

**Wirksamkeit, Nebenwirkung und Verteilung von
Lithiumchlorid: ein neuer Wirkstoff zur Behandlung von
Varroa destructor bei Honigbienenvölkern (*Apis mellifera*)**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Landesanstalt für Bienenkunde
Institut für Biologie

vorgelegt von
Carolin Vanessa Rein
aus *Heilbronn*
2024

Die vorliegende Arbeit wurde am 04.07.2024 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Dekan der Fakultät Naturwissenschaften: Prof. Dr. Jan Frank

- | | |
|-------------|-----------------------------|
| 1. Prüfer | PD Dr. Peter Rosenkranz |
| 2. Prüferin | Prof. Dr. Ute Mackenstedt |
| 3. Prüfer | Prof. Dr. Martin Hasselmann |

Einreichung der schriftlichen Dissertation am: 15.04.2024

Datum der mündlichen Prüfung: 15.07.2024

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Varroose als Hauptursache von Völkerverlusten bei <i>Apis mellifera</i>	
1.2	In Deutschland verfügbare Varroa-Behandlungsmittel (Varroazide).....	9
1.3	Lithiumchlorid als neues Varroazid.....	14
1.4	Zulassungsprozess eines neuen Tierarzneimittels	19
1.5	Ziele der Arbeit.....	22
2	Veröffentlichungen	24
2.1	Publikationsliste	24
2.2	Angaben zum Eigenanteil.....	27
2.3	Lithium chloride leads to concentration dependent brood damages in honey bee hives (<i>Apis mellifera</i>) during control of the mite <i>Varroa destructor</i>	30
2.4	Lithium chloride treatments in free flying honey bee colonies: efficacy, brood survival, and within colony distribution.....	45
2.5	From consumption to excretion: Dynamics of lithium in honey bees (<i>Apis mellifera</i>) after the application of lithium chloride and the time-dependent effects on parasitizing <i>Varroa destructor</i>	61
3	Diskussion	73
3.1	Diskussion der verwendeten Methoden.....	73
3.1.1	Käfigversuche	73
3.1.2	Feldversuche	75
3.2	Diskussion der Ergebnisse	80
3.2.1	Nebenwirkungen auf die Bienenbrut	80

3.2.2	Wirksamkeit.....	87
3.2.3	Verteilung von Lithium	93
4	Fazit und Ausblick.....	98
5	Zusammenfassung	101
6	Summary	104
7	Literaturverzeichnis	107
	Danksagung	120

1 Einleitung

1.1 Varroose als Hauptursache von Völkerverlusten bei *Apis mellifera*

Der Befall eines Honigbienenvolkes mit ektoparasitischen Milben der Gattung *Varroa* wird allgemein als Varroose bezeichnet. Die bedeutendste Art ist dabei *Varroa destructor* (übersetzt: *destruct* = zerstören), welche Anfang des 20. Jahrhunderts erfolgreich den Wirt gewechselt hat und von der östlichen Honigbiene *Apis cerana* auf die westliche Honigbiene *Apis mellifera* übergegangen ist. Durch einen intensiven Handel von Bienenvölkern der westlichen Honigbiene hat sich die Varroamilbe binnen kurzer Zeit auf der ganzen Welt verbreitet und gilt seither als einer der Hauptgründe für die hohen Winterverluste von Bienenvölkern von bis zu 30% (Genersch et al. 2010; Le Conte et al. 2010; Noël et al. 2020). Der Verlust von Bienenvölkern führt auch zu einem Rückgang der Bestäubungsleistung und damit zu geringeren Erträgen bei Nutzpflanzen, vor allem von Obst, Gemüse und Speiseöl (Gallai et al. 2009). Der wirtschaftliche Wert der Bestäubungsleistung wurde 2005 auf 153 Milliarden Euro geschätzt, was etwa 9,5% des Gesamtwerts der weltweiten Nahrungsmittelproduktion entspricht (Gallai et al. 2009). Inzwischen geht man von einer noch höheren Summe von 235-577 Milliarden US-Dollar aus (Lautenbach et al. 2012; Potts et al. 2016). Ein Rückgang der Bienenvölker könnte folglich zu hohen Ertragseinbußen in der Landwirtschaft führen (Gallai et al. 2009; Potts et al. 2010).

Im Laufe der Zeit haben sich Varroamilben sehr stark an ihren Wirt, die Honigbiene, angepasst und man findet sie ausschließlich im Bienenvolk.

Außerhalb des Volkes und getrennt vom Wirt können Varroamilben nicht überleben. Ihr Lebenszyklus lässt sich in eine Verbreitungs- und eine Reproduktionsphase unterteilen (Traynor et al. 2020). Während der **Verbreitungsphase** sitzen die Milben bevorzugt zwischen den Tergiten der Ammenbienen und ernähren sich von ihrem Fettkörper und der umgebenden Hämolymphe (Han et al. 2024; Ramsey et al. 2019). In dieser Phase kann es auch zur Übertragung der Milben auf benachbarte Völker kommen, wenn sich zum Beispiel eine befallene Biene verfliegt oder ein stark von Varroamilben infiziertes und schwaches Volk von anderen Honigbienen ausgeräubert wird.

Die zweite Phase, welche als **reproduktive Phase** bezeichnet wird, findet ausschließlich in den Brutzellen der Honigbienen statt. Hierbei werden die Varroamilben, welche bevorzugt auf Brutpflegenden Ammenbienen sitzen, direkt zu verdeckelungsreifen Zellen, in denen sich eine Larve im fünften Larvenstadium befindet, transportiert. Da die Drohnenbrut häufiger von Ammenbienen gepflegt wird und die Zeit bis zur Verdeckelung der Zelle länger ist, ist Drohnenbrut 8 – 10 mal häufiger mit Milben befallen als Arbeiterinnenbrut (Fuchs 1990, 1992). Bereits wenige Stunden nach dem Eindringen in die Zelle beginnt die Milbe mit der Parasitierung der Larve und saugt kontinuierlich Hämolymphe, zunächst von der Bienenlarve und später von den Puppenstadien. Dadurch wird die Eireifung in der Muttermilbe aktiviert und 60 – 70h nach der Zellinvasion wird das erste, unbefruchtete Ei gelegt, welches sich zu einem Männchen entwickelt. Danach folgen alle 30h weitere befruchtete Eier, welche sich zu weiblichen Milben entwickeln. Noch in der Brutzelle findet eine Bruder-Schwester Paarung statt, sobald die Geschlechtsreife der Tochtermilben erreicht ist. Mit dem Schlupf der

Honigbiene verlassen auch die Muttermilbe und ihre durchschnittlich 1,3 – 1,45 Tochtermilben die Zelle (Martin 1994; Rosenkranz et al. 2010). Durch die längere Entwicklungszeit der Drohnenbrut, kommt es hier zu einem erhöhten Reproduktionserfolg der Milben, wodurch im Mittel 2,2 – 2,6 Tochtermilben die Zelle verlassen (Martin 1995).

Die Schädigung der Varroamilben wird bereits allein durch die Parasitierung der Bienenbrut und dem Hämolymphverlust deutlich: eine Jungbiene die während ihrer Entwicklung von einer Milbe parasitiert wurde, zeigt ein geringeres Schlupfgewicht (Bowen-Walker und Gunn 2001), ein schlechteres Orientierungs- und Heimfindeverhalten (Kralj und Fuchs 2006) und hat eine verkürzte Lebensdauer (van Dooremalen et al. 2012). Des Weiteren überträgt die Varroamilbe etliche Bienenviren, was zur nachhaltigen Schwächung der Bienen führt (Francis et al. 2013; Traynor et al. 2020). Hier ist vor allem das Flügeldeformationsvirus (DWV) zu nennen, das erst durch die Varroa-Parasitierung zu einem tödlichen Pathogen wurde und als Hauptverursacher für den Zusammenbruch ganzer Bienenvölker gilt (Dainat et al. 2012; Genersch et al. 2010)

Da die westliche Honigbiene als neuer Wirt in der evolutionär betrachtet kurzen Zeit von 70 Jahren kaum Abwehrmechanismen entwickelt hat und es bislang nur wenige durch natürliche Selektion entstandene resistente Populationen gibt (Rosenkranz 1999; Seeley 2017), kann sich die Varroamilbe meist ungehemmt vermehren. Trotz der zahlreichen Zucht- und Selektionsansätze für varroaresistente Bienenvölker (Büchler et al. 2010; Rinderer et al. 2010) gibt es bis heute keinen Beleg dafür, dass eine durch

selektive Züchtung etablierte Bienenpopulation längerfristig ohne Bekämpfung überleben kann. Nach wie vor gilt, dass es ohne Intervention des Imkers fast immer zu einem exponentiellen Anstieg der Milbenpopulation im Volk kommt. Gerade im Spätsommer und zu Beginn des Herbstes, wenn die für die Überwinterung notwendigen langlebigen Winterbienen aufgezogen werden, erreicht die Milbenpopulation ihr Maximum (Abb. 1). Die Winterbienen und damit das gesamte Volk werden zunehmend geschwächt und ein hoher Varroa-Befall führt schlussendlich zum Verlust des Volkes, meist während der Überwinterungsphase (Genersch et al. 2010; Seitz et al. 2015; Stahlmann-Brown et al. 2022).

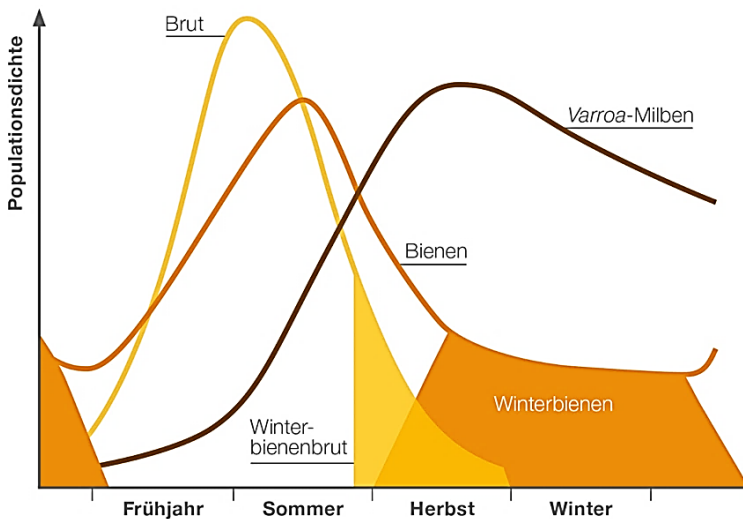


Abbildung 1: Varroa-Milben Population im Jahresverlauf. Aus "Die Varroa-Milbe" des Bee Care Centers, Bayer AG, 2019.

1.2 In Deutschland verfügbare Varroa-Behandlungsmittel (Varroazide)

Um Völkerverluste durch die Varroamilbe zu verhindern, ist eine Behandlung mit Varroaziden unerlässlich. In Deutschland gibt es dazu verschiedene Präparate mit unterschiedlichen Wirkstoffen und Wirkmechanismen die zur Behandlung der Varroamilbe bei Honigbienenvölkern eingesetzt werden können (Tab. 1). Zur Gruppe der **organischen Säuren** gehören die Milchsäure, Oxalsäure und Ameisensäure. Diese Säuren sind natürliche Bestandteile des Honigs, was den Vorteil hat, dass bei der Zulassung zumeist keine Rückstandshöchstmengen für Bienenprodukte festgelegt werden müssen und die Akzeptanz beim Verbraucher höher ist. Zudem sind diese Wirkstoffe auch für Bio-zertifizierte Imkereien zugelassen. Dennoch sollte eine Behandlung erst nach der Honigernte durchgeführt werden und im Falle der Oxalsäure darf z.B. erst im Folgejahr nach der Behandlung wieder Honig geerntet werden. Milch- und Oxalsäure wirken zudem nur auf die Milben in der Verbreitungsphase, wenn sie relativ ungeschützt auf den adulten Bienen sitzen. Daher eignen sich diese Behandlungsmittel auch nur für Völker im brutfreien Zustand (Ableger, Schwärme, zur Winterbehandlung). Bei korrekter Anwendung können dann Wirksamkeiten von über 90% erreicht werden (Rosenkranz et al. 2010). Für die Behandlung von brütenden Völkern im Sommer verwenden viele Imker daher Ameisensäure, da es der einzige derzeit verfügbare Wirkstoff ist, welcher den Zelldeckel der Bienenbrut durchdringt und somit auch auf die reproduzierenden Milben wirkt (Emmerich 2018). Die Applikation erfolgt über ein Verdunstungssystem in einer extra Zarge über dem Bienensitz und muss

zwei Mal im Abstand von 2 Wochen angewendet werden, um Milbenmortalitäten von über 90% zu erreichen (Satta et al. 2005).

Allerdings hat die Behandlung mit organischen Säuren auch Nachteile. Einerseits muss Schutzkleidung getragen werden, um Hautverätzungen zu vermeiden. Andererseits hängt die Wirksamkeit und der damit verbundene Behandlungserfolg stark von äußeren Faktoren ab. Zum Beispiel beeinflusst die Temperatur die Verdunstungsraten der Ameisensäure während einer Sommerbehandlung. Bei niedrigen Temperaturen ist die Wirksamkeit zu gering und bei hohen Temperaturen kann es zu Verätzungen und Verlusten an Bienen und Brut kommen (Steube et al. 2021). Im Winterbienenvolk hängt der Behandlungserfolg stark von der korrekten und gleichmäßigen Verteilung des Wirkstoffs (Oxal- oder Milchsäure) ab. Dieser muss in die Wabengassen geträufelt oder mit einer Sprühflasche auf jede Wabe gesprüht werden, um alle Bienen und aufsitzenden Milben zu erreichen. Um eine optimale Wirkung der organischen Säuren zu erzielen, müssen daher die klimatischen Bedingungen und die Bedingungen im Bienenstock bei der Anwendung berücksichtigt werden. Die Behandlungen lassen sich somit kaum längerfristig planen, was gerade für Berufsimker mit mehreren hundert Völkern, aber auch für Hobbyimker, ein großes Problem darstellt.

Als weitere Varroa-Behandlungsmittel sind **synthetische Akarizide** mit Wirkstoffen aus der Gruppe der Triazapentadiene (Amitraz) oder Pyrethroide (Flumethrin) zugelassen (Tab. 1). Meist werden mit dem Wirkstoff imprägnierten Kunststoffstreifen direkt zwischen die Wabengassen ins Bienenvolk gehängt und wirken durch Kontakt auf die auf den Bienen

sitzenden Milben. Dadurch sind sie wetterunabhängig und können bei Dauerbehandlung über einen oder mehrere Brutzyklen (= 21 Tage) auch in Völkern mit Brut angewendet werden. Um Milbenmortalitäten von über 90% zu erreichen, müssen die Streifen je nach Präparat zwischen 4 und 10 Wochen im Volk verbleiben. Diese lange Anwendungszeit und die lipophile Eigenschaft der Wirkstoffe führen jedoch zu Rückständen im Bienenwachs, in dem sich die Wirkstoffe nach wiederholter Anwendung akkumulieren können und dann auch den Honig und andere Bienenprodukte negativ beeinflussen (Bogdanov et al. 1998; Wallner 1999; Albero et al. 2023). Varroazid-Rückstände sind nicht nur ein Problem für die Vermarktung des „Naturproduktes Honig“, sondern können auch zur Resistenzbildung bei den Milben führen, wodurch die Präparate an Wirksamkeit verlieren und der gewünschte Behandlungserfolg ausbleibt (Higes et al. 2020; Martin 2004; Mitton et al. 2022).

Tabelle 1: Verfügbare Varroazide für Honigbienen in Deutschland mit ihren Vor- und Nachteilen.

Wirkstoff	Präparat	Vorteile	Nachteile		
Organische Säuren					
Allgemein		→ Natürlicherweise im Honig enthalten	→ Schutzkleidung notwendig		
Milchsäure	Milchsäure 15%	Behandlung von Ablegern und Schwärme	Wirkt nicht in Brutzellen; aufwendige Sprühanwendung	Volk ohne Brut	
Oxalsäure	Oxalsäure Dihydrat-Lösung 3,55 (m/V)	Gute Wirksamkeit bei Träufelanwendung im Winter	Wirkt nicht in Brutzellen; Honig darf erst im Folgejahr geerntet werden; Schäden an Bienen bei wdh. Anwendung		
	Oxuvar® 3,5% (m/V)				
	Oxuvar® 5,7%				
	Oxybee®				
Ameisensäure	Ameisensäure 60%	Wirkt auch auf reproduzierende Milben in der Brut	Wirkung ist Temperatur abhängig; Schäden an der offenen Bienenbrut + Jungbienen; Verdunstungssystem und extra Zarge notwendig	Volk mit Brut	
	Formivar® 60%				
	Formic Pro® Ameisensäure 68,2g				
Ameisensäure + Oxalsäure	VarroMed®	Ganzjährig anwendbar, gebrauchsfertig, keine Wartezeit bis Honigernte	Erhöhte Bienenmortalität bei wdh. Anwendung		
Pyrethroide					
Flumethrin	Bayvarol® 6,61g/Strip	Geringe Bienenmortalität; Unabhängig vom Wetter	Anwendungszeit: 4-9 Wochen; Rückstände; Resistenzbildung; Schutzhandschuhe		
	PolyVar® Yellow				
Triazapentadiene					
Amitraz	Apitraz® 500mg	Geringe Bienenmortalität; Unabhängig vom Wetter	Anwendungszeit: 6-10 Wochen; Rückstände; Resistenzbildung; MRL von 200µg/kg; Schutzhandschuhe;		
	Apivar® 500mg				

Ätherische Öle			
Thymol	Apiguar® 25%	Natürlicher Bestandteil im Wachs + Honig	Verzögerter Wirkeintritt; anwendbar zw. 20-30°C; persistenter Thymolgeruch; Rückstände
	Thymovar® 15g		
Thymol, Campher, Eukalyptus, Levomenthol	Apilife Var®		

Neben den oben aufgeführten Tierarzneimitteln gibt es noch weitere biotechnische und biologische Verfahren, die die Milbenpopulation reduzieren können. Allerdings erzielen sie alleine keinen zufriedenstellenden Behandlungserfolg und sind mit großem Mehraufwand verbunden. Eine weitere Problematik ist, dass sich durch die immer kürzer werdenden Kälteperioden im Winter auch die brutfreien Phasen im Bienenvolk verkürzen, in denen die Königin ihre Legetätigkeit einstellt. Dadurch kann sich die Milbe bei vorhandener Brut nahezu ganzjährig vermehren und eine einzige Maßnahme im Jahr reicht nicht mehr aus, um die Milbenpopulation unter der Schadschwelle zu halten und das Überleben des Bienenvolkes zu sichern.

