



Schlussbericht zum Forschungsauftrag:

„Aufklärung der Wirkung des Gehaltes an
Hydroxymethylfurfural (HMF) in Futtermitteln für Bienen
hinsichtlich der Tiergesundheit und des Carry overs von HMF
in Honig“

Auftragnehmer: LAVES Institut für Bienenkunde Celle

Auftraggeber: Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung für das
Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

Projektnummer: 314-06.01-2815HS002

Laufzeit: 28.09.2015 – 31.10.2016

Autoren: Dorothee J. Lüken, Dr. Werner von der Ohe

Hintergrund

Obwohl bestimmte Zucker und insbesondere der Gehalt an Hydroxymethylfurfural (HMF) von Bienenwinterfutter nachteilig für das Überleben von Winterbienen sein können, gibt es derzeit keine ausreichenden gesetzlichen Regelungen zu Bienenwinterfutter. Erwärmung und / oder Säureeinwirkung lassen in Zuckerlösungen HMF entstehen, ebenso kann HMF auch bei unsachgemäßer Lagerung von Honig wie auch Bienenwinterfutter entstehen. Aufgrund von nachgewiesenen Bienenverlusten durch Winterfutter mit zu hohen HMF-Gehalten setzt sich das LAVES Institut für Bienenkunde Celle seit Jahren bezüglich der Regelung von Bienenwinterfutter ein und gibt die Empfehlung heraus, dass der HMF-Gehalt in Winterfutter bei Auslieferung 40 mg / kg HMF (Produktspezifikation) möglichst nicht überschreiten sollte. Seit dem Jahr 2014 nimmt sich das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) des Themas an. Inzwischen wurde ein Ringversuch zum Nachweis von HMF in Bienenwinterfutter durchgeführt. Mittels Fütterungsversuchen mit Winterbienen und frisch geschlüpften Bienen soll die Festlegung eines Grenzwertes für HMF in Bienenwinterfutter ermöglicht werden. Der Ablauf des Forschungsauftrages ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Ablauf des Forschungsauftrages 2015 / 2016

März 2016	•Vorversuch mit Winterbienen
April 2016	•Zwischenbericht
Juni 2016	•Sommerversuch mit frisch geschlüpften Bienen
August 2016	•Herbstversuch mit frisch geschlüpften Bienen
Oktober 2016	•Abschlussbericht

In der Vergangenheit wurde von unterschiedlichen Forschungsgruppen mit verschiedenen Versuchsansätzen die Wirkung von HMF auf adulte Bienen ermittelt. Die Methoden wie auch die Ergebnisse früherer Forschung sind in Tabelle 2 dargestellt. Aufgrund dieser Daten wurde das Versuchsdesign für den Vorversuch (Range finder) am LAVES Institut für Bienenkunde zusammengestellt. Die Daten von Benkert *et al* (2016) lagen zum Zeitpunkt der Ermittlung des Versuchsdesigns für den Vorversuch noch nicht vor. Die HMF-Konzentrationen für den Sommerversuch wurden aufgrund der Ergebnisse des Vorversuchs erhöht. Zusätzlich zu der Mortalität und dem Futterverbrauch wurde beim Sommer- sowie beim Herbstversuch die Evaporation aus den Futterspritzen ermittelt und die Futteraufnahme entsprechend der Evaporation korrigiert. Der Herbstversuch wurde gemäß dem Sommerversuch durchgeführt bis auf die Erhöhung der Temperatur des Klimaschranks.

Tabelle 2: Methoden und Ergebnisse zur Forschung mit der Wirkung von HMF auf Bienen

	Blum und Illies	Pflugfelder und Gallmann	Le Blanc <i>et al</i>	Jachimovic und El Sherbiny	Bailey	Benkert <i>et al</i>
N Tage	23	60	26	20	-	29
Temperatur (°C)	-	25	-	30	30	-
Jahreszeit	-	Oktober	-	Mai	-	-
Gruppengröße (Anzahl Bienen / Käfig)	20	10	100	100	30	20
Konzentration in mg / kg	0, 5,72; 9,22; 13,0; 74,17	0 – 25.600	57, 100,150, 200, 250	0, 30, 150 (2x), 750	0, 200	0, 5, 20, 40, 150, 450
LC 50 (mg / kg)	74	-	250	150	200	Erhöhte Mortalität bei 450
NOEC (mg / kg)	-	200 nach 32 d, 800 nach 22 d	-	-	-	-
Alter Bienen	Frisch geschlüpft	-	Frisch geschlüpft	0 - 3 Tage	Von Waben gefegt	5 Tage
Futteraufnahme	-	-	60 mg / 3 Tage / Biene	-	-	-
Anstieg der Mortalität	Ca. 12 Tage	-	Bei 150 ppm nach 19 Tagen	150 ppm 16 d	13,5	Bei ca. 20d bei 450 mg / kg
LC 50 Kontrolle	Ca. 23 Tage	-	25	-	34,5	-
Eiweißfütterung	Pollen	Kein Pollen	Pollen	Sojamehl	-	Pollen
Bienenrasse	-	-	Italienerbiene	<i>A. m. carnica</i>	-	<i>Apis mellifera</i>

Material und Methoden

Vorversuch (Range Finder)

Aufgrund der späten Zusage zur Durchführung des Forschungsprojektes HMF wurde der erste Versuchsdurchlauf als Vorversuch vom 29.02.2016 (Tag 0) bis zum 04.04.2016 (Tag 35) durchgeführt. Das Bienenvolk Nr. 29 der Rasse *Apis mellifera carnica* Celler Linie war brutfrei, so dass ausschließlich Winterbienen zum Einsatz kamen. Winterbienen sind im realen Expositionsszenario diejenigen Bienen, die potentiell am längsten mit HMF im Winterfutter konfrontiert sein können. Getestet wurden eine unbehandelte Kontrolle und sechs HMF-Testkonzentrationen, siehe Tabelle 3.

Tabelle 3: Versuchsdesign des Vorversuchs (Range finder)

Prüfglieder		Bezeichnung	HMF-Testkonzentration (mg / kg)	Anzahl Käfige	Anzahl Bienen pro Käfig	Testkonzentration gemessen (mg / kg) D0	Testkonzentration gemessen (mg / kg) D25
Kontrolle	C	Ca - j	50 %-ige Zuckerlsg (w / w)	10	20	-	-
Test	T1	T1a - d	20	4	20	20,82	22,70
	T2	T2a - d	40	4	20	40,48	44,00
	T3	T3a - d	80	4	20	77,76	91,32
	T4	T4a - d	160	4	20	150,08	174,08
	T5	T5a - d	320	4	20	298,56	346,72
	T6	T6a - d	640	4	20	588,48	676,48

Die Bienen wurden am Vortag vom Teststart in mit Filterpapier ausgelegte Edelstahlkäfige gesetzt und mit einer 50 %igen Zuckerlösung (w / w) über eine Spritze ad libitum gefüttert. Die Käfige befanden sich während der gesamten Versuchslaufzeit in einem Klimaschrank mit konstanter Temperatur ($25,0\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$) und konstanter relativer Luftfeuchte ($60\text{ \% rel. LF} \pm 10\text{ \%}$). Bis auf die Dauer der Fütterung sowie der Verhaltensbonituren war der Innenraum des Klimaschranks dunkel.

