockbienen und den Larvenfuttersaft“

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.
2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.
3. Ich habe nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung oder -beratung in Anspruch genommen.
4. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und der strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich. Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Ort und Datum

Unterschrift

Belehrung

Die Universität Hohenheim verlangt eine Eidesstattliche Versicherung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistungen, um sich glaubhaft zu versichern, dass die Promovendin bzw. der Promovend die wissenschaftlichen Leistungen eigenständig erbracht hat.

Weil der Gesetzgeber der Eidesstattlichen Versicherung eine besondere Bedeutung beimisst und sie erhebliche Folgen haben kann, hat der Gesetzgeber die Abgabe einer falschen eidesstattlichen Versicherung unter Strafe gestellt. Bei vorsätzlicher (also wissentlicher) Abgabe einer falschen Erklärung droht eine Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder eine Geldstrafe.

Eine fahrlässige Abgabe (also Abgabe, obwohl Sie hätten erkennen müssen, dass die Erklärung nicht den Tatsachen entspricht) kann eine Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder eine Geldstrafe nach sich ziehen.

Die entsprechenden Strafvorschriften sind in § 156 StGB (falsche Versicherung an Eides Statt) und in § 161 StGB (Fahrlässiger Falscheid, fahrlässige falsche Versicherung an Eides Statt) wiedergegeben.

§ 156 StGB: Falsche Versicherung an Eides Statt

Wer vor einer zur Abnahme einer Versicherung an Eides Statt zuständigen Behörde eine solche Versicherung falsch abgibt oder unter Berufung auf eine solche Versicherung falsch aussagt, wird mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.

§ 161 StGB: Fahrlässiger Falscheid, fahrlässige falsche Versicherung an Eides Statt:

Abs. 1: Wenn eine der in den §§ 154 und 156 bezeichneten Handlungen aus Fahrlässigkeit begangen worden ist, so tritt Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe ein.

Abs. 2: Strafflosigkeit tritt ein, wenn der Täter die falsche Angabe rechtzeitig berichtigt. Die Vorschriften des § 158 Absätze 2 und 3 gelten entsprechend.

Ich habe die Belehrung zur Eidesstattlichen Versicherung zur Kenntnis genommen.

Ort und Datum

Unterschrift