Daher wurde von Bienenforschern, staatlicher Fachberatung und Imkerverbänden in Baden-Württemberg ein Behandlungskonzept entwickelt, welches aus drei Maßnahmen an drei Stichtagen im Jahr besteht. Dieses Konzept kombiniert biotechnische Maßnahmen im Frühjahr mit einer Ameisensäurebehandlung im Sommer und einer Oxalsäure-Behandlung im Winter. Das Ziel dieser Kombinationen ist es, die Milbenpopulation im Volk über das ganze Jahr hinweg unterhalb der Schadschwelle zu halten und rückstandsfrei und resistenzvermeidend zu bekämpfen.

Trotz dieser arbeitsaufwendigen und kostenintensiven Bemühungen kommt es immer wieder zu hohen Völkerverlusten – zumeist während der Überwinterungsphase – die auf den Befall mit Varroamilben und den damit verbundenen Erkrankungen durch Bienenviren zurückzuführen sind. Der Bedarf nach sicheren, wetterunabhängigen und einfach anwendbaren Behandlungsmitteln, die hoch effektiv gegen die Milben wirken und einfach anzuwenden sind, ist daher nach wie vor enorm.

1.3 Lithiumchlorid als neues Varroazid

Bei der Suche nach neuen Bekämpfungsansätzen wurde auch die Verwendung von RNA Interferenzen (RNAi) zur Deaktivierung von lebenswichtigen Milbengenen, als eine neue Möglichkeit zur Kontrolle der Varroamilbe diskutiert und in ersten Versuchen getestet (Garbian et al. 2012). Hierbei wird doppelsträngige RNA (dsRNA) in Zuckersirup gelöst und an die Bienen verfüttert. Die an der Biene parasitierende Milbe nimmt diese durch das Fressen auf, die dsRNA lagert sich an die zu transkribierende mRNA an und die Milbe stirbt an den Folgen der Genstilllegung. In Versuchen mit Kleinvölkern konnte hierbei die Varroapopulation auf adulten Bienen um 61% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reduziert werden (Garbian et al. 2012).

Experimente an der Landesanstalt für Bienenkunde in Hohenheim, mit dem Ziel, die Effektivität der RNAi im Vergleich zu Garbian et al. (2012) zu erhöhen, brachten jedoch eine überraschende Wendung: Nicht die RNAi sondern das **Lithiumchlorid (LiCl)**, welches in hohen Konzentrationen zur Herstellung der

doppelsträngigen RNA verwendet wurde, führte in Käfigversuchen zu einer hohen Milbenmortalität (Ziegelmann et al. 2018). Weitere Versuche bestätigten diesen Zufallsfund und belegten die toxische Wirkung von Lithiumchlorid auf Varroamilben.

Lithiumchlorid ist ein allgegenwärtiges Salz, das natürlicherweise im Wasser und Boden und regional in sehr unterschiedlichen Konzentrationen vorkommt (Kavanagh et al. 2018). In der Albertquelle in Bad Mergentheim wurden Lithium-Gehalte von bis zu 13 mg/l gemessen und auch im Honig ist es bereits in Konzentrationen von 2,5 bis 15,6 mg/kg vorhanden (Abdulkhalig und Swaileh 2017; Bogdanov 2006; Bogdanov et al. 2008; Tariba Lovaković et al. 2018). Um den Tagesbedarf an Lithium zu decken, wird empfohlen, dass eine 70 kg schwere Person täglich 1 mg Lithium zu sich nimmt (Aral und Vecchio-Sadus 2008). Dies wird meistens schon durch die natürlich vorkommenden Lithiumgehalte in Trinkwasser (1,7 – 1725 µg/l), Gemüse (0,5-3,4 mg Li/kg), Milchprodukte (0,5 mg Li/kg) und Fleisch (0,012 mg Li/kg) erreicht (Schrauzer 2002; Seidel et al. 2019) und muss daher nicht supplementiert werden.

Im humanmedizinischen Bereich ist die Lithium-Therapie, entwickelt von John Cade im Jahr 1949, bei der Behandlung von Depressionen und bipolaren Störungen von großer Bedeutung (Cade 1949; Luu und Rodway 2018; Malhi et al. 2012; Schou 1968). Die Dosierung variiert je nach Indikation und Blutkonzentration. Typischerweise liegt die Tagesdosis zwischen 675 und 1125 mg, um eine Serumkonzentration von 5,6 – 8,4 mg/l zu erreichen (Aral und Vecchio-Sadus 2008). Obwohl der Wirkmechanismus noch nicht vollständig

verstanden ist, konnte nachgewiesen werden, dass Lithium die Konzentration einiger Neurotransmitter wie Glutamat, Dopamin und GABA (Gamma-Aminobuttersäure) beeinflusst und daher als Stimmungsstabilisator und -aufheller beim Menschen fungiert (Maggi und Enna 1980; Malhi et al. 2012). Außerdem wird die Glykogen Synthase Kinase-3 inhibiert, welche an einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen beteiligt ist (Snitow et al. 2021; Williams und Harwood 2000). Die sorgfältige Überwachung der Lithium-Behandlung ist allerdings aufgrund des schmalen therapeutischen Fensters besonders wichtig, insbesondere bei Schwangeren, da die Einnahme das Risiko von Herzfehlbildungen erhöht (Patorno et al. 2017). Studien an Modellorganismen wie Zebrafisch und Krallenfrosch haben gezeigt, dass Lithium negative Auswirkungen auf die Embryonalentwicklung und Zelldifferenzierung haben kann, indem es Signalkaskaden hemmt (Kao et al. 1986; Stachel et al. 1993).

Umso überraschender war es, als 2018 die Fütterung von Honigbienen mit LiCl-Sirup zu einer hohen Sterblichkeit der aufsitzenden Milben führte. Nach über 30 Jahren Varroaforschung wurde damit ein neuer Wirkstoff zur Behandlung der Varroamilbe entdeckt, der einen völlig neuen Wirkmechanismus und damit vielversprechende Vorteile gegenüber den bisher zugelassenen Arzneimitteln aufweist. Im Gegensatz zu organischen Säuren und synthetischen Substanzen, die die Milbe durch Kontakt abtöten, wirkt LiCl systemisch. Das heißt, LiCl wird über die Nahrung in die Biene aufgenommen, verteilt sich im Körper und die auf der Biene sitzende Milbe nimmt das LiCl während der Parasitierung auf und stirbt (Abb. 2).



Abbildung 2: Systemischer Wirkmechanismus von Lithiumchlorid auf *V. destructor*. LiCl wird in Zuckersirup gelöst, an die Biene verfüttert und verteilt sich im Körper der Biene. Eine parasitierende Milbe nimmt durch das Fressen an der Biene LiCl auf und fällt kurze Zeit später tot von der Biene. (Grafik wurde in biorender.com erstellt).

Eine Varroa-Behandlung würde sich dadurch enorm vereinfachen und könnte mit der Einfütterung der Bienen nach der Honigernte im Spätsommer kombiniert werden. Es bestünde somit kein zusätzlicher Materialaufwand (Verdunstungssystem bzw. Schutzkleidung) und die Anwendung wäre sicher für die Imkernden, da nicht mit gefährlichen Säuren hantiert werden müsste. Die systemische Wirkungsweise ermöglicht zudem eine witterungsunabhängige Applikation, was den Behandlungserfolg begünstigt. Durch ihre soziale Lebensweise stehen die Honigbienen in ständigem Futteraustausch (= Trophallaxis) (LeBoeuf 2017) und man erhofft sich, dass die Bienen nicht nur das Futter, sondern auch das darin enthaltene LiCl schnell im ganzen Volk verteilen, so dass alle Bienen und die darauf sitzenden Milben erreicht werden und somit ein hoher Behandlungserfolg erzielt wird. Außerdem wäre das Risiko von Rückständen in den Bienenprodukten begrenzt, da LiCl ein wasserlösliches Salz ist, das sich nicht am Wachs anlagert

und natürlicherweise im Honig vorkommt. Auf der Basis dieser Befunde wurde von der Universität Hohenheim und dem Kooperationspartner siTOOLS in München die Verwendung von Lithiumsalzen zur Bekämpfung der Varroose patentrechtlich geschützt (WO2017/042240 A1).

Die vielversprechenden Aspekte von Lithium haben nicht nur das Interesse der Imkernden, in der Hoffnung auf ein neues Behandlungsmittel, geweckt, sondern motivierten auch andere Wissenschaftler zur Untersuchung weiterer Forschungsfragen. In den Studien wurde gezeigt, dass LiCl auch über einen Kontaktmechanismus die Milben tötet (Kolics et al. 2020) und eine LiCl-Träufelbehandlung zu einer hohen Milbenmortalität führt, die sogar die gängige Oxalsäurebehandlung übertrifft (Kolics et al. 2021b; Kolics et al. 2022a). Darüber hinaus wurde auch die Effektivität anderer Lithiumsalze, wie z.B. Lithiumcitrat, untersucht und auch hier zeigten sich, sowohl in Käfigversuchen als auch in Feldversuchen, hohe Milbenmortalitäten von 93 – 100% (Jovanovic et al. 2022; Stanimirovic et al. 2022; Ziegelmann et al. 2018). In den durchgeführten Studien wurden nach einer Behandlung bislang keine Lithium-Rückstände im Wachs festgestellt (Kolics et al. 2021a). Die Lithium-Konzentrationen waren sogar geringer, als in der Negativkontrolle von kommerziellen Wachsmittelwänden (Stanimirovic et al. 2022). Da Lithium natürlicherweise im Honig vorkommt (Abdulkhaliq und Swaileh 2017; Bogdanov et al. 2008; Tariba Lovaković et al. 2018), wird bei einer Varroabehandlung auch kein synthetischer oder honigunspezifischer Stoff eingebracht. Es muss jedoch sichergestellt werden, dass der Lithiumgehalt des im Folgejahr geernteten Honigs durch die Behandlung nicht beeinflusst wird, was bisher noch nicht untersucht wurde.

1.4 Zulassungsprozess eines neuen Tierarzneimittels

Da die Honigbiene als ein „Lebensmittel produzierendes Nutztier“ gilt und Honig und andere Bienenprodukte erzeugt, welche in den Verkehr gebracht und vom Menschen verzehrt werden, bestehen hohe rechtliche Hürden für den Einsatz von Tierarzneimitteln. Das Tierarzneimittelgesetz greift, sobald ein Stoff „zur Heilung oder Verhütung von Tierkrankheiten bestimmt“ ist (Artikel 4, TAMVO). Da dies auch auf LiCl zur Behandlung der Varroamilbe zutreffen würde, muss ein Unternehmen oder eine andere juristische Person zunächst die Zulassung als neues Varroazid beantragen. Im Rahmen des Zulassungsverfahrens werden dann Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit des Mittels geprüft und sichergestellt. Außerdem muss die Sicherheit für Anwender, Umwelt und Verbraucher gewährleistet sein. Darüber hinaus müssen alle pharmakologisch wirksamen Stoffe, zu denen auch LiCl gehört, auf Rückstände in tierischen Produkten untersucht und Rückstandshöchstmengen (MRL = Maximum Residue Level) festgelegt werden. Erst nach erfolgter Zulassung dürfen Varroazide legal eingesetzt werden und zwar ausschließlich mit dem Verfahren, mit dem sie im Zulassungsprozess erfolgreich geprüft wurden.

Für die Zulassung von Arzneimitteln zur Behandlung der Varroamilbe in Bienenvölkern sind laut Europäischer Arzneimittelagentur (EMA 2021) folgenden 3 Studien erforderlich:

1. **Dosisfindungsstudien** im Käfig: zur Ermittlung der minimalen Dosis, die gegen die Milben wirksam ist und der maximal verträglichen Dosis, die von den Bienen toleriert wird.
2. **Klinische Vorversuche:** Feldversuche an Bienenvölkern in kleinerem Maßstab, um Behandlungsdetails zu klären. Dabei soll die Anzahl der Behandlungen, die Behandlungsdauer und ggf. der Behandlungsabstand bei mehrmaliger Anwendung festgelegt werden.
3. **Klinische Studien:** standardisierte Feldversuche unter verschiedenen klimatischen Bedingungen mit dem Produkt, für das eine Markteinführung angestrebt wird. Dadurch werden die Wirksamkeit und Verträglichkeit des Produktes nachgewiesen.

Um die Wirksamkeit im Falle eines Varroabehandlungsmittels zu bewerten, muss der Milbentotenfall vor, während und nach der Behandlung in Intervallen von 1-2 Tagen erfasst werden. Eine Nachbehandlung mit einem bereits zugelassenen Präparat, das eine Wirkung von mindestens 95% aufweist, gibt dann Aufschluss über die restlichen im Volk befindlichen Milben. Die Wirksamkeit des Produktes sollte mindestens 90% für nicht synthetische Wirkstoffe und mindestens 95% für synthetische Wirkstoffe betragen und wird am Ende der Behandlung wie folgt berechnet (EMA 2021):

% Wirksamkeit =

$$\frac{\text{Anzahl getöteter Milben durch Testbehandlung} \times 100}{\text{Anzahl getöteter Milben durch Testbehandlung} + \text{Anzahl getöteter Milben durch Nachbehandlung}}$$

Zusätzlich sollte eine Placebogruppe einbezogen werden, die zeitgleich mit der Testgruppe die gleiche Nachbehandlung erhält, jedoch keine Behandlung mit dem Testprodukt. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen, sollten jedes Volk, das in der klinischen Studie bewertet wird, zwischen 300 und 3.000 Milben haben. Schwache Völker sollten bereits vor Studienbeginn ausgeschlossen werden.

Die Verträglichkeit für Bienenvölker wird untersucht, indem die Auswirkungen der Behandlung auf die Bienenpopulation analysiert wird. Dazu werden Schätzungen der Volksstärke sowie der Größe der Brutfläche vor, während und nach der Behandlung durchgeführt. Zudem kann die Brutentwicklung auch im Detail beobachtet werden, wenn Schäden an den Larven oder Puppen zu erwarten sind. Die Beobachtung der Flugaktivität der Bienen sowie des Bienentotenfalls dient als Indikator für die Gesundheit und Vitalität der Bienenvölker und soll vor, während und nach der Behandlung erfasst werden. Der Bienentotenfall wird in gleichen 1-2 Tagesintervallen wie der Milbentotenfall erfasst. Langzeitbeobachtungen, wie beispielsweise die Erfassung des Überwinterungserfolgs und der Honigproduktion im darauffolgenden Jahr, geben Aufschluss über die langfristigen Effekte des Produkts auf die Volksstärke und Vitalität der Bienenvölker.

Da die klinischen Studien mit standardisierten Bienenvölkern unter verschiedenen klimatischen Bedingungen und in ausreichend großen Stichproben durchgeführt werden müssen, ist der zeitliche und finanzielle Aufwand enorm. Es wird geschätzt, dass für ein solches umfassendes Zulassungsverfahren 2 bis 3 Millionen Euro erforderlich sind und die

Markteinführung etwa fünf Jahre dauern würde. Zur Finanzierung eines solchen Zulassungsverfahrens ist daher die finanzielle Unterstützung von Investoren oder anderen Geldgebern notwendig. Diese müssen von der Notwendigkeit eines neuen Behandlungsmittels und dem Potenzial von LiCl als Problemlöser überzeugt werden, wofür bisher noch belastbare Daten – insbesondere unter praxisnahen Bedingungen – fehlten.

1.5 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Dissertation wurde innerhalb des „EAsy-Life“-Projektes, gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL), bearbeitet. Das Akronym steht für die „**Entwicklung eines Applikationsverfahrens zur systemischen Varroabekämpfung mit Lithiumchlorid für Bienenvölker**“. Das Ziel des dreijährigen Kooperationsprojektes in Zusammenarbeit mit siTOOLS Biotech GmbH war es, eine geeignete Applikationsform von LiCl für die Behandlung von Bienenvölkern zu entwickeln. Diese Daten sollten auch dazu dienen die Chancen und Risiken für ein Zulassungsverfahren besser beurteilen zu können und erfolgsversprechende Strategien für die Zulassung zu entwickeln. Dazu wurden Feld- und Laborexperimente mit folgenden konkreten Fragstellungen durchgeführt:

- 1. Führt eine LiCl-Behandlung zu Schäden und Verlusten an der Bienenbrut und lassen sich diese Nebenwirkungen quantifizieren?**

- 2. Wie schnell wirkt LiCl nach einer Applikation und wie kann eine praxistaugliche LiCl-Applikation in Völkern mit und ohne Brut aussehen, wenn die für eine Zulassung notwendigen Wirkungsgrade von über 95% erreicht werden sollen?**
- 3. Wie verteilt sich Lithium nach einer Applikation von LiCl im Körper der Biene und innerhalb eines Volkes?**
- 4. Kommt es nach einer LiCl-Behandlung im Wirtschaftsvolk zu Rückständen im Honig des Folgejahres?**

2 Veröffentlichungen

2.1 Publikationsliste

Originalarbeiten 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. DOI: 10.1007/s13592-022-00949-y.

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. DOI: 10.1007/s00436-023-08084-y

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*. DOI: 10.1002/ps.8311

Weitere Veröffentlichungen

Neben den genannten Veröffentlichungen ist während der Dissertationszeit eine weitere Publikation entstanden, die thematisch zwar verwandt, jedoch nicht Bestandteil der vorliegenden Dissertation ist.

Piou, V., Vilarem, C., Rein, C., Sprau, L., & Vétillard, A. (2021). Standard Methods for Dissection of *Varroa destructor* Females. *Insects*, 13(1), 37. DOI:10.3390/insects13010037

Beiträge in Fachzeitschriften

Rein, C. (2023): Lithiumchlorid als Varroa-Medikament? Deutsches Bienen-Journal 2/2023, S. 20-21

Vorträge auf Fachkongressen

Rein, C., Grünke, M., Rosenkranz, P. (2021): Happy hive - happy life: Aktueller Kenntnisstand über Lithiumchlorid als neues Varroabehandlungsmittel. 68. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V., Göttingen, Deutschland.