Die Testsubstanz HMF (Reinheit $\geq 99\text{ \%}$, Sigma - Aldrich) wurde vor Versuchsbeginn in einer 50 %-igen Zuckerlösung (w / w) gelöst und die fertig hergestellten Testlösungen wurden während des Versuchsdurchlaufes bei konstanten 4 °C im Kühlraum gelagert. Von einem täglich neuen Ansatz der Testlösungen wurde abgesehen, da der Ringversuch vom VDLUFA (2015) sowie Honiglagerungsversuche des LAVES Instituts für Bienenkunde Celle einen relativ konstant bleibenden HMF-Gehalt bei einer kühlen Lagerung nachweisen konnten. Die Testlösungen wurden zur Überprüfung des HMF-Gehaltes am Tag 0 (D 0) und an Tag 25 (D 25) per HPLC-Analyse gemessen. Die an Tag 25 gemessenen Werte lagen etwas höher als die an Tag 0 gemessenen HMF-Werte, siehe Tabelle 3. Die Bienen wurden ab Teststart ad libitum mit der Kontroll- und den jeweiligen Testlösungen über Spritzen gefüttert ($24\text{ h} \pm 2\text{ h}$). Die Spritzen wurden bis Tag 25 täglich gewechselt. Die Spritzen wurden vor der Fütterung sowie wiederum nach Entnahme aus den Käfigen gewogen, um die tägliche Futteraufnahme zu bestimmen. Nach Tag 25 wurden die Fütterungsintervalle vergrößert, die Vorgehensweise bzgl. der Fütterung und dem Wiegen der Spritzen wurde beibehalten. Nach der täglichen Fütterung wurde die Anzahl toter Bienen pro Käfig erfasst und das Verhalten der Bienen

beurteilt. Über die Anzahl der toten Bienen wurde die prozentuale Mortalität ermittelt. Die toten Bienen wurden aus hygienischen Gründen aus den Käfigen entfernt.

Sommerversuch

Der Sommersversuch wurde aufgrund der Ergebnisse des Vorversuchs modifiziert, indem die Testkonzentrationen erhöht wurden und eine zusätzliche Testkonzentration getestet wurde, siehe Tabelle 4. Der Versuchsbeginn war am 01.06.2016 (D0) und das Testende am 01.07.2016 (D30). Die Fütterungs- und Boniturntervalle der Mortalität und des Verhaltens waren am Montag, Mittwoch und Freitag. Für den Sommersversuch wurden frisch geschlüpfte Bienen genutzt. Um frisch geschlüpfte Bienen mit einem definierten Alter zu erhalten, wurden aus den institutseigenen Bienenvölkern Nr. 41, Nr. 890 und Nr. 821 jeweils eine Brutwabe mit verdeckelter Brut sowie Pollen und Futter am 27.05.2016 entnommen und bei 34,5°C sowie 60%-iger relativer Luftfeuchte im Klimaschrank bebrütet. Die geschlüpften Bienen wurden am 31.05.2016 von den Brutwaben abgesammelt und in Stahlkäfige (Beschreibung siehe Vorversuch) mit ad libitum Fütterung gesetzt. Um die Vergleichbarkeit zwischen dem Vorversuch und dem Sommersversuch zu wahren, wurde die Temperatur des Klimaschranks während der Versuchsphase auf 25°C herabgesetzt. Die Herstellung und Lagerung der Testlösungen sowie die Fütterung und die Bonituren der Mortalität und des Verhaltens wurden gemäß der Beschreibung des Vorversuchs durchgeführt.

Tabelle 4: Versuchsdesign des Sommersversuchs

Prüfglieder		Bezeichnung	HMF-Testkonzentration (mg / kg)	Anzahl Käfige	Anzahl Bienen pro Käfig	Testkonzentration gemessen (mg / kg) D0	Testkonzentration gemessen (mg / kg) D30
Kontrolle	C	Ca - j	50 %-ige Zuckerlsg (w / w)	10	20	-	-
Test	T1	T1a - d	40	4	20	40,68	42,84
	T2	T2a - d	120	4	20	-	-
	T3	T3a - d	240	4	20	-	-
	T4	T4a - d	480	4	20	-	-
	T5	T5a - d	960	4	20	-	-
	T6	T6a - d	1920	4	20	-	-
	T7	T7a - d	3840	4	20	-	-

Zur Korrektur der Futtermittelsverbrauchsdaten wurden beim Sommersversuch in dem Fütterungsversuch der Bienen in den Käfigen sieben Käfige ohne Bienen mit gefüllten Futterspritzen bestückt. Futter kann durch Evaporation aber auch durch geringfügiges Tropfen aus den Futterspritzen entweichen.

Herbstversuch

Der Herbstversuch wurde vom 01.09.2016 (D0) bis zum 30.09.2016 (D30) durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse des Sommersversuchs wurde die Klimaschranktemperatur von 25°C auf 33°C erhöht. Ansonsten blieben die Gewinnung der Bienen sowie der Versuchsaufbau gemäß dem Sommersversuch, siehe Tabelle 5. Die frisch geschlüpften Bienen für den Herbstversuch wurden aus den Bienenvölkern Nr. 299, Nr. 792 und Nr. 504 gewonnen.

Tabelle 5: Versuchsdesign des Herbstversuchs

Prüfglieder		Bezeichnung	Testkonzentration (mg / kg)	Anzahl Käfige	Anzahl Bienen pro Käfig	Testkonzentration gemessen (mg / kg) D0	Testkonzentration gemessen (mg / kg) D30
Kontrolle	C	Ca - j	50 % ige Zuckerlsg (w / w)	10	20	-	-
Test	T1	T1a - d	40	4	20	40,88	40,78
	T2	T2a - d	120	4	20	-	-
	T3	T3a - d	240	4	20	-	-
	T4	T4a - d	480	4	20	-	-
	T5	T5a - d	960	4	20	-	-
	T6	T6a - d	1920	4	20	-	-
	T7	T7a - d	3840	4	20	-	-

Ergebnisse und Diskussion

Vorversuch (Range Finder)

Der Futtermittelsverbrauch lag im Durchschnitt über alle Testglieder bei 44,3 mg / Biene / Tag (min: 23,7 mg / Biene / Tag, max: 66,0 mg / Biene / Tag). Dies war geringfügig höher als in den Ringtestergebnissen (Kling *et al*, 2016), wo der Futtermittelsverbrauch bei 40,6 mg / Biene / Tag lag. Bei den verschiedenen Testkonzentrationen (T1 – T6) lag der durchschnittliche Futtermittelsverbrauch unter dem durchschnittlichen Futtermittelsverbrauch der Bienen in den

Kontrollkäfigen, bis auf T4, siehe Abbildung 1. Bei den Bienen von T4 konnte von Beginn des Vorversuches an ein verstärktes Abkoten beobachtet werden, was Einfluss auf den Futtermittelverbrauch haben könnte.

