



Akute Vergiftung der Hummel *Bombus terrestris* (LINNAEUS, 1758) durch drei Pestizide und deren Kombination

A. WAIBEL, W. SCHÜHLY, J. HERNÁNDEZ-LÓPEZ, U. RIESSBERGER-GALLÉ,
V. STROBL & K. CRAILSHEIM

Abstract: Acute Toxicity Effects of three Pesticides and their Combinations on *Bombus terrestris* (LINNAEUS, 1758). Bumblebees are valuable pollinators and, like honeybees, contribute to crop production worldwide. During pollination, they come into contact with pesticides, which affect their vitality and behaviour. Moreover, the applications of pesticide mixtures in agriculture increase exposure risks to many animals, including insects. In this study, *Bombus terrestris* workers were fed with imidacloprid, cypermethrin and dimethoate, either as single compounds or as mixtures. Each pesticide was tested at the LD₅₀ values found in the literature and in near concentrations to these, as well as at 1/10 of the experimentally evaluated LD₅₀, including one to four replicates per pesticide or pesticide combination. The effect on worker mortality was documented after 24h and 48h, respectively. For these experiments, individuals from different colonies with nearly the same weights were used as subjects and were marked to trace their origin. The statistical strength of the results were verified by applying Mann-Whitney-U tests. A dramatically higher mortality rate was observed in the LD₅₀ experiments that included combinations of the three pesticides, even at the minimal dosage of 1/10 of the full LD₅₀ value. This study also alludes to the inherent difficulties of measuring LD₅₀ values. LD₅₀ values found in the present experiments were much higher than those reported in the literature. The results obtained support the hypothesis that pesticide combinations are responsible for higher mortality rates supposedly through synergistic effects.

Key words: Insektizide, Apidae, Mortalität, Imidacloprid, Cypermethrin, Dimethoat

Citation: WAIBEL A., SCHÜHLY W., HERNÁNDEZ-LÓPEZ J., RIESSBERGER-GALLÉ U., STROBL V. & CRAILSHEIM K. 2016: Akute Vergiftung der Hummel *Bombus terrestris* (LINNAEUS, 1758) durch drei Pestizide und deren Kombination. – Entomologica Austriaca 23: 97–107.

Einleitung

Ermöglicht durch hochentwickelte Technik werden heutzutage enorme Mengen an Agrargütern produziert, die den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln, insbesondere Insektiziden, als ein notwendig zu erachtendes Übel erscheinen lassen. Insektizide wirken nicht nur auf die Zielorganismen (Schadinsekten), sondern schädigen oder beeinflussen potentiell alle Insekten, die in der Biosphäre ein Expositionsrisiko tragen.

Hummeln werden bereits seit einiger Zeit von z. B. Gemüseproduzenten als Bestäuber in Glashäusern verwendet. Sie tragen dort wesentlich zum wirtschaftlichen Erfolg bei; allein in den Niederlanden wurden im Jahr 2000 ca. 40.000 Hummelkolonien als Bestäuber in künstlichen Anlagen verwendet (VAN DER STEEN 2001). Somit haben Hummeln hinsichtlich ihrer Bestäubungsaktivitäten neben der ökologischen auch eine wirtschaftliche Bedeutung.

Die aktuelle Diskussion um eine Gruppe von Pestiziden – die sogenannten „Neonikotinoide“ – wurde durch Hilferufe der Imker in Gang gesetzt, die diese Stoffgruppe zumindest zum Teil als Verursacher des „Bienensterbens“ in Verdacht hatten (PISTORIUS et al. 2009). Bei Honigbienen (*Apis mellifera*) ist es vergleichsweise einfach, Verluste der Tiere zu registrieren, da sie von Menschen gehalten werden. Bei Hummeln und Wildbienen ist dies gemeinhin nicht der Fall. Während zum Einfluss von Pestiziden auf Honigbienen mittlerweile eine Fülle von Studien publiziert wurde, ist der Einfluss von Pestiziden auf Hummeln weniger gut erforscht (TASEI et al. 2000, WHITEHORN et al. 2012). Insbesondere zur Wirkung kombinierter Pestiziddosen existieren nur sehr wenige Untersuchungen (GILL et al. 2012).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, wie sich drei verschiedene Gifte – aus den Gruppen der Neonikotinoide, Pyrethroide und Organophosphate auf die Vitalität von Arbeiterinnen der Dunklen Erdhummel (*Bombus terrestris*) auswirken, wenn diese zeitgleich aufgenommen werden. Da jedes Insektizid anders wirkt und um einen Richtwert der Menge für jedes Pestizid zu erhalten, musste zuvor für jeden der drei verwendeten Stoffe die LD_{50} (letale Dosis 50 %) ermittelt werden.