Rein, C. (2021): Wirksamkeit und Verträglichkeit von Lithiumchlorid als neues Varroa-Behandlungsmittel. 51. Süddeutsche Berufs- und Erwerbsimkertage, Friedrichshafen, Deutschland

Rein, C., Renz, J., Rosenkranz, P. (2022): Happy Hive – EAsy Life: Effektivität und Nebenwirkungen von Lithiumchlorid als neues Varroabehandlungsmittel. 69. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V., Hohenheim, Deutschland.

Rein, C., Rosenkranz, P. (2022): Wirksamkeit, Verträglichkeit und Rückstandsverhalten von Lithiumchlorid als neues Varroa-Behandlungsmittel. 11. Leipziger Tierärztekongress, Leipzig, Deutschland.

Rein, C., Makosch, M., Renz, J., Rosenkranz, P. (2022): Effects of lithium chloride on the development of honey bee brood during control of *Varroa destructor*. 9th European Congress of Apidology (EurBee 9), Belgrad, Serbien.

Rein, C., Grünke, M., Traynor, K., Rosenkranz, P. (2023): Ein gefährlicher Biss: wie sich Lithium im Honigbienengewebe anreichert, an dem *Varroa destructor* frisst. 70. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V., Potsdam, Deutschland.

Rein, C. (2023): EAsy Life – Entwicklung eines Applikationsverfahrens zur systematischen Varroabekämpfung mit Lithiumchlorid für Bienenvölker. Öko-Feldtage, Ditzingen, Deutschland.

Rein, C., Rosenkranz, P., Traynor, K. (2024) - Control of *Varroa destructor* with Lithiumchloride: efficacy and side effects. American Bee Research Conference, New Orleans LA, United States.

2.2 Angaben zum Eigenanteil

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei Manuskripte mit mehreren Autoren erstellt und in internationalen „peer-review“ Journalen veröffentlicht. Welchen Beitrag die jeweiligen Autoren geleistet haben, wird im Folgenden genauer erläutert.

Veröffentlichung 1

Carolin Rein hat zusammen mit Peter Rosenkranz die Versuche im Freiland geplant. Sie führte die Brutprotokolle mit verschiedenen LiCl-Konzentrationen durch und betreute die Versuche von Julia Renz. Alle Daten wurden von ihr ausgewertet und statistisch analysiert. Ebenfalls erstellte sie alle im Manuskript vorkommenden Abbildungen und Tabellen. Das Manuskript wurde von ihr entworfen, eingereicht und während des peer-review Prozesses überarbeitet.

Marisa Makosch führte im Rahmen ihrer Masterarbeit die Versuche zur *in-vitro* Larvenaufzucht durch.

Julia Renz erhob im Rahmen ihrer Bachelorarbeit die Daten der Brutprotokolle mit unterschiedlichen Fütterungsperioden. Sie nahm darüber hinaus die Proben der unterschiedlich alten Larven für die späteren Analysen der Lithium-Konzentrationen.

Peter Rosenkranz betreute und war an der Planung aller Experimente beteiligt. Er war an der Gliederung des Manuskripts beteiligt und hat das Manuskript korrigiert und überarbeitet.

Veröffentlichung 2

Carolin Rein hat zusammen mit Peter Rosenkranz die Experimente geplant. Sie bereitete und führte die Versuche durch und wertete die erhobenen Daten aus. Alle im Manuskript enthaltenen Abbildungen und Tabellen wurden von ihr erstellt und statistisch ausgewertet. Sie entwarf das Manuskript und überarbeitete es während des peer-review Prozesses.

Marius Blumenschein führte im Rahmen seiner Bachelorarbeit die Vorversuche 2018 durch, welche mit in das Manuskript aufgenommen wurden.

Kirsten Traynor war beim Schreiben des Manuskripts beteiligt und hat dieses korrigiert und überarbeitet.

Peter Rosenkranz war an der Planung und Durchführung der Experimente beteiligt. Er überarbeitete und finalisierte das Manuskript im Erstentwurf und im peer-review Prozess.

Veröffentlichung 3

Carolin Rein hat das Versuchsdesign erstellt und die Experimente durchgeführt. Alle im Manuskript enthaltenen Daten wurden von ihr ausgewertet und graphisch dargestellt, sowie statistisch analysiert. Sie schrieb den Erstentwurf des Manuskript und überarbeitete es im peer-review Prozess.

Markus Grünke führte die Käfigversuche zu den Aufbauraten des Lithiums in der Bienen durch und extrahierte die Hämolymphe und die Kotblase.

Kirsten Traynor hat das Manuskript korrigiert und überarbeitet.

Peter Rosenkranz war an der Planung der Experimente beteiligt. Zudem überarbeitete und finalisierte er das Manuskript sowohl im Erstentwurf als auch im peer-review Prozess.

2.3 Lithium chloride leads to concentration dependent brood damages in honey bee hives (*Apis mellifera*) during control of the mite *Varroa destructor*

Publiziert in *Apidologie*


Abstract

Lithium chloride (LiCl) has a high efficacy against *Varroa destructor* and a good tolerability for adult bees but the effect of LiCl on the honey bee brood has not been taken into consideration yet. We quantified the mortality of larvae fed with different concentrations of LiCl. For artificially reared larvae already, a concentration of 1 mM had significant toxic effects while under colony conditions, 10 mM was well tolerated. However, a chronic application of the effective concentration of 25 mM elicited brood mortalities between 60 and 90%. Shorter feeding periods of 2 or 4 days reduced the brood damages significantly. Measurements of the lithium concentrations in larvae and pupae during a chronic exposure with 10, 17.5 and 25 mM LiCl revealed respective lithium levels in 5th instar larvae of 7, 13 and 15 mg/kg. No lithium was detectable in 2-day old larvae indicating that pure worker jelly from the hypopharyngeal gland is not contaminated with LiCl. Based on these results, applications of LiCl in colonies with brood should be avoided.

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. DOI: 10.1007/s13592-022-00949-y.



Lithium chloride leads to concentration dependent brood damages in honey bee hives (*Apis mellifera*) during control of the mite *Varroa destructor*

Carolin REIN¹ , Marisa MAKOSCH¹, Julia RENZ¹, and Peter ROSENKRANZ¹

¹ Apicultural State Institute, University of Hohenheim, 70599 Stuttgart, Germany

Received 19 January 2022 – Revised 21 April 2022 – Accepted 27 June 2022

Abstract – Lithium chloride (LiCl) has a high efficacy against *Varroa destructor* and a good tolerability for adult bees but the effect of LiCl on the honey bee brood has not been taken into consideration yet. We quantified the mortality of larvae fed with different concentrations of LiCl. For artificially reared larvae already, a concentration of 1 mM had significant toxic effects while under colony conditions, 10 mM was well tolerated. However, a chronic application of the effective concentration of 25 mM elicited brood mortalities between 60 and 90%. Shorter feeding periods of 2 or 4 days reduced the brood damages significantly. Measurements of the lithium concentrations in larvae and pupae during a chronic exposure with 10, 17.5 and 25 mM LiCl revealed respective lithium levels in 5th instar larvae of 7, 13 and 15 mg/kg. No lithium was detectable in 2-day old larvae indicating that pure worker jelly from the hypopharyngeal gland is not contaminated with LiCl. Based on these results, applications of LiCl in colonies with brood should be avoided.

lithium chloride / varroa destructor / mite control / brood damages

1. INTRODUCTION

The survival of a honey bee colony essentially depends on the success of treatments against the parasitic mite *Varroa destructor*. In combination with virus infections, varroosis is still the crucial factor for winter losses of managed colonies resulting in enormous economic damages for the beekeeping business (Cook et al. 2007; Francis et al. 2013; Gisder and Genersch 2020; Le Conte et al. 2010; Traynor et al. 2020; van Dooremalen et al. 2012). There are numerous products registered for *Varroa* treatment, ranging from organic acids and essential oils to synthetic acaricides (Emmerich 2018;

Rosenkranz et al. 2010; Underwood and Currie 2003). But none of these veterinary products fulfils all requirements of the beekeeper such as a good efficacy independent from environmental conditions (Underwood and Currie 2003), no measurable contaminations of honey bee products (Bogdanov 2006; Thrasylvoulou and Pappas 1988), low risk of mite resistances (Milani 1999; Sammataro et al. 2005) and no severe side effects to bees and brood (Rosenkranz et al. 2010). Despite the overall unsatisfactory performance of the currently available products, new acaricidal compounds have not been registered during the past decades. Still, registered products for the treatments of *V. destructor* are nearly exclusively based on a limited number of active substances such as oxalic acid, formic acid, lactic acid, thymol and the synthetic agents tau-fluvalinate, flumethrin, coumaphos and amitraz (Emmerich 2018; Mutinelli 2016). Recently, lithium chloride (LiCl)

Corresponding author: C. Rein,
carolin.rein@uni-hohenheim.de
 Manuscript editor: Yves Le Conte

has been discovered as a new compound with promising varroacidal properties (Ziegelmann et al. 2018). Lithium chloride is a hydro-soluble and ubiquitous distributed salt and furthermore, a natural component of honey (Tutun et al. 2019). In contrast to the acaricides listed above, LiCl has a systemic mode of action which means that it could easily be applied by adding it to the honey bee food. Ziegelmann et al. (2018) showed that even small concentrations of 25 mM LiCl can lead to mite mortalities of nearly 100% when fed to caged bees. Even under field conditions, a short-term feeding of LiCl killed about 90% of the mites in brood-less colonies, such as artificial swarms (Ziegelmann et al. 2018). Meanwhile, the extraordinary efficacy of LiCl has been confirmed by other working groups in first field experiments during summer (Stanimirovic et al. 2021) or as winter treatment (Kolics et al. 2020b) and it has been shown to be also effective in killing mites by a contact mode of action (Kolics et al. 2020a). Also, first analyses on the residues of lithium in the honey bee products have been performed, revealing a moderate concentration in honey which returns to control level 16 days after treatment and low contaminations in bee bread (Kolics et al. 2021; Prešern et al. 2020). Moreover, no measurable residues were found in bees wax (Kolics et al. 2021). The so far measured lithium levels in honey are in the range of certain commercialized honeys (Kolics et al. 2021) and should, therefore, not be an insuperable barrier for a registration of LiCl as a veterinary product.

An equally important requirement for the suitability of LiCl as a new varroacidal compound is its tolerability for bees and brood. For adult bees, the available data indicate no or only moderate side effects even after overdose treatments of colonies or cage bees with LiCl (Prešern et al. 2020; Stanimirovic et al. 2021; Ziegelmann et al. 2018). In contrast, no published data exist on the effect of LiCl on the development of the honey bee brood. However, first measurements of lithium concentrations in larval tissue after respective treatments revealed similar levels to that in adult bees and might, therefore, pose a risk for the brood (Prešern et al. 2020).

In this study, we quantified the effect of different concentrations of LiCl on the mortality of defined larval stages using both, feeding

of artificially reared larvae and field-realistic applications in free flying colonies. In both approaches, a chronic exposure of the larvae throughout the complete feeding period from the 1st to the 5th instar was simulated and larval mortality was recorded in short-term intervals over the whole period of preimaginal development. We hypothesize that the level of brood damage depends on the duration of the treatment and the applied LiCl concentration. Parallel to this, we analysed the accumulation of lithium in larvae of different age by an ICP-MS method in order to define stage-specific thresholds for larval damages. Here, we expect higher lithium concentrations in particular in older larval instars that receive nectar and pollen in addition to the worker jelly (Böhme et al. 2019; Jung-Hoffmann 1966).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Feeding of lithium chloride to artificially reared larvae

To investigate the impact of LiCl on the development of the honey bee brood, 96 larvae were reared in the laboratory and fed for a period of 6 days with in total 160 µl (Table 1) of artificial food, containing different concentrations of LiCl (> 99.9%, p.a., ultra-quality, Roth®): (1 mM, 1.5 mM and 2 mM). The artificial larval food consists of royal jelly, fructose, glucose, yeast extract, purified water, as described by Aupinel et al. (2005) and the respective amount of LiCl. First, the fructose, glucose and yeast extract were weighed and dissolved in either purified water or LiCl solution and afterwards mixed with the respective amount of royal jelly.

The larvae originated from two colonies of the Apicultural State Institute of Hohenheim, Stuttgart which were equal in colony strength and headed by sister queens. To generate a sufficient number of larvae of the same age, the queen of each hive was caged on one brood frame for at least 24 h in early summer 2017. Two to three days later, the newly hatched 1st instar larvae were transferred to plastic queen cups on top of

Table 1 Amount of food consumed per day for each larva reared in vitro

Rearing day	1	2	3	4	5	6	Total
Consumed food per larva (μl)	10	10	20	30	40	50	160

dental rolls in a 48-well tissue culture plate. Each dental roll was of 5 mm in diameter and wetted with potassium sulphate (K_2SO_4) solution to maintain a relative air humidity of about 95%.

For the artificial feeding, we followed the description of Aupinel et al. (2005) and therefore kept the well in an incubator (Memmert IPP500) at 34 °C for 6 days. The larvae were only removed from the incubator for daily artificial feeding and checking on mortality. During the feeding, the well was placed on a heating plate of 35 °C to keep the larvae warm. As soon as the larvae started to defecate and building a cocoon, they were transferred into a new 48-well plate, where the dental rolls were now wetted with sodium chloride (NaCl) to reduce the relative air humidity to 80%, and then placed back in the incubator for another week. All successfully pupated larvae were then kept in small plastic cages, each containing a piece of wax till the time of hatching. Also, a small amount of honey was provided for the newly hatched bees. The mortality of the larvae and pupae was recorded in daily intervals until day 21 of larval development, briefly before adult hatching took place. Dead larvae/pupae were identified by spiracular movements and whether or not they react to a slight touch with a forceps.

After evaluating the first artificial rearing experiment, we conducted a second approach where the larvae were only fed for a period of 3 days with a diet containing 2 mM LiCl to investigate if a shorter feeding period results in lower mortalities and if there is a difference between young and old larvae. For this purpose, the larval phase was divided into two periods which corresponded to young larvae from 1st to 3rd larval instar (L1–L3) and old larvae from the end of the 3rd to the 5th larval instar (L3–L5), respectively (Rembold et al. 1980). The L1–L3 group was fed with LiCl-diet for the first 3 days

of rearing and afterwards replaced by lithium-free food. The L3–L5 group was fed the other way around receiving control diet for the first 3 days followed by a change to LiCl-diet for the rearing day 4 to 6. The survival probability was evaluated the same way as described above.

2.2. Assessment of brood development in free flying colonies

Twelve colonies of *A. mellifera* headed by sister queens were established in polystyrene mini-hives (“Mini Plus”) in June 2020 at the campus of the Apicultural State Institute, Hohenheim. Each hive consisted of approx. 7000 worker bees and one sister queen on 18 to 24 small combs (size 16 cm \times 25.2 cm) and only small amounts of food reserves. The colonies were fed with dough made from icing sugar (Stützucker Group) and honey produced from summer nectar of the same region in the ratio 2:1. Four different batches were produced, one untreated control and three batches where different concentrations of lithium chloride (> 99.9%, p.a., ultra-quality, Roth®) were added: 10 mM, 17.5 mM and 25 mM (each $n=3$). The respective concentrations were verified by ICP-MS analysis (see below) of the different batches. The colonies were randomly divided into 4 groups (three colonies each for control, 10, 17.5 and 25 mM LiCl) and at day 0 all colonies received 2 kg of the respective food. Over a period of 8 days, the amount of remaining food was weighted and recorded on daily intervals, in order to make sure that over the entire period of larval development, the nurse bees consumed lithium-contaminated food. After 8 days of feeding and the sealing of the assessed brood cells, the remaining food was weighted and removed.

To quantify the impact of LiCl on the development of individual honey bee larvae within these colonies, we conducted a brood development assessment according to the method described by Schur et al. (2003), starting on the first day of feeding. Briefly, the position of at least 250 eggs per colony in each hive was marked on a transparent sheet (=brood area fixing day (BFD)) and the development of the brood was assessed every 48 h. During each inspection, the labelled cells with viable larvae as well as brood cells that have been cleared out were marked on a new transparent sheet. These data were used to calculate the survival probability for each monitoring day. The monitoring of the brood was terminated on day 16 after BFD before a possible hatching of the eldest brood cells.

For the second brood assessment in the year 2021, we only used the 25 mM LiCl concentration and evaluated the impact of the duration of the feeding on the survival rate of the brood. To realize this, the feeding with LiCl-contaminated food started either in the 1st, 3rd or 5th larval instar resulting in appr. 6, 4 or less than 2 days of exposure to contaminated food. For this purpose, we marked 48–86 individuals of different larval instars (L1, L3 and L5; (Rembold et al. 1980)) on a brood comb on a transparent sheet. The feeding of the colonies and the inspections every 48 h were performed as above.

2.3. Analysis of lithium concentration in food and different larval instars

From the 2020 experiment, samples of the applied food (control, 10 mM, 17.5 mM, 25 mM) were analysed. Samples of 5th instar larvae shortly before brood cell sealing were collected 7 days after the application of the lithium-contaminated food. From each experimental hive ($n=3$ per group), 20 larvae were pooled, homogenized and then analysed with ICP-MS.

In the 2021 experiments, we analysed the course of lithium concentration over the different developmental larval stages and in relation to the duration of the feeding. For this purpose, we took samples on the 5th, 7th, 10th, 11th, 14th

and 18th day post-treatment, which corresponds to the days after egg-laying. For instance, on the 5th day, we sampled 2-day old larvae considering the 3 days for egg development. This should provide first information on how the lithium accumulates in young larvae and gets metabolized during metamorphosis. Five to 10 larvae/pupae per sample were pooled and each hive ($n=3$ per group) was sampled 3 times per sampling date.

The content of lithium was determined with the ICP-MS device NexION 300X from Perkin-Elmer. For this purpose, the obtained samples (applied food, larvae) of 0.05 g were completely dissolved with 2 ml of HNO_3 in a microwave digestion using an Ultra Clave III from MLS (900 watts at 100 bar pressure; heated from 80 to 200 °C in 5 steps) and the digestion solution was then filled up to 10 ml. For the ICP-MS measurement, the sample solution was again diluted tenfold and CertiPUR Rhodium ICP Standard Solution 1000 mg/l Rh, Merck Company was added as an internal standard. The dilutor of a microLAB 600 series was used for dilution. For calibration, a Merck VI standard solution (ICP multi-element standard solution) was diluted to the following concentrations: 0.1 µg/l, 0.2 µg/l, 1 µg/l, 10 µg/l, 20 µg/l. The calibration solutions were prepared with ultrapure H_2O and HNO_3 (ROTH ROTIPURAN Supra quality 69% from Roth Company) and also diluted with the dilutor. A calibration straight line was prepared on the basis of the solutions. This straight line was the basis for quantifying the lithium content in the digestion solutions (LOQ < 0.025 mg/kg).

