Abschlussbericht zum Innovationsprojekt EAsy Life
(281C301A19)

Entwicklung eines Applikationsverfahrens zur systemischen Varroabekämpfung mit Lithiumchlorid für Bienenvölker (EAsy Life) – Teilprojekt A

Universität Hohenheim

Landesanstalt für Bienenkunde

01.02.2021 – 31.03.2024

Gefördert durch Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

Gefördert durch

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

Projektträger

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung

Abschlussbericht zum Innovationsprojekt EAsy Life

Zuwendungsempfänger: Universität Hohenheim	Förderkennzeichen: 281C301A19
Vorhabenbezeichnung: Verbundprojekt: Entwicklung eines Applikationsverfahrens zur systemischen Varroabekämpfung mit Lithiumchlorid für Bienenvölker (EAsyLife) - Teilprojekt A	
Laufzeit der Vorhabens: 01.02.2021 - 31.03.2024	

Teil I: Kurzbericht

Aufgabenstellung

Honigbienen sind unverzichtbare Bestäuber sowohl für unser Ökosystem als auch für die Landwirtschaft. Für Honigbienen und Imkerei stellt die weltweit verbreitete parasitische Milbe *Varroa destructor* seit Jahrzehnten das größte Problem dar; die Varroose ist die Hauptursache für periodische Völkerverluste und wirtschaftliche Schäden. Derzeit gibt es kein zufriedenstellendes Behandlungsverfahren, das alle Anforderungen der Imkerschaft erfüllt. Mit Lithiumchlorid (LiCl) haben wir einen neuen Wirkstoff mit varroazider Wirkung entdeckt, der sehr gute Wirksamkeit auf Varroamilben mit guter Verträglichkeit für Bienen verbindet und aufgrund der systemischen Wirkungsweise sehr einfach angewendet werden kann. Das zentrale Ziel des Projektes ist also, für die Imkerei praxistaugliche Applikationen mit diesem neuen Wirkstoff zu entwickeln, um so Völkerverluste und Einkommenseinbußen weitgehend zu reduzieren.

Konkret standen dabei drei Aspekte im Vordergrund:

1. Die Anwendung von LiCl zur Bekämpfung brutfreier Bienenvölker soll zur Praxisreife weiterentwickelt werden. (Projektpartner UHOH)
2. Die höhere Empfindlichkeit der Bienenbrut gegenüber LiCl soll quantifiziert werden und eine Applikationsmethode entwickelt werden, bei der die Larven weniger Wirkstoff erhalten als die Adultbienen. Dies soll über eine funktionelle Formulierung des Wirkstoffes erreicht werden. (Projektpartner UHOH)
3. Molekulare Untersuchungen einschließlich genomweiter Expressionsanalysen sollen Hinweise zum Wirkmechanismus von Li bringen. (Projektpartner siTOOLs).
4. Darüber hinaus werden mit einer neuen Analysemethode Wirkstoffverteilung und Wirkdauer von Li in Bienen quantifiziert, um (a) die Applikation zu optimieren und (b) Hinweise für die Entwicklung weiterer Wirkstoffe zu erhalten. (UHOH)

Ablauf des Vorhabens

Quantifizierung der Brutschäden: Unter praxisnahen Freilandbedingungen führte die Applikation von LiCl zu konzentrationsabhängigen Schäden und hohen Ausräumraten der Bienenbrut, abhängig von der Fütterungsdauer und dem Larvenalter. Bei 25 mM LiCl überlebten nur etwa 40% der Bienenbrut. In zwei Tage alten Larven konnte noch kein Lithium nachgewiesen werden und das Sekret aus der Futtersaftdrüse der Ammenbienen, mit dem die Königin und jungen Larven gefüttert werden, war weitgehend lithiumfrei. Daher stellt die LiCl-Applikation vermutlich kein Risiko für die Königin oder die jungen Larven dar. In älteren Larven stieg die Lithium-Konzentration signifikant an, was auf die Futterumstellung von reinem Futtersaft auf gemischtes Larvenfutter zurückzuführen ist, bei der auch das im Futter eingelagerte Lithium weitergegeben werden kann.

Applikation im brutfreien Bienenvolk: Aufgrund der schädlichen Wirkung von LiCl auf die Bienenbrut wurde eine Applikation für brutfreie Völker entwickelt und getestet. Die Kombination einer brutfreien Phase durch Sperren der Königin mit der LiCl-Behandlung erzielte Wirkungsgrade von 78–98%. Höchste Wirkungsgrade wurden erst nach über 5 Tagen Fütterung erreicht, was Schäden an der neu angelegten Brut zur Folge hatte. In Käfigversuchen mit einer Biene und einer parasitierenden Milbe wurden allerdings bereits nach 48 Stunden Milbenmortalitäten von über 95% erzielt. Der Wirkungseintritt im Volk verzögerte sich aufgrund des sozialen Futteraustauschs, der jedoch notwendig ist, um den Wirkstoff gleichmäßig zu verteilen. Es besteht weiterer Optimierungsbedarf, um die für eine Zulassung erforderlichen Wirkungsgrade von über 90% zu erreichen, ohne die Bienenbrut zu schädigen.

Quantitative Lithium-Analysen über ein von unserer Core-Facility adaptiertes ICP-OES-Verfahren bestätigten die gleichmäßige Verteilung des Wirkstoffs im Volk. Bereits einen Tag nach der LiCl-Applikation wurden im Schnitt 93 mg/kg Lithium in den Honigblasen der Bienen nachgewiesen, unabhängig von ihrer Position im Volk. Analysen der Bienen-Hämolymphe zeigten, dass nach 12 Stunden Fütterung im Käfig ein Gleichgewicht von 5–8 mg/kg Lithium erreicht wird, was zum Tod der Milben führt. Für eine optimale Applikation bedeutet dies, dass das Lithium schnell im gesamten Volk verteilt und ausreichend lange zirkulieren sollte, um in allen Bienen die für Milben tödliche Konzentration zu erreichen. Diese Konzentration sollte etwa 48 Stunden aufrechterhalten werden, um eine Milbenmortalität von über 95% zu erzielen.

Die im Rahmen des Projektes durchgeführten Versuche bieten eine umfangreiche Datengrundlage, welche genutzt werden kann, um die bisherigen Behandlungsverfahren zu optimieren und dann in klinischen Studien zu testen. Die für das Zulassungsverfahren vom

Projektpartner gegründete Firma „Varolis GmbH“ kann diese Daten zudem nutzen, um Investoren davon zu überzeugen, den Zulassungsprozess zu finanzieren. Der Finanzbedarf für eine Zulassung wird dabei auf ca. 3 Millionen € geschätzt.

Für brütende Bienenvölker müssen jedoch alternative Behandlungsmöglichkeiten entwickelt werden, um den Kontakt der Brut mit dem Wirkstoff zu vermeiden. Die mit einer Spezialfirma entwickelten ersten Ansätze von funktionellen Wirkstoffformulierungen zeigten zwar hohe Milbenmortalitäten in Käfigversuchen und konnten das „proof of concept“ grundsätzlich bestätigen. Allerdings waren die Ergebnisse der ersten Versuche im Bienenvolk noch nicht zufriedenstellend. Hier müsste der zeitliche und finanzielle Aufwand für die Entwicklung solcher Wirkstoffformulierungen deutlich erhöht werden.

Abschlussbericht zum Innovationsprojekt EAsy Life

Zuwendungsempfänger: Universität Hohenheim	Förderkennzeichen: 281C301A19
Vorhabenbezeichnung: Verbundprojekt: Entwicklung eines Applikationsverfahrens zur systemischen Varroabekämpfung mit Lithiumchlorid für Bienenvölker (EAsyLife) - Teilprojekt A	
Laufzeit der Vorhabens: 01.02.2021 - 31.03.2024	

Teil II: Eingehende Darstellung

Im Rahmen des EAsy Life Projektes wurden wesentliche Aspekte erarbeitet, die für ein Zulassungsverfahren von LiCl als neues Behandlungsmittel zur Bekämpfung der Varroamilbe in Bienenvölkern relevant sind. Es wurden umfangreiche Daten zur Wirksamkeit und Wirkstoffverteilung erhoben sowie die Nebenwirkungen auf die Bienenbrut quantifiziert, sowohl unter Labor- als auch praxisrelevanten Freilandbedingungen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Meilensteine der jeweiligen Arbeitspakete dargestellt.