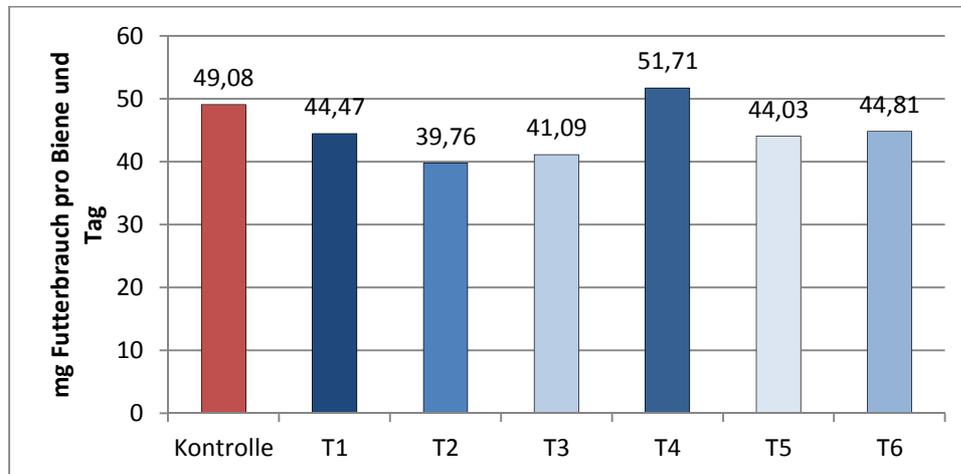


Abbildung 1: Täglicher Futtermittelverbrauch pro Biene in mg des Vorversuchs

Andererseits wäre auch ein Einfluss der Evaporation denkbar. An der Abbildung 2 ist ein leichter Trend zu höheren Werten beim Futtermittelverbrauch von D0 – D35 sichtbar. Dieser Trend könnte mit der ansteigenden Mortalität der Bienen in den Käfigen und der Evaporation aus den Futtermittelspritzen zusammenhängen.

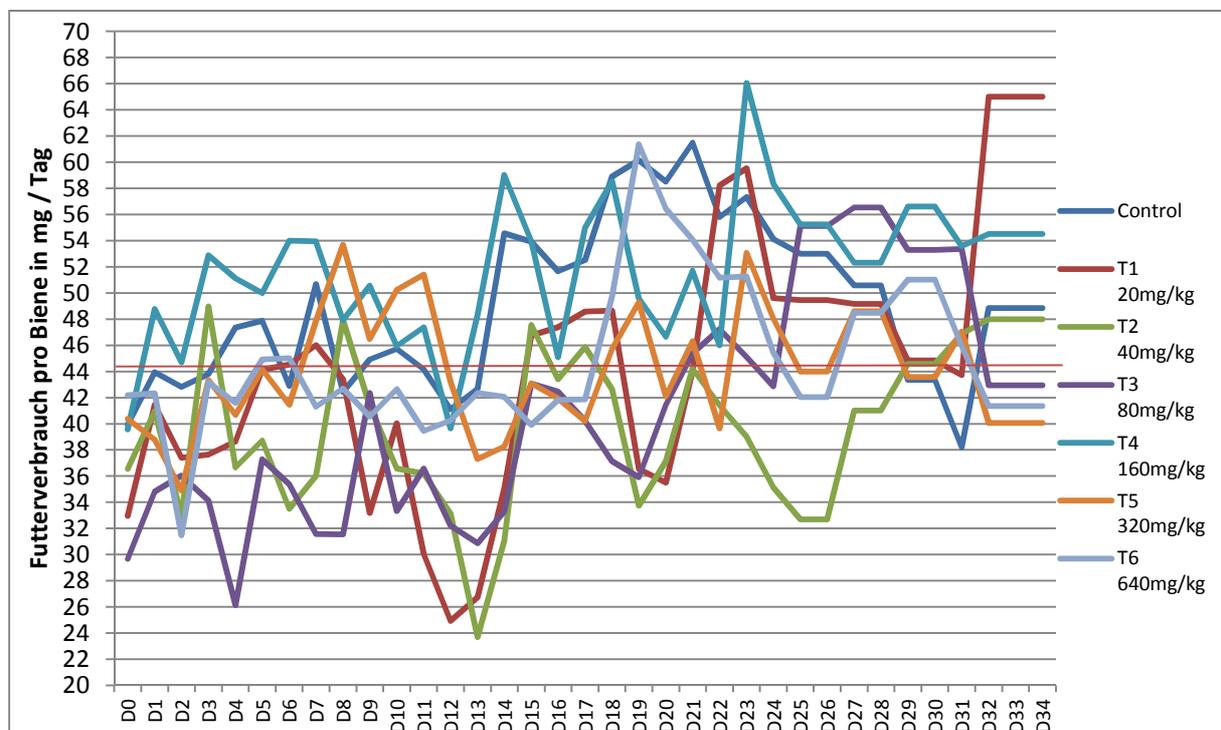


Abbildung 2: Futtermittelverbrauch von Tag 0 bis Tag 35 in mg pro Biene und Tag des Vorversuchs

Im Ringtest von Kling *et al.*, 2016 wurde ermittelt, dass im Verhältnis zur Anzahl der Bienen pro Käfig bei sinkender Anzahl Bienen der Einfluss der Evaporation steigt. Daher wurde bei den beiden folgenden Versuchsdurchläufen die verbrauchte Futtermenge um die Höhe der Evaporation korrigiert.

Die Kontrollmortalität war bis Tag 29 $\leq 15\%$. Die Grenze der Mortalität in der Kontrolle von $\leq 15\%$ nach 10 Tagen stellt das Validitätskriterium von chronischen Käfigversuchen (Kling *et al.*, 2016) dar. Dies zeigt, dass die Nutzung von Winterbienen auch über einen langen Zeitraum in der Laborsituation möglich ist, siehe Abbildung 3.