2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using IBM SPSS Statistics version 27. The survival probability of the in vitro reared larvae was analysed using a Kaplan–Meier test with log-rank. The survival probabilities of the brood assessments were first tested on normal distribution with Shapiro–Wilk test and consequently analysed using Mann–Whitney–U test for two variables or Kruskal–Wallis test for

more than two variables. Food uptake data were first judged on variance homogeneity followed by ANOVA for 2020 and *t*-test for 2021. The concentration analyses were evaluated using the post hoc Tukey HSD test.

3. RESULTS

3.1. Feeding of lithium chloride to artificially reared larvae

The artificial rearing of larvae allowed an exact application of a defined quantity and concentration of lithium-contaminated food. The survival of the treated larvae was recorded throughout the complete period of the preimaginal development (21 days). The survival of those larvae exposed to lithium-contaminated food was significantly reduced ($p < 0.001$; log-rank test) compared to the control larvae for all concentrations (Figure 1). Higher concentrations of LiCl lead to lower survival

probabilities of the larvae with most of the deaths occurring during the prepupal and pupal stages (after day 10). While there was no significant difference between the 1 mM and 1.5 mM treatment group ($p = 0.166$; log-rank test), the 2 mM treatment revealed a highly significant difference to all other groups ($p < 0.001$; log-rank test). The 2 mM treatment obviously represents an absolute damage threshold for larvae, because only 3% of the larvae survived till day 21.

In the second approach, the larvae were fed only for a period of 3 days with food containing 2 mM LiCl, either from the start of larval development till 3rd larval instar or from the 3rd larval instar till the end of the feeding period in the 5th instar. Relative to the control group, both treated groups showed significant reduced survival rates (Figure 2). However, younger larvae (group L1–L3) were significantly more susceptible to LiCl compared to those larvae treated only in the second phase of larval development (L3–L5) ($p < 0.001$, log-rank test, Figure 2).

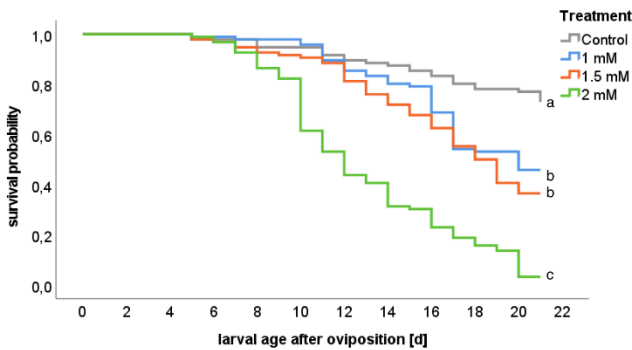


Figure 1. Kaplan–Meier survival curve of artificially reared larvae exposed to different concentrations of LiCl in larval food compared to the control group. 1st instar larvae (day 4 after egg laying) were transferred into artificial cells and fed daily with the corresponding diet ($n = 4$ well plates/treatment, $n = 24$ larvae/well plate). Lines not sharing any index letter are statistically different at $p < 0.001$ (Kaplan–Meier test; log rank (Mantel-Cox)).

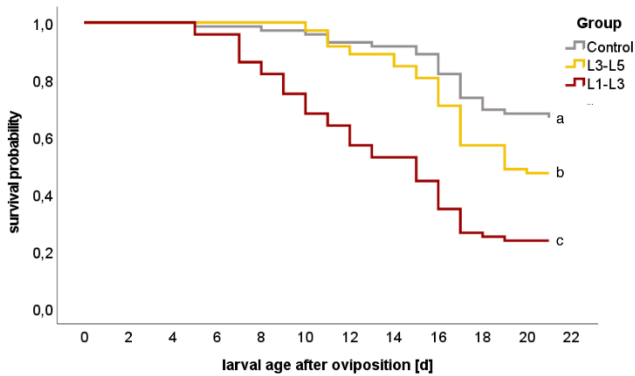


Figure 2. Kaplan–Meier survival curve of artificially reared larvae exposed to a diet containing 2 mM of LiCl either from the start of larval development to 3rd larval instar (L1–L3) or from 3rd larval instar to 5th instar (L3–L5) ($n=3$ well plates/treatment, $n=24$ larvae/well plate). Lines not sharing any index letter are statistically different at $p < 0.05$ (Kaplan–Meier test; log rank (Mantel–Cox)).

3.2. Assessment of brood development in free flying colonies

Our field experiments on the brood assessment clearly showed that LiCl has harmful effects also on larvae in free flying colonies (Figure 3). The

total number of selected eggs for the assessment ranged from 741 to 797 per treatment group. We provided LiCl-contaminated food ad libitum resulting in a continuous food uptake during the entire larval feeding period of about 8 days. There were no differences in food uptake

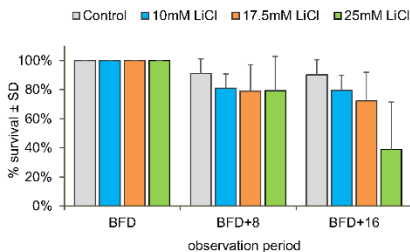


Figure 3. Effect of a chronic feeding of LiCl (10 mM, 17.5 mM and 25 mM) in free flying colonies on the survival of the honey bee brood starting on the BFD (brood area fixing day) till BFD + 16 compared to the untreated control ($n=3$). The total number of selected eggs on BFD were 797 (control), 748 (10 mM), 741 (17.5 mM) and 748 (25 mM). The 25 mM treatment elicited high brood mortalities; however, there were no significant differences between the treatment groups ($p=0.516$, $p=0.123$, Kruskal–Wallis test).

Table II Total food uptake in g of dough with different LiCl concentrations during the brood assessments in free flying colonies in the study years 2020 and 2021 ($n=3/\text{treatment}$). There were no significant differences between the treatment groups (2020: $F(3,8)=0.339$, $p=0.798$; 2021: $t(4)=1.706$, $p=0.163$)

	LiCl concentration			
	Control	10 mM	17.5 mM	25 mM
2020	1,518 ± 305	1,643 ± 861	1,221 ± 660	1,262 ± 432
2021	1,733 ± 252			1,484 ± 28

between the control and the LiCl-treated colonies ($F(3,8)=0.339$, $p=0.798$); the consumption of food with higher concentrations of LiCl, however, was reduced by approximately 20% (Table II).

The brood survival rates on BFD + 8, shortly before the sealing of the brood cell, reveal only small differences between the LiCl-treated groups and the untreated control hives, which were not significant different ($p=0.516$, Kruskal–Wallis test). However, these differences in brood survival rates increased on BFD + 16, particularly in the highest concentration of 25 mM, where only 39% of the brood survived.

These differences performed during the season of 2020 were not statistically significant due

to a high variation among individual colonies; however, the repetition of the 25 mM application in 2021 clearly revealed a significant effect of this lithium concentration (see Figure 4). We could also confirm the finding from the laboratory experiments (Figure 1), that most of the damages occur during the prepupal or pupal stages when the cells are sealed (BFD + 16) rather than in larval stages (until BFD + 8).

3.2.1. Brood assessment with different treatment periods

We can clearly show that the level of brood damages depends on the duration of the application of lithium-contaminated food. A short-term feeding of a period of less than 2 days directly before the sealing of the brood cell had only a slight, but not significant effect on the continued survival of the 5th instar larvae (Figure 4). However, longer feeding periods of 4 days or even over the complete larval development (appr. 6 days) increased the brood mortality rates significantly compared to the respective control group ($p=0.01$, Mann–Whitney- U test, Figure 4). In detail, only 26% of the larvae survived a LiCl application over 4 days and only 7% of the larvae survived the 6-day-treatment. The food uptake in

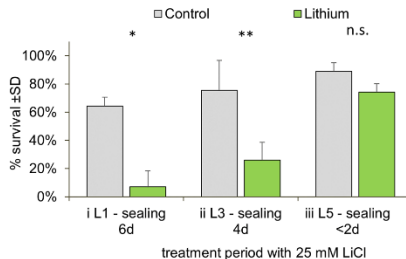


Figure 4. Brood survival rate in free flying colonies after feeding of 25 mM LiCl during distinct periods of the larval development: **i** 1st instar larvae till sealing of the brood cell (appr. 6 days), **ii** 3rd instar larvae till sealing of the brood cell (appr. 4 days) and **iii** 5th instar larvae till sealing of the brood cell (<2 days). Data given as mean ± standard deviation of survived brood on day 19 of larval development. The total number of recorded larvae ranged from $n=272$ to $n=360$ per group. Compared to the control, there were significant differences in the survival rates of the colonies fed over 6 and 4 days (Mann–Whitney- U test, $p=0.01$, $p=0.009$, respectively) but not in the colonies fed for <2 days.

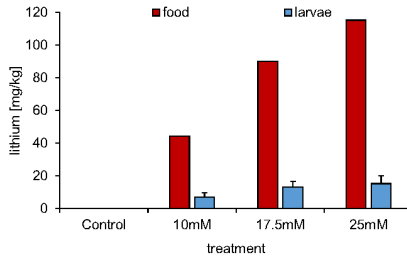


Figure 5. Concentration of lithium in the applied food and in the 5th instar larvae 7 days post-treatment with different LiCl concentrations. Data of larvae were each given as mean \pm standard deviation ($n=3$). The food was only measured once in the three stock solutions. Control larvae samples were below the limit of quantification ($LOQ=0.025$ mg/kg).

colonies fed with 25 mM LiCl was not significantly different from the food uptake in the control colonies ($t(4)=1.706, p=0.163$, Table II).

It is noteworthy that the brood survival rate of the control larvae (using 1st instar larvae at the BFD) was considerably lower (Figure 4, left column; 64%) compared to the survival rate in the respective control of the previous year (Figure 3; 90%).

3.3. Analysis of lithium concentration in food and different larval instars

First of all, we could confirm the desired concentration of our applied food with 44.3 mg/kg lithium for the 10 mM, 89.9 mg/kg for the

17.5 mM and 115 mg/kg for the 25 mM LiCl concentration. The concentration of lithium in the larvae increased with (i) higher concentrations of LiCl in the food (Figure 5) and (ii) with the time of exposure (Figure 6). In the last instar larvae (L5) from hives treated with 10 mM LiCl, we measured lithium concentrations of 7.0 mg/kg, whereas in the larvae treated with 17.5 mM, the lithium concentration was almost doubled (13.1 mg/kg). The 25 mM treatment leads to the highest concentration of 15.2 mg/kg. Compared to the concentrations of lithium in our applied food, we measured a sixfold lower concentration in the respective larvae (Figure 5).

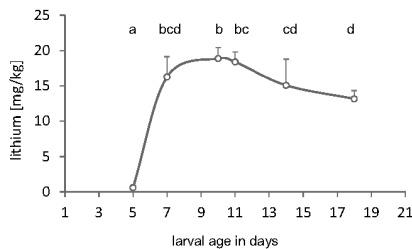


Figure 6. Concentration of lithium in larvae from colonies chronically treated with 25 mM LiCl. Sampling of brood stages was performed on the 5th, 7th, 10th, 11th, 14th and 18th day after egg laying, which corresponds to different developmental stages. Data are given as mean \pm standard deviation ($n=9$). Plotted values not sharing any index letter are statistically different at $p < 0.05$ (post hoc Tukey HSD test).

To analyse the course of the lithium concentration in larvae, we analysed different larval instars during a chronic application of 25 mM LiCl. The lithium concentration differed significantly depending on age of larvae/pupae ($F(5,42)=71.89$, $p < 0.00$; Figure 6). In 2-day-old larvae (L2/L3) sampled 5 days after the start of lithium treatment, we only found traces of lithium (0.59 ± 0.35 mg/kg; Figure 6). The concentration of lithium significantly increases already 2 days later (L4) to values of 16.3 ± 2.9 mg/kg. In the pre-pupal stage briefly after sealing of the brood cell, the lithium concentration reaches a maximum of 18.9 ± 1.5 mg/kg and thereafter decreases slightly towards 13.2 ± 1.2 mg/kg during the pupal phase (Figure 6).

During the sampling of larvae and pupae for the residue analysis, we frequently observed that the pupae were malformed with an incomplete development of head, thorax and abdomen while most of the larval instars seemed normally developed. This might indicate that lithium disturbed the metamorphosis of the honey bee larva which is supported by the high mortality and brood removal rates of pre-pupal and pupal stages as shown in Figures 1 and 4.

4. DISCUSSION

Lithium chloride (LiCl) is one of the very few new active compounds with a promising potential to become an effective veterinary product for the control of the mite *Varroa destructor*. This potential is based on the (i) contact and systemic mode of action (“easy to apply”), (ii) high efficacy under broodless conditions, (iii) good tolerability to adult bees and (iv) no identifiable risk for the user and consumer. Despite these advantages of the new compound, a number of details on the mode of action and, in particular, on side-effects on the honey bee brood still need to be clarified. Here, we analysed for the first time the impact of LiCl on the development of honey bee larvae and pupae using both, in vitro reared larvae and larvae reared within the colony.

For the in vitro assay, we used larval diets with very low concentrations of LiCl of 1 to 2 mM which is considerably below the effective treatment

concentration of 25 to 50 mM (Stanimirovic et al. 2021; Ziegelmann et al. 2018) and close to the range of concentrations naturally occurring in certain honeys (Bogdanov et al. 2008). However, even the larval diet with the lowest concentration of 1 mM LiCl led to a survival probability of only 46%. This is significantly lower compared to the untreated control colonies with nearly 80% survived larvae on day 21. Higher LiCl concentrations of 1.5 mM and 2 mM reduced the survival rate even stronger with only three of 96 larvae that survived the 2 mM diet until day 21. This clearly demonstrates the high sensitivity of the honey bee brood to LiCl, particularly when compared to cage experiments with adult worker bees where a continuous feeding of LiCl concentrations of 2 to 25 mM over up to 7 days did hardly reveal any toxic effects (Stanimirovic et al. 2021; Ziegelmann et al. 2018). We could also show that the extent of brood damages depends on the duration of the LiCl application: the survival of larvae receiving the 2 mM diet increased substantially when applied only during the first or during the second phase of larval development. It is not surprising that the younger larvae (L1–L3) are significantly more susceptible to LiCl compared to the older ones (L4, L5). It is noticeable that brood mortality not only occurred during the period when the larvae actively consumed the contaminated food but also even to a higher extent during the non-feeding prepupal and pupal phase. This indicates long-term effects of LiCl on the developmental processes during the metamorphosis.

The field experiments confirmed the low tolerability of the honey bee brood to LiCl. However, a substantial increase of larval mortality was only recorded when the colonies received food containing 25 mM LiCl over the entire larval developmental period resulting in a more than 50% lower brood survival rate compared to the control colonies. Lower concentrations of 10 mM and 17.5 mM LiCl elicited only a low reduction in brood survival rates of 20% and 28%, respectively. In the second experiment — performed in the following season — the 25 mM application led to even lower survival probabilities of only 7% compared to 64% in the untreated control (Figure 4). This is surprising because the experiments in the two consecutive

years (2020 and 2021) were performed with the same experimental setup and at the same apiary. This reveals a general problem of the brood assessment as a standard field method for toxicity test of larvae (Medrzycki et al. 2013). Numerous studies have criticized high variations in the brood removal rates even among control colonies or in repetitions with identical treatments (Pistorius et al. 2011). One general reason for these variations is that the brood removal rates in free flying colonies depend on many factors, such as colony strength, the availability of food, the total amount of brood or simply the time of the year (Bigio et al. 2013). Also covert brood diseases and the genotype can lead to different pronounced hygienic behaviour (Panasiuk et al. 2008). At the beginning of our experiments we, therefore, standardized the numbers of bees and brood cells and the amount of stored food as far as possible. However, a particular problem is most likely the fact that we could not quantify which proportion of the applied LiCl has been transferred by the nurse bees to the diet of individual larvae. Though, the food uptake was not significantly different between the LiCl-contaminated food and the LiCl-free control food. Larval food is a mixture of hypopharyngeal gland secretion of the nurse bees with pollen and nectar or honey. The precise composition depends on the age and caste of the larvae that has to be fed (Haydak 1970). So far, it is not clear to what proportion the nurse bees use freshly collected nectar, applied food or stored food for the feeding of the larvae (Babendreier et al. 2004; Brodschneider and Crailsheim 2010; DeGrandi-Hoffman and Hagler 2000). In any case, high foraging activities of our experimental colonies could dilute the concentration of LiCl in the larval diet when freshly collected nectar is preferred over the applied lithium-contaminated dough. An influence of the foraging activity of the bees on the composition of larval food has also been confirmed by Böhme et al. (2019) who identified freshly collected pollen in worker jelly.

Different foraging activities might therefore be responsible for the different brood removal rates in the years 2020 and 2021. Both experimental seasons were rather different concerning

nectar and pollen availability with perfect conditions in the year 2020 in contrast to an unusual cold and rainy summer with an extremely poor nectar flow in the following year. In the 2021 experiments, these unfavourable conditions might have increased (i) the general removal rate of the brood even in the control colonies and (ii) the exposure of larvae to LiCl because the applied LiCl was not diluted with nectar collected from outside. An obvious positive effect of the reduced foraging activity in 2021 is the lower variation within the different treatment groups.

At least, the results of both years show impressively that a long-term application of LiCl in colonies with brood should absolutely be avoided due to high brood damages which are not in accordance with a good beekeeping practice. The application of lower concentrations of 10 mM or less might reduce the brood damages to an acceptable level, but for an effective treatment against *V. destructor*, a concentration of 25 to 50 mM LiCl (Stanimirovic et al. 2021; Ziegelmann et al. 2018) is required.

However, our experiment with different treatment periods demonstrates clearly that not only the concentration of the applied food but also the duration of the LiCl application has a significant impact on the larval development. The survival probability of the brood after a short-term contact with LiCl for a maximum of 2 days was not significantly different to the control group. It has to be analysed in further field experiments whether repeated short-term treatments ("block treatments") with small amounts of 25 mM LiCl are suitable to minimize the brood damages during a treatment while maintaining a high efficacy. But the therapeutic window for such an approach seems to be small since already a feeding period of 4 days had a clear toxic effect in our experiments. And even in case of no measurable brood damages, the vitality of the bees hatching from treated brood has to be investigated in additional experiments.