Arbeitspaket 1: Entwicklung einer effektiven Behandlungsmethode von brutfreien Bienenvölkern (UHOH)

a. Sommerbehandlung mit LiCl

Im Zulassungsverfahren eines neuen Tierarzneimittels müssen Wirkungsgrade von mindestens 90% erzielt werden und es muss ein genaues Behandlungsverfahren angegeben werden (EMA 2021). Im Rahmen des Projektes wurden verschiedene Lithiumkonzentrationen, Fütterungsdauer und Applikationsweisen von LiCl getestet, um zu evaluieren, welche Applikationsform im Volk praktikabel und effektiv ist. Aufgrund der schädigenden Wirkung von LiCl auf die Bienenbrut (s. u.) wurden die Völker durch das Sperren der Königin in einen brutfreien Zustand gebracht, wodurch der Kontakt der Larven mit LiCl verhindert werden sollte. Zudem bietet dies den Vorteil, dass sich die Milben nicht mehr in der Brut verstecken und vermehren können, sondern alle Milben auf den Bienen sitzen und dadurch leichter und schneller mit dem Behandlungsmittel zu erreichen sind. Mit den getesteten Applikationsvarianten konnten Wirkungsgrade von durchschnittlich 78 – 98% erzielt werden, welche die gängige Ameisensäurebehandlung in Deutschland übertrafen (Abb. 1). Die beste Wirkung erzielte dabei die 9-tägige Behandlung brutfreier Völker mit 2,5 kg 50 mM LiCl-Teig (A1), was bei allen sechs untersuchten Völkern über 95% der Milben tötete.

Allerdings war diese Behandlung auch mit hohen Brutverlusten verbunden, die in der imkerlichen Praxis nicht tolerierbar sind.

Im folgenden Jahr (2022) wurden zwei weitere Ansätze untersucht. Im ersten Ansatz wurde die Behandlungsdauer auf fünf Tage und die Dosis auf 2 kg 50 mM LiCl-Teig (A2) reduziert. Dadurch verringerten sich zwar die Schäden an der Bienenbrut, allerdings nahm auch der Behandlungserfolg gegen die Milben ab und betrug im Mittel nur noch 77,5%.

Ein weiterer Ansatz verfolgte die Idee, Völker mit Brut durch eine wiederholte Kurzzeitfütterung von viermal 0,5 kg 50 mM LiCl-Teig (A3) im Abstand von sieben Tagen zu behandeln, ohne dabei die Brut zu schädigen, da nur kleine Mengen LiCl verwendet wurden. Hier erzielten wir höhere Milbenmortalitäten von durchschnittlich 88%. Die wiederholte Kurzzeitfütterung sollte den Kontakt der Larven mit dem LiCl-Futter gering halten und Schäden vermeiden. Leider konnten dadurch aber die Brutverluste nicht verhindert werden (52% Überlebensrate) und es zeigten sich länger anhaltendende negative Effekte (8% Überlebensrate im 2. Brutzyklus).

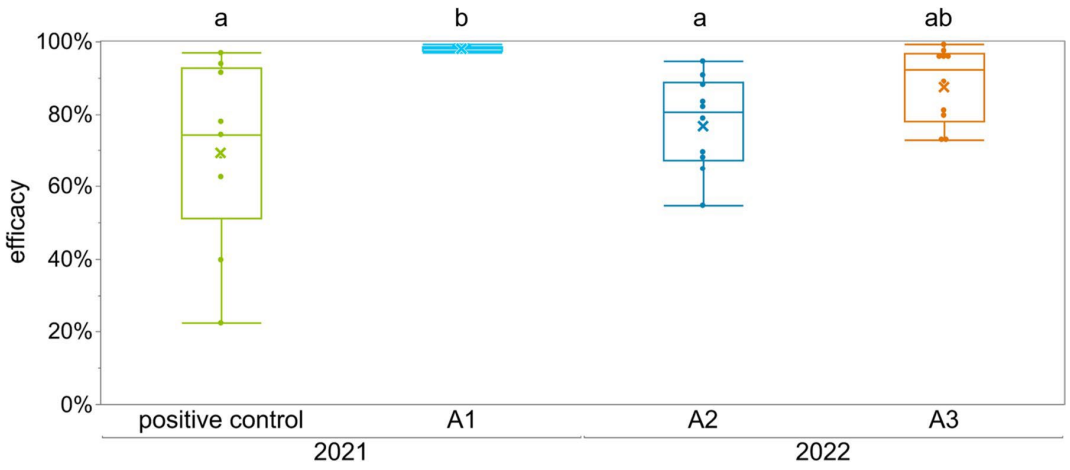

Abb. 1: Wirkungsgrade verschiedener LiCl-Behandlungen im Vergleich zur Kontroll-Behandlung mit 60% Ameisensäure. Abbildung aus der Veröffentlichung Rein et al. (2024) a).

Eine gute Wirksamkeit von LiCl wird nur erzielt, wenn der Wirkstoff gleichmäßig unter den Bienen im Volk verteilt wird und somit auf alle Milben, die auf den Bienen sitzen, wirken kann. Zuerst war angedacht die Verteilung nur qualitativ zu untersuchen, indem man das LiCl-Futter mit Farbstoff anfärbt und anschließend die Honigblasen der Bienen präpariert. Damit hätte man Rückschlüsse auf den Konsum des LiCl-Futters ziehen können. Stattdessen wurde die optische Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) hinzugezogen, wodurch der Lithium Gehalt in Bienen- und Futterproben auch quantitativ genaustens bestimmt werden konnte.

Die Lithium-Analysen der herauspräparierten Honigblasen von Bienen behandelter Bienenvölkern zeigen, dass Lithium bereits einen Tag nach Beginn der Behandlung in Konzentrationen von bis zu 93 mg/kg nachweisbar ist (Abb. 2). Somit konnten zunächst einmal der Konsum und die Weitergabe des LiCl-Futters durch die Bienen unter Praxisbedingungen bestätigt werden. Hierbei wurden keine Unterschiede in den Lithium-Konzentrationen zwischen den Bienen aus verschiedenen Bereichen des Bienenvolkes festgestellt. Dies lässt vermuten, dass sowohl das applizierte Futter als auch der darin enthaltene Wirkstoff im gesamten Volk weitgehend gleichmäßig verteilt werden. Diese gleichmäßige Verteilung wurde auch durch den Milbenfall bestätigt, welcher mit den nachgewiesenen Lithium-Konzentrationen in den Bienen korrelierte und im Falle der brutfreien Behandlung am fünften Tag sein Maximum erreichte – ein Tag nachdem die höchste Lithium-Konzentration gemessen wurde. Außerdem wurde gezeigt, dass die Lithiumkonzentration in den Honigblasen nach Ende der Behandlung zwar schnell abnimmt, jedoch 20 Tage später immer noch bis zu 23 mg/kg Lithium nachgewiesen werden können. Zumindest ein Teil des applizierten LiCl-Futters wird offenbar von den Bienen auch als Vorrat eingelagert. Dieses mit LiCl kontaminierte Futter scheint demnach noch länger im Volk zu zirkulieren und könnte somit auch noch nach Behandlungsende auf die Milben wirken, bzw. auch die Brutschäden erklären (s. u.).

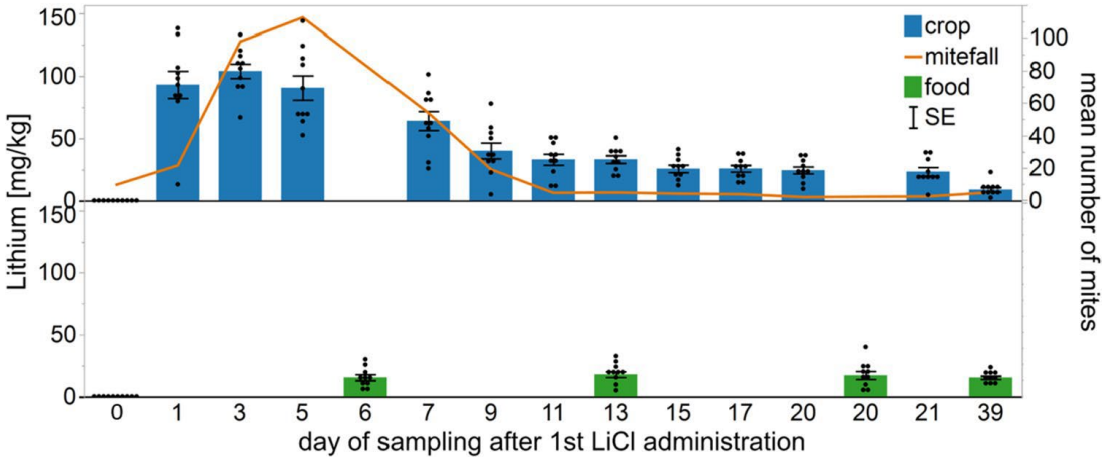

Abb. 2: Verteilung von Lithium in Honigblasen- und Futterproben während einer 5-tägigen LiCl-Behandlung. Der Milbenfall ist mit einer orangenen Linie angegeben. Abbildung aus der Veröffentlichung Rein et al. (2024) a).

Ebenfalls wurde der im Folgejahr geerntete Honig auf den Lithiumgehalt untersucht, um Rückschlüsse ziehen zu können, ob eine LiCl-Applikation zu Rückständen im Honig führt. Der beprobte Honig wies lediglich Konzentrationen von 0,1 – 0,2 mg/kg Lithium auf und liegt somit

unterhalb der natürlich vorkommenden Gehalte von teilweise bis zu 15,6 mg/kg Lithium. Daher sollte dies zumindest kein Problem für ein anstehendes Zulassungsverfahren darstellen.

Die Ergebnisse der Sommerbehandlungen wurden im Journal *Parasitology Research* am 22.12.2023 veröffentlich:

Rein, C., Blumenschein, M., Traynor, K., & Rosenkranz, P. (2024). Lithium chloride treatments in free flying honey bee colonies: efficacy, brood survival, and within-colony distribution. *Parasitology Research*, *123*(1), 67.

b. Winterbehandlung mit LiCl

Die Behandlung von brutfreien Völkern im Winter erzielte im ersten Untersuchungsjahr 2021 keine aussagekräftigen Ergebnisse. Dies lag vor allem daran, dass wir kaum Milben in den Völkern nachweisen konnten (< 10 gefallene Milben in 8 Wochen) und somit keine Aussage auf die Effektivität einer 100 mM LiCl-Träufelbehandlung im Vergleich zur Oxalsäure gezogen werden konnte. In Hinblick auf die Nebenwirkungen auf die Bienen und den damit verbundenen Bienentotenfall, zeigten sich jedoch kaum Unterschiede. Bei der LiCl-Behandlung starben mehr Bienen in der 1. Woche, wohingegen mit Oxalsäure mehr Bienen in der 3. Woche nach der Behandlung starben.

Im Winter 2022/2023 wurden 11 Völker an zwei Standorten mit einer LiCl-Träufelbehandlung im Vergleich zu der gängigen Oxalsäurebehandlung (N=11) behandelt. Diese Völker wurden zu Beginn der Behandlung mit der Liebefelder-Schätzmethode geschätzt, um den Überwinterungserfolg der Völker zwischen den Behandlungen zu vergleichen. Ebenfalls wurde der Milbenfall erhoben.

Sowohl durch das Träufeln des LiCl-Sirups als auch der Oxalsäure erhöhte sich der Milbenfall. Die Wirkung hielt bei beiden Behandlungen über den gesamten Dezember hin an und lies erst Anfang Januar nach (Abb. 3). Am Ende der Beobachtungszeit lag der durchschnittliche Milbenfall bei beiden Behandlungsgruppen im Mittel bei unter 10 Milben pro Woche, was somit einer zufriedenstellenden Behandlung entspricht.

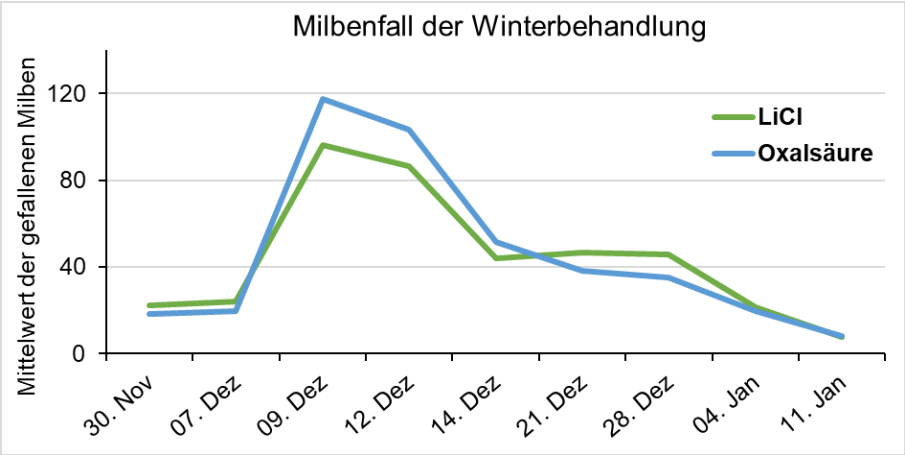

Abb. 3: Gefallene Milben während der Winterbehandlung mit 100mM LiCl oder 3,5% Oxalsäure.

Anhand der Schätzungen der Bienenmasse im Frühjahr 2023 konnte der Überwinterungserfolg der Völker berechnet werden:

$$Überwinterungserfolg = \frac{Bienenmasse\ Auswinterung}{Bienenmasse\ Einwinterung}$$

Aus Tab. 1 geht hervor, dass die Völker am Standort Nürtingen stärker ausgewintert haben, als in Stockhausen und die Bienenmasse doppelt so hoch war, wie bei der Einwinterung. In Stockhausen waren die Völker im Frühjahr auch stärker als noch bei der Einwinterung (Bienenmasse > 1,0). Im Mittel haben die Völker, welche mit Oxalsäure behandelt wurden, etwas stärker ausgewintert als die mit LiCl behandelten Völker. Ein Volk aus der LiCl-Gruppe ist über den Winter gestorben.

Zusammen mit den Milbenfalldaten lässt sich sagen, dass eine Winterbehandlung mit LiCl möglich ist, jedoch weiterer Daten bedarf, um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten. Die größte Problematik stellt die Anzahl der Milben in einem Winterbienenvolk dar. Völker mit einer für den Versuch ausreichenden Anzahl an Milben, sind möglicherweise schon stark geschwächt und können während des Versuches eingehen. Wohingegen gesunde Bienenvölker mit wenig Milben keinen Rückschluss auf die Effektivität der Behandlung zulassen.

Vor allem in den Wintermonaten ist die Probennahme von Bienen aus der Wintertraube problematisch, da durch das Öffnen des Volkes die Wintertraube und das Heizverhalten der Bienen gestört wird und es zum Erfrieren einiger Bienen kommen kann.

Tab. 1: Überwinterungserfolg der behandelten Völker an den Standorten Nürtingen und Stockhausen.

Standort	Behandlung	Überwinterungserfolg
Nürtingen	LiCl	2,1 ± 1,2
	Oxalsäure	2,3 ± 1,0
Stockhausen	LiCl	1,5 ± 0,4
	Oxalsäure	1,6 ± 0,6

Arbeitspaket 2: Untersuchung und Quantifizierung der Schäden an der Bienenbrut im Volk während einer LiCl-Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen (UHOH)

Eine *in-vivo* Larvenaufzucht im Labor zeigte bereits vor Start des Projektes, dass die Bienenlarven sensibel gegenüber einer Fütterung von LiCl-Futter reagieren. Es war bislang jedoch fraglich, ob überhaupt und wenn ja, welche LiCl-Konzentration von den Ammenbienen im Volk an die Larven weiterverfüttert wird. Daher wurden verschiedene LiCl-Konzentrationen an MiniPlus Völker verfüttert und die schädigende Wirkung von LiCl und das damit verbundene Ausräumverhalten unter praxisnahen Freilandbedingungen untersucht. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass LiCl zu konzentrationsabhängigen Schäden und hohen Ausräumraten der Bienenbrut führt, welche zudem von der Dauer der Fütterung und dem Larvenalter abhängig sind.

Eine 10 mM LiCl-Konzentration zeigte im Vergleich zur lithium-freien Fütterung keine signifikanten Unterschiede und erzielt ähnlich hohe Überlebensraten von 80% (Abb. 4). Bei einer Fütterung von 25 mM LiCl – was die Mindestkonzentration für eine ausreichende varroazide Wirkung darstellt – überleben nur knapp 40% der Bienenbrut.

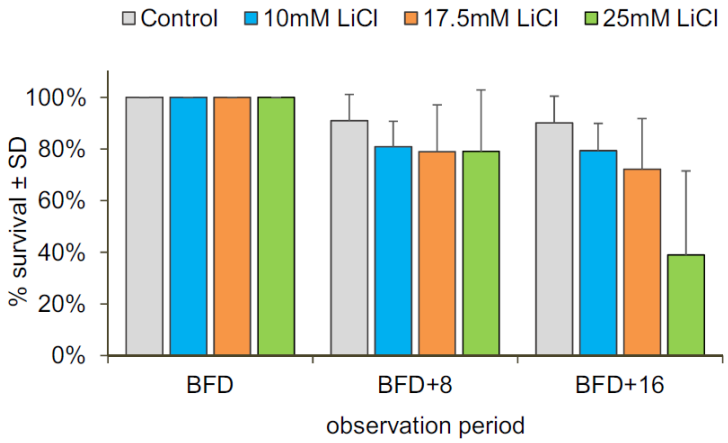

Abb. 4. Überlebensraten der Bienenbrut nach Fütterung unterschiedlicher LiCl-Konzentrationen in Mini-Plus Völker. Abbildung aus der Veröffentlichung Rein et al. (2022).

Analysen der Lithium-Konzentration verschiedener Larvenstadien zeigen, dass in zwei Tage alten Larven kein Lithium nachgewiesen werden kann (Abb. 5). Die Analysen der Futtersaftdrüsen haben bestätigt, dass das Sekret der Ammenbienen, mit dem die Königin und die jungen Larvenstadien gefüttert werden, weitgehend frei von Lithium ist. Daher sollte eine LiCl-Applikation kein Risiko für die Königin, oder die jungen Larven darstellen. In älteren Larven steigt die Lithium-Konzentration dagegen signifikant an. Dies ist auf die stadienspezifische Futterumstellung von reinem Futtersaft auf gemischtes Larvenfutter zurückzuführen. Hierbei wird auch eingelagertes Futter aus den umliegenden Waben beigemengt, wodurch auch zuvor eingelagertes Lithium weitergegeben werden kann.

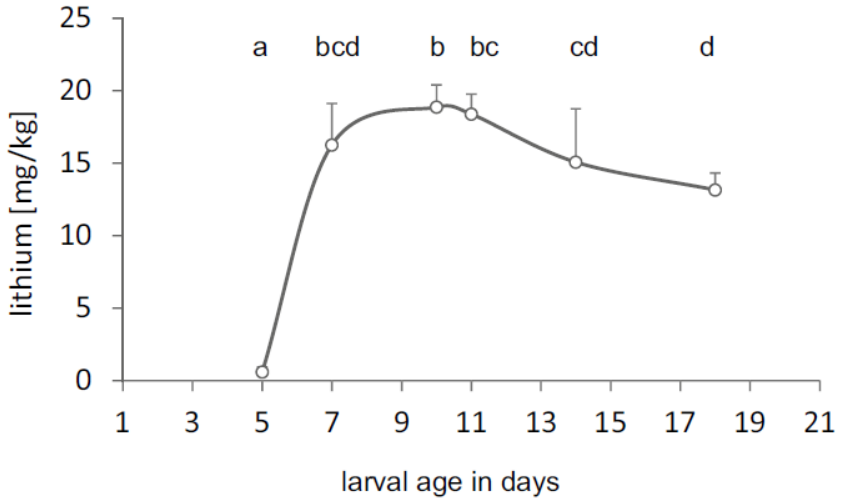

Abb. 5: Lithium-Konzentration in unterschiedlich alten Larven. Abbildung aus der Veröffentlichung Rein et al. (2022).

Die optische Untersuchung von verschiedenen Larven- und Puppenstadien zeigte darüber hinaus, dass sich die Larven bis zur Verdeckelung der Zelle weitestgehend normal entwickelten. Kommt es in der verdeckelten Zelle zur Metamorphose der Bienen, so zeigten die Larven, welche mit LiCl gefüttert wurden, eine fehlerhafte Entwicklung (Abb. 6). Zum Teil konnten sich die Larven nicht richtig verpuppen und unterschieden sich somit auch optisch von den Kontroll-Larven, welche eine normale Entwicklung durchlebten.

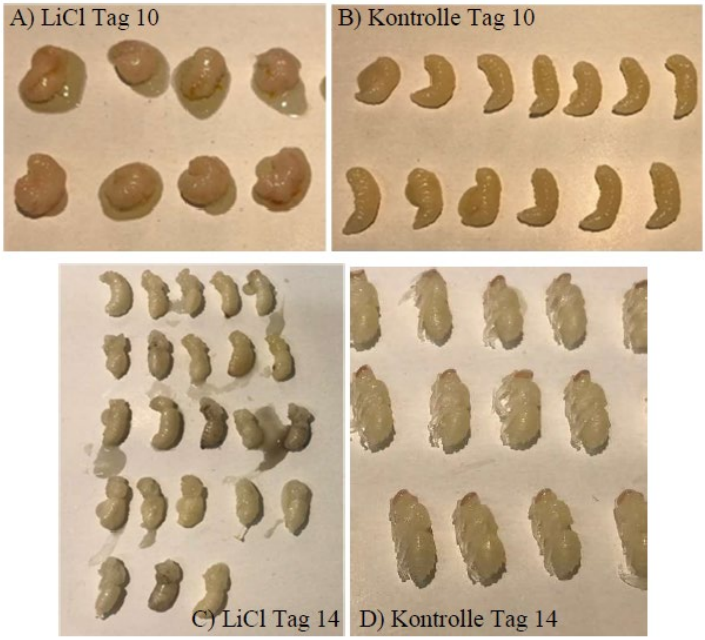

Abb. 6: Sichtbare Schäden bei Larven und Puppen, welche mit LiCl gefüttert wurden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Abbildung aus der Bachelorarbeit von Julia Renz (2021).

Aufgrund dieser Daten ist daher eine Applikation von LiCl in brütenden Völkern nicht ratsam, da dies mit starken Schäden und hohen Brutverlusten verbunden ist, welche in der Imkereipraxis nicht wünschenswert sind.

Die Ergebnisse wurden im Journal *Apidologie* am 22.07.2022 veröffentlich:

Rein, C., Makosch, M., Renz, J., & Rosenkranz, P. (2022). Lithium chloride leads to concentration dependent brood damages in honey bee hives (*Apis mellifera*) during control of the mite *Varroa destructor*. *Apidologie*, *53*(4), 38.

Arbeitspaket 3: Entwicklung einer Behandlungsmethode brütender Bienenvölker mit guter Verträglichkeit für Bienen und Bienenlarven durch spezifische Wirkstoff-Formulierungen (UHOH)

Da neben der Behandlung brutfreier Völker auch die Behandlung brütender Völker angestrebt wird, sollten Lösungen gefunden werden, um die Brutschäden zu vermeiden. Ein konkreter Lösungsansatz besteht darin, dass das im Futter enthaltene Lithium nach der Futteraufnahme durch eine Arbeiterin in dieser verbleibt und nur gereinigtes, weitgehend Lithium-freies Futter in die Waben eingelagert oder an die Larven verfüttert wird. In diesem Ansatz sollte die Filtereigenschaft des Verdauungstraktes der Biene genutzt werden, wodurch am Übergang von Honigblase zum Mitteldarm der gesammelte Nektar bzw. das aufgenommene Futter von Fremdpartikeln gefiltert wird. Durch den Einsatz einer geeigneten organischen Hülle mit ausreichender Größe, in oder an der das Lithiumsalz gebunden ist, könnte der größte Teil des Lithiums nach Futteraufnahme durch diesen bienenspezifischen Mechanismus schnell in den Mitteldarm geschleust werden und dort während des Verdauungsvorgangs seine Wirkung entfalten. Die „gereinigte“ Nahrung in der Honigblase könnte dann gefahrlos eingelagert oder an die Larven weitergegeben werden.

Die zuerst getesteten Li_2CO_3 Kristalle zerfielen bereits bei Kontakt mit einer zuckerhaltigen Lösung und waren daher nicht geeignet für eine Fütterung an die Bienen. Danach wurden sogenannte „water-oil-water“ (WOW) Partikel hergestellt, die bereits Lithiumchlorid enthielten. In Vorversuchen wurden Bienen per Hand mit der WOW-Lösung gefüttert und anschließend die Bienen präpariert. Wir konnten sowohl in der Honigblase als auch im Mitteldarm Partikel finden: das Herausfiltern hat somit funktioniert. In anschließenden Lebensdauerversuchen mit verschiedenen WOW-Konzentrationen fiel auf, dass eine Dauerfütterung von mehr als 3 Tagen nicht verträglich für die Bienen ist. Daraufhin wurde als erste Optimierungsmaßnahme die Glucose-Konzentration der WOW-Lösung von 10% auf 50% erhöht.

In weiteren Käfigversuchen befanden sich nun auch Milben auf den Bienen und es wurde sowohl die Milben- als auch Bienenmortalität erfasst. Die Milben starben bereits 2-3 Tage nach Beginn der Fütterung. Im Vergleich zu den ersten Käfigversuchen, haben die Bienen nun auch eine 5-tägige Fütterung mit WOW überlebt. Danach stieg die Mortalität der WOW-Bienen aber rapide an.

Im Mai 2023 wurden die „water-oil-water“-Partikel (WOW) mit unterschiedlichen LiCl-Konzentrationen (0, 2.5, 10, 25, 50, 100 mM) und eine weitere Formulierung aus „Alginate“ (10, 50, 100 mM) getestet. In jedem Käfig befanden sich 43±2 frisch geschlüpfte Bienen, die über einen Zeitraum von 16 Tagen mit den unterschiedlichen Formulierungen und LiCl-Konzentrationen gefüttert wurden (Abb. 7). Bereits nach 5 Tagen stieg die Bienenmortalität bei den Käfigen mit hohen LiCl-Konzentrationen an, unabhängig von der „WOW“ oder „Alginate“-

Formulierung, oder der reinen Form des Emulsifiers (Tween). Bei Käfigen mit geringeren LiCl-Konzentrationen unter 25mM gab es bis Tag 12 kaum Unterschiede zur Kontrolle, die nur mit Apiinvert Zuckersirup gefüttert wurden. Es scheint also, als ob eher die LiCl-Konzentration, als die Formulierung ausschlaggebend für die Bienensterblichkeit ist.

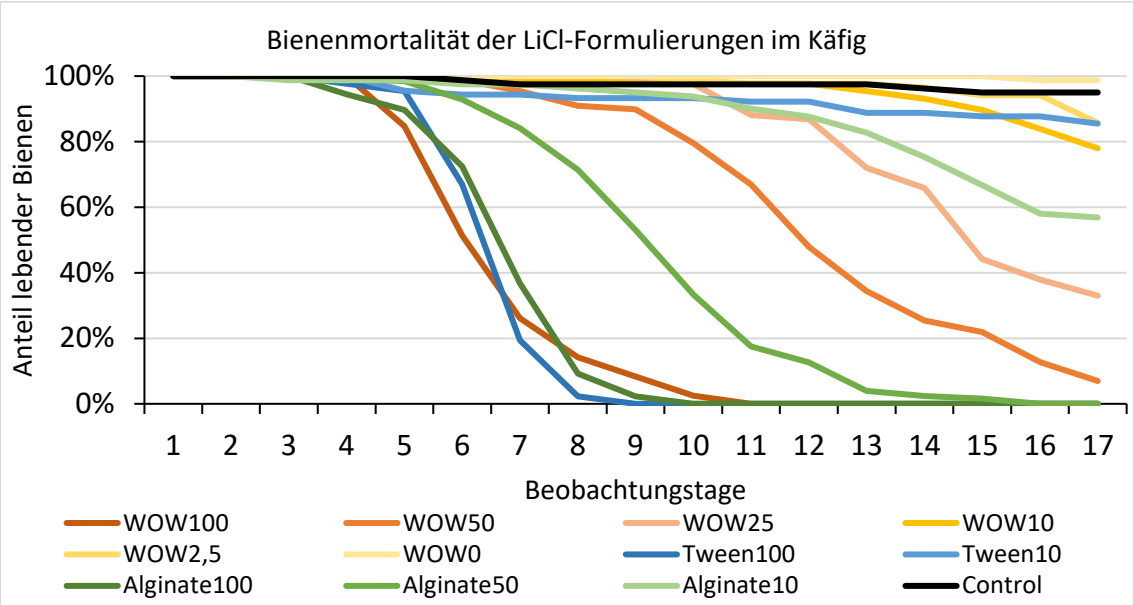

Abb. 7 : Bienenmortalität des Käfigversuchs bei Fütterungen mit unterschiedlichen Formulierungen (WOW, Alginate, Tween) und LiCl-Konzentrationen (0, 2,5, 10, 25, 50, 100) im Vergleich zur Kontrolle.

Da im Volk bereits ab einer LiCl-Konzentration von 25mM Schäden an der Bienenbrut zu sehen sind und das Ziel der Formulierungen war, diese Schäden zu reduzieren oder gar komplett zu vermeiden, wurde für die Volksversuche eine LiCl-Konzentration von 25 mM für die Formulierungen gewählt.

Die Brutprotokolle starteten Anfang Juli 2023. Pro Behandlung (25 mM LiCl, WOW 25 mM, Alginate 25 mM, Kontrolle) wurden 3 Kleinvölker mit je 2 Litern gefüttert. Ebenfalls wurde der Milbenfall erfasst, um zu schauen ob die toxischen Effekte von Lithium, trotz Formulierung, auf die Milbe erhalten bleiben. Mit Start der Fütterung wurden pro Volk ca. 260 Eier auf einer Wabe markiert (= Brood Fixing Day, BFD), welche über einen Zeitraum von 16 Tagen im Volk verblieb. An Tag 8 und Tag 16, wurde die Entwicklung der Brut überprüft und protokolliert.

Der Versuch ist nicht wie erwartet verlaufen und die Ergebnisse geben keinen vollständigen Aufschluss darüber, welche Effekte die unterschiedlichen Behandlungen auf die Brut hatten, bzw. ob sich die Formulierungen für eine Reduzierung der Brutschäden eignen. Folgende Beeinträchtigungen sind anzumerken:

1. Trachtlücke, wodurch schon leichte Räubereistimmung bei den Völkern war → Kontroll-Futter und 25 mM LiCl-Futter wurden sehr schnell abgenommen und in die Zellen gelagert. Das führte dazu, dass einige Eier aus den Zellen ausgeräumt wurden und durch Futter ersetzt wurde. Das Ausräumen der Zelle kann also nicht eindeutig auf einen Schaden an der Brut zurück geführt werden, oder damit begründet, dass Futter in die Zelle gelagert wurde. Bei den Kontroll-Völkern wurden mehr Zellen ausgeräumt, als bei den LiCl-Völkern.
2. WOW-Futter wurde kaum abgenommen und die Bienen sind im Trog ertrunken. Das Haarkleid der Bienen war sehr ölig, vermutlich war das der Auslöser für das Ertrinken. Nach 5 Tagen befand sich immer noch sehr viel Futter im Trog, welches ein paar Tage später entfernt werden musste, da es angefangen hat zu schimmeln. Im Diagramm ist bei den WOW-Völkern das höchste Überleben zu verzeichnen, was jedoch nicht verwunderlich ist, wenn kaum Futter abgenommen wurde und somit kein Wirkstoff ins Volk gelangt ist.
3. Alginate-Futter wurde sehr gut abgenommen, ähnlich wie der Futtersirup. Allerdings befanden sich im Futtertrog noch Reste von den festen Bestandteilen (Abb. 8). Fraglich hierbei ist also, in wie weit die Lithium-Partikel ihren Weg in die Biene und das Volk geschafft haben, oder ob der Großteil des Wirkstoffs im Futtertrog zurück bleibt.
   Bereits an Tag 8 wurden schon über 70% der markierten Zellen ausgeräumt, an Tag 16 waren nur noch 5 (0,6%) Zellen vorhanden. Die Alginate-Partikel scheinen daher noch weniger verträglich für die Bienenbrut zu sein.

Abb. 8: Links: Alginate-Partikel die im Futtertrog zurück geblieben sind. Rechts: WOW-Futter, das von den Bienen nicht abgenommen wurde. Einige Bienen liegen tot in der Flüssigkeit

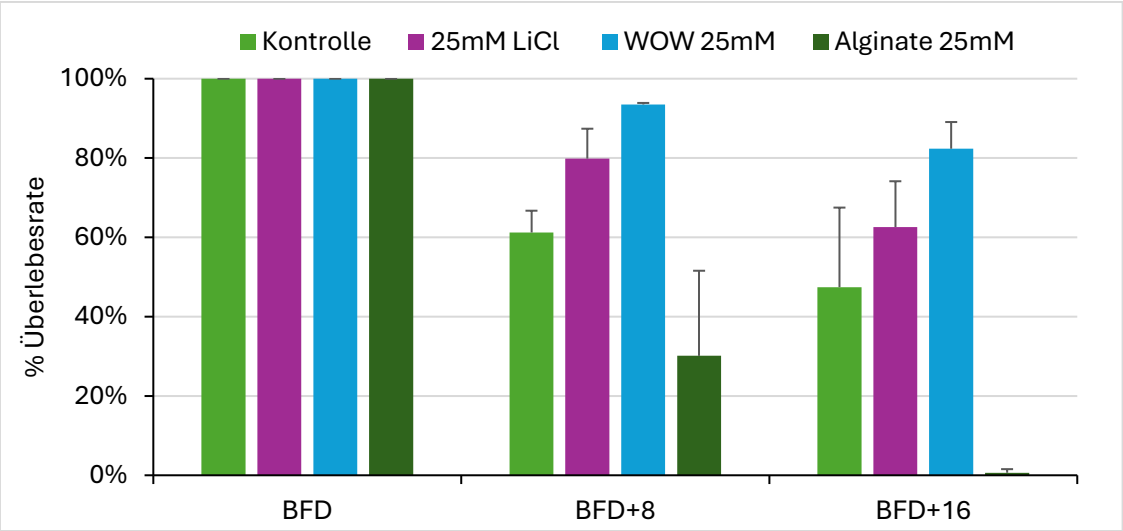

Abb. 9: Überlebensrate der Brut im Volk. Je 3 Völker pro Gruppe wurden mit den LiCl- Formulierungen (WOW oder Alginate), reinem LiCl-Sirup oder Kontroll-Futtre gefüttert.

Leider konnten mit den getesteten LiCl-Formulierungen nur mäßig zufriedenstellende Erfolge verzeichnet werden. Wir konnten zeigen, dass die Funktionalität der LiCl-Formulierungen möglich ist. In Käfigversuchen wurden die Partikel aus der Honigblase herausgefiltert, an den Darm weitergegeben und freigesetzt, was durch die erhöhte Milbenmortalität bestätigt wurde. Der Transfer ins Freiland war jedoch mit einigen Schwierigkeiten behaftet (s.o) und bedarf weiterer Untersuchungen.

Aus den vorhandenen Daten wurde eine Erfindungsmeldung angelegt und ein Patent beantragt, welches derzeit noch geprüft wird. Die Bezeichnung der Erfindung lautet: „Partikel zur Reduzierung der Brutschäden während Varroa-Bekämpfung bei Honigbienen".

Arbeitspaket 4: Untersuchung zur Wirkstoffverteilung und der Wirkdauer in der individuellen Biene (UHOH)

Um eine genaue Aussage darüber treffen zu können, ob und wie sich das LiCl im Körper der Biene konzentriert, wurde die Aufbaurate in der Hämolymphe untersucht. Dazu wurden Bienen im Käfig mit LiCl-Sirup gefüttert und nach verschiedenen Zeitabständen die Hämolymphe extrahiert und anschließend die Li-Konzentration über ICP-OES bestimmt. Als neue Extraktionsmethode wurde der Sinusschnitt erprobt, welcher es ermöglichte mithilfe einer Kapillare 5-6µl Hämolymphe pro Biene zu extrahieren. Dabei werden die Bienen zuerst betäubt und anschließend wird in das 3. abdominal Segment geschnitten, um den dorsalen Sinus zu erreichen. Durch Andrücken der Kapillare kann reine Hämolymphe extrahiert werden (Abb. 10). Ebenfalls wurde die Kotblase

herauspräpariert, um als letzter Abschnitt des Verdauungstraktes den Metabolismus des Lithiums in der Biene nachvollziehen zu können.

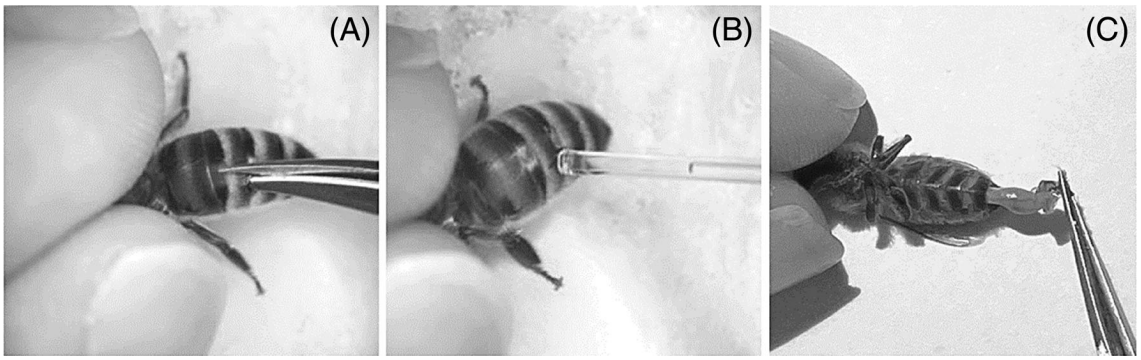

Abb. 10: Dorsaler Sinusschnitt zur Extraktion der Hämolymphe (A+B) und Extraktion der Kotblase (C). Abbildung aus der Veröffentlichung Rein et al. 2024 b).

Die Ergebnisse zeigen, dass bereits nach 12 Stunden 5,2 mg/kg Lithium in der Hämolymphe enthalten ist (Abb. 11). Die Li-Konzentration in der Hämolymphe bleibt über die gesamte Fütterungsdauer in einem Bereich zwischen 6 und 12 mg/kg. In der Kotblase hingegen steigt die Li-Konzentration mit der Fütterungsdauer an. Nach 7 Tagen wird de Höchstwert von 476 mg/kg Lithium erreicht.

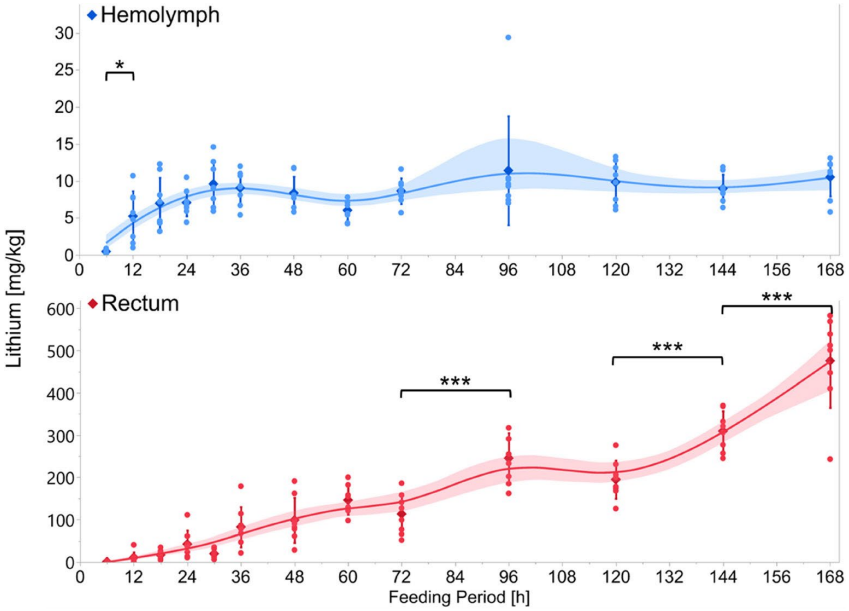

Abb. 11: Lithium Konzentration in Hämolypmhe und Kotblase nach unterschiedlich langer Fütterung der Bienen im Käfig. Proben wurden mithilfe der ICP-OES auf den Lithium-Gehalt analysiert. Abbildung aus der Veröffentlichung Rein et al. 2024 b).

Der genaue zeitliche Eintritt der Wirkung des LiCls auf die Milbe nach Fütterungsstart wurde anhand von Einzelkäfigen mit je einer Biene und einer Milbe untersucht. Dazu wurden 147 Bienen

mit aufsitzenden Milben mit LiCl und 86 mit Kontroll-Sirup gefüttert und stündlich die Mortalität überprüft. Die erste Milbe ist bereits 4 Stunden nach Fütterungsstart gestorben. In den ersten 12h konnten insgesamt 38% der Milben getötet werden, weiter 40% folgten in den nächsten 12h (Abb.12). Innerhalb 48h konnten mit einer LiCl-Fütterung somit 95% der Milben getötet werden.

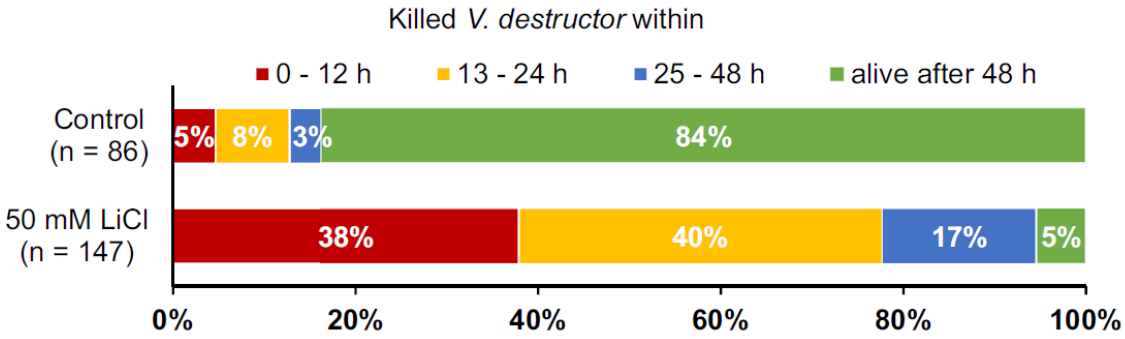

Abb. 12: Wirkeintritt von LiCl nach Fütterung von einer Biene mit einer Milbe im Käfig. Abbildung aus der Veröffentlichung Rein et al. 2024 b).

Anlehnend an den Versuch zum Wirkeintritt, der den Tod der Milben nach Beginn der LiCl-Fütterung untersucht hat, stand noch die Frage der Wirkdauer, nach Ende der LiCl-Fütterung im Raum. Dazu wurden Bienen in einem Käfig für 48h mit 50 mM LiCl gefüttert und anschließend auf Lithium-freien Sirup umgestellt. Nach unterschiedlich langen Pausen (0h, 24h, 48h, 72h, 96h) wurden Milben zu den Bienen im Käfig gesetzt und die Milbenmortalität in den nächsten Tagen erfasst. 88% der Milben, die direkt nach Futterumstellung (0h) auf die Biene gesetzt wurden, waren bereits am nächsten Tag tot (Abb. 13). Bereits bei einer Pause von 24h von LiCl-Fütterung bis Aufsetzen der Milben, verringerte sich die toxische Wirkung und damit der Milbenfall, sodass bis Tag 6 noch über 50% der Milben am Leben waren. Bei den anderen Käfigen, die eine längere Pause bis zum Aufsetzen der Milben hatten, verzögerte sich der Eintritt des Milbenfalls ebenfalls bis zu Tag 6, an dem dann doch noch verzögert der Milbenfall einsetzte.

Der Gehalt an Lithium in der Biene scheint nach Futterwegnahme schnell ab, jedoch nicht komplett auf Null zu fallen, da nach 6 Tagen die toxische Wirkung auf die Milben verzögert eintritt. Bei einer Fütterung im Bienenvolk würde das bedeuten, dass nach Behandlungsende, der Milbenfall zwar absinkt, jedoch auch nach mehreren Tagen noch eine toxische Wirkung auf die Milben möglich ist, und somit noch über den Behandlungszeitraum hinaus wirkt.

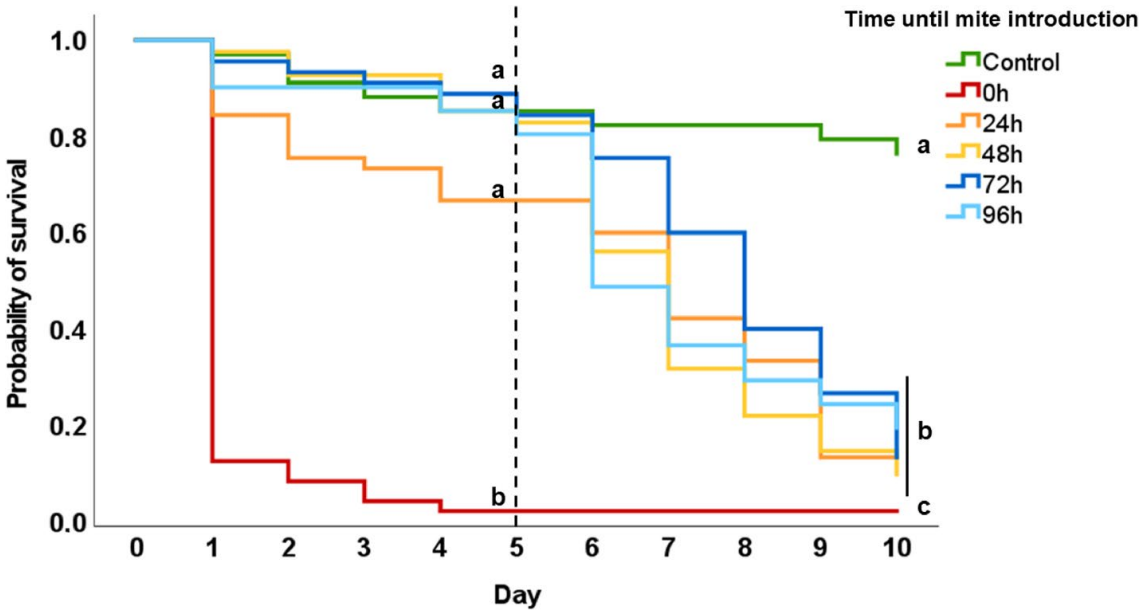

Abb. 13: Wirkdauer von LiCl nach Futterumstellung. Bienen wurden für 48h mit 50 mM LiCl Sirup gefüttert. Danach wurde das Futter auf LiCl-freien Sirup umgestellt und nach unterschiedlichen Pausen (0h – 96h) Milben dazugesetzt. Abbildung aus der Veröffentlichung Rein et al. 2024 b).

Die Analysen der Bienen-Hämolymphe zeigen, dass bereits nach einer 12-stündigen Fütterung der Bienen im Käfig ein Gleichgewicht von 5 – 8 mg/kg Lithium erreicht wird, welches zum Tod der Milbe führt. Zusammen mit den Daten zum Wirkeintritt und der Wirkdauer lässt sich zusammenfassen, dass das Lithium nach einer LiCl-Applikation möglichst schnell im gesamten Volk verteilt werden und ausreichend lange im Volk zirkulieren sollte, um möglichst in allen Bienen die für Milben tödliche Konzentration zu erreichen. Diese Konzentration sollte für etwa 48 Stunden aufrechterhalten werden, um eine Milbenmortalität von über 95% zu erreichen.

Die Ergebnisse wurden im Journal *Pest Management Science* am 17.07.2024 veröffentlich:

Rein, C., Grünke, M., Traynor, K., & Rosenkranz, P. (2024). From consumption to excretion: Lithium concentrations in honey bees (*Apis mellifera*) after lithium chloride application and time-dependent effects on *Varroa destructor*. *Pest Management Science*.

Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises:

0812 (Beschäftigte E13): Bezüge von Carolin Rein

Carolin Rein war zuständig für die Planung und Durchführung der Versuche. Darüber hinaus hat sie die Daten ausgewertet, in wissenschaftlichen Fachzeitschriften veröffentlicht und auf Tagungen präsentiert.

0822 (sonst. Beschäf.-Entgelte): wissenschaftliche Hilfskräfte

Studentische Hilfskräfte unterstützten bei der Durchführung der Versuche (v.a. Milben zählen und Probenaufbereitung)

0835 (Vergabe von Aufträgen): Excytex

Die Firma Excytex hat in Zusammenarbeit mit UHOH verschiedene Lithiumformulierungen hergestellt

0843 (Sonst. Allg. Verw. Ausg.): CFH, Futtermittel, Behandlungsmittel, Versuchskleinteile

Die CFH (Core Facility Hohenheim) analysierte den Lithium-Gehalt von Bienen- und Futterproben mithilfe der ICP-OES Methode

0846 (Dienstreisen):

Teilnahme Tagungen, Fahrten zu Bienenständen

Die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten:

Die Entwicklung eines neuen Wirkstoffes oder Verfahrens zur Bekämpfung der Varroose im Bienenvolk verläuft im Allgemeinen in zwei Phasen: Zunächst muss nachgewiesen werden, dass der (neue) Wirkstoff in Verbindung mit einem bestimmten Applikationsverfahren grundsätzlich wirksam ist und es ein Potential für den veterinärmedizinischen Markt gibt. Hier werden meist zahlreiche Versuchsansätze durchgeführt, um die erfolgversprechendste Applikation bzgl. Wirksamkeit, Nebenwirkungen und Akzeptanz beim Anwender zu ermitteln. Im zweiten Schritt müssen dann im Rahmen eines Zulassungsverfahrens mit klar definierten Dosierungen und Applikationsformen Versuche durchgeführt werden, um die o.a. Versuchsergebnisse unter standardisierten Bedingungen zu bestätigen und darüber hinaus die Unbedenklichkeit des Verfahrens für Tier, Anwender und Verbraucher nachzuweisen. Solche Versuche sind aufwendig und teuer. Bei Lebensmittel produzierenden Tieren wie den Honigbienen kalkuliert man hierfür mit Kosten von 2 – 3 Millionen Euro. Im Bereich der Imkerei ist der Markt für Veterinärprodukte allerdings deutlich kleiner als für andere Nutztiere und das wirtschaftliche Potential eines Produktes ist darüber hinaus schwieriger zu beurteilen. Um Sponsoren oder Unternehmen für ein solches Zulassungsverfahren zur Anwendung bei Honigbienen zu gewinnen, benötigt man daher belastbare Daten zu Wirksamkeit und Nebenwirkungen unter praxisnahen und feldrealistischen

Bedingungen. Dies beinhaltet sowohl Laborversuche (meist Käfigversuche mit Einzelbienen oder kleineren Gruppen von Bienen) als auch Freilandversuche mit einer größeren Anzahl an Bienenvölkern, die von Varroamilben befallen sind. Diese Versuche erfordern sowohl wissenschaftliche als auch imkerliche und labortechnische Kompetenzen. Wir konnten im Rahmen des Projektes zentrale Fragen zur Applikation (Dosierung, Wirkstoff-Konzentration, Dauer der Anwendung etc.) klären sowie Wirksamkeiten und Nebenwirkungen quantifizieren. Damit haben wir die Chancen auf die Gewinnung von Geldgebern oder eine Beteiligung von Unternehmen erheblich verbessert.

Voraussichtliche Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses - auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft:

Unsere Ergebnisse erhöhen signifikant die Wahrscheinlichkeit, dass der Imkerei mit Lithiumchlorid (oder einem anderen Lithiumsalz) in absehbarer Zeit ein neuer, effektiver und einfach anzuwendender Wirkstoff zur Bekämpfung der Varroose zur Verfügung steht. Dies wird Varroa-bedingte Verluste von Honigbienenvölkern reduzieren und zu einer Steigerung der wirtschaftlichen Erträge der Imkerei beitragen. Von Seiten der Imkerschaft besteht nach wie vor ein enormes Interesse an unseren Arbeiten mit Lithium, was sich positiv auf die Vermarktungsmöglichkeiten eines Lithium-Produktes auswirken dürfte.

Die vielversprechenden Ergebnisse unseres Projektes haben auch dazu geführt, dass sich mit „Varolis“ (https://www.varolis-apimed.de) bereits ein KMU gegründet hat, das (a) Sponsoren und/oder Fördergelder einwerben will und (b) im Spätsommer 2024 mit zwei Bieneninstituten bereits erste Feldversuche initiiert hat, deren Ergebnisse in ein Zulassungsverfahren einfließen sollen. Unsere Ergebnisse haben also bereits zu einer Verwertung im Sinne einer Firmengründung sowie einer konkreten mittelfristigen Planung für ein Zulassungsverfahren von Lithium zur Varroabekämpfung geführt.

Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen:

Die vom Bieneninstitut in Hohenheim in Kooperation mit siTools entdeckte außergewöhnliche Wirksamkeit von Lithium auf Varroamilben (Ziegelmann et al. 2018) war ein Auslöser für zahlreichen Studien anderer Arbeitsgruppen im Bereich der Bienenforschung. Die Schwerpunkte der Forschungsthemen waren Wirksamkeit verschiedener Lithium-Salze in Käfig- und Freilandtests, Nebenwirkungen auf Brut und Bienen sowie Lithium-Rückstände in Honig, Wachs

und Bienen. Die Forschergruppen sind mittlerweile nahezu weltweit verteilt mit Schwerpunkten in Osteuropa und Südamerika, wobei es in einigen Ländern Osteuropas bereits einen illegalen Markt für Lithiumpräparate gibt. Insgesamt wurden in diesen Studien die zentralen Ergebnisse unseres Projektes bestätigt: (1) Sehr gute Wirksamkeit von Lithiumsalzen auf Varroamilben, (2) Gute Verträglichkeit bei adulten Bienen, (3) Brutschäden bei Einsatz effektiver Konzentrationen bzw. Dosierungen und (4) keine problematischen Rückstände in Bienenprodukten.

Wir hatten darüber hinaus konkrete Anfragen zur Anwendung von Lithiumsalzen im Bienenvolk von nationalen Bienenforschungseinrichtungen in Israel und Neuseeland. Da wir nur für die EU und Nordamerika einen entsprechenden Patentschutz für die Anwendung von Lithiumsalzen zur Varroabekämpfung haben, könnten in diesen Ländern unabhängig von uns nationale Zulassungen etabliert werden. Wir sehen diese Aktivitäten weniger als Konkurrenz, sondern eher als Booster für unsere Zulassungsbemühungen.

Die erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 der NABF

- Bzgl. der allgemeinen Patentsituation bzgl. Anwendung von Lithiumsalzen zur Varroabekämpfung (siTools & UHOH) hat sich im Projektzeitraum nichts geändert. Die Universität Hohenheim hat beschlossen, ihren Anteil am Patentschutz weiter aufrecht zu erhalten.

- Abschlussarbeiten
    - Bachelorarbeit Julia Renz 2021
    - Bachelorarbeit Celine Uhlmann 2022
    - Dissertation Carolin Rein 2024
    - Bachelorarbeit Elisa Bischoff 2024

- Veröffentlichungen in Peer Review Journalen:
    - Rein, C., Makosch, M., Renz, J., & Rosenkranz, P. (2022). Lithium chloride leads to concentration dependent brood damages in honey bee hives (*Apis mellifera*) during control of the mite *Varroa destructor*. *Apidologie*, *53*(4), 38.
    - Rein, C., Blumenschein, M., Traynor, K., & Rosenkranz, P. (2024). Lithium chloride treatments in free flying honey bee colonies: efficacy, brood survival, and within-colony distribution. *Parasitology Research*, *123*(1), 67.
    - Rein, C., Grünke, M., Traynor, K., & Rosenkranz, P. (2024). From consumption to excretion: Lithium concentrations in honey bees (*Apis mellifera*) after lithium

chloride application and time-dependent effects on *Varroa destructor*. *Pest Management Science*.

- Präsentation der Ergebnisse auf nationalen und internationalen Tagungen
    - Vortrag 68. AG Bienentagung – 24.03.2021
    - Vortrag Imkerverein Waiblingen 10.09.2021
    - Vortrag 51. Süddeutsche Berufs- und Erwerbsimkertage 28.-31.10.2021
    - Vortrag 69. AG Bienentagung 07.04.2022
    - Vortrag Imkerverein Stuttgart 12.05. 2022
    - Vortrag Imkerverein Nagold 21.05. 2022
    - Vortrag Leipziger Tierärztekongress 07.-09.07.2022
    - Vortrag Imkerverein Crailsheim 17.07. 2022
    - Vortrag 9. EurBee Kongress in Belgrad 20.-22.09.2022
    - Vortrag Imkerverein Pfinzgau 06.10.2022
    - Vortrag Imkerverein Biberach 10.10.2022
    - Vortrag Imkerverein Gschwend 19.11.2022
    - Vortrag 70. AG Bienentagung 30.03.2023
    - Vortrag Imkerverein Kirchheim Teck 28.07. 2023
    - Vortrag Imkerverein Riedlingen Alleshausen 04.10.2023
    - Vortrag Imkerverein Oberer Pfinzgau 19.10.2023
    - Vortrag American Bee Research Conference in New Orleans – 09.-12.01.2024
    - Vortrag Imkerverein Westerhausen 13.10.2024
    - Vortrag Imkerverein Frankfurt 27.10.2024