Hummeln sind ihren Verwandten, den Honigbienen, bei oberflächlicher Betrachtung in vielen Aspekten ähnlich, jedoch gibt es auch einige hier aufgeführte Unterschiede. Hummelvölker sind generell viel kleiner als Bienenvölker; je nach Art kann die Größe des Volkes zwischen 20 (*Bombus pascuorum*, *Bombus sylvarum*) und 400 (*Bombus terrestris*, *Bombus lapidarius*) Tieren variieren. Der Verlust eines Tieres für ein Hummelvolk ist daher schwerer zu verkraften als für ein Bienenvolk, das leicht mehr als 25.000 Tiere umfassen kann. Die Arbeitsteilung im Nest erfolgt nicht wie bei den Bienen nach dem Alter der Tiere, sondern nach deren Größe. Kleinere bzw. leichtere Hummelarbeiterinnen kümmern sich um die Brut, während größere Tiere als Sammlerinnen fungieren. Hummeln bauen keine Wachswaben und produzieren weniger Honig. Die Eier werden in einen Klumpen aus Pollen und Nektar gelegt und mit einer Wachssubstanz überzogen. Um die Entwicklung der Brut zu beschleunigen, brüten die Königin und in weiterer Folge Arbeiterinnen auf diesen Brutklumpen (GOULSON 2010). Direkte Fütterkontakte zu Larven gibt es nicht.

Es gibt zwei große Gruppen von Pestiziden, systemische und nicht-systemische. Bei der Anwendung von Pestiziden müssen viele Faktoren wie z. B. Tageszeit und Witterung beachtet werden, damit kein zusätzlicher Schaden entsteht oder der Stoff seine Wirkung verliert.

Das wohl bekannteste der drei verwendeten Pestizide ist Imidacloprid, ein Neonikotinoid. Neonikotinoide werden mitverantwortlich gemacht für die teils hohen Völkerverluste und das Phänomen der „Colony Collapse Disorder“ (CCD), den Zusammenbruch ganzer Bienenvölker. Imidacloprid ist systemisch und wirkt sowohl bei Kontakt als auch durch gastrointestinale Aufnahme.

Bei Kontakt mit niedrigen Imidacloprid-Konzentrationen kommt es oftmals zu subletalen Effekten auf die Individuen. Die Tiere sterben nicht, doch sie werden auf unterschiedliche Weise in ihrem Verhalten und ihrer Physiologie beeinflusst und beeinträchtigt. Zahlreiche Studien beschäftigten sich mit den subletalen Effekten von Imidacloprid v. a. auf Honigbienen (*A. mellifera*), jedoch gibt es vergleichsweise wenig Literatur zu den Effekten auf *Bombus*-Arten (BLACQUIÈRE et al. 2012). Seit 1.12.2013 ist die Anwendung von Imidacloprid EU-weit verboten, in Österreich gilt das Verbot seit 1.10.2013 (EUROPEAN COMMISSION 2013).

Das zweite hier verwendete Insektizid ist α -Cypermethrin. Dieses Insektizid gehört zur Gruppe synthetischer Pyrethroide und wirkt nicht-systemisch. α -Cypermethrin ist wie Imidacloprid ein Nervengift; es löst multiple Nervensignale aus und veranlasst in weiterer Folge benachbarte Nervenstränge zur Signalleitung. Zusätzlich wird das Enzym Monoaminooxidase inhibiert, das für den Abbau von Neurotransmittern mitverantwortlich ist. In Kombination mit anderen Pestiziden (v. a. Organophosphate) kann α -Cypermethrin noch toxischer wirken (MARTIN et al. 2003).

Pyrethroide wirken bei niedrigen Temperaturen toxischer und werden deshalb in der Früh oder am Abend ausgebracht, um die Effizienz der Anwendung zu steigern. Aus diesem Grund sind Hummeln besonders stark mit dieser Stoffgruppe belastet, da sie früher ausfliegen als Honigbienen und bis in die späten Nachmittagsstunden aktiv sind. Pyrethroide sind für Hummeln ähnlich giftig wie für Honigbienen. Insbesondere im Frühling, wenn die jungen Königinnen geeignete Nistplätze suchen und ein Volk gründen, sind Verluste von Tieren für die Population besonders drastisch (THOMPSON 2001).

Dimethoat ist das dritte Insektizid, das verwendet wurde, es gehört zur Stoffgruppe der Organophosphate und wirkt systemisch. Veröffentlichte Studien über subletale Effekte von Dimethoat auf Hummeln oder Honigbienen sind relativ rar.

Material und Methoden

Um Anhaltspunkte für die Dosen der einzelnen Pestizide und somit ihrer Verhältnisse zueinander im Futter zu bekommen, musste vor dem Versuch die LD_{50} für jedes Pestizid überprüft bzw. bestimmt werden. Die Vorversuche dienten somit der Ermittlung eines LD_{50} -Wertes, der dann in den Kombinationsexperimenten verwendet werden konnte. Ausgangspunkt für die Austestung der LD_{50} bildeten für Imidacloprid und Dimethoat LD_{50} -Werte aus MARLETTO et al. (2003), für α -Cypermethrin wurden LD_{50} -Werte aus THOMPSON (2001) zugrundegelegt.