So far, we do not know how lithium disturbs the larval and pupal development. Interestingly, it seems that in both, in the *in vitro* and in the field experiments, most of the damage occurs during prepupal and pupal stage when the metamorphosis

takes place rather than after the moults of the different larval instars. This was supported by yet not quantified observations during the removal of pupae from the brood cells for chemical analysis where most of the pupae showed malformations while most of the larval instars in unsealed brood cells seemed normally developed. Nonetheless, specific susceptibilities of different larval instars under natural conditions and possible long-term effects need to be examined.

There are some evidence that lithium can also alter the development of other organisms than honey bees through inhibition of glycogen synthase kinase-3 β , which plays a role in cell fate determination (Klein and Melton 1996; Phiel and Klein 2001). In embryos of the clawed frog *Xenopus laevis*, the exposure to lithium caused an expansion and duplication of dorsal and anterior structures (Kao et al. 1986) and inhibited the morphogenesis of the nervous system (Breckenridge et al. 1987). Among insects, in the genetic model organism *Drosophila melanogaster*, 12 genes were identified with a significant response to lithium exposure (Kasuya et al. 2009). These genes were subdivided into four groups according to their biological function: (i) amino acid transport and metabolism, (ii) detoxication, stress response or self-defense reactions, (iii) psychiatric or neurological disorders, and (iv) others (Kasuya et al. 2009). Especially, the genes of the group (i) could be of interest for a comparative gene expression analysis as an application of lithium seems to influence also the metabolism in honey bee larvae.

Such experiments are a prerequisite to better understand the negative effects of lithium on the physiological processes during larval development. Until then, our ICP-MS analyses of the lithium concentration in differently treated larvae provide a first hint on the threshold concentration that is still tolerable for a successful preimaginal development. As honey bee larvae do not defecate before the end of 5th larval instar, we can exactly determine the concentration of lithium that has accumulated in the in vitro reared larvae by calculating the concentration of lithium in the consumed food. During the artificial rearing, we fed a total of 160 μ l of LiCl contaminated food to each larva. For the 1 mM application,

this corresponds to a consumption of 6.8 μ g LiCl or 1.1 μ g pure lithium per larva. Considering a body weight of the larvae at the end of the feeding phase (5th larval instar before defecation) of about 160 mg (Rembold et al. 1980), we can calculate a lithium concentration in these larvae of 6.9 mg/kg reared on the 1 mM diet. This value is exactly equal to the concentration of lithium measured in larvae from hives treated with a ten-fold higher concentration (10 mM) of LiCl during the complete period of larval development (7.0 mg/kg). It should be considered that during the larval feeding phase, lithium might enter the larval body not only by feeding but also through the cuticle. It has been proven that LiCl is effective on mites by topical application (Kolics et al. 2020a). The honey bee larvae have continuously contact to the liquid food which is applied in frequent intervals. Whether a trans-cuticular uptake is relevant for the observed side effects has to be proven in additional approaches.

After the feeding of higher LiCl concentrations within the colony, we found a corresponding increase of lithium levels in the respective larvae. In detail, the 2.5-fold increase of LiCl in the applied food (10 to 25 mM) resulted in a 2.2-fold increase of lithium within the larvae (7 to 15.3 mg/kg). It is remarkable that the concentration of lithium in the larvae is always considerably lower compared to the concentration in the applied food (Figure 5) and confirms the above-mentioned statement that under natural brood rearing conditions, only a small part of the lithium from the applied food ends up in the larval diet. The reasons for these differences are most likely (i) dilution of the LiCl food by nectar, (ii) metabolization of LiCl including defaecation by the hive bees and (iii) no or little accumulation of LiCl in the hypopharyngeal glands of the nurse bees and, therefore, in the worker jelly. The latter assumption is supported by the extremely low lithium concentrations in the 5-day-old larvae (egg laying as starting point) which according to Rembold et al. (1980) corresponds to the beginning of the 3rd larval instar. Up to this age, the larvae exclusively receive worker jelly from the hypopharyngeal gland (Babendreier et al. 2004; Haydak 1970) which obviously was largely uncontaminated by lithium.

Albeit our *in vitro* experiment with stage-specific applications of LiCl revealed a significant higher susceptibility of the younger larvae compared to the older ones, these first larval instars are likely not exposed to lithium-contaminated food under natural conditions. This means that an application of LiCl will not contaminate the worker jelly neither the royal jelly. This can be regarded as positive because a treatment with LiCl is neither a risk for worker larvae of the 1st and 2nd instar nor the queen, which is fed with royal jelly throughout the lifetime (Jung-Hoffmann 1966). The latter is supported by Kolics et al. (2021) who did not detect any lithium residues in queens 28 days after applying 1 l of 25 mM LiCl syrup within the hive.

From days 5 to 7 of larval development, the concentration of lithium increases rapidly to the maximum value. This concentration remains at the same level during metamorphosis and the beginning of the pupal phase followed by an only slight reduction during the pupal phase. Finally, the low standard deviations of the different residue analyses, each based on 9 brood samples, clearly indicate an even distribution of the lithium within the entire brood nest of the treated hives.

5. CONCLUSION

Lithium is not only highly effective in the treatment of bipolar disorders (Schou 2001) but has also become a promising substance to combat the parasitic mite *Varroa destructor*. Here, we clearly show that a concentration of 25 mM LiCl, which is required to effectively kill the mites on adult bees, leads to severe brood damages when applied over the whole larval developmental period. But our results also indicate that lithium is not or only in traces incorporated in the worker or royal jelly synthesized in the hypopharyngeal glands of the nurse bees. Although this should yet be confirmed by direct measurements of the lithium concentration in hypopharyngeal glands and in larval food, young worker larvae and queen larvae in general seem to be less endangered by a LiCl application. The preliminary consequence for a possible application is that a LiCl treatment should be performed exclusively in brood-free

colonies, at least in colonies without elder brood stages, whether a repeated short-term application of LiCl could be a conceivable solution for colonies with brood has to be analysed in additional field experiments.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to explicitly thank Barbara Horn and Dr. Monika Bach (core facility, University of Hohenheim) for the chemical analyses of the lithium content in larval samples.

AUTHOR CONTRIBUTION

CR and PR developed the design of the study. CR conducted the field experiments, analysed the data and drafted the manuscript. MM performed the *in vitro* experiments. JR conducted the brood assessment studies in 2021. PR supervised the experiments and finalized the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. The project (281C301A19) is supported by funds of the Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) based on a decision of the Parliament of the Federal Republic of Germany via the Federal Office for Agriculture and Food (BLE) under the innovation support programme.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIAL

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

CODE AVAILABILITY

Not applicable.

DECLARATIONS

Ethics approval Not applicable.

Consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

Conflict of Interest The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

REFERENCES

- Aupinel P, Fortini D, Dufour H, Tasei J-N, Pham-Delègue M-H (2005) Improvement of artificial feeding in a standard *in vitro* method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bull Insectol* 58(2):107–111
- Babendreier D, Kalberer N, Romeis J, Fluri P, Bigler F (2004) Pollen consumption in honey bee larvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plants. *Apidologie* 35(3):293–300. <https://doi.org/10.1051/apido:2004016>
- Bigio G, Schürch R, Ratnieks FLW (2013) Hygienic behavior in honey bees (Hymenoptera: Apidae): effects of brood, food, and time of the year. *J Econ Entomol* 106(6):2280–2285. <https://doi.org/10.1603/ec13076>
- Bogdanov S (2006) Contaminants of bee products. *Apidologie* 37(1):1–18. <https://doi.org/10.1051/apido:2005043>
- Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P (2008) Honey for nutrition and health: a review. *J Am Coll Nutr* 27(6):677–689. <https://doi.org/10.1080/07315724.2008.10719745>
- Böhme F, Bischoff G, Zebitz CPW, Rosenkranz P, Wallner K (2019) From field to food II – will pesticide-contaminated pollen diet lead to a contamination of worker jelly? *J Apic Res* 58(4):542–549. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1614727>
- Breckenridge LJ, Warren RL, Warner AE (1987) Lithium inhibits morphogenesis of the nervous system but not neuronal differentiation in *Xenopus laevis*. *Development* 99(3):353–370. <https://doi.org/10.1242/dev.99.3.353>
- Broschneider R, Crailsheim K (2010) Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* 41(3):278–294. <https://doi.org/10.1051/apido/2010012>
- Cook DC, Thomas MB, Cunningham SA, Anderson DL, de Barro PJ (2007) Predicting the economic impact of an invasive species on an ecosystem service. *Ecological Applications: a Publication of the Ecological Society of America* 17(6):1832–1840. <https://doi.org/10.1890/06-1632.1>
- DeGrandi-Hoffman G, Hagler J (2000) The flow of incoming nectar through a honey bee (*Apis mellifera* L.) colony as revealed by a protein marker. *Insectes Soc* 47(4):302–306. <https://doi.org/10.1007/PL00001720>
- Emmerich IU (2018) Zugelassene Arzneimittel für Honigbienen (*Apis mellifera*) in Deutschland. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* (131)
- Francis RM, Nielsen SL, Kryger P (2013) Varroa-virus interaction in collapsing honey bee colonies. *PLoS ONE* 8(3):e57540. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057540>
- Gisder S, Genersch E (2020) Direct evidence for infection of *Varroa destructor* mites with the bee-pathogenic deformed wing virus variant B - but not variant A - via fluorescence-in situ-hybridization analysis. *J Virol* 95(5). <https://doi.org/10.1128/JVI.01786-20>
- Haydak MH (1970) Honey bee nutrition. *Annu Rev Entomol* 15(1):143–156
- Jung-Hoffmann J (1966) Die Determination von Königin und Arbeiterin der Honigbiene. *Zeitung Für Bienenforschung* 8:296–322
- Kao KR, Masui Y, Elinson RP (1986) Lithium-induced respecification of pattern in *Xenopus laevis* embryos. *Nature* 322(6077):371–373
- Kasya J, Kaas G, Kitamoto T (2009) Effects of lithium chloride on the gene expression profiles in *Drosophila* heads. *Neurosci Res* 64(4):413–420. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2009.04.015>
- Klein PS, Melton DA (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(16):8455–8459. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.16.8455>
- Kolics É, Mátyás K, Taller J, Specziár A, Kolics B (2020a) Contact effect contribution to the high efficiency of lithium chloride against the mite parasite of the honey bee. *Insects* 11(6). <https://doi.org/10.3390/insects11060333>
- Kolics É, Specziár A, Taller J, Mátyás KK, Kolics B (2020b) Lithium chloride outperformed oxalic acid sublimation in a preliminary experiment for Varroa mite control in pre-wintering honey bee colonies. *Acta Vet Hung* 68(4):370–373. <https://doi.org/10.1556/004.2020.00060>
- Kolics É, Sajtos Z, Mátyás K, Szepesi K, Solti I, Németh G, Taller J, Baranyai E, Specziár A, Kolics B (2021) Changes in lithium levels in bees and their products following anti-Varroa treatment. *Insects* 12(7). <https://doi.org/10.3390/insects12070579>
- Le Conte Y, Ellis M, Ritter W (2010) Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses? *Apidologie* 41(3):353–363. <https://doi.org/10.1051/apido/2010017>
- Medrzycki P, Giffard H, Aupinel P, Belzunces LP, Chauzat M-P et al (2013) Standard methods for toxicology

- research in *Apis mellifera*. *J Apic Res* 52(4):1–60. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.14>
- Milani N (1999) The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie* 30(2–3):229–234. <https://doi.org/10.1051/apido:19990211>
- Mutinelli F (2016) Veterinary medicinal products to control *Varroa destructor* in honey bee colonies (*Apis mellifera*) and related EU legislation – an update. *J Apic Res* 55(1):78–88. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1172694>
- Panasiuk B, Skowronek W, Bienkowska M (2008) Influence of genotype and method of brood killing on brood removal rate in honey bee. *J Apic Res* 52(2)
- Phiel CJ, Klein PS (2001) Molecular targets of lithium action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41(1):789–813
- Pistorius J, Becker R, Lückmann J, Schur A, Barth M, Jeker L, Schmitzer S, Von der Ohe W (2011) Effectiveness of method improvements to reduce variability of brood termination rate in honey bee brood studies under semi-field conditions. In Proceedings of the 11th International Symposium of the ICP-BR Bee Protection Group, Wageningen, November 2–4. <https://doi.org/10.5073/JKA.2012.437.000>
- Prešern J, Kur U, Bubnič J, Šala M (2020) Lithium contamination of honeybee products and its accumulation in brood as a consequence of anti-varroa treatment. *Food Chem* 330:127334. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127334>
- Rembold H, Kremer J-P, Ulrich GM (1980) Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee. *Apis Mellifera I Apidologie* 11(1):29–38. <https://doi.org/10.1051/apido:19800104>
- Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B (2010) Biology and control of *Varroa destructor*. *J Invertebr Pathol* 103(Suppl 1):96–119. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>
- Sammataro D, Untalan P, Guerrero F, Finley J (2005) The resistance of varroa mites (Acari: Varroidae) to acaricides and the presence of esterase. *Int J Acarology* 31(1):67–74. <https://doi.org/10.1080/01647950508684419>
- Schou M (2001) Lithium treatment at 52. *J Affect Disord* 67:21–32
- Schur A, Tornier J, Brasse D, Muhlen W, von der Ohe W, Wallner K, Wehling M (2003) Honey bee brood ring-test in 2002: method for the assessment of side effects of plant protection products on the honey bee brood under semi-field conditions. *Bull Insectol* 56(1):91–96
- Stanimirovic Z, Glavinic U, Jovanovic NM, Ristanic M, Milojkovic-Opsenica D, Mutic J, Stevanovic J (2021) Preliminary trials on effects of lithium salts on *Varroa destructor*, honey and wax matrices. *J Apic Res*. <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1988277>
- Thrasivoulou AT, Pappas N (1988) Contamination of honey and wax with malathion and coumaphos used against the varroa mite. *J Apic Res* 27(1):55–61. <https://doi.org/10.1080/00218839.1988.11100782>
- Traynor KS, Mondet F, de Miranda JR, Techer M, Kowallik V, Oddie MAY, Chantawannakul P, McAfee A (2020) *Varroa destructor*: a complex parasite, crippling honey bees worldwide. *Trends Parasitol* 36(7):592–606. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.004>
- Tutun H, Kahraman HA, Aluc Y, Avci T, Ekici H (2019) Investigation of some metals in honey samples from West Mediterranean region of Turkey. *Veterinary Research Forum: an International Quarterly Journal* 10(3):181–186. <https://doi.org/10.30466/vrf.2019.96726.2312>
- Underwood RM, Currie RW (2003) The effects of temperature and dose of formic acid on treatment efficacy against *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), a parasite of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Exp Appl Acarol* 29(3–4):303–313. <https://doi.org/10.1023/A:1025892906393>
- van Dooremalen C, Gerritsen L, Cornelissen B, van der Steen JJM, van Langevelde F, Blacquière T (2012) Winter survival of individual honey bees and honey bee colonies depends on level of *Varroa destructor* infestation. *PLoS ONE* 7(4):e36285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036285>
- Ziegelmann B, Abele E, Hannus S, Beitzinger M, Berg S, Rosenkranz P (2018) Lithium chloride effectively kills the honey bee parasite *Varroa destructor* by a systemic mode of action. *Sci Rep* 8(1):683. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-19137-5>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

2.4 Lithium chloride treatments in free flying honey bee colonies: efficacy, brood survival, and within colony distribution

Publiziert in *Parasitology Research*

Abstract

The efficacy of various lithium chloride (LiCl) applications in eradicating the parasitic mite *Varroa destructor* in honey bee colonies was investigated, with a specific focus on its impact on brood development. In broodless colonies (3 weeks post queen caging), the highest efficacy of 98% was achieved with a 9-day treatment of 2.5 kg of candy spiked with 50 mM LiCl. A shorter 5-day treatment with 2 kg of 50 mM LiCl candy resulted in an efficacy of 78%. In colonies with brood, a repeated short-term application of 4x0.5 kg 50 mM LiCl candy yielded an efficacy of 88%. LiCl treatment led to a removal of the first batch of brood reared after release of the queen. However, no long-term effects on colony growth were observed, and the colonies successfully overwintered. Additionally, the study demonstrated that lithium is rapidly distributed among the bees of a colony within 2 days, yet only low concentrations were detected in stored food samples. This suggests that the bees efficiently absorb and distribute lithium within the colony. The harvested honey in the following spring revealed a lithium concentration of 0.1 – 0.2 mg/kg, which is below naturally occurring lithium levels in honey. Based on these findings, LiCl can be considered an effective and easy-to-apply acaricide in broodless colonies, and even in colonies with brood, it had good efficacy and no long-term effects on colony survival. Further research may be

necessary to determine the optimal treatment period for achieving an efficacy over 95%.

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. DOI: 10.1007/s00436-023-08084-y



Lithium chloride treatments in free flying honey bee colonies: efficacy, brood survival, and within-colony distribution

Carolin Rein¹ · Marius Blumenschein¹ · Kirsten Traynor¹ · Peter Rosenkranz¹Received: 4 August 2023 / Accepted: 3 December 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

The efficacy of various lithium chloride (LiCl) applications in eradicating the parasitic mite *Varroa destructor* in honey bee colonies was investigated, with a specific focus on its impact on brood development. In broodless colonies (3 weeks post queen caging), the highest efficacy of 98% was achieved with a 9-day treatment of 2.5 kg of candy spiked with 50 mM LiCl. A shorter 5-day treatment with 2 kg of 50 mM LiCl candy resulted in an efficacy of 78%. In colonies with brood, a repeated short-term application of 4 × 0.5 kg 50 mM LiCl candy yielded an efficacy of 88%. LiCl treatment led to a removal of the first batch of brood reared after release of the queen. However, no long-term effects on colony growth were observed, and the colonies successfully overwintered. Additionally, the study demonstrated that lithium is rapidly distributed among the bees of a colony within 2 days, yet only low concentrations were detected in stored food samples. This suggests that the bees efficiently absorb and distribute lithium within the colony. The harvested honey in the following spring revealed a lithium concentration of 0.1–0.2 mg/kg, which is below naturally occurring lithium levels in honey. Based on these findings, LiCl can be considered an effective and easy-to-apply acaricide in broodless colonies, and even in colonies with brood, it had good efficacy and no long-term effects on colony survival. Further research may be necessary to determine the optimal treatment period for achieving an efficacy over 95%.