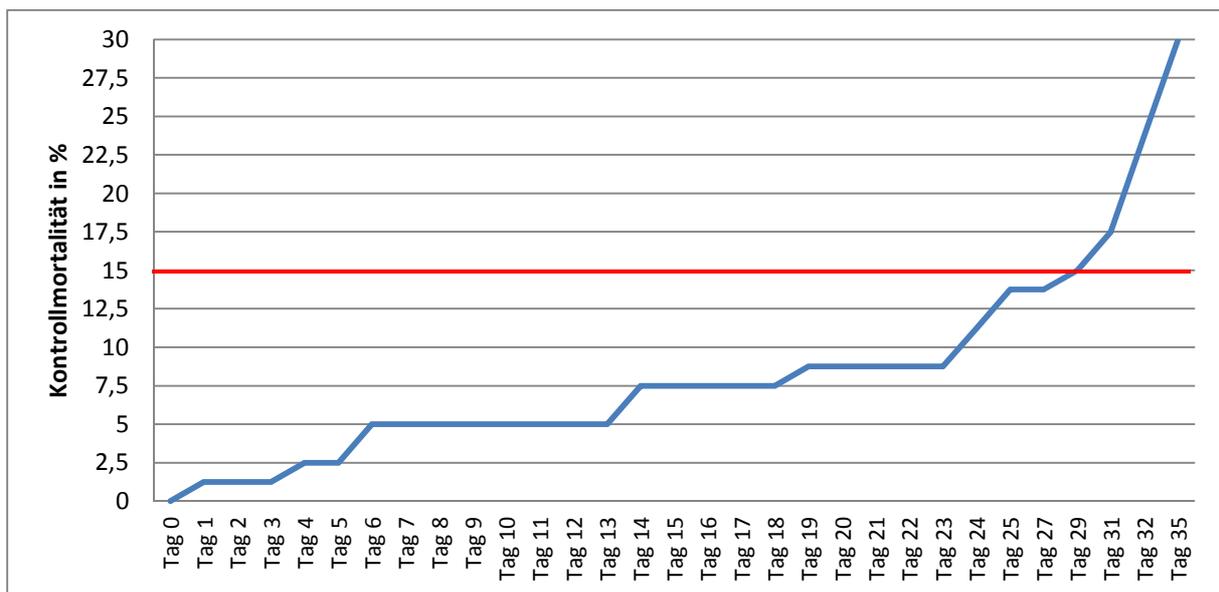


Abbildung 3: Kontrollmortalität in % des Vorversuchs

In der Abbildung 4 ist die kumulative Mortalität aller Testglieder dargestellt. Die Mortalität der Testgruppen T4 und T6 unterschieden sich signifikant zur Mortalität der Kontrolle (pairwise comparison, Chi² Fourfold table test, $\alpha = 0,05$; ToxRat Standard 2.10). In den Tabellen 6 und 7 sind die Testtage D29 und D35 dargestellt. Die Käfige der Testgruppe T4 waren bereits kurz nach Testbeginn stark verkotet. Der Zusammenhang zwischen einer Infektion mit *Nosema spec.* Sporen und dem Einfluss von HMF wird schon seit längerem diskutiert und wurde von Benkert *et al.* (2016) untersucht. Es konnte kein eindeutiger Zusammenhang festgestellt werden. Dennoch ist anzunehmen, dass der signifikante Unterschied der Mortalität zwischen T4 und der Kontrolle auf ein Zusammenspiel zwischen einem gesundheitlichen Defizit der Bienen, einer erhöhten Futteraufnahme und der Toxizität des HMFs zurückgeht. Die Mortalität der Versuchsgruppen T1, T2, T3 und T5 unterschieden sich nicht signifikant von der Mortalität der Kontrolle bis D35, obwohl ein stärkeres Verkoten der Käfige bei aufsteigender Testkonzentration im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden

Tabelle 6: Chi² Fourfold table test an D 29 (pairwise comparison, Chi² Fourfold table test, $\alpha = 0,05$; ToxRat Standard 2.10)

Chi² 2x2 Table

Chi²-2x2 Test (alpha is 0,05; one-sided greater): Pair-wise comparisons between treatment and control; The one-sided test is based on the standard normal variable z, which is a measure of the difference between treatment and control;; Ho (no effect) is accepted, if the probability $p(z) > \text{Alpha}$.

Treatm.[mg/kg]	Introduced	Survived	Dead	% Mortality	z	p(z)	sign.
Control	200	161	39	19,5			
20,000	80	68	12	15,0	0,881	0,811	-
40,000	80	69	11	13,8	1,135	0,872	-
80,000	80	69	11	13,8	1,135	0,872	-
160,000	80	53	27	33,8	2,538	0,006	+
320,000	80	65	15	18,8	0,144	0,557	-
640,000	80	51	29	36,3	2,953	0,002	+

+: significant; -: non-significant

Tabelle 7: Chi² Fourfold table test an D 35 (pairwise comparison, Chi² Fourfold table test, $\alpha = 0,05$; ToxRat Standard 2.10)

Chi² 2x2 Table

Chi²-2x2 Test (alpha is 0,05; one-sided greater): Pair-wise comparisons between treatment and control; The one-sided test is based on the standard normal variable z, which is a measure of the difference between treatment and control;; Ho (no effect) is accepted, if the probability $p(z) > \text{Alpha}$.

Treatm.[mg/kg]	Introduced	Survived	Dead	% Mortality	z	p(z)	sign.
Control	200	129	71	35,5			
20,000	80	56	24	30,0	0,878	0,810	-
40,000	80	64	16	20,0	2,532	0,994	-
80,000	80	63	17	21,3	2,320	0,990	-
160,000	80	43	37	46,3	1,669	0,048	+
320,000	80	55	25	31,3	0,677	0,751	-
640,000	80	43	37	46,3	1,669	0,048	+

+: significant; -: non-significant

Sommerversuch

Der tägliche durchschnittliche Verlust an Futtermenge in den Spritzen betrug 49,42 mg (min: 44,71 mg; max: 53,64 mg). Der bereits korrigierte durchschnittliche Futterverbrauch lag im Sommersversuch bei 15,55 mg / Biene / Tag (min: 6,90 mg / Biene / Tag; max: 29,61 mg / Biene / Tag), siehe Abbildung 5.

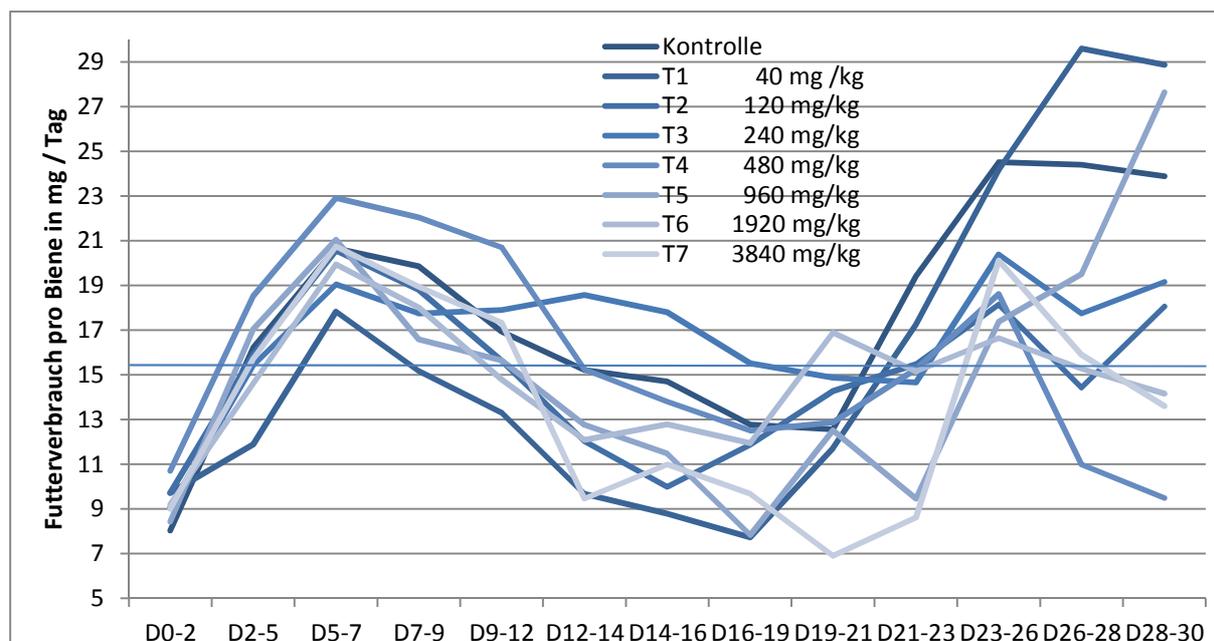


Abbildung 5: Futterverbrauch von Tag 0 bis Tag 30 in mg pro Biene und Tag des Sommersversuchs

Der Sommersversuch unterschied sich zum Vorversuch durch eine geringere Futteraufnahmemenge pro Biene und Tag. Die Futteraufnahmemenge im Vorversuch betrug 44,3 mg / Biene / Tag (min: 23,7 mg / Biene / Tag, max: 66,0 mg / Biene / Tag). Die Futteraufnahmemengen wurden beim Sommersversuch um die Menge der Evaporation korrigiert. Die nicht korrigierte Futterverbrauchsmenge der Kontrollbienen beim Sommersversuch lag bei 20,25 mg / Biene / Tag (min: 10,66 mg / Biene / Tag; max: 27,40 mg / Biene / Tag).

Die Mortalität der Bienen des Sommersversuchs war nicht entsprechend der Testkonzentrationen verteilt, siehe Abbildung 6. Die Bienen der Testkonzentration T5 hatten an D 30 mit 1,25 % die geringste Mortalität aller Versuchsglieder. Die Kontrollbienen hatten an D 30 die höchste Mortalität mit 17,00 %. Somit lag die Kontrollmortalität etwas über dem Validitätskriterium der chronischen 10 - Tage Käfigversuche (Kling *et al*, 2016). Die ungleiche Verteilung der Mortalität könnte mit der geringen Futteraufnahme und somit eingeschränkter Exposition der Bienen mit HMF zusammenhängen.

Verhaltensauffälligkeiten, die im Zusammenhang mit der Testsubstanz stehen könnten, wurden nicht festgestellt werden. Jedoch wurde beobachtet, dass die Bienen in den Käfigen fast regungslos wie in einer Art kleiner Wintertraube saßen. Mutmaßlich war die Klimaschranktemperatur von 25°C zu niedrig für das physiologische Optimum der frisch geschlüpften Bienen und wurde daher für den Herbstversuch auf 33°C erhöht.

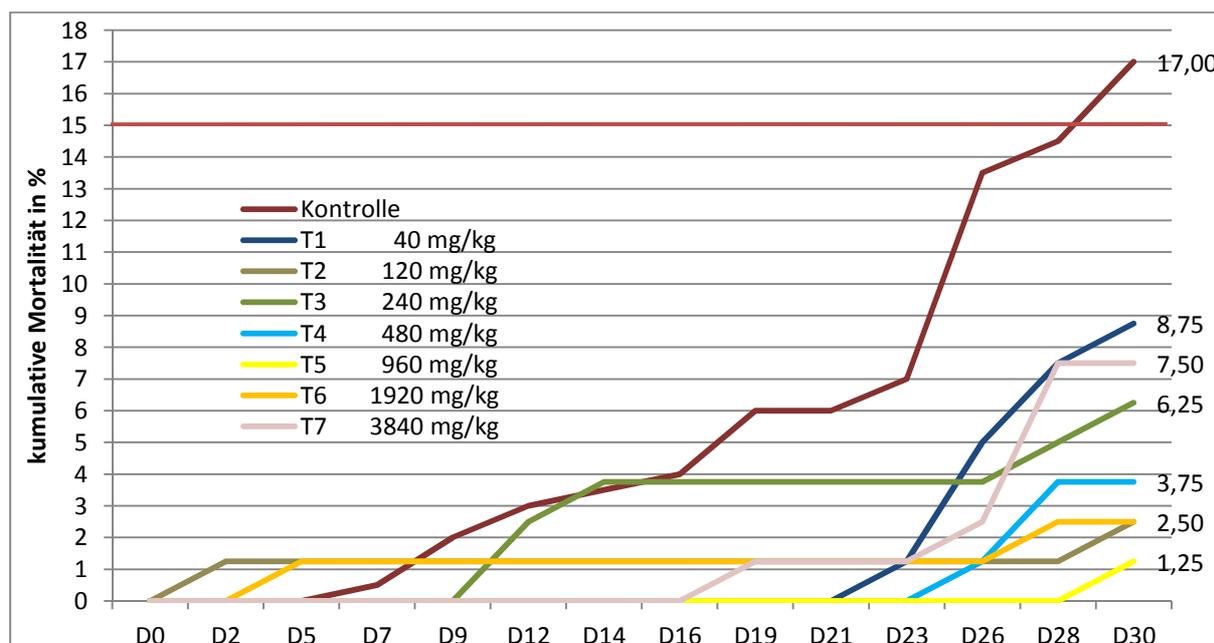


Abbildung 6: Kumulative Mortalität aller Testglieder in % des Sommersversuchs

Herbstversuch

Der Herbstversuch wurde entsprechend dem Sommersversuch durchgeführt. Die einzige Änderung war die Erhöhung der Temperatur des Klimaschranks von 25°C auf 33°C.

Die gemessene Evaporation von Futterlösung aus den Futterspritzen heraus betrug im Herbstversuch durchschnittlich 78,85 mg / Tag (min: 70,86 mg / Tag; max: 89,07 mg / Tag). Die Evaporation im Sommersversuch betrug 49,42 mg / Tag (min: 44,71 mg / Tag; max: 53,64 mg / Tag), war demnach ca. 1,6-mal geringer als im Herbstversuch. Die Evaporation steigt scheinbar mit der Temperatur im Klimaschrank an. Bei Nichtbeachten wäre der Futtermittelverbrauch in der Herbststudie um den durchschnittlichen Futtermittelverbrauch von 3-4 Bienen pro Käfig täglich verfälscht worden.

Die um die Evaporation korrigierte durchschnittliche Futteraufnahme aller Testglieder betrug 22,59 mg / Biene / Tag (min: 11,03 mg / Biene / Tag; max: 32,73 mg / Biene / Tag), siehe Abbildung 7.