Die im praktischen Teil durchgeführten Experimente beruhen auf einer Modifikation der unter der OECD-Richtlinie Nummer 213 aus dem Jahr 1998 und der EFSA Richtlinie von 2013 dargestellten Expositionsversuche an Bienen und Hummeln (EFSA 2013, OECD guideline No. 213. 1998) und auf einem bereits bestehenden Leitfaden (OOMEN & PISTORIUS 2014). Auf einzelne Abweichungen wird hingewiesen. Die Ergebnisse wurden mittels SPSS 20.0 anhand eines Mann-Whitney-U-Test auf ihre Signifikanz ($p < 0,05$) geprüft. Für die Versuche wurden für jede Behandlungsart 10 Sammlerinnen (vorzugsweise mit Pollenhöschchen als Nachweis der Sammelaktivität) von *B. terrestris* am Vorabend des Ver-

suchstages vor dem Einflugloch der Stöcke mithilfe eines Handsaugers abgefangen. Der an den Corbiculae der Hintertibien der Tiere befindliche Pollen wurde vor der Unterbringung in den Käfigen komplett entfernt, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden, da die Tiere eventuell Futter aus Pollen beziehen können (OOMEN & PISTORIUS 2014). Besonders schwere oder sehr leichte Tiere wurden von den Untersuchungen ausgeschlossen, da diese gewichtsabhängig unterschiedlich empfindlich auf Pestizide reagieren (VAN DER STEEN 1994). Aufgrund der erheblichen interindividuellen Unterschiede der Mengen chronisch aufgenommener Nahrung erwies sich eine chronische Verabreichung der Pestizide als nicht praktikabel und auch deshalb, weil keine Korrelation mit dem Gewicht der Arbeiterinnen sichtbar wurde. Aus diesen Gründen wurden die Tiere akut belastet.

Es wurden stets Individuen mehrerer Völker (Volk A–G) gleichzeitig verwendet, um ausschließen zu können, dass die Mortalität in den Versuchen durch volksinterne Faktoren beeinflusst wurde. Einige Völker wurden im Institutsgebäude mit Zugang ins Freie (A, D, F) gelagert, während die restlichen Völker (B, C, E, G) überdacht im Freien standen. Alle Völker hatten stets Zugang ins Freie. Der mögliche Verwendungszeitraum für die einzelnen Völker lag zwischen 3–5 Wochen.

In jedem der Akut-Ansätze wurden 10 Tiere pro Behandlungsdosis individuell markiert und in Nicot cupkit® honey bee queen emergence cages (Königinnenaufzucht Käfige für Honigbienen) über Nacht zwischen 14 und 22 Stunden im Brutkasten bei ca. 24°C akklimatisiert (OOMEN & PISTORIUS 2014). Vor der Überführung der Tiere in die Königinnenkäfige wurden sie für 10–15 Minuten gekühlt. Durch die Kälte wurden die Tiere langsamer und konnten stressfreier markiert und in die Käfige eingebracht werden. Diese Methode wurde der Anästhetisierung mit CO₂ und der Arbeit unter Rotlicht vorgezogen (OOMEN & PISTORIUS 2014).

Während der Akklimatisierungsphase wurde allen Tieren 50%ige Saccharoselösung ad libitum zur Verfügung gestellt. Dies wurde über Nacht durchgeführt und diente dazu, für alle Individuen die gleichen Ausgangsbedingungen zu schaffen und um zu garantieren, dass sie genügend Energiereserven hatten, bevor der Durchgang gestartet wurde. Zusätzlich diente die Akklimatisierung der Aussonderung schwacher Tiere, weshalb die Zahl der Individuen pro Ansatz und Pestizid nicht immer bei 10 lag, denn nicht alle Hummeln überlebten diese Phase. Die relative Luftfeuchtigkeit im Brutkasten (Umgebung in Dunkelheit) lag stets bei ca. 60%. 50% Saccharoselösung (w/v) konnten die Tiere aus einer Spritze beziehen. Um der kurzrüsseligen *B. terrestris* eine unterbrechungsfreie Nahrungsaufnahme zu ermöglichen, mussten die Spitzen um etwa die Hälfte eingekürzt werden, da die Saccharoselösung zu viskos ist, um in das dünne Rohr einer Spritze nachzuffießen. Nach der Akklimatisierung wurden die Tiere zwei- bis zweieinhalb Stunden nüchtern gesetzt, da sie ohne vorausgehenden Futterentzug die pestizidhaltige Saccharoselösung lange nicht aufgenommen hätten. Diese Tiere hätten dann nicht in die Auswertung miteinbezogen werden können. Anders als im Leitfaden von OOMEN & PISTORIUS (2014) angegeben, war es nicht möglich, die Tiere länger als zweieinhalb Stunden hungern zu lassen, da dies viele nicht überlebten. Die Arbeitsschritte wurden bei Tageslicht durchgeführt. Bei Wartezeiten in der Hungerphase und der darauf folgenden Belastungsphase, in der die Hummeln die Pestizid-Zuckerlösung zu sich nahmen, wurden die Tiere in den Brutkasten zurückgegeben.

Die Verfütterung der pestizidhaltigen Zuckerlösung erfolgte akut. Den Hummeln wurde einmalig eine gewisse Menge an Pestizid-Zuckerlösung angeboten, danach wurde ihnen wieder reine 50%ige Saccharoselösung zur Verfügung gestellt.

In den Vorversuchen wurden die verwendeten Konzentrationen der einzelnen Gifte für die Kombinationsversuche ermittelt. Die Pestizide wurden täglich frisch aus einer Stammlösung (1 mg/ml) in Aceton auf entsprechende Verdünnungen in Wasser verdünnt und der Zuckerlösung zugegeben. Alle drei Insektizide wurden pro Ansatz an 7 bis 10 Hummeln in verschiedenen Konzentrationen in 20 µl 50%iger Saccharoselösung verfüttert. Hier musste die Methode der Leitfäden ebenso angepasst werden: Bei einer Futtermenge von 10 µl verhungerten einige Tiere in der Zeit, während bei einer Menge von 40 µl (OOMEN & PISTORIUS 2014) die Lösung fast nie vollständig aufgenommen wurde. Kontrollen wurden mit Aceton und Aqua dest. durchgeführt, da die Substanzen in Aceton und destilliertem Wasser gelöst worden waren und die Hummeln somit auch geringe Mengen davon aufgenommen hatten. Die Kontrollen wurden nur als gültig gewertet, wenn nach 48 Stunden weniger als 10 % Mortalität verzeichnet wurde. Nach der Belastungsphase kamen alle Tiere eines Durchganges, die dasselbe Pestizid verabreicht bekommen hatten (im Idealfall 10 Individuen, aufgrund der Mortalität während der Akklimatisierungsphase oft weniger als 10), gemeinsam in größere Käfige, wo sie die Möglichkeit hatten zu fliegen und mit anderen Individuen in Kontakt zu kommen. Ab diesem Zeitpunkt wurde ihnen wieder reine 50%ige Saccharoselösung zur Verfügung gestellt.

Im Gegensatz zu Honigbienen ist es bei den Hummeln nicht möglich, die Tiere von Anfang an bereits in der Belastungsphase gemeinsam in einem größeren Käfig zu halten, weil die konsumierte Dosis pro Individuum bei gemeinsamer Fütterung nicht ermittelbar ist (VAN DER STEEN 2001).

Nach Überführung der Individuen in die größeren Becherkäfige wurde die Mortalitätsrate in festgelegten Abständen (4 Std., 24 Std., 48 Std.) ab dem Endzeitpunkt der Belastungsphase beobachtet und notiert. Ein längerer Beobachtungszeitraum kann besonders bei Versuchen mit Organophosphaten (hier: Dimethoat) wichtig sein, da sich bei dieser Stoffgruppe der Effekt mit der Zeit verstärken kann (VAN DER STEEN 2001). Zeichnete sich eine Annäherung an einen LD_{50} -Wert ab, wurde diese Dosis in mehreren Durchgängen verfüttert.

Für die Kombinationsversuche der Pestizide wurde das gleiche Versuchsschema, jedoch mit dem entsprechenden Pestizid-Mix, angewendet. Folgendes Mengenverhältnis von Imidacloprid, Cypermethrin und Dimethoat zueinander wurde ausgetestet und je zweimal wiederholt:

- a) LD_{50} Imidacloprid (250 ng/Hummel) + LD_{50} α -Cypermethrin (750 ng/Hummel) + LD_{50} Dimethoat (800 ng/Hummel),
- b) $1/10 LD_{50}$ Imidacloprid (25 ng/Hummel) + $1/10 LD_{50}$ α -Cypermethrin (75 ng/Hummel) + $1/10 LD_{50}$ Dimethoat (80 ng/Hummel).

Ergebnisse

Die Hummeln fraßen bei Haltung in den o. g. Käfigen im Durchschnitt bei einer Spritzenpipettenlänge an der Futterquelle von 1 mm in 24 Stunden 0,156 ml 50%ige Saccha-

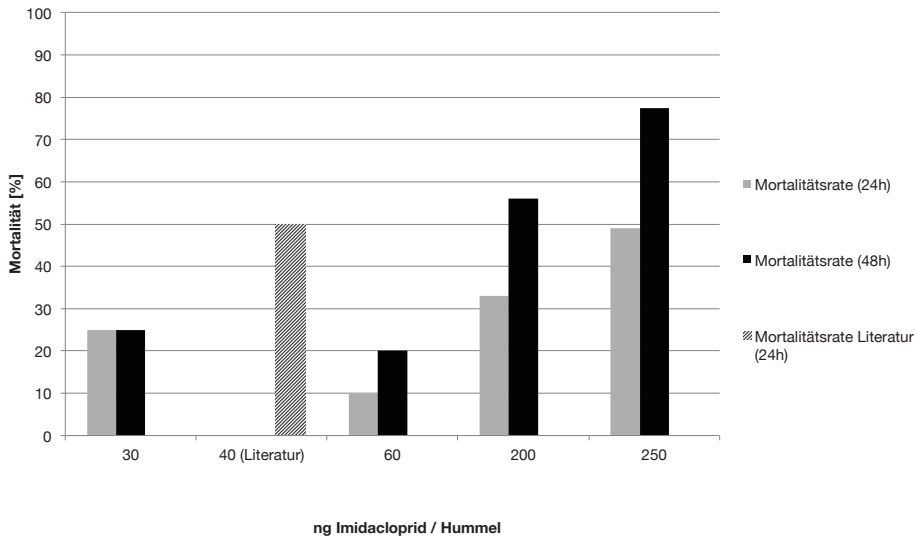


Abb. 1: Mortalitätsrate bei Hummel-Arbeiterinnen in Abhängigkeit der Dosis (ng/Hummel) von Imidacloprid nach 24 h (hellgrauer Balken) und 48 h (dunkelgrauer Balken); schraffierter Balken weist auf Literaturwert hin.

roselösung. Der Futterkonsum des ersten Tages im Käfig wurde nicht miteinbezogen, da nicht bekannt war, wie groß der Energievorrat der einzelnen Tiere zum Fangzeitpunkt war. Es wurde festgestellt, dass die Menge des aufgenommenen Futters nicht mit der Masse der Individuen korrelierte.

Vorversuche mit akuter Belastung

Mit o. g. Methode wurden die Ergebnisse der Akutfütterungen für Imidacloprid, α -Cypermethrin und Dimethoat generiert. Die Ergebnisse der Vorversuche wurden für die eigentlichen Kombinationsversuche benötigt.

In den Diagrammen 1–3 sind die Ergebnisse der einzelnen LD_{50} Austestungen dargestellt, jeweils 24 Std. und 48 Std. nach erfolgter Pestizidaufnahme. Als Vergleich sind auch die Literaturwerte angeführt.

Kombinationsversuche

Diagramm 4 zeigt die Ergebnisse der Kombinationsversuche der vollen LD_{50} und einem Zehntel davon im direkten Vergleich. Beide Kombinationsversuche lieferten signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$).

Verhaltensbeobachtungen

Die Tiere verhielten sich bei Verabreichung von Imidacloprid auffallend ruhig, manche zeigten agonisches Verhalten, indem sie zuckten und auf dem Rücken lagen. Oftmals erholten sie sich davon aber wieder und waren einige Tage später aktiv. Bei Dimethoat-, aber im speziellen bei α -Cypermethrin-Verabreichung, waren die Tiere extrem aktiv, teils sogar aggressiv – auch untereinander. Dieser Aktivitätslevel senkte sich auch nach einigen

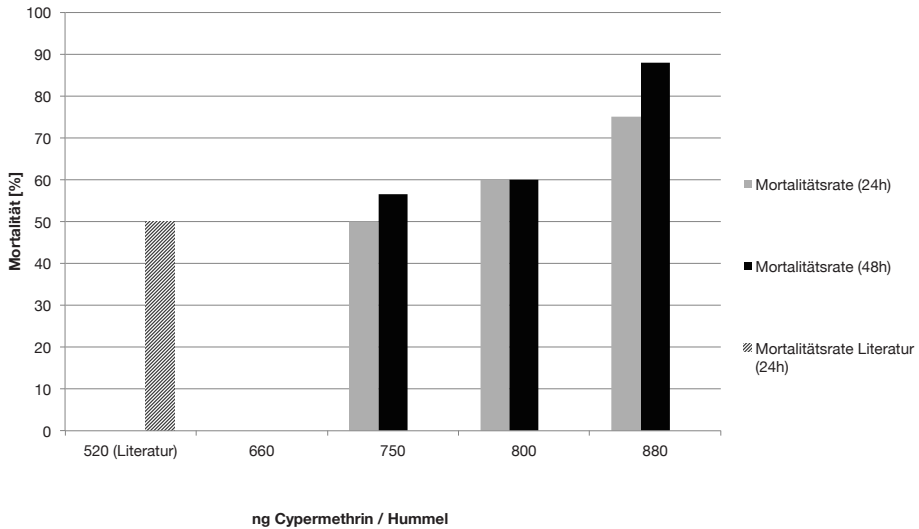


Abb. 2: Mortalitätsrate bei Hummel-Arbeiterinnen in Abhängigkeit der Dosis (ng/Hummel) von α -Cypermethrin nach 24 h (hellgrauer Balken) und 48 h (dunkelgrauer Balken); schraffierter Balken weist auf Literaturwert hin – bei diesem Pestizid wurde der Anfangswert aus Literatur zu LD₅₀ bei Bienen auf Hummeln umgerechnet (unter Berücksichtigung der täglich aufgenommenen Nahrungsmenge beider Organismen).

Tagen nicht merklich. Bei den Kombinationsversuchen waren die Tiere sehr inaktiv und erholten sich auch nach einigen Tagen nicht sichtbar.

Diskussion

Es gelang, die Tiere bis zu 28 Tage lang in den Königinnenaufzuchtskäfigen zu halten, was in etwa auch der Lebensspanne einer durchschnittlichen Hummel-Arbeiterin entspricht (GOULSON 2010). Nichtsdestotrotz ist es nicht empfehlenswert, die Hummeln länger als einige Tage isoliert in den Käfigen zu halten, da lange Isolation in den Versuchen sehr unnatürliche Rahmenbedingungen schafft. Die Versuche wurden nicht mit Hummeln genau definierten Alters gemacht, daher wurde für alle Kontrollversuche eine gewisse zufällige bzw. altersbedingte Ausfallsrate (maximal 10 % nach 48 Std.) zugelassen.

Die Tatsache, dass die Sammlerinnen immer weniger Futter zu sich nahmen je länger sie sich in den Käfigen befanden, kann dadurch erklärt werden, dass die Flugmöglichkeiten der Tiere in den kleinen Käfigen drastisch reduziert waren und die Hummeln im dunklen Brutschrank gehalten wurden, wodurch sie weniger Energie benötigten.

Stellt man die Nahrungsaufnahme in Abhängigkeit zur Masse der Individuen dar, ist bei keinem der drei Pestizide eine deutliche Korrelation erkennbar. Die Nahrungsaufnahme stieg nicht – wie angenommen – mit dem Gewicht der Hummeln an. Bereits publizierte Untersuchungen weisen jedoch auf das Gegenteil hin (THOMPSON 2001).

Einen weiteren Aspekt der Nahrungsaufnahme liefern Untersuchungen, bei denen Hummeln mit verschiedenen natürlichen Toxinen konfrontiert wurden und sich in weiterer Folge an deren Geruch erinnerten und Vermeidungsverhalten zeigten (TIEDEKEN et al.

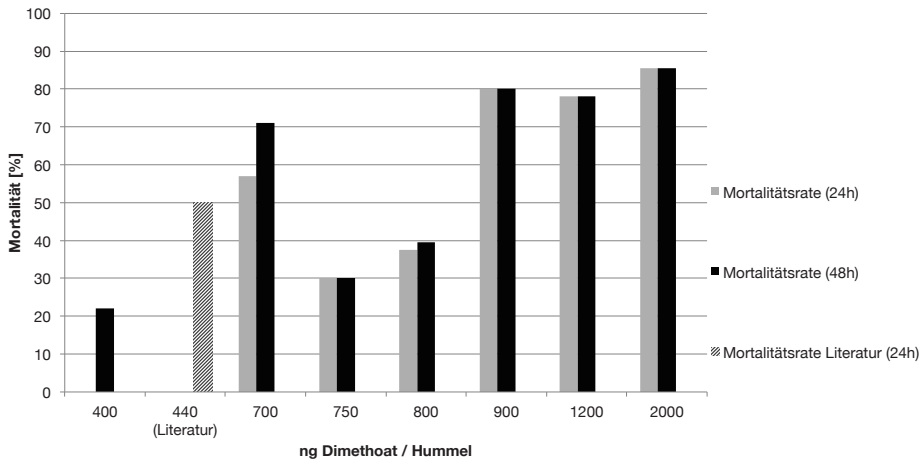


Abb. 3: Mortalitätsrate bei Hummel-Arbeiterinnen in Abhängigkeit der Dosis (ng/Hummel) von Dimethoat nach 24 h (hellgrauer Balken) und 48 h (dunkelgrauer Balken); schraffierter Balken weist auf Literaturwert hin.

2014). Es wäre durchaus denkbar, dass die Tiere die Pestizide in den Futterlösungen olfaktorisch registrieren konnten und eine Assoziation mit Nebenwirkungen herstellen. Laut einer Studie sind größere/schwerere Hummeln weniger empfindlich auf Pestizide als kleinere/leichtere (VAN DER STEEN 1994, 2001). Bei unseren Versuchen war die Tendenz generell umgekehrt.

Vorversuche mit akuter Belastung

Für alle drei Pestizide erwiesen sich die LD_{50} -Werte für akute Belastung aus der Literatur als zu niedrig. Laut einer 2003 veröffentlichten Studie von MARLETTO et al. (2003) liegt die LD_{50} (24 Std.) für Imidacloprid bei 40 ng/Hummel, unsere Ergebnisse ergaben jedoch einen Wert von 250 ng/Hummel – mehr als das 6-Fache. THOMPSON (2001) postuliert 520 ng/Tier als LD_{50} (24 Stunden) für α -Cypermethrin. Bei der Austestung des Wertes lag jedoch die 50%-Marke bei einer Dosis von 750 ng α -Cypermethrin/Hummel.

Kompliziert und umfangreich gestaltete sich die Austestung der LD_{50} für Dimethoat. 440 ng/Hummel (24 Std.) werden von MARLETTO et al. (2003) genannt, doch bei 400 ng konnte nach 24 Std. keine Mortalität verzeichnet werden. Nach Versuchen mit schwankender Mortalität stellte sich der LD_{50} -Wert (24 Std.) von Dimethoat auf 800 ng/Hummel ein. Generell fällt bei Dimethoat die geringe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auf, was mit der höheren Flüchtigkeit dieses Stoffes zusammenhängen könnte.

Eine mathematische Berechnung der LD_{50} (Interpolation) basierend auf nur wenigen Datenpunkten wurde nicht für sinnvoll erachtet und daher nicht durchgeführt.

Kombinationsversuche

Bei den Ergebnissen der Kombinationsversuche fällt auf, dass für beide Konzentrationen der Mengenverhältnisse (volle LD_{50} und 1/10 der LD_{50} aller drei Pestizide) jeweils der zweite Durchgang eine höhere Mortalitätsrate aufwies als der erste Durchgang. So kommt

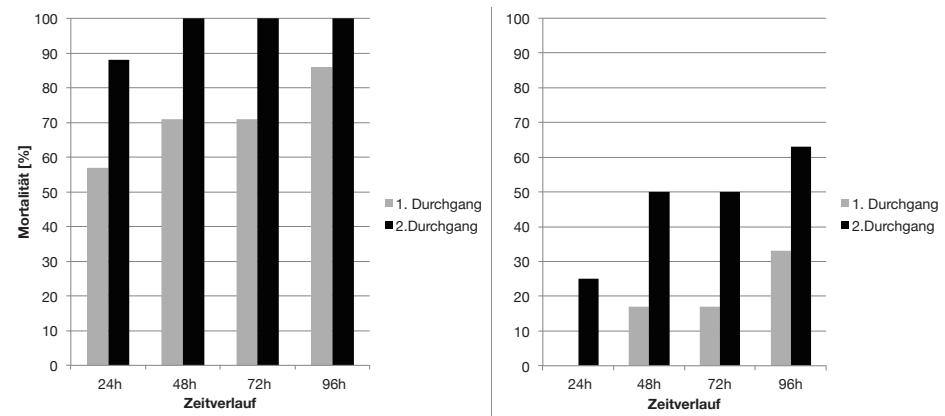


Abb. 4: Zeitverlauf der Mortalität bei Aufnahme des Pestizid-Mix mit voller LD₅₀ Imidacloprid (250 ng/Hummel), α -Cypermethrin (750 ng/Hummel) und Dimethoat (800 ng/Hummel) (links). Im Vergleich Aufnahme des Pestizid-Mix mit 1/10 LD₅₀ Imidacloprid (25 ng), α -Cypermethrin (75 ng) und Dimethoat (80 ng) (rechts). Akut innerhalb von 2 Stunden in 20 μ l 50%iger Saccharoselösung aufgenommen; erhöhte Mortalitätsrate bei wiederholter Durchführung, Durchgänge wurden nur gewertet, wenn in den Kontrollen eine Mortalitätsrate von 10 % nach 48 Std. nicht überschritten wurde; der Unterschied zwischen Versuch LD₅₀ und 1/10 LD₅₀ ist signifikant (Mann-Whitney-U-Test mit SPSS 20.0: $p < 0,00$).

auch die größere Signifikanz des zweiten Durchganges bei 1/10 der LD₅₀ der Pestizide in der Lösung zustande. Trotzdem sind alle Kombinationsversuche statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test); der p -Wert liegt immer unter 0,05 und die Kontrollversuche wiesen Mortalitätsraten $< 10\%$ auf. Auch der Vergleich zwischen den beiden Konzentrationen liefert ein signifikantes Ergebnis (Mann-Whitney-U-Test $p < 0,00$). Es gibt einen eindeutigen Unterschied zwischen den Durchgängen mit den drei vollen LD₅₀ von Imidacloprid, Cypermethrin und Dimethoat und einem Zehntel davon.

In Abbildung 4 sieht man deutlich, dass die Mortalitätsrate bei Verabreichung des Pestizid-Mix mit LD₅₀ aller Pestizide tatsächlich sehr hoch ist, ebenso bei 1/10 der LD₅₀; wo man aufgrund der eingesetzten Dosen eine deutlich niedrigere Mortalität erwarten würde.

In dieser Studie wurde versucht, auf die physiologischen Auswirkungen von Pestizidkombinationen hinzuweisen. Es ist jedoch zu bedenken, dass diese Ergebnisse in künstlicher Umgebung entstanden. Freilanduntersuchungen sind aber besonders bei dieser Tiergruppe aufgrund ihrer Lebensweise sehr schwer durchzuführen. Beispielsweise ist es wegen der Struktur des Nestes beinahe unmöglich, die Auswirkungen von Pestiziden auf die Brut von Hummeln zu untersuchen (VAN DER STEEN 2001).

Der leichtfertige Umgang in der Anwendung von Pestiziden hat starke Auswirkungen sowohl auf aquatische als auch auf terrestrische Ökosysteme. Von den Neonikotinoiden weiß man mittlerweile, dass auch kumulative Dosen weit unterhalb der LD₅₀ bei längerer Einwirkung toxisch wirken (TENNEKES & SÁNCHEZ-BAYO 2013). Das derzeitige weitgehende Verbot der Anwendung dieser Stoffgruppe ist daher vom Standpunkt des Hummel- und Nutzinsektenschutzes positiv zu bewerten.

Auch wenn es den Anschein hat, dass Hummeln im Vergleich zu Honigbienen mit Pestiziden grundsätzlich besser zurechtkommen und robuster erscheinen, sind weitere

Untersuchungen essenziell für die richtige Einschätzung des Gefährdungspotenzials dieser wertvollen Bestäuber. Wie bereits erwähnt, sammeln Hummeln nicht zur selben Tageszeit wie Honigbienen und besuchen teilweise auch andere Pflanzenarten. Dadurch sind sie nicht zwangsläufig den selben Xenobiotika ausgesetzt wie Honigbienen. Die vorliegende Arbeit versteht sich als ein weiterer Hinweis auf die besondere Gefährdung, die von Pestizidkombinationen im Hinblick auf Hummeln ausgeht.

Zusammenfassung

Anhand von zuvor ausgetesteten LD_{50} -Werten der Insektizide Imidacloprid, Cypermethrin und Dimethoat wurden Kombinations-Schemata dieser drei Stoffe erstellt und an Arbeiterinnen von *Bombus terrestris* verfüttert. Die eigenen LD_{50} -Werte lagen meist deutlich über den Werten der Literatur. Alle ergebnisbringenden Durchgänge wurden mindestens einmal wiederholt und es wurden stets Kontrollgruppen mitgeführt. Bei zeitgleicher Verabreichung der Kombination aller drei Stoffe in der vollen LD_{50} wurde eine erhöhte Mortalität verzeichnet und selbst bei einem Zehntel der Konzentration der drei Stoffe wurden sehr hohe Mortalitätsraten dokumentiert.

Dies zeigt, dass die gleichzeitige Aufnahme mehrerer Stoffe eine Effektverstärkung mit sich bringt. Bei Verhaltensbeobachtungen wurde festgestellt, dass auch geringe Dosen der Insektizide starke Auswirkungen auf die Aktivität der Tiere hatten.

Danksagung

Diese Arbeit entstand im Rahmen des Projektes „Zukunft Biene“ des Ministerium für ein lebenswertes Österreich. Wir danken besonders Mag. Sophie Krainer für die tatkräftige Unterstützung im Labor und Emmanuelle Noël für wertvolle praktische Hinweise zur Anpassung der OECD- und EFSA-Richtlinie auf unsere Hummelexperimente.

Literatur

- BLACQUIÈRE T., SMAGGHE G., VAN GESTEL C.A. & MOMMAERTS V. 2012: Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. – *Ecotoxicology* 21: 973–992.
- EFSA 2013: EFSA Guidance Document on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). – In: *EFSA Journal* 11(7), 266 pp.
- EUROPEAN COMMISSION 2013: Commission implementing Regulation (EU) No 485/2013 of 24 May 2013 amending Implementing Regulation (EU) No 540/2011, as regards the condition of approval of the active substances clothianidin, thiamethoxam and imidacloprid, and prohibiting the use and sale of seeds treated with plant protection products containing those active substances. – *Official Journal of the European Union*, L139/12.
- GILL R.J., RAMOS-RODRIGUEZ O. & RAINE N.E. 2012: Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. – *Nature* 491: 105–109.
- GOULSON D. 2010: Bumblebees – behaviour, ecology, and conservation. – Oxford University Press Inc., New York, Second edition, 336 pp.
- MARLETO F., PATETTA A. & MANINO A. 2003: Laboratory assessment of pesticide toxicity to bumblebees. – *Bulletin of Insectology* 56(1): 155–158.

- MARTIN T., OCHOU O.G., VAISSAYRE M. & FOURNIER D. 2003: Organophosphorus insecticides synergize pyrethroids in the resistant strain of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (HÜBNER) (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa. – Journal of Economic Entomology 96: 468–474.
- OECD guideline No. 213, 1998 (adapted 21st September): Honeybees, Acute Oral Toxicity Test. – Original Guideline, 8 pp.
- OOMEN P.A. & PISTORIUS J. 2014: Hazards of pesticides to bees: 12th International Symposium of the ICP-PR Bee Protection Group, Ghent (Belgium). – Julius-Kühn-Archiv 450: 194–206.
- PISTORIUS J., BISCHOFF G. & HEIMBACH U. 2009: Bienenvergiftung durch Wirkstoffabrieb von Saatgutbehandlungsmitteln während der Maisaussaat im Frühjahr 2008. – Journal für Kulturpflanzen 61: 9–14.
- TASEI J.-N., LERIN J. & RIPAUT G. 2000: Sub-lethal effects of imidacloprid on bumblebees, *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae), during a laboratory feeding test. – Pest Management Science 56: 784–788.
- TENNEKES H.A. & SÁNCHEZ-BAYO F. 2013: The molecular basis of simple relationships between exposure concentration and toxic effects with time. – Toxicology 309: 39–51.
- THOMPSON H.M. 2001: Assessing the exposure and toxicity of pesticides to bumblebees (*Bombus* sp.). – Apidologie 32: 305–321.
- TIEDEKEN E.J., STOUT J.C., STEVENSON P.C. & WRIGHT G.A. 2014: Bumblebees are not deterred by ecologically relevant concentrations of nectar toxins. – The Journal of Experimental Biology 217: 1620–1625.
- VAN DER STEEN J.J.M. 1994: Method development for the determination of the contact LD₅₀ of pesticides to bumblebees (*Bombus terrestris*, L.). – Apidologie 25: 463–465.
- VAN DER STEEN J.J.M. 2001: Review of the methods to determine the hazard and toxicity of pesticides to bumblebees. – Apidologie 32: 399–406.
- WHITEHORN P.R., O'CONNOR S., WACKERS F.L. & GOULSON D. 2012: Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. – Science 336: 351–352.

Anschrift der VerfasserInnen

Angelika Waibel BSc (Korrespondenz-Autorin), PD Dr. Wolfgang Schühly,
Dr. Javier Hernández-López, Mag. Dr. Ulrike Riessberger-Gallé, MSc Verena Strobl,
Univ.-Prof. Dr. Karl Crailsheim, Institut für Zoologie, Karl-Franzens Universität Graz,
Universitätsplatz 2, 8010 Graz, Austria. E-Mail: angelika.waibel@edu.uni-graz.at