Keywords *Varroa destructor* · *Apis mellifera* · Lithium chloride · Brood survival · Distribution

Introduction

The negative impacts from globalization are exemplified by the worldwide spread of the honey bee mite *Varroa destructor* (Anderson and Trueman 2000), a striking example of the redistribution of diseases and parasites in wildlife and livestock (Travis et al. 2011). *V. destructor* is originally a parasite of the Eastern honey bee *Apis cerana* (Fabricius 1793) in Asia. Intensive trade of managed *Apis mellifera* (Linnaeus 1758) colonies during the last century enabled the mite's shift to this new host and promoted worldwide distribution (Chantawannakul et al. 2016; Chapman et al. 2023).

V. destructor causes severe morbidity and mortality of entire *A. mellifera* colonies by feeding on host tissues and

transmitting viruses (Rosenkranz et al. 2010; Traynor et al. 2020). Regular *Varroa* treatments are indispensable because without beekeeper intervention, colonies dwindle (Genersch et al. 2010; Gray et al. 2019; Hernandez et al. 2022; Seitz et al. 2015; Stahlmann-Brown et al. 2022). Colony losses due to *Varroa* infestation continue to be high for two main reasons: firstly, there has been limited success in breeding viable *Varroa*-resistant honey bees (Büchler et al. 2010; Mondet et al. 2020a, b) and secondly, the biology of *V. destructor* with the reproductive phase inside the protected brood cell hinders the effectiveness of treatments (Traynor et al. 2020). When brood is present in the colonies, reproductive mites are located within the capped brood cells (Fuchs 1985, 1992; Ifantids 1988) and thus protected against nearly all common acaricides, except formic acid (Rosenkranz et al. 2010). A further challenge to controlling *V. destructor* under temperate climate conditions is that (i) chemical treatments should be avoided during nectar flows when bees collect nectar to make honey yet (ii) a treatment must be performed in late summer before the bees rear their long-lived winter bees, so that their longevity is not compromised through

Section Editor: Van Lun Low

 Carolin Rein
carolin.rein@uni-hohenheim.de¹ State Institute of Bee Research, University of Hohenheim,
70599 Stuttgart, Germany

Published online: 22 December 2023

Springer

high levels of parasitization. High mite infestation levels in late summer and the subsequent damage to winter bees, as mite levels continue to be high in fall, are the main drivers of winter colony losses (Genersch et al. 2010; Gray et al. 2019; Seitz et al. 2015). The relatively small window of time for late summer treatment increases the need for highly effective varroacides in mite management strategies. Several varroacides are registered; however, the majority are based on only a few active compounds such as formic and oxalic acid, thymol and a few synthetic substances from the group of pyrethroids, formamidin, and organophosphate (Mutinelli 2016; Qadir et al. 2021; Vilarem et al. 2021). None of these registered products fulfill all desired characteristics of an “ideal” veterinary drug: (1) high and reliable efficacy, (2) limited side effects, (3) no residues in bee products above critical thresholds, (4) low risk of mite resistance, and (5) easy-to-apply. The widely used organic acids are poorly tolerated by bees or brood with significant impacts on colony size, especially in warm climates (Bubnić et al. 2021; Elzen et al. 2004; Rademacher et al. 2017; Satta et al. 2005). In particular, formic acid, a common agent used in late summer as it penetrates into the brood nest, requires specific environmental conditions and its efficacy is strongly influenced by colony factors, such as colony size and amount of colony thermoregulation (Pietropaoli and Formato 2019; Steube et al. 2021; Underwood and Currie 2003). Repeated applications are necessary to achieve sufficient efficacy, which makes the use of organic acids time-consuming and thus costly, especially in large beekeeping operations (Berry et al. 2022). Synthetic varroacides often result in accumulating levels of residues in beeswax, with potential impacts on later larval survival and queen quality (Albero et al. 2023; Haarmann et al. 2002; Kast et al. 2021), and frequent reuse leads to the development of mite resistance (Higes et al. 2020; Mitton et al. 2022). Due to these shortcomings of the current options for chemical control of Varroa, there is still urgent demand for further varroacidal compounds.

The recently discovered lithium chloride (LiCl) meets many of the above mentioned requirements of a varroacide (Ziegelmann et al. 2018), and so we wanted to examine its efficacy and distribution in free flying colonies. LiCl is a widely distributed salt (Szkłarska and Rzymiski 2019), a natural component of honey (Abdulkhalik and Swaileh 2017; Bogdanov et al. 2008; Conti et al. 2018; Karabagias et al. 2017; Tariba Lovaković et al. 2018), and is used in therapeutic treatments of bipolar disorders and depression (Ferenstajn-Rochowiak et al. 2021; Gomes-da-Costa et al. 2022). LiCl is very effective at killing mites via contact and displays a systemic mode of action, while being well-tolerated by adult honey bees (Kolies et al. 2020, 2021b; Ziegelmann et al. 2018). A limitation for a broad applicability of LiCl is currently the low tolerability by honey bee brood (Rein et al. 2022).

Climate change alters the way beekeepers manage colonies, as often colonies no longer have a natural brood break which enables an effective winter treatment. In southern Europe, it has therefore become common to cage queens after the summer honey harvest and then treat the mites in the dispersal phase on adult bees when colonies are broodless (Büchler et al. 2020; Lodesani et al. 2014). LiCl is an ideal compound under these circumstances, due to its high efficacy and good tolerability by adult bees (Stanimirovic et al. 2022; Ziegelmann et al. 2018). Some field tests with lithium salts have already been performed; however, most of them used a repeated trickling method similar to the application of oxalic acid (Jovanovic et al. 2022; Kolies et al. 2021b, 2022).

In our approach, we wanted to capitalize on the systemic mode of action of LiCl, i.e. the administration of the active substance via food to the colonies. This new application method would enable a quick and “easy-to-apply” treatment. We present the efficacy and distribution of LiCl using different food applications in broodless colonies under realistic field conditions with a special focus on the subsequent development of the brood. In the trial of 2022, we compared the broodless application with repeated short-term treatments in brood rearing colonies. We hypothesized that such short-term treatments would reduce the exposure time and risk of honey bee larvae to LiCl and therefore potentially reduce the loss of brood as described in Rein et al. (2022).

Materials and methods

Experimental setup

Field trials were performed in two apiaries. The preliminary experiment in 2018 took place at the field station Heidfeldhof of the University of Hohenheim (48°42'55.3"N 9°10'49.2"E), whereas the main experiments in 2021 and 2022 were performed in the local apiary of the State Institute of Bee Research at the University of Hohenheim (48°42'32.7"N 9°12'38.9"E). Each colony consisted of a total of 20 frames in two Zander size brood boxes with similar colony strength—estimated by the number of combs covered with bees and the number of brood combs—and headed by healthy sister queens. The queens originated from the local “wildtype” stock managed by the State Institute of Bee Research, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany.

The experimental setups of the different trials are shown in Table 1. Our main objective was to investigate different applications of LiCl in broodless colonies during summer, so to achieve broodless colonies we first had to cage the queen. After the last honey harvest in summer, the queen of the respective colony was placed in a small plastic cage (Varroa control box, Rubee®) on a frame in the middle of

Table 1 Specifications of the tested treatment methods with acronym, LiCl concentration used, treatment period, number of tested colonies, and intervals of data collection for the preliminary and main experiments

Treatment method	LiCl concentration	Treatment period [days]	No. of colonies	Start of brood assessment	Sampling interval of bees and food
Preliminary experiment					
Positive control: 250 ml formic acid; Nassenheider®	–	8	4	–	–
P1: 7 l syrup; 1 day after ROQ*	25 mM	8	4	–	–
P2: 4.5 kg candy; 1 day after ROQ*	50 mM	8	5	–	–
Experiment I, 2021					
Positive control: 250 ml formic acid; Nassenheider®	–	9	9	–	–
A1: 2.5 kg candy; on the day of ROQ*	50 mM	9	6	5 days after application	4 days
Experiment II, 2022					
A2: 2 kg candy; on the day of ROQ*	50 mM	5	10	3 + 19 days after application	2 days
A3: 4 × 0.5 kg candy in 7 day intervals; breeding colonies	50 mM	4 × 2	10	0 + 16 days after 1st application	2 days

*ROQ release of queen

the brood nest in the bottom hive body at the start of each trial (Fig. 1). The cages are designed with queen-excluder sized material, allowing worker bees to pass through while confining the queen. After three weeks, when the last of the brood emerged, the queen of the respective colony was released and the treatment with LiCl started on the same day.

In the preliminary experiment, we tested two different LiCl applications with 25 mM LiCl syrup and 50 mM LiCl candy and compared the efficacy to positive control colonies treated with 250 ml formic acid (60%, Nassenheider® evaporator) (Table 1). The concentrations were chosen based on previous experiments by Ziegelmann et al. (2018) with artificial swarms.

In the main experiments, we used 50 mM LiCl candy, as it was the more promising approach due to ease of application combined with a slower, more consistent consumption of the LiCl food. In 2021, we tested a single application (A1) of 2.5 kg

50 mM LiCl candy (fed over a period of 9 days via a plastic bowl protected by an empty honey chamber) and compared it with the positive control group, treated with 250 ml formic acid (60%, Nassenheider® evaporator) (Table 1). In 2022, we modified the LiCl application and fed 2 kg 50 mM LiCl candy via small Ziplock plastic bags (1 l SafLoc®, Topptis®) put directly on top of the frames (A2) (Fig. 2), due to ease of application and to provide ready access for the bees. We also shortened the treatment period from 9 to 5 days to eliminate exposure of the newly developed larvae with LiCl. A flipped top feeder (Nico®) provided enough space for the bees to access the treatment food.

To test whether a repeated short-term application (A3) can prevent brood removal with the same Varroa control efficacy, we applied 0.5 kg 50 mM LiCl candy four times



Fig. 1 Queen is caged inside the Rubee® Varroa control box inserted into a brood frame, which prevents her from laying eggs and allows the colony to achieve a broodless phase



Fig. 2 Treatment application (A2) of 50 mM colored LiCl candy in plastic bags on top bars of frames. Slits were cut into the bags to allow access to the bees

in 7-day intervals (in total 2 kg candy) without caging the queen, meaning that all brood stages were present during the treatment. The plastic bags containing 0.5 kg candy were emptied within 2 days of application, therefore the treatment period was defined as 4 × 2 days. Untreated colonies were not used as a negative control to avoid mite reinfestation by highly infested nearby colonies (Frey and Rosenkranz 2014), which would result in inaccurate calculations of efficacy.

Data were collected on Varroa mite mortality, brood development, and distribution of lithium in sampled bees and stored food as described below.

LiCl food production

For the syrup, we used Apilvert® (saccharose, fructose and glucose, Suedzucker Group[®]) and mixed it with the respective amount of lithium chloride (> 99.9%, p.a., ultra-quality, Roth®) to reach a 25 mM concentration (1.06 g LiCl-salt per liter). We added food coloring ("Tannengrün", Städter®) to the syrup, which dyed it green, so we could identify where the syrup was stored in the combs. Such food coloring has no negative impact on honey bees or honey bee brood (Ehrenberg et al. 2019).

The candy was made from powdered sugar (Suedzucker Group[®]) and honey harvested during summer nectar flows, mixed in the ratio of 2:1. Additionally, a concentration of 50 mM LiCl and red food coloring (Allura Red AC, Sigma-Aldrich®) was added into the mixture. To reach this concentration, we used 1.57 g LiCl-salt dissolved in water for 1 kg of candy. This was mixed until the food coloring was evenly distributed using a commercial dough mixer (ITR50 2 V "Evo", Prismafood DE). To determine the exact amount of LiCl used per colony, food consumption was measured by weighing the remains of the applied food upon removal.

Varroa mite mortality and calculation of efficacy

The mite mortality was recorded by counting the mites every two days on the sticky board inserted under the screened bottom board of the hive, which was not accessible to bees. The sticky board is a tray prepared with a single layer of kitchen paper towel, moistened with oil, which prevents other insects from removing the dead mites and which was renewed after each mite mortality count. The natural mite drop was recorded two weeks prior to the treatments. Dead mites found on the sticky board during LiCl food application and the consecutive 7 days were considered killed by LiCl. For the positive control colonies treated with formic acid, we considered dead mites on the sticky board from 1st to 20th day after treatment administration. Formic acid penetrates the sealed brood cells to kill mites inside capped cells, which is why we extended the monitoring period to cover an entire brood cycle.

Each colony received a follow-up treatment for four to six weeks with either Bayvarol® (2018 and 2022) or Apivar® (2021). We alternated the compound for the follow-up treatments every year to avoid development of mite resistance. In addition, the good efficacy of both, Bayvarol® and Apivar® has been confirmed by field trials conducted on the Hohenheim campus in the previous years.

The efficacies of the treatments were calculated on the basis of mite mortality in the test colonies. The following formula was used according to standard guidelines for control of *V. destructor* (Dietemann et al. 2013; EMA 2021; Pietropaoli and Formato 2019; Semkiw et al. 2013), where the number of mites killed by the treatment is divided by the total number of mites that fell including those killed by the follow-up treatment:

$$\% \text{ efficacy} = \frac{\text{no. of mites killed by treatment} \times 100}{\text{no. of mites killed by treatment} + \text{no. of mites killed by follow up treatment}}$$

Honey bee brood survival

To evaluate the effects of the different LiCl treatments on brood, we conducted a brood assessment of newly laid eggs in the main experiment. We marked the position of eggs on a transparent acetate sheet (= brood area fixing day (BFD)), according to the method described by Schur et al. (2003). We inspected the viability of the brood every four days and marked cells with viable larvae as well as cleared out cells on a new transparent sheet. As eggs do not hatch for three days, the exact age of the larvae varied between 1 and 72 h. To keep the error rate low and to guarantee that empty cells were cleared out and the bees had not emerged, we terminated the assessment on day 16 (BFD + 16). From these data, we calculated the brood survival rate for each assessment.

After being caged for three weeks, the queen typically requires a few days to start laying eggs again, therefore we started the brood assessment in treatment group A1 five days after the release of the queen and the start of the treatment application. In treatment group A2, we were already able to find enough eggs three days after queen release. In 2022, we not only examined the development of the first brood cycle, but also a second brood cycle 16 days later to evaluate possible long-term effects (Table 1) for both the A2 and A3 treatment groups.

Distribution of lithium among worker bees, stored food, and residue in honey

An even distribution of the active component lithium among the worker bees is important for a sufficient treatment efficacy. In contrast, the chloride anion is not significant (Ziegelmann et al. 2018). Thus, we utilized ICP-MS analysis

to determine the concentration of lithium in the samples. In 2021, we took bee samples (approx. 30 bees) from each treated colony at regular intervals during and post treatment (as shown in Online Resource 1). In 2022, we took bee samples from the central frames of the hives every other day for three weeks in trial A2 and for four weeks in trial A3, as well as collecting additional bees 39 days post-treatment from both groups. Stored food samples were taken once a week until day 39 post-treatment from four combs containing food stores in the top hive body.

To investigate whether the LiCl treatments had an effect on the lithium levels in food and honey of the following year, we took a sample from the brood chamber of each colony before installing the honey chamber on 19th of April 2023. Three weeks later, we took samples from the honey chamber of each colony that already collected nectar. On the 9th of June, the honey was harvested for each treatment group individually (A2 and A3) and samples were analyzed.

After sampling, the bees were frozen (-20°C) until dissection of the honey crop. Bees were thawed, and we gently pulled on the abdomen with forceps, which exposes the crop. The crops of 20 bees per sample were pooled, homogenized, and analyzed with ICP-MS (Inductively Coupled Mass Spectrometry) for the concentration of lithium. The samples of stored food from the colony were also frozen (-20°C) until analysis.

For ICP-MS analysis, about 500 mg of honey or crop samples, respectively, was weighed into glass tubes. 2 ml of HNO_3 was added, and tubes were filled up with double distilled water to a final volume of 10 ml and vortexed to ensure sample homogeneity. Following this, microwave digestion was done with an Ultra Clave III (MLS Mikrowellen-Labor-Systeme GmbH, Leutkirch, Germany) where temperature was gradually increased from 80 to 200 $^{\circ}\text{C}$ at 900 W and 100 bar. Samples were cooled down and diluted adequately for ICP-MS analysis (NexION 300 X, PerkinElmer, Waltham, MA, USA). A ICP multi-element standard solution (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was used for calibration at concentrations of 0.1 $\mu\text{g/l}$, 0.2 $\mu\text{g/l}$, 1 $\mu\text{g/l}$, 10 $\mu\text{g/l}$, and 20 $\mu\text{g/l}$ prepared with double distilled water and HNO_3 . A CertiPUR Rhodium ICP-standard solution ($c=1000\text{ mg/l Rh}$, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) served as internal standard ($\text{LOQ}<0.025\text{ mg/kg}$).

Statistics

The data were statistically analyzed using JMP Pro 16. Data on efficacy were checked with a Shapiro-Wilk test for normal distribution. Because of the non-parametric characteristics of the data, we used the Kruskal-Wallis test and a post hoc Dunn's test including Bonferroni correction for multiple comparisons. For comparison of the 1st and 2nd brood

assessments of each treatment we used the Wilcoxon Rank Sum test (Mann-Whitney test).

Results

Efficacy of different treatments

In the preliminary experiment in 2018, the broodless colonies treated with LiCl demonstrated an efficacy of $92.0 \pm 4.5\%$ for the syrup application (P1) where each colony received 7 l of 25 mM LiCl spiked Apiinvert®. For the candy application (P2), we applied 4.5 kg 50 mM LiCl which resulted in a mean food uptake of $2040 \pm 786\text{ g}$ of candy per colony in 8 days (additional data are given in Online Resource 2) and an efficacy of $89.8 \pm 5.6\%$, with no significant difference between the treatments (Fig. 3, $p=1$, Dunn's test, Online Resource 3). Treatment with LiCl outperformed the positive control treatment with formic acid, where only $59.5 \pm 8.5\%$ of the mites were killed. The formic acid treated colonies did not have caged queens, as the treatment penetrates into the brood nest, and we wanted to compare LiCl results with the most commonly used method of Varroa control in Germany.

In the years 2021 and 2022, LiCl was exclusively applied via candy (Fig. 4). For treatment A1 each colony received 2.5 kg 50 mM LiCl candy, which resulted in a mean food uptake of $1,739 \pm 167\text{ g}$ in 9 days and the highest efficacy with $98.1 \pm 0.7\%$, followed by A3 with $87.9 \pm 10.5\%$ and A2 with $77.5 \pm 12.8\%$. For treatment A2 and A3 each colony consumed a total of 2 kg of 50 mM LiCl candy, which incorporates 3.1 g LiCl-salt (additional data are given in Online Resource 2). Positive control with formic acid was the least effective ($69.8 \pm 25.2\%$) and showed the highest variation between colonies, ranging in efficacy from 22.4% to 96.9%. Due to higher variances in A2 and A3, they did not differ significantly from the positive control ($p=1$ and $p=0.6$, respectively, Dunn's test, Online Resource 4) (Fig. 4).

The total number of counted mites in 2021 showed a mean mite load per colony of $3,087 \pm 915$ for positive control colonies and $2,129 \pm 967$ for A1 colonies. Each colony had more than 1000 mites (Table 2). In 2022, the mean mite loads were on average 1429 ± 1155 mites for the A3 colonies and substantially lower in the A2 colonies with on average 456 ± 296 mites. Here, the lowest number of total counted mites per colony was 153 and 168, respectively.

The mean number of mites killed per colony by the follow-up treatment was 933 in positive control colonies, 36.3 in colonies treated with A1, 83.1 in those treated with A2, and 95.9 for those treated with A3 (Table 2). This information can be used for assessing whether the LiCl treatments alone have reduced the mite population below the economic threshold.

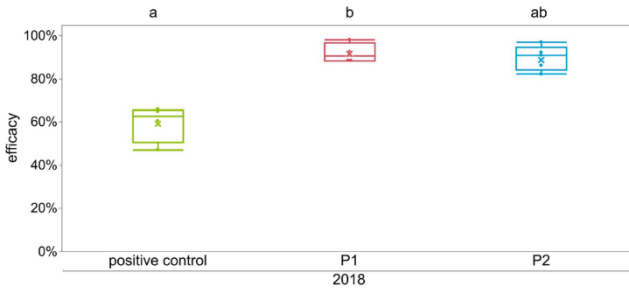


Fig. 3 Efficacy of different treatments in the preliminary trials 2018 shown as box plots and mean indicated by the x. Positive control colonies were treated with 250 ml 60% formic acid ($n=4$), P1 colonies were treated with 7 l of 25 mM LiCl syrup ($n=4$), P2 with 4.5 kg 50 mM LiCl candy ($n=5$). Significant differences are indicated by different letters ($p < 0.05$, Dunn's test; additional data are given in Online Resource 3)

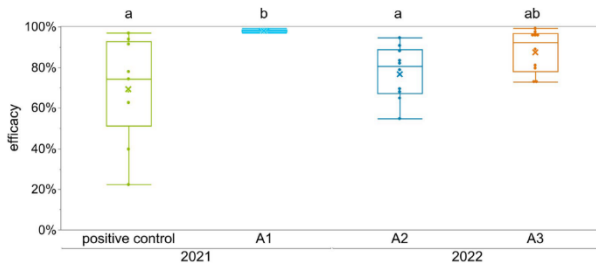


Fig. 4 Efficacy of different LiCl administrations and positive control shown as box plots and mean by x. Positive control colonies ($n=9$) were treated with 250 ml 60% formic acid. For A1 ($n=6$) we applied 2.5 kg 50 mM LiCl candy over a period of 9 days; A2 colonies ($n=10$) received 2 kg 50 mM LiCl candy in 5 days; for A3 ($n=10$)

we applied 0.5 kg of 50 mM LiCl candy four times in seven-day intervals (total of 2 kg candy) without caging the queen. Box plots with different letters are statistically different (Dunn's test, $p < 0.05$, additional data are given in Online Resource 4)

Honey bee brood survival

In total, we assessed 9463 brood cells from the freshly laid egg stage in 6 colonies of A1, 8 colonies of A2 and 10 colonies for both brood assessments of A3. Due to absence of eggs in two colonies on the assessment day, we could only examine the brood development for 8 of 10 colonies in A2.

Treatment A1 with 9 days of LiCl treatment led to the highest brood removal rates and only 4.7% of the brood survived until BFD+16 (Fig. 5). The first assessment of A2 (A2-1) showed a high variability in the survival probability of brood from the 8 treated colonies with a mean brood survival rate of 45%. The 2nd assessment (A2-2), which started 19 days after the LiCl application, had the highest brood survival rate with 82%, which was statistically different to

Table 2 Total number of dead mites counted during the observation period (main treatment and follow-up treatment) for each treatment group are given together with the mean mites per colony \pm standard deviation. Additionally, the range of mite counts per colony and the mean mites during follow-up treatment are given. Positive control colonies were treated with 250 ml 60% formic acid. For A1 we applied 2.5 kg 50 mM LiCl candy over period of 9 days; A2: 2 kg 50 mM LiCl candy in 5 days; A3: 4 \times 0.5 kg 50 mM LiCl candy in seven-day intervals with no queen caging

Treatment	Year	Total mites	No. of colonies	Mean mites/colony	Range of mite counts/colony	Mean mites during follow-up treatment
Positive control	2021	27,783	9	3087 \pm 915	1305–4710	933
A1	2021	12,776	6	2129 \pm 96	1154–3508	36.3
A2	2022	4558	10	456 \pm 296	168–1102	85.1
A3	2022	14,291	10	1429 \pm 1155	153–3231	95.9

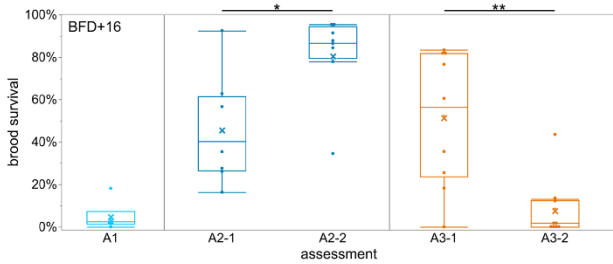


Fig. 5 Brood survival rates in free flying colonies during different applications of 50 mM LiCl candy. A1: 2.5 kg of 50 mM LiCl candy over 9 days ($n=6$); A2: 2 kg of 50 mM LiCl candy over 5 days ($n=8$); A3: 4 \times 0.5 kg 50 mM LiCl candy in seven-day intervals in colonies without queen caging ($n=10$). For treatment A2 and A3, a subsequent brood assessment was carried out after completing the

first one. Data given as boxplots for survival rate on day 16 post the brood fixing day (BFD), mean is given as an x. Total number of selected eggs on BFD were 982 (A1), 2574 (A2-1), 1600 (A2-2), 2049 (A3-1) and 2258 (A3-2). Significant differences between 1st and 2nd assessments are indicated with an asterisk (Wilcoxon Rank Sum test)

the first assessment ($p=0.02$, Wilcoxon Rank Sum test). The mean brood survival rate of the first assessment in A3 was 52% and thus similar to the first assessment of A2. However, in the 2nd brood assessment (A3-2), which started 2 days after the 3rd LiCl application, the brood survival rate decreased to only 8%, which was significantly lower than A3-1 ($p=0.004$, Wilcoxon Rank Sum test).

Colony winter survival

In winter 2021, we lost one colony from the positive control group due to Nosema disease. The diagnosis was made through microscopic examination of sampled bees. In the 2022 experiments, we found one colony dead in the following spring probably due to queen loss in fall. In this colony, the queen was still present during the first brood assessment

(A2-1); however, during the second assessment (A2-2), we were not able to find eggs. All the other colonies overwintered well.

Distribution and detection of lithium

In colonies treated over a period of nine days (A1), we took 66 stored food and 61 adult bee samples over a period of 21 days. The 1st sampling was conducted before LiCl application, showing no lithium contamination in bees nor in food (Online Resource 5). Within five days of commencing the treatment, the concentration of lithium in the honey crop of bees sampled from the central area of the lower hive body rose to 69 mg/kg lithium and doubled four days later to reach the maximum of 131 mg/kg. After the remaining LiCl food was removed on day 9, the lithium concentration quickly

dropped through day 17; thereafter it increased slightly during the last sampling 21 days post treatment. On no sampling day was there a significant difference between the lithium concentration from bees sampled from top or bottom hive body in our two brood chamber set-up. The increase in the lithium concentration in the honey crop was mirrored by the number of fallen mites. The mite drop reached a maximum on the fifth day, when a mean of 983 mites dropped, decreasing thereafter as shown in the figure (Online Resource 5).

In the stored food samples, we first detected lithium in uncapped cells on day 9 after commencing the LiCl treatment (25 mg/kg), whereas the first detection in capped cells was on day 13 (4.4 mg/kg). The lithium concentration was always lower in samples taken from capped cells and was significantly lower on day 17 with 5.2 mg/kg lithium compared to 36 mg/kg in open cells ($p=0.013$, Tukey–Kramer HSD) (Online Resource 5).

In 2022, when colonies were treated for five days (A2), 130 bee samples were taken from the treated colonies. From the colonies repeatedly treated for 4 × 2 days (A3) 170 bee samples were taken. Lithium concentration in the honey crop of bees from the A2 treatment displayed a similar distribution as in A1 group with a peak of 104 mg/kg

lithium on day 3, decreasing after termination of treatment (Fig. 6). Maximum lithium concentration in stored food occurred 13 days after the start of the treatment (18 mg/kg).

For the repeated short-term treatments used in A3, we detected several short peaks after each application of the 0.5 kg LiCl candy (Fig. 7). The highest concentration in the honey crop was found on day 16 after the 3rd application with 98 mg/kg lithium. The concentration of lithium in the sampled food reached a maximum on day 28 with 20 mg/kg. For both treatments, A2 and A3, we took the last samples 39 days after the last application of LiCl and measured 15.4 mg/kg lithium in the A2-treated colonies and 13.2 mg/kg in the A3-treated colonies.

The stored food sampled from brood chambers in Spring 2023 revealed low concentrations of 5.4 ± 2.4 mg/kg lithium in A2-treated colonies and an even lower concentration of 3.1 ± 2.4 mg/kg in the A3 treatment group (Table 3). In the freshly collected nectar from honey chambers, we measured 0.8 ± 0.7 mg/kg lithium from A2 colonies, which was further reduced to 0.1 mg/kg in the harvested honey. For A3, we measured 0.2 ± 0.2 mg/kg and 0.2 ± 0.2 mg/kg, respectively (Table 3).

Fig. 6 Distribution of lithium in the honey crop of sampled bees and in stored food from colonies ($n=10$) during the five-day treatment (A2), each value given as the mean \pm SE in the error bars. Administration of 2 kg of 50 mM LiCl candy started 1 day after the first sampling and was terminated five days later. The mean number of fallen mites for every two days is shown by the orange line. Follow-up treatment with Bayvarol® started on day 11

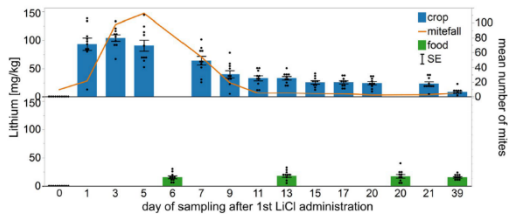


Fig. 7 Distribution of lithium in the honey crop of sampled bees and stored food from colonies ($n=10$) during the repeated short-term treatment (A3), each value given as the mean \pm SE in the error bars. Administration of each 0.5 kg 50 mM LiCl candy took place on days 0, 7, 14, and 21. The mean number of fallen mites for every 2 days is shown as the orange line. Follow-up treatment with Bayvarol® started on day 30

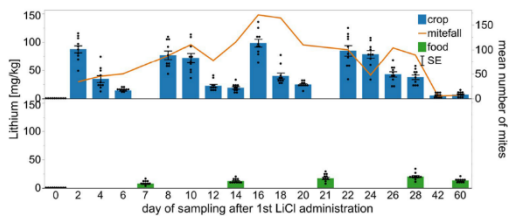


Table 3 Lithium concentration in spring 2023 of samples from stored food of brood chambers, freshly collected nectar in honey chambers and harvested honey from colonies treated in summer 2022. Each given as mean \pm standard deviation for the treatment groups. Numbers of analyzed samples are given in brackets

Treatment method	Lithium [mg/kg]		
	Brood chamber	Honey chamber	Honey
A2	5.4 \pm 2.4 (n=9)	0.8 \pm 0.7 (n=6)	0.1 \pm 0 (n=4)
A3	3.1 \pm 2.4 (n=10)	0.2 \pm 0.2 (n=5)	0.2 \pm 0.2 (n=4)

Discussion

Our field experiment demonstrated high efficacy of LiCl in colonies with and without brood when applied by feeding in syrup or candy. In the preliminary experiments in the year 2018 with broodless colonies, we already reached a mean efficacy of more than 90% with both the syrup and the candy application. We then decided to continue with the candy treatment, because of the slower consumption by the bees which enables a continuous flow of LiCl into the colony for more than one week through a single feeding. The field test with broodless colonies in the year 2021 revealed an even higher efficacy of 98%, which was significantly different from colonies treated with the standard formic acid Varroa control in the same apiary. This confirmed that the high efficacy of LiCl, which had previously been demonstrated by Kolics et al. (2021b) with the trickling method, can also be achieved using a single application of 2.5 kg candy spiked with 50 mM LiCl. The next field test with broodless colonies in the year 2022 had only a 78% efficacy. Two reasons could potentially have caused this significantly lower efficacy compared to the 2021 study. First, we reduced the duration of the treatment from 9 to 5 days to reduce the impact on brood loss in the first subsequent brood cycle seen in the 2021 experiment (see below). But this shortened period was obviously not sufficient to achieve a high efficacy. Second, the mean mite load per colony was 456 mites compared to 2129 in the year before and some colonies had less than 200 mites. In colonies with relatively low mite numbers, the reinvasion of mites in late summer and early fall (Frey and Rosenkranz 2014), a common occurrence in apiaries in this part of Germany, can have a greater impact on the calculation of the efficacy. Our experimental apiaries were not in the direct vicinity of colonies managed by other beekeepers, however even over a distance of 1.5 km an invasion of more than 100 mites per colony is possible (Frey et al. 2011).

Our repeated short-term LiCl treatments of colonies with brood revealed an efficacy of 88% and confirmed the results of former field tests with lithium salts in brood rearing colonies (Stanimirovic et al. 2022), however at the cost of high brood removal rates (see below). The efficacy of a

treatment is not the only important value, rather it is crucial whether the LiCl treatments reduce the absolute number of mites in all colonies below the economic threshold. This economic threshold can be estimated in various ways such as the natural daily mite drop or the infestation in sampled adult bees. Jack and Ellis (2021) defined an infestation rate of the adult bees of 2–3% as a general accepted economic threshold. In our follow-up treatments directly after the LiCl applications we killed an average of only 36–96 mites per colony. With an average number of about 15,000–20,000 bees in our colonies at the end of September, this number of mites represents an infestation of considerably less than 1%. Therefore, we consider LiCl applications in late summer as sufficiently effective to reduce the Varroa infestation below the economic threshold, providing beekeepers with a highly effective alternative treatment option once it is approved for use.

Our analysis of honey bee crops and stored food for traces of lithium demonstrated an even distribution of the active ingredient lithium within the colony, despite food uptake differing somewhat between colonies. This low variance between colonies in the distribution of the active ingredient lithium and the efficacy of treatment results in high levels of treatment success throughout an apiary, which cuts down on varroa reinvasion and potential transfer of mites between strong and weak colonies (Giacobino et al. 2023).

In contrast to currently available varroacides, our application method of LiCl takes advantage of the social behavior of food sharing in bees, called trophallaxis (LeBoeuf 2017). This leads to a rapid distribution of the treatment food throughout the whole colony (Crailsheim 1998; Nixon and Ribbands 1952) with sufficient amounts of lithium to kill Varroa mites in sampled bees within 48 h of application, as demonstrated by the spike in the mite drop within two days of LiCl administration (see Fig. 6). We always detected substantially lower levels of lithium in the food samples than in the crop of the sampled bees. In 2021, when about 1.7 kg of a 50 mM LiCl candy was applied per colony, the maximum lithium content found in open food cells was 36 mg/kg, whereas in the crop it rose to 131 mg/kg. In 2022, when the feeding period was reduced from 9 to 5 days, the maximum lithium levels were somewhat lower, with similarly low levels in food compared to bee crops as seen in 2021. To produce honey from nectar or from a beekeeper applied food source like syrup or candy, honey bees rework the food source multiple times, before permanently storing it in a cell (Park 1925). During this food processing, the bee's ventriculus removes contaminations and excess water. Honey bees also have the capacity to remove heavy metals from collected nectar in the process of producing honey (Borsuk et al. 2021), which could help explain why we always detected substantially lower lithium concentrations in stored food compared to crop samples.

As shown in previous studies, exposure to LiCl during larval development can result in high brood mortality (Rein et al. 2022). We thus paid particular attention to the survival of the first batch of brood reared after release of the queen. In 2021, the long treatment period of 9 days resulted in low brood survival, most likely due to an overlap of applied LiCl food and the presence of the first larvae. To avoid this loss of brood, we shortened the treatment period to 5 days in 2022, reducing the exposure of the sensitive early larval stages to LiCl. Brood survival increased, but with high variance in survival rates among the colonies. We assessed a second brood cycle, which showed that there are no long-term effects to brood survival from LiCl as was also observed in 2021. This is also supported by the fact that 34 colonies treated with LiCl (from all experiments) overwintered well and only one colony died due to queen loss in fall 2022. Thus, although we see a short time frame of brood loss immediately after treatment, the colony then successfully rears brood and does not suffer any population loss from this brief interruption.

Other studies tested different LiCl applications in broodless colonies with even higher concentrations, but failed to evaluate the aftereffects on brood reared post treatment (Kolics et al. 2022). Stanimirovic et al. (2022) carried out lithium citrate treatments in colonies with brood and stated that there were no side effects observed during the year, however the authors did not analyze potential carryover effects of lithium citrate on brood directly after the treatment applications. Our experiments with repeated short-term treatments in colonies with a free-roaming queen and brood (A3) clearly confirm the low tolerability of honey bee larvae for LiCl. The goal with this new application method was to limit the contact of larvae to LiCl for a maximum of 1–2 days by feeding the treatment repeatedly in small amounts. However, this did not provide the desired reduction in brood loss. Both the first and second brood assessment during application resulted in low survival rates and so clearly a treatment with LiCl in colonies with brood is only possible at the cost of lost brood during the application period. As seen in our studies, the side effects on brood only occur during and shortly after the period of the treatment when lithium contaminated food is still circulating among the nurse bees.

From our comprehensive studies on LiCl, we can conclude the following regarding efficacy, distribution of the compound within the colony and side effects on brood for the treatment of broodless colonies:

1. A single feeding of 2 kg of 50 mM LiCl candy kills more than 95% of Varroa mites under field conditions when exposure lasts 9 days. It could potentially be shortened, but 5 days was too short to achieve the required 90% efficacy for Varroa mite control.
 2. Side effects on the honey bee brood occurred only in the first brood cycle laid directly after the end of the application. If queens were released one week after treatment cessation, these side effects could largely be prevented.
 3. Our data on the concentration and distribution of lithium within the worker bees of a treated colony indicate that within 48 h lithium levels reach their maximum level within the bee's crop and remain elevated for the duration of the treatment. Even some days after the end of the application the lithium concentrations within the crops of the bees should still be high enough to kill the parasitizing mites.
- These results suggest that a promising strategy for future applications would be to start the treatment via candy one week before the release of the queen, when the colony only contains capped brood. The lithium concentration in the bees at the time of queen release should be sufficient to kill the few mites emerging with the last brood cells, yet subside to a harmless level by the time the first larvae hatch from queen laid eggs.
- The long-term circulation of lithium in colonies post treatment and thus the potential risk of residue accumulation in the honey must be investigated before lithium-salts can be authorized as a varroacide. Lithium occurs naturally in some honeys (up to 15.6 mg/kg) (Abdulkhaliq and Swaileh 2017; Bogdanov et al. 2008; Conti et al. 2018; Tariba Lovaković et al. 2018), mineral water (1.7–1725 µg/l) (Seidel et al. 2019), and even other beverages like wine and soft drinks (Seidel et al. 2020). We even found lithium at a concentration of 0.27 mg/kg in the Apiinvert® syrup sold as bee feed on the German market. It is thus hard to define an acceptable residue level, though the naturally occurring range in honey suggests a higher limit than with other varroacide residues is warranted. What is considered acceptable is currently debated; Kolics et al. (2021a) found an increase in lithium in uncapped honey directly after application but claimed a “full recovery” by day 22 with a concentration below 0.25 mg/kg. Yet they found a concentration of 22.4 mg/kg in the ripe honey on day 28. In contrast, Stanimirovic et al. (2022) found a significant difference of lithium in honey taken from honey chambers of untreated colonies (0.018 mg/kg) compared to 0.034 mg/kg from lithium treated colonies, which is still far below the naturally occurring concentrations of lithium in honey.
- Another study detected lithium concentrations seven days post-treatment between 0.05 and 0.9 mg/kg (Prešern et al. 2020). Our residue analysis of honey and stored bee food was conducted in the spring of the following year, which was almost ten months post treatment. We found lithium at rates of 3.1 to 5.4 mg/kg in the stored food of the brood chamber. Colonies were fed an additional 15–20 kg of sugar syrup post treatment to provide them with enough winter food stores, which must have diluted the lithium concentrations. In freshly

made spring honey we harvested, we only found 0.1–0.2 mg/kg lithium which is far below the natural occurring concentrations. Our treatment method of feeding LiCl in candy does not lead to undesirable residues in honey.

LiCl provides many advantages compared to current varroacides on the market. The most frequently used non-synthetic varroacides in Middle and Northern Europe are currently formic acid in the summer and oxalic acid in the winter, both of which require specific environmental or colony conditions for high efficacy and good tolerability (Adjlane et al. 2016; Steube et al. 2021). Our new application method, unlike these organic acids, allows the beekeeper to be independent of environmental factors. Even though caging the queen, in order to create a broodless period requires additional effort and time, especially in large beekeeping operations like in the USA or Canada, such caging is becoming more standard as a method of integrated Varroa control (Büchler et al. 2020; Gregorc et al. 2017; van der Steen and Vejsnæs 2021). A brood interruption not only has the advantage that all mites are forced to reside on the adult bees, which makes them vulnerable to varroacides, it also interrupts the mite's reproductive cycle which slows down this parasite's population growth (Gabel et al. 2023; Jack and Ellis 2021; Rosenkranz et al. 2010). In the colonies with the repeated treatments where we allowed bees to keep rearing brood, three times as many mites fell (compare A3 with brood to A2 without brood in Table 2), even though the natural mite drop before the treatment was similar in both groups. Giacomelli et al. (2016) showed that queen caging alone resulted in a 40% reduction of Varroa populations, but should always be used in combination with a varroacide to achieve sufficient mite mortalities. As LiCl is a natural salt, the combination of queen caging and LiCl application could be a treatment option for organic beekeepers, too. A comparison of the additional workload generated by different summer brood interruption methods showed that queen caging was one of the least labor-intensive ones with no negative impact on colony strength between the different methods (Büchler et al. 2020). Rather, Lodesani et al. (2014) demonstrated that in Italy treatments that include a brood interruption approach yielded the greatest colony survival rate compared to alternative treatment methods. A broodless period during late summer allows beekeepers to remove old combs and replace them with new ones, reducing pesticide residues in the lipophilic beeswax, which has been shown to have a beneficial effect on the productivity of the colony (Berry and Delaplane 2001; Taha et al. 2021).

Conclusion

When caging the queen is integrated into a varroa treatment strategy, the application of LiCl via candy feeding represents an effective and “easy to apply” treatment due to its rapid action and even distribution within a colony, regardless of

external weather conditions. The systemic mode of action makes LiCl an attractive new varroacide that deserves more attention and a communal effort to bring this new Varroa control tool to the market, where it can aid beekeepers in treating infested colonies sustainably and keeping their bees healthy.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00436-023-08084-y>.

Acknowledgements Our thanks are due to Dr. Sandra Renz and Andrea Ruf from the Core Facility Hohenheim for the analysis of lithium in samples. We also express our gratitude to Julia Renz and Markus Grikeke for dissection of the bee samples in 2021. We appreciate the help of Nick Baumann and Adrian Preusch with the experiments in 2022, including colony management and sampling.

Author contribution CR: conceptualization, methodology, validation, formal analysis, investigation, data curation, writing—original draft, writing—review and editing, visualization, project administration, funding acquisition. MB: conceptualization, methodology, investigation. KI: writing—review and editing. PR: conceptualization, methodology, validation, writing—review and editing, supervision, project administration, and funding acquisition.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. The project was supported by funds of the Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) based on a decision of the Parliament of the Federal Republic of Germany via the Federal Office for Agriculture and Food (BLE) under the innovation support program (Grant number 281C301A19).

Data availability The datasets generated during and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval Not applicable.

Consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

Competing interests The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Abdulkhaliq A, Swaileh KM (2017) Physico-chemical properties of multi-floral honey from the West Bank, Palestine. *Int J Food Prop* 20:447–454. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1166128>
- Adjlane N, Tarek E-O, Haddad N (2016) Evaluation of oxalic acid treatments against the mite varroa destructor and secondary effects on honey bees *Apis mellifera*. *J Arthropod Borne Dis* 10:501–509
- Albero B, Miguél E, García-Vaquéral AJ (2023) Acaricide residues in beeswax. Implications in honey, brood and honey-bee. *Environ Monit Assess* 195:454. <https://doi.org/10.1007/s10661-023-11047-6>
- Berry JA, Delaplane KS (2001) Effects of comb age on honey bee colony growth and brood survivorship. *J Apic Res* 40:3–8. <https://doi.org/10.1080/00218839.2001.11101042>
- Berry JA, Bartlett LJ, Bruckner S, Baker C, Brannan SK, Delaplane KS, Williams GR (2022) Assessing repeated oxalic acid vaporization in honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) colonies for control of the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *J Insect Sci* 22. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieab089>
- Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P (2008) Honey for nutrition and health: a review. *J Am Coll Nutr* 27:677–689. <https://doi.org/10.1080/07315724.2008.10719745>
- Borsak G, Sulborska A, Stawiarz E, Olszewski K, Witek D, Ramzi N, Nawrocka A, Jedryczka M (2021) Capacity of honeybees to remove heavy metals from nectar and excrete the contaminants from their bodies. *Apidologie* 52:1098–1111. <https://doi.org/10.1007/s13592-021-00890-6>
- Bubnić J, Moosbeckhofer R, Prešern J, Moškrič A, Formato G, Pietropaoli M, Gregore A, Muz MN, Škerl MIS (2021) Three pillars of Varroa control. *Apidologie* 52:1305–1333. <https://doi.org/10.1007/s13592-021-00903-4>
- Büchler R, Berg S, Le Conte Y (2010) Breeding for resistance to *Varroa destructor* in Europe. *Apidologie* 41:393–408. <https://doi.org/10.1007/s13592-021-00101-1>
- Büchler R, Uzunov A, Kovačić M, Prešern J, Pietropaoli M, Hatjina F, Pavlov B, Charistos L, Formato G, Galazra E, Gerula D, Gregore A, Malagnin V, Meixner M, Nedić N, Puškadija Z, Ržverca-Gomis J, Rogelj Jenko M, Smeđić Škerl MI, Valton J, Vojt D, Wilde J, Nanetti A (2020) Summer brood interruption as integrated management strategy for effective Varroa control in Europe. *J Apic Res* 59:764–773. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1793278>
- Chantawanakul P, de Guzman LI, Li J, Williams GR (2016) Parasites, pathogens, and pests of honeybees in Asia. *Apidologie* 47:301–324. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0407-5>
- Chapman NC, Colin T, Cook J, da Silva CRB, Gloger R, Hogendoorn K, Howard SR, Rennant EJ, Roberts JMK, Tierney SM, Wilson RS, Mikheyev AS (2023) The final frontier: ecological and evolutionary dynamics of a global parasite invasion. *Biol Lett* 19:20220589. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2022.0589>
- Conti ME, Canepari S, Foino MG, Mele G, Astolfi ML (2018) Characterization of Italian multifloral honeys on the basis of their mineral content and some typical quality parameters. *J Food Compos Anal* 74:102–113. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.09.002>
- Crahlheim K (1998) Trophallic interactions in the adult honeybee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 29:97–112. <https://doi.org/10.1051/apido:19980106>
- Diemann V, Nazzi F, Martín SJ, Anderson DL, Locke B, Delaplane KS, Wauquiez Q, Tamahill C, Frey E, Ziegelmann B, Rosenkranz P, Ellis JD (2013) Standard methods for varroa research. *J Apic Res* 52:1–54. <https://doi.org/10.1080/00218839.1.52.1.09>
- Ehrenberg S, Lewkowski O, Erler S (2019) Dyeing but not dying: Colourful days as a non-lethal method of force labelling for in vitro-reared honey bee (*Apis mellifera*) larvae. *J Insect Physiol* 113:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.12.008>
- Elzen PJ, Westervelt D, Lucas R (2004) Formic acid treatment for control of Varroa destructor (*Mesostigmata: Varroidae*) and safety to *Apis mellifera* (*Hymenoptera: Apidae*) under southern United States conditions. *J Econ Entomol* 97:1509–1512. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-97.5.1509>
- European Medicines Agency (2021) Guideline on veterinary medicinal products controlling Varroa destructor parasitosis in bees (EMA/CVMP/EWP/459883/2008-Rev.1^o Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP)). https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-veterinary-medicinal-products-controlling-varroa-destructor-parasitosis-bees-revis-101_en.pdf. Accessed 25 Nov 2023
- Ferenčstajn-Rochowiak E, Chłopocka-Woźniak M, Rybakowski JK (2021) Ultra-long-term lithium therapy: all-important matters and a case of successful 50-year lithium treatment. *Braz J Psychiatry* 43:407–413. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2020-1111>
- Frey E, Rosenkranz P (2014) Autumn invasion rates of *Varroa destructor* (*Mesostigmata: Varroidae*) into honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) colonies and the resulting increase in mite populations. *J Econ Entomol* 107:508–515. <https://doi.org/10.1603/EC13381>
- Frey E, Schnell H, Rosenkranz P (2011) Invasion of *Varroa destructor* mites into mite-free honey bee colonies under the controlled conditions of a military training area. *J Apic Res* 50:138–144. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.50.2.05>
- Fuchs S (1985) Untersuchungen zur quantitativen Abschätzung des Befalls von Bienenvölkern mit *Varroa jacobsoni* Oud. und zur Verteilung des Parasiten im Bienenvolk. *Apidologie* 16:343–368. <https://doi.org/10.1051/apido:19850401>
- Fuchs S (1992) Choice in *Varroa jacobsoni* Oud. between honey bee drone or workerbrood cells for reproduction. *Behav Ecol Sociobiol* 31:429–435. <https://doi.org/10.1007/BF00170610>
- Gabel M, Scheiner R, Büchler R (2023) Immediate and long-term effects of induced brood interruptions on the reproductive success of *Varroa destructor*. *Apidologie* 54:1–17. <https://doi.org/10.1007/s13592-023-00993-z>
- Genersch E, von der Ohe W, Kasst H, Schroeder A, Otten C, Büchler R, Berg S, Ritter W, Mühlens W, Gisdler S, Meixner M, Liebig G, Rosenkranz P (2010) The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* 41:332–352. <https://doi.org/10.1051/apido/2010014>
- Giacobino A, Mioti C, Molinari A, Orrellano E, Signorini M, Pacini A (2023) Short communication: Varroa destructor re-invasion dynamics during autumn and winter in *Apis mellifera* colonies from a temperate climate. *J Invertebr Pathol* 197:107890. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.107890>
- Giacomelli A, Pietropaoli M, Carvelli A, Iacoponi F, Formato G (2016) Combination of thymol treatment (Apidugard®) and caging the queen technique to fight *Varroa destructor*. *Apidologie* 47:606–616. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0408-4>
- Gomes-da-Costa S, Marx W, Corponi F, Annella G, Murru A, Pons-Cabrera MT, Gutiérrez-Palomo A, Gutiérrez-Anango F, Llach CD, Fico G, Kotzalidis GD, Verdolini N, Valentí M, Berk M, Vieta E, Pacheriotti I (2022) Lithium therapy and weight change in people with bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev* 134:104266. <https://doi.org/10.1016/j.neurosci.2021.07.011>
- Gray A, Brodtschneider R, Adjlane N, Ballis A, Brubardis V, Charrière JD, Chlebe R, Coffey FM, Cornelissen B, Da Amaro Costa C, Csiki T, Dahle B, Damihlić J, Drazić MM, Evans G, Fiedorak M, Forsythie I, Graf de D, Gregore A, Johannessen J, Kaulo L, Kristiansen P, Marikkala M, Martín-Hermández R, Medina-Flores CA, Mutinelli F, Patalano S, Petrov P, Raudmets A, Ryzhakov VA, Simon-Delso N, Stevanovic J, Topolska G, Uzunov A, Vejsnaes F,

- Williams A, Zanmit-Mangion M, Soroker V (2019) Loss rates of honey bee colonies during winter 2017/18 in 36 countries participating in the COLOSS survey, including effects of forage sources. *J Apic Res* 58:479–485. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1615661>
- Gregoe A, Alburaki M, Werle C, Knight PR, Adamczyk J (2017) Brood removal or queen caging combined with oxalic acid treatment to control varroa mites (*Varroa destructor*) in honey bee colonies (*Apis mellifera*). *Apidologie* 48:821–832. <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0526-2>
- Haarmann T, Spivak M, Weaver D, Weaver B, Glenn T (2002) Effects of fluralinate and coumaphos on queen honey bees (Hymenoptera: Apidae) in two commercial queen rearing operations. *J Econ Entomol* 95:28–35. <https://doi.org/10.1093/ee/95.1.28>
- Hernandez J, Hattendorf J, Aebi A, Diemann V (2022) Compliance with recommended *Varroa destructor* treatment regimens improves the survival of honey bee colonies over winter. *Res Vet Sci* 144:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.12.025>
- Higes M, Martín-Hernández R, Hernández-Rodríguez CS, González-Cabrera J (2020) Assessing the resistance to acaricides in *Varroa destructor* from several Spanish locations. *Parasitol Res* 119:3595–3601. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06879-x>
- Iñanidís MD (1988) Some aspects of the process of *Varroa jacobsoni* mite entrance into honey bee (*Apis mellifera*) brood cells. *Apidologie* 9:387–396. <https://doi.org/10.1051/apidoc:19880406>
- Jack CJ, Ellis JD (2021) Integrated pest management control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), the most damaging pest of (*Apis mellifera* L., (Hymenoptera: Apidae)) colonies. *J Insect Sci* 21. <https://doi.org/10.1093/jissat/ebaa058>
- Jovanović NM, Glavinic U, Ristanic M, Vejnovic B, Stevanovic J, Cosic M, Stanimirovic Z (2022) Contact varroacidal efficacy of lithium citrate and its influence on viral loads, immune parameters and oxidative stress of honey bees in a field experiment. *Front Physiol* 13:1000944. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1000944>
- Karabagias IK, Louppis AP, Karanbouriotti S, Kontakos S, Papastephanoou C, Kontomitis MG (2017) Characterization and geographical discrimination of commercial *Citrus* spp. honeys produced in different Mediterranean countries based on minerals, volatile compounds and physicochemical parameters, using chemometrics. *Food Chem* 217:445–455. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.124>
- Kast C, Kilchenmann V, Charnière J-D (2021) Long-term monitoring of lipophilic acaricide residues in commercial Swiss beeswax. *Pest Manag Sci* 77:4026–4033. <https://doi.org/10.1002/ps.6427>
- Kolics E, Mátys K, Teller J, Speziár A, Kolics B (2020) Contact effect contribution to the high efficiency of lithium chloride against the mite parasite of the honey bee. *Insects* 11:333. <https://doi.org/10.3390/insects11060333>
- Kolics E, Speziár A, Teller J, Mátys KK, Kolics B (2021b) Lithium chloride outperformed oxalic acid sublimation in a preliminary experiment for Varroa mite control in pre-wintering honey bee colonies. *Acta Vet Hung* 68:370–373. <https://doi.org/10.1556/094.2020.09040>
- Kolics B, Kolics E, Mátys K, Teller J, Speziár A (2022) Comparison of alternative application methods for anti-Varroa lithium chloride treatments. *Insects* 13:633. <https://doi.org/10.3390/insects13070633>
- Kolics É, Sajtos Z, Mátys K, Szepesi K, Solti I, Németh G, Teller J, Baranyai E, Speziár A, Kolics B (2021a) Changes in lithium levels in bees and their products following anti-varroa treatment. *Insects* 12. <https://doi.org/10.3390/insects12070579>
- LeBoeuf AC (2017) Trophallaxis. *Curr Biol* 27:R1299–R1300. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.10.047>
- Lodesani M, Costa C, Besana A, