

# **AUSWIRKUNGEN VON NEEMAZAL-T/S AUF DIE BRUT VON HONIGBIENENVÖLKERN (*APIS MELLIFERA CARNICA* L., HYMENOPTERA, APIDAE). ERGEBNISSE EINES HALBFREILANDVERSUCHES.**

**BORIS LEYMANN (1), WERNER MÜHLEN (2), ALOIS EDELMANN (1)**

(1) Universität Bielefeld, Fakultät Biologie, Abteilung Morphologie und Systematik der Tiere, Morgenbreite 45, D-33501 Bielefeld, Germany

(2) Landwirtschaftskammer Westfalen-Lippe, Institut für Pflanzenschutz, Saatgutuntersuchung und Bienenkunde (IPSAB), Nevinghoff 40, D-48 147 Münster

## **Zusammenfassung**

*NeemAzal-T/S wurde bei der Honigbiene (*Apis mellifera* L.) im Halbfreilandtest auf brutschädigende Wirkungen geprüft. In den drei Versuchsgliedern wurde neben NeemAzal-T/S als Referenzmittel Alsystin WP 25 ausgebracht. Die Kontrolle wurde nur mit Wasser behandelt. Es wurden zwei Wiederholungen durchgeführt. Individuelle Brutzellen wurden in ihrem Entwicklungsverlauf beobachtet. Eine prozentuale Unterteilung in geschädigte und normalentwickelte Zellen machte eine Einstufung der Brutschädigung der Pflanzenschutzmittel möglich. Im Zeltversuch konnte für NeemAzal-T/S weder eine brutschädigende Wirkung noch eine akute Toxizität nachgewiesen werden.*

## **Einleitung**

Da NeemAzal-T/S auf Entwicklungsstadien von Insekten wirkt, liegt die Vermutung nahe, daß dieses Produkt auch auf die Entwicklungsstadien von Honigbienen wirken könnte. Laborversuche zur Toxizität von Pflanzenschutzmitteln (Czoppelt 1991, Wittmann 1982) sowie qualitative Fütterungsversuche (Oomen und de Ruijter 1992) und Halbfreiland- bzw. Freilandversuche (Mühlen 1996) lassen keine Einschätzung der tatsächlichen Gefährdung der Brut in Bienenvölkern zu. Aufbauend auf der bei Mühlen (1996) beschriebenen Methode sowie auf der Grundlage der EPPO-Guideline 170 (OEPP/EPPO 1992) und dem Decision making Scheme (OEPP/EPPO 1993) wurde eine Testmethode entwickelt, die es erlaubt, den Einfluß von Insektenwachstumsregulatoren (IGR) auf die Entwicklung von Honigbienenvölkern quantitativ zu beschreiben.

## **Material und Methode**

Für die Versuche wurden folgende Substanzen und Aufwandmengen ausgewählt:

- Prüfmittel: NeemAzal-T/S:  
NeemAzal-T/S (Trifolio - M) mit dem Wirkstoff Azadirachtin A ist für adulte Honigbienen nicht toxisch. Es wird allerdings vermutet, daß NeemAzal-T/S auf Entwicklungsstadien der Bienen einen hemmenden Effekt ausübt.  
NeemAzal-T/S wurde mit der verdoppelten, höchsten zuzulassenden Aufwandmenge von 6,0 l auf 400 l Wasser/ha getestet.

- Referenzmittel: Alsystin WP 25:

Alsystin WP 25 (Bayer, Leverkusen) mit dem Wirkstoff Triflumuron besitzt eine bekannte brutschädigende Wirkung und wurde in der vorliegenden Studie in erhöhter Dosis mit 800 g in 400 l Wasser/ha ausgebracht (Faktor 10 nach Schmidt, Bayer, Ringversuch AG Bienenschutz 1994) (siehe auch MÜHLEN 1996).

- Kontrolle: Wasser:

Die Kontrolle wurde mit 400 l Wasser behandelt, da die Formulierungen in wäßriger Lösung ausgebracht werden.

Für die Versuche wurden Großzelte, sogenannte Tunnelzelte, angefertigt. Die Größe der Tunnelzelte betrug 12 m x 4 m x 2 m (L x B x H). Dies entspricht einer Grundfläche von 48 m<sup>2</sup> und einem Raumbvolumen von 96 m<sup>3</sup>.

Der Boden des Innenrandes der Tunnelzelte war mit Schattierungsleinen von 30 cm Breite ausgelegt. Dieser Randbereich diente zur Registrierung der Mortalität im Zelt. Vor den Bienenvölkern wurden Gary-Fallen eingesetzt. Gary-Fallen sind Rückhalte-Systeme für die im Stock gestorbenen Bienen. Diese Fallen bestanden aus einem seitlich bienendicht geschlossenen Drahtkäfig mit einer Maschenweite von 3 mm und einem bienendurchlässigen Deckel mit 8 mm Maschenweite. Abfliegende Bienen konnten durch diese weiten Maschen im Deckel der Falle den Bienenstock verlassen. Im Stock gestorbene Bienen sammelten sich auf dem Boden der Fallen und wurden hier zu den Boniturzeiten abgesammelt und registriert.

Ein Flugaktivitätsmessgerät (BeeSCAN) wurde in den Zelten eingesetzt (STRUYE et. al. 1994). Das BeeSCAN-Gerät ist eine microprozessorgesteuerte Einheit, die über Lichtschranken den Ein- und Ausflug von Honigbienen am Stock registriert. Es ist möglich, das individuelle Flugaktivitätsmuster der Prüfvölker im Tageslauf zu dokumentieren. Die Differenz der Ein- und Ausflüge gibt die tatsächlichen, absoluten Bienenverluste pro Tag wieder. Es kann sichergestellt werden, daß tatsächlich eine Spritzung in den vollen Bienenflug gegeben ist. Ferner können Repellenteffekte mit diesem Gerät dokumentiert werden. Anhand der Flugdaten kann im Vergleich der Versuchsglieder das Verhalten und die Mortalität zur Beurteilung des Pflanzenschutzmittels herangezogen werden.

Als Versuchsvölker wurden in jedes Großzelt weiselrichtige Kleinstvölker in Schaukästen mit jungen Brutstadien eingestellt. Die Größe der Versuchsvölker betrug etwa 4 000 Bienen.

Die Schaukästen erlaubten es, die Brutnester der Völker ohne Öffnen der Beuten beobachten zu können. Jeweils zwei Waben Deutsch-Normal-Maß (DNM: 35,4 cm x 20,7 cm; ca. 7 dm<sup>2</sup> je Wabenseite, ges. 14,6 dm<sup>2</sup>) waren übereinander angeordnet und von beiden Seiten durch eine Glasscheibe geschützt. Durch die Glasscheiben war es möglich, direkt auf die Waben bzw. in die Brutzellen zu blicken, ohne die Völker öffnen oder Waben entnehmen zu müssen. Dies verhinderte ein zu starkes Auskühlen des Brutnestes während der Bonituren und beunruhigte die Bienen nicht wesentlich. Zwei mit Isoliermaterial ausgekleidete Holzklappen deckten die Glasscheiben ab.

Das Brutnest wurde zur besseren Übersicht auf eine Wabe beschränkt. Als obere Wabe wurde eine frisch ausgebaute, helle Wabe ausgewählt, um die Eier und junge Maden am Grunde der Zellen besser erkennen zu können. Diese Wabe wurde mindestens fünf Tage vor Behandlung eingehängt, damit Eier und junge Maden als

empfindlichste Brutstadien zum Zeitpunkt der Applikation vorhanden waren (worst case conditions). Als untere Wabe wurde eine volle Honigwabe eingesetzt. Diese Honigwabe war größtenteils verdeckelt. Die Verdeckung hält die Bienen davon ab, sofort auf diesen Honig zuzugreifen. Bei Futterengpässen stellt sie allerdings eine Reserve dar. War keine Futterwabe vorhanden, wurde statt dessen eine Futtertasche mit Futterteig eingesetzt. Eine natürliche Tracht wird dem Futterteig jederzeit vorgezogen.

Als Versuchspflanzen wurden Phacelia (*Phacelia tanacetifolia* Benth.) sowie Raps (*Brassica napus*) gewählt. Beide Testpflanzen besitzen sehr lange Blühperioden. Die Antheren in den Blüten stehen über den Kelchen. Dies stellt ideale Prüfbedingungen (worst case conditions) dar, da bei Applikation auch der für die Ernährung der Brut wichtige Pollen von der Spritzbrühe getroffen wird.

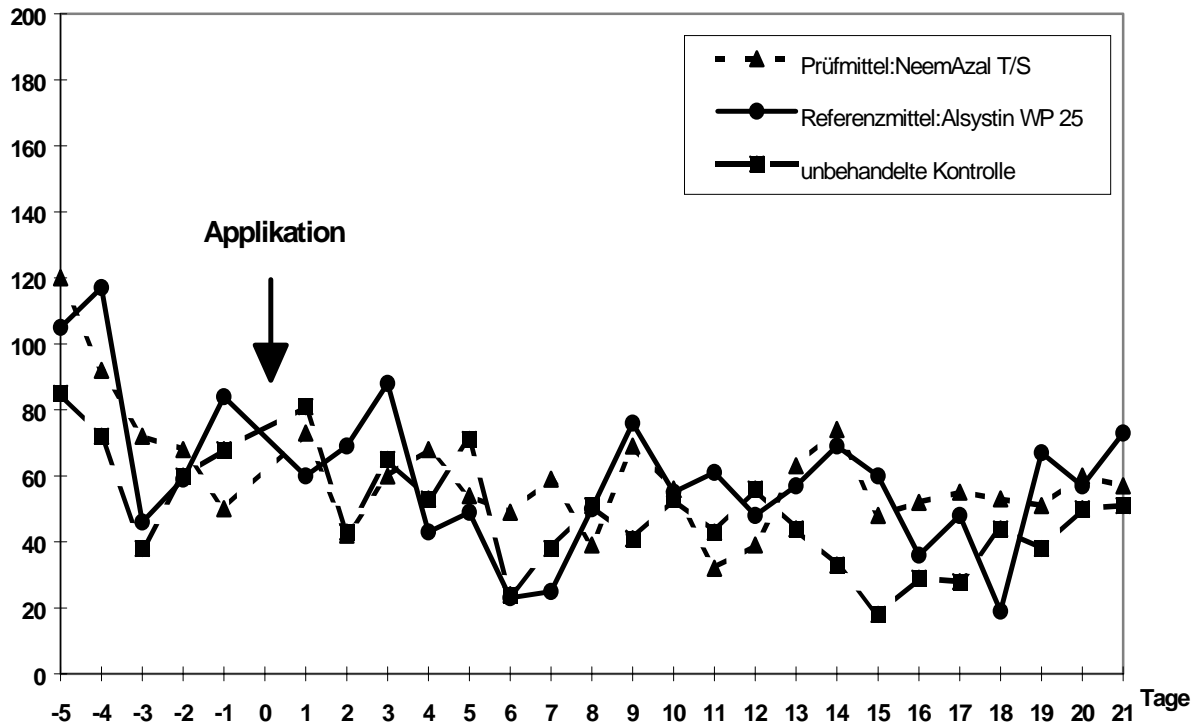
Auf Overhead-Folien wurde festgehalten, in welchen Entwicklungsstadien sich die verschiedenen Zellen auf der Brutwabe befanden. Die Folie wurde auf der Glasscheibe des Beobachtungsstocks über das Brutnest gebracht und hier fixiert. Kurz vor Applikation wurden auf der Brutwabe jeweils ca. 100 Eizellen und jüngste Maden (Alter 1-3 Tage) individuell auf der Folie markiert. Durch die Folie und die Glasscheibe wurden die Zeichen für die verschiedenen Brutstadien mit einem roten Folienschreiber auf die Folie gezeichnet. Die genaue Position der Zellen wurde später auf eine zweite Folie übertragen. Diese Folie stellte nun die Schablone für die nächsten Zählungen dar. Sie wurde 21 mal auf Folie kopiert. Eine dieser Folien diente bei der Auswertung als Zählschablone. Hier wurden Zahlen mit grünem Folienschreiber eingetragen, durch die die Zellen für die Auswertung individuell numeriert wurden. Die Entwicklung individuell markierter Zellen ließ sich so verfolgen und bewerten.

## **Ergebnisse**

### ***Mortalität adulter Bienen:***

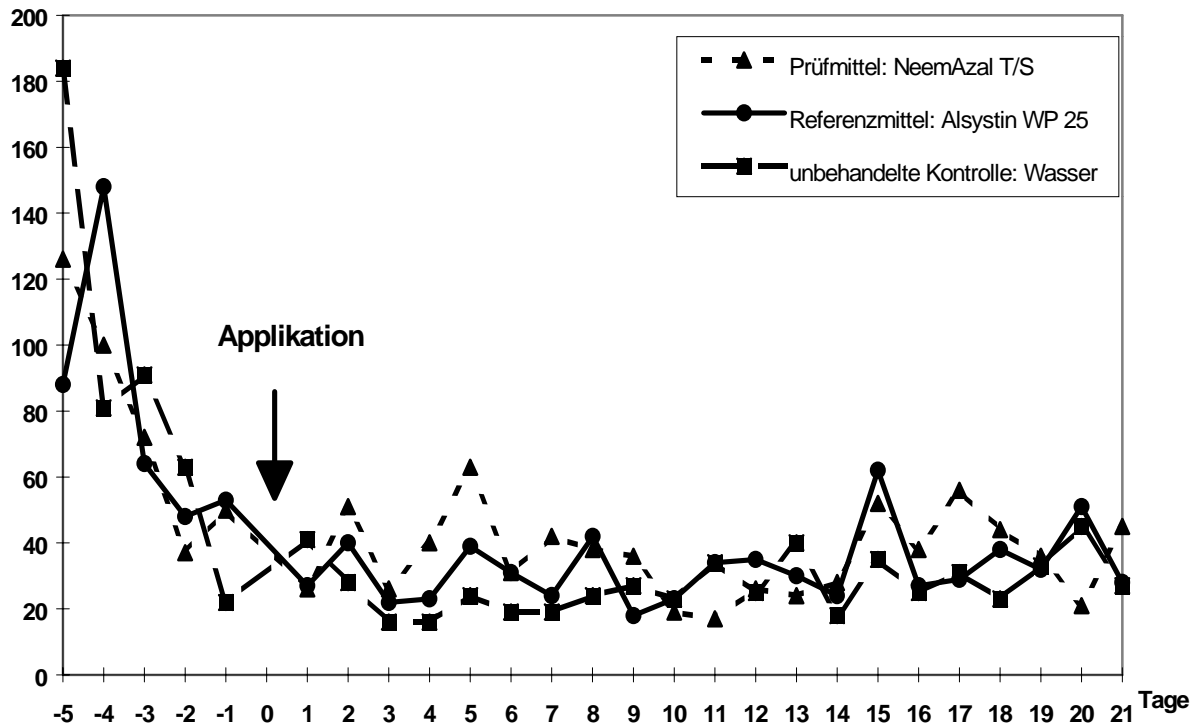
Der tägliche Totenfall wurde mindestens fünf Tage vor Applikation aufgenommen. Die erhöhten Werte der ersten zwei Tage in Graphik I. und II. sind dem erhöhten Decken- und Eckenflug älterer Flugbienen zuzuschreiben. Diese alten Flugbienen konnten sich nicht an die neue Situation im Zelt gewöhnen. Nach Applikation der Mittel ergaben sich keine signifikanten Änderungen im täglichen Totenfall. Er schwankt um 40 bis 50 Bienen pro Tag. Eine akute Toxizität kann also ausgeschlossen werden. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Flugaktivität, unterliegt auch die täglich registrierte Mortalität normalen, witterungsbedingten Schwankungen.

Anzahl Bienen



Graphik I: Mortalitätsraten adulter Bienen in der 1. Wiederholung

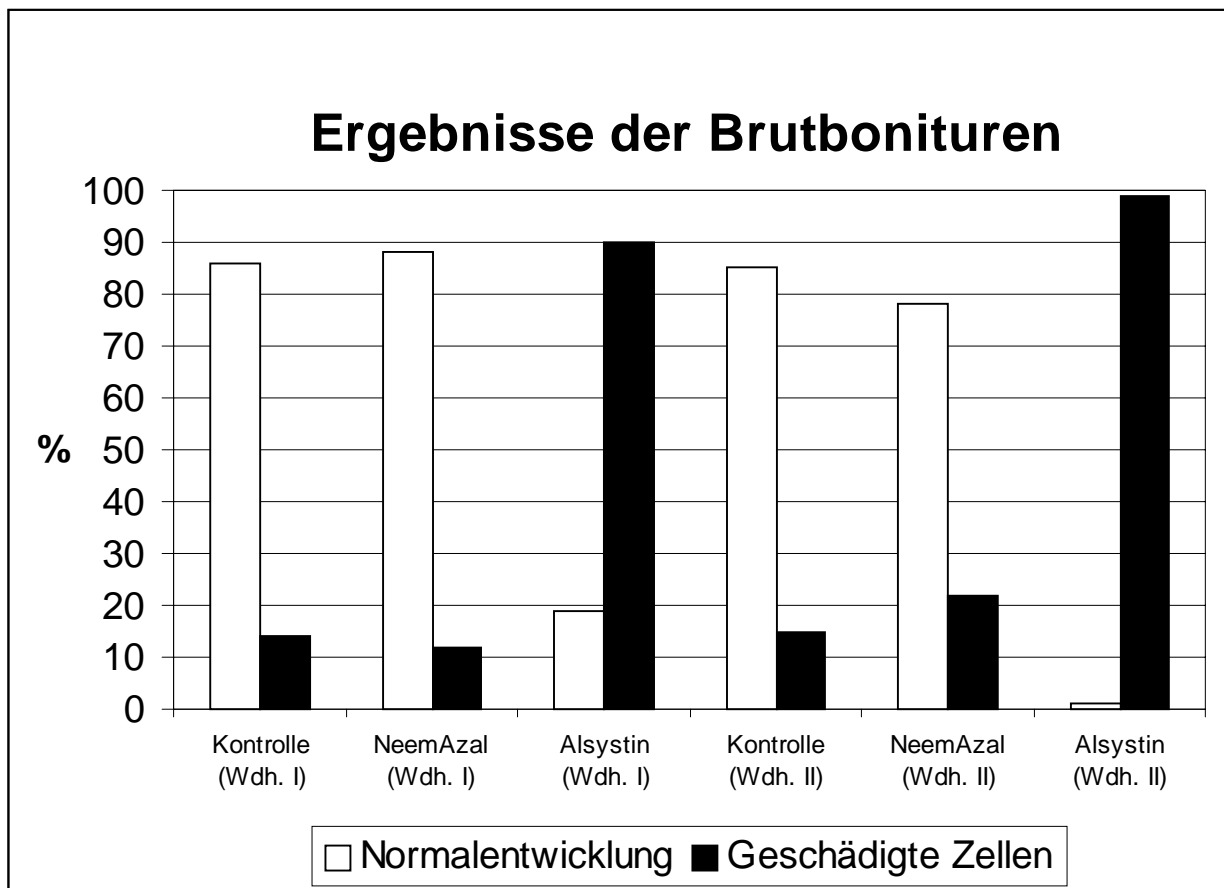
Anzahl Bienen



Graphik II: Mortalitätsraten adulter Bienen in der 2. Wiederholung

**Tabelle I:** Brutkontrolle Halbfreilandprüfung

<b>1. Wiederholung</b>			
<i>Kontrollierte Zellen</i>	Prüfmittel: <b>NeemAzal-T/S</b>	Vergleichsmittel: <b>Alsystin WP 25</b>	unbehandelte <b>Kontrolle</b>
Gesamtzahl Zellen	<b>153</b>	<b>187</b>	<b>189</b>
Normale Entwicklung	133	18	162
Abgestorbene Zellen	20	169	27
Normale Entwicklung (%)	86,9	9,6	85,7
Abgestorbene Zellen (%)	13,1	90,4	14,3
<b>2. Wiederholung</b>			
<i>Kontrollierte Zellen</i>	Prüfmittel: <b>NeemAzal-T/S</b>	Vergleichsmittel: <b>Alsystin WP 25</b>	unbehandelte <b>Kontrolle</b>
Gesamtzahl Zellen	359	359	128
Normale Entwicklung	282	2	109
Abgestorbene Zellen	77	358	19
Normale Entwicklung (%)	78,6	0,6	85,2
Abgestorbene Zellen (%)	21,4	99,4	14,8
<b>Mittelwerte aus 1. und 2. Wiederholung</b>			
Mittelwert norm. Z. (%)	82,8	5,1	85,5
Mittelwert abgest. Z. (%)	17,2	94,9	14,5



**Graphik III:** Ergebnisse der Brutbonituren aus 1. und 2. Wiederholung

### **Mortalität in der Bienenbrut:**

Tabelle I zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse der Brutbonituren. Ausgezählt wurden einzelne Zellen, deren Entwicklung bewertet wurde. In der Kontrolle entwickelten sich in der ersten Wiederholung 85,7% der Brutzellen normal. In der zweiten Wiederholung waren es 85,2% der beobachteten Zellen. 14% der Brutzellen starben in der Kontrolle ab (1. Wdh.: 14,7%; 2. Wdh.: 14,8%).

Bei Behandlung mit NeemAzal-T/S entwickelten sich 86,9% der Bienen in der ersten Wiederholung normal, in der zweiten Wiederholung waren es 78,6%.

Die Behandlung mit Alsystin WP 25 führte zu einem sehr hohen Brutverlust von 90,4% in der ersten und 99,4% in der zweiten Wiederholung. Geschädigte Zellen wurden zu einem großen Teil erst sehr spät, oft Tage nachdem der Zelldeckel eingefallen war, ausgeräumt. Die toten Larven und Puppen befanden sich in sehr unterschiedlichen Entwicklungsstadien.

Graphik I zeigt die relativen Anteile der geschädigten und normalentwickelten Zellen. Die Werte der Kontrolle stimmen mit Literaturwerten von 15 bis 20% Brutverlust bei unbehandelten Völkern gut überein. Die Werte des Prüfmittels entsprechen den Werten der Kontrolle. Die Referenzsubstanz führt fast zu einem vollständigen Brutverlust.

Die Versuchsvölker beflogen ruhig und gleichmäßig den Pflanzenbestand. Ein Repellenteffekt in Form von Meidung der Versuchsfläche konnte nicht beobachtet werden.

Eine akute Toxizität von NeemAzal-T/S wurde nicht beobachtet. NeemAzal-T/S kann auf der Grundlage dieses Tests daher als „bienenungefährlich“ eingestuft werden.

### **Literatur**

- CZOPPELT, CH. 1991: Toxizitätsmessungen mit dem Juvenoid Fenoxicarb an Bienenlarven im in vitro Aufzuchttest. *Apidologie* **22**, 457-459.
- GARY, N. E. 1960: A Trap to quantitatively recover dead and abnormal honeybees from the hive. *Journal of Economic Entomology* Bd.53, H.5, S. 782-785.
- MÜHLEN, W., 1996: Implications of the IGR Alsystin WP 25 on the Development of Honeybee Colonies under Field and Semi-Field Conditions. Proc. of the 6th International Symposium on Hazards of Pesticides to Bees. Braunschweig.
- OEPP/EPPO 1992: Guideline on Test Methods for Evaluating the Side-Effects of Plant Protection Products on Honeybees. *Bulletin OEPP-EPPO Bulletin* **22**, 203-216.
- OEPP/EPPO 1993: Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products. *Bulletin OEPP-EPPO Bulletin* 151-165.
- OOMEN, P.A., DE RUIJTER, A., VAN DER STEEN, J. 1992: Method for Honeybee Brood Feeding Tests with Insect Growth-Regulating Insecticides, *Bulletin OEPP-EPPO Bulletin*, **22**, 613-616.
- STRUYE, M.H., MORTIER, H.J., ARNOLD, G., MINIGGIO, C. UND BORNECK, R. 1994: Microprocessor-controlled Monitoring of Honeybee Flight Activity at the Hive Entrance. *Apidologie* **25**, 384-395.

WITTMANN, D. 1982: Entwicklung von Testverfahren und Experimente zur Beurteilung von Insektizid - Wirkungen auf Bienenlarven. Dissertation, Universität Tübingen