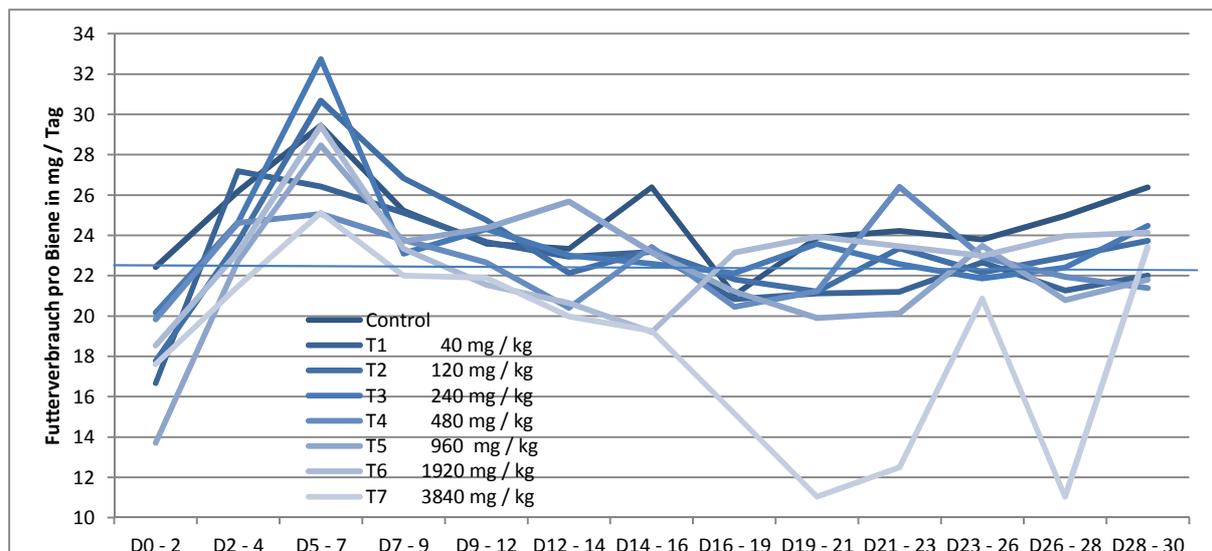


Abbildung 7: Futterverbrauch von Tag 0 bis Tag 30 in mg pro Biene und Tag des Herbstversuchs

Der Futterverbrauch der einzelnen Testglieder ist aus der Abbildung 8 zu entnehmen. Dargestellt wurden jeweils der durchschnittliche, der minimale sowie der maximale Futterverbrauch. Die schwarze Linie beschreibt den durchschnittlichen Futterverbrauch aller Testglieder von 22,59 mg / Biene / Tag. Der durchschnittliche Futterverbrauch der Testglieder C, T1, T2, T3, T4 und T6 lag oberhalb des durchschnittlichen Futterverbrauchs aller Testglieder, T5 lag knapp darunter. Der durchschnittliche Futterverbrauch des Testglieds T7 lag etwas stärker unterhalb der durchschnittlichen Futteraufnahmemenge.

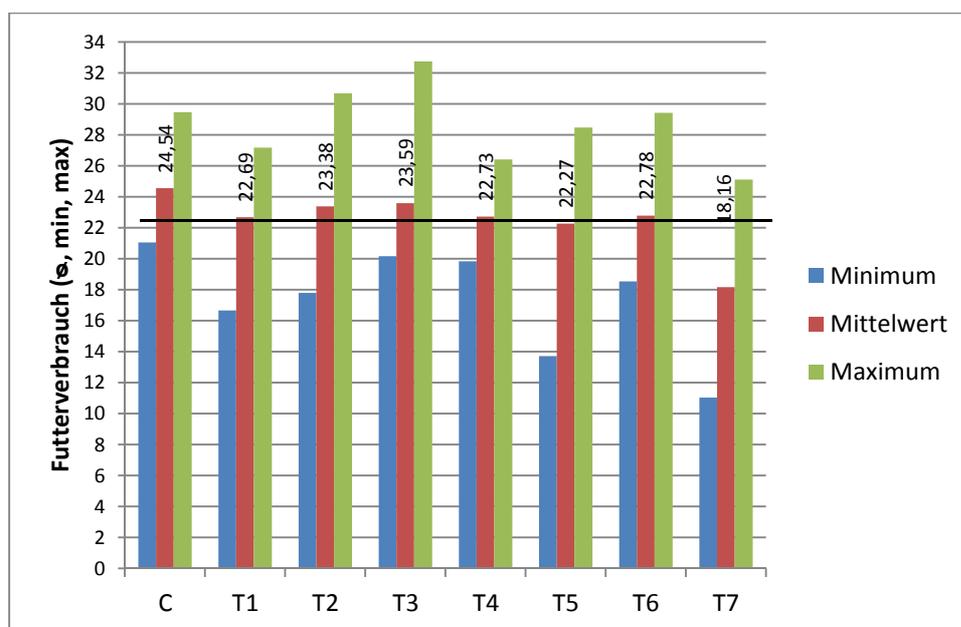


Abbildung 8: Korrigierter Futterverbrauch (s, min, max) in mg pro Biene und Tag der einzelnen Testglieder des Herbstversuchs

Die Mortalität der Bienen aller Testglieder ist in der Abbildung 9 dargestellt. Die geringste Mortalität hatte T1 (40 mg / kg) mit 13,75 %, gefolgt von C (unbehandelte Kontrolle) mit 18,50 %, T3 (240 mg / kg) mit 18,75 % und T2 (120 mg / kg) mit 21,25 %. Ab der Testkonzentration T4 (480 mg / kg) mit 27,50 % Mortalität waren die Unterschiede der Testkonzentrationen signifikant zur Kontrolle (pairwise comparison, Chi² Fourfold table test, $\alpha = 0,05$; ToxRat Standard 2.10, siehe Tabelle 8). Die Testkonzentration T5 (960 mg / kg) löste eine Mortalität von 45,00 % aus, T6 (1920 mg / kg) von 77,50 % und T7 (3840 mg / kg) von 97,50 %. Der NOEC lag bei 240 mg / kg. Der berechnete EC₁₀ lag bei 440,25 mg / kg, EC₂₀ bei 693,14 mg / kg und EC₅₀ bei 1375,81 mg / kg (Weibull Analyse, p(Chi²): 0,2708; p(F): 0,0000), siehe Tabelle 9 und Abbildung 10.

Die Mortalität der Kontrolle lag über 15 %, dem Validitätskriterium der 10-Tage chronischen Adultstudien im Labor. Aufgrund der verlängerten Testdauer bis 30 Tage des Herbstversuches wird eine Überschreitung von 3,50 % als nicht kritisch für die Aussage und Teststärke des gewählten Systems gewertet.

Verhaltensauffälligkeiten waren insbesondere in den Testgliedern T6 und T7 zu verzeichnen. Die Auffälligkeiten waren insbesondere Koordinationsschwierigkeiten in den Bewegungsabläufen der Bienen bis hin zur völligen Bewegungslosigkeit.

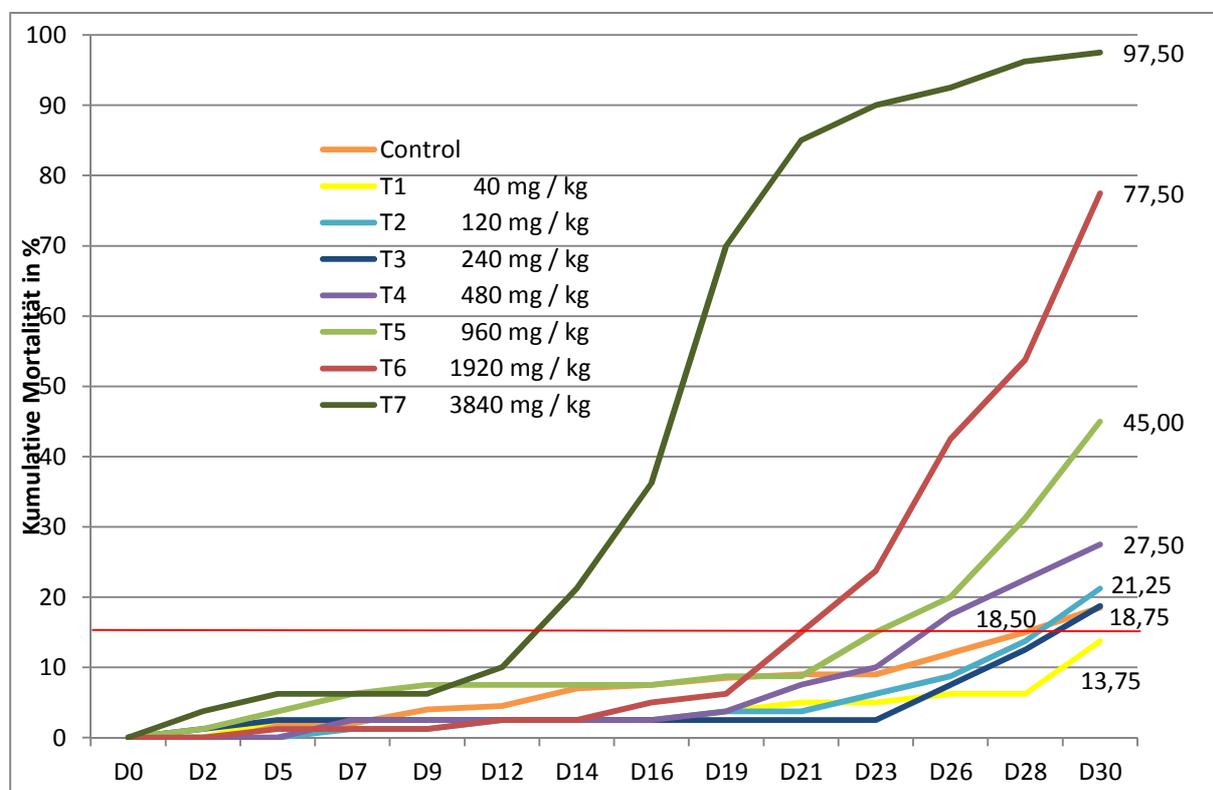


Abbildung 9: Kumulative Mortalität aller Testglieder in % des Herbstversuchs

Tabelle 8: Chi² Fourfold table test

Relation of Mortality on Concentration at 30 d

Chi² 2x2 Table

Chi²-2x2 Test (alpha is 0,05; one-sided greater): Pair-wise comparisons between treatment and control; The one-sided test is based on the standard normal variable z, which is a measure of the difference between treatment and control;; Ho (no effect) is accepted, if the probability p(z) > Alpha.

Treatm.[mg/kg]	Introduced	Survived	Dead	% Mortality	z	p(z)	sign.
C Control	200	163	37	18,5			
T1 40,000	80	69	11	13,8	0,953	0,830	-
T2 120,000	80	63	17	21,3	0,527	0,299	-
T3 240,000	80	65	15	18,8	0,049	0,481	-
T4 480,000	80	58	22	27,5	1,668	0,048	+
T5 960,000	80	44	36	45,0	4,563	<0.001	+
T6 1920,000	80	18	62	77,5	9,329	<0.001	+
T7 3840,000	80	2	78	97,5	12,139	<0.001	+

+: significant; -: non-significant

Tabelle 9: Weibull Analyse

Results of the Weibull analysis

Results of the Weibull analysis: Selected effective concentrations (ECx) of the test item and their 95%- and 99%-confidence limits (according to Fieller's theorem).

Parameter	EC10	EC20	EC50
Value [mg/kg]	440,248	693,144	1375,810
lower 95%-cl	339,939	573,051	1222,997
upper 95%-cl	536,845	806,353	1537,025
lower 99%-cl	316,385	543,105	1179,854
upper 99%-cl	576,811	850,814	1593,229

n.d.: not determined due to mathematical reasons or inappropriate data
Slope function after Litchfield and Wilcoxon: 1,831

(The slope function is derived from the slope, b, of the linearized probit function and computes as $S = 10^{(1/b)}$; please note that small values refer to a steep concentration/response relation and large ones to a flat relation.)

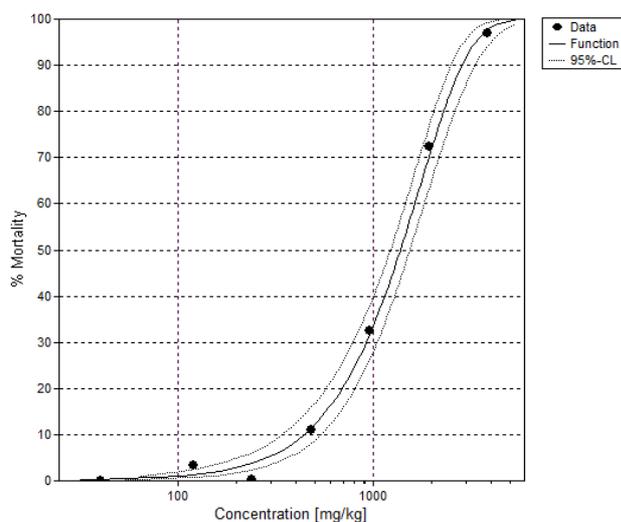


Abbildung 10: Mortality response curve 30 Tage der Weibull Analyse

Vorversuch, Sommersversuch und Herbstversuch im Vergleich

Die Unterschiede zwischen den drei HMF-Versuchen waren die im Testsystem genutzten Bienen, die Temperatur des Klimaschranks sowie die Testkonzentrationen. Im Vorversuch wurden Winterbienen genutzt, im Sommer- und Herbstversuch ausschließlich frisch geschlüpfte Bienen. Die Klimaschranktemperatur betrug im Vorversuch sowie im Sommersversuch 25°C und im Herbstversuch 33°C. Die Testkonzentrationen waren im Vorversuch niedriger als im Sommer- und Herbstversuch, bei denen die Testkonzentrationen gleich hoch waren. Vermutlich war durch den ca. 1,4-mal geringeren Futterverbrauch und die geringe Aktivität der Bienen, bedingt durch die geringere Klimaschranktemperatur bedingt, die Exposition der Bienen im Sommersversuch nicht ausreichend für einen messbaren Effekt des HMF auf die Mortalität der Bienen.

Der Futterverbrauch der Kontrollbienen der drei HMF-Versuche ist in Abbildung 11 dargestellt. Der jeweils blau dargestellte Futterverbrauch wurde nicht um die Evaporation (EV) korrigiert und der rot dargestellte Futterverbrauch wurde um die Evaporation korrigiert. Im Vorversuch wurde die Evaporation nicht erfasst, daher wurde um die durchschnittliche Evaporation des Sommersversuchs korrigiert. Der Vorversuch und der Sommersversuch wurden jeweils mit einer Klimaschranktemperatur von 25°C durchgeführt, daher sollte die Evaporation vergleichbar sein.

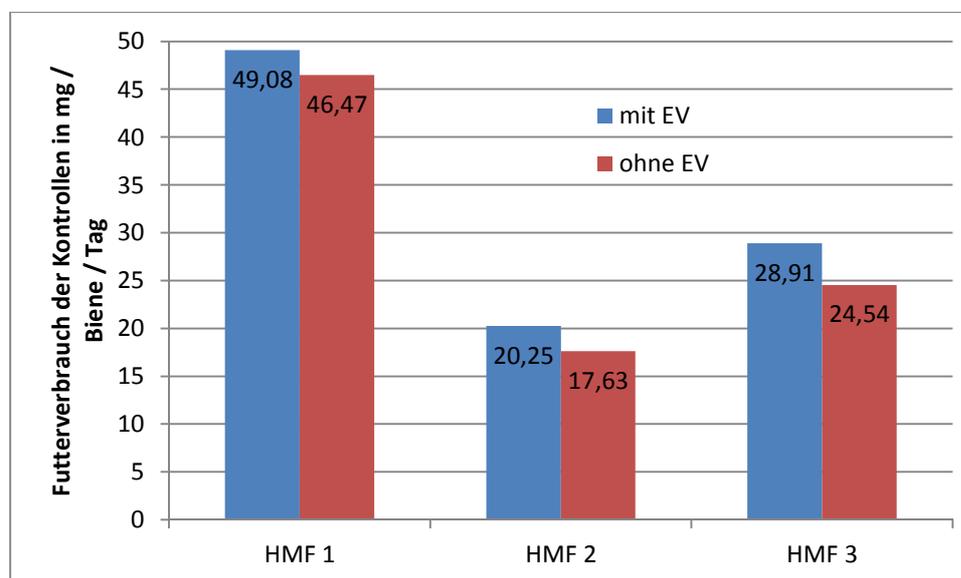


Abbildung 11: Korrigierter durchschnittlicher Futterverbrauch der Kontrollen in mg pro Biene und Tag aller drei Versuche

Der Futterverbrauch der Kontrollbienen war im Vorversuch am höchsten, ähnlich dem Futterverbrauch im Ringtest von Kling *et al* (2016) und im Sommersversuch am niedrigsten.

Die durchschnittliche Futterraufnahmemenge war bei den Kontrollbienen des Vorversuchs ca. 2,6-mal höher als bei den Kontrollbienen des Sommersversuchs und im Vergleich zu der Futterraufnahme im Herbstversuch ca. 1,9-mal höher. Die Futterraufnahme im Herbstversuch war ca.1,4-mal höher als im Sommersversuch. In die Berechnung flossen jeweils die um die Evaporation korrigierten Daten ein.

Signifikante Unterschiede zwischen den Testkonzentrationen und der Kontrolle konnten bei den zwei Hauptversuchen ausschließlich im Herbstversuch ermittelt werden. Ab der Testkonzentration T4 (480 mg / kg) mit 27,50 % Mortalität waren die Unterschiede der Testkonzentrationen signifikant zur Kontrolle. Der berechnete EC₁₀ lag bei 440,25 mg / kg, EC₂₀ bei 693,14 mg / kg und EC₅₀ bei 1375,81 mg / kg. Im Vorversuch war die Testkonzentration 640 mg / kg signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, die nächst niedrigere Konzentration von 320 mg / kg nicht. Die Ergebnisse des Vorversuchs und des Herbstversuches lagen somit in einem ähnlichen Konzentrationsbereich, in dem scheinbar bei einer 30 tägigen Testdauer ein negativer Effekt des HMFs auf die Lebensdauer von Bienen beginnt. Der NOEC des Herbstversuches lag bei 240 mg / kg nach 30 Tagen und der NOEC bei Pflugfelder und Gallmann (2011) entsprach 200 mg / kg nach 32 Tagen.

Die Gesamtbewertung des Forschungsvorhabens siehe „Entscheidungshilfe“.

Literatur

Bailey L. (1966): The effect of acid-hydrolysed sucrose on honeybees. Journal of Apicultural Research 5(3), 127-136

Benkert M., Berg S., Härtel S. (2016): Auswirkungen von 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd auf Lebensdauer und Temperaturregulation bei *Apis mellifera* (L.). Poster AG-Tagung Braunschweig

Blum E. und Illies I. (?): Einfluss von Pyrrolizidinalkaloiden (PA) und HMF auf Bienen, Präsentation

Jachimowicz T. und El Sherbiny G. (1975): Zur Problematik der Verwendung von Invertzucker für die Bienenfütterung. Apidologie, 6 (2), 121 – 143.

Kling A. et al (2016): Proposal for a new guideline for the testing of chemicals – Honey bee (*Apis mellifera* L.) chronic oral toxicity test 10 day feeding test in the laboratory (unveröffentlicht)

LeBlanc B. W., Eggleston G., Sammataro D., Cornett C., Dufault R., Deeby T. und St. Cyr E. (2009): Formation of Hydroxymethylfurfural in Domestic High-Fructose Corn Syrup and Its

Schlussbericht HMF 2016
Dorothee J. Lüken, Dr. Werner von der Ohe

Toxicity to the Honey Bee (*Apis mellifera*). J. Agric. Food Chem. 2009, 57, 7369–7376,
DOI:10.1021/jf9014526

Pflugfelder J. und Gallmann P. (2011): Zucker Fütterung-nicht allein eine Frage der Menge:
Chronische Toxizität von Hydroxymethylfurfural auf Winterbienen, AG-Tagung Berlin

VDLUFA, FG VIII, AK Organik (2015): Bericht zum Validierungsringversuch 166/2015/M
der Methode: „ Bestimmung des Gehaltes an Hydroxymethylfurfural (HMF) in
Bienenwinterfutter“ auf Basis der § 35 LMBG Methode L40.00-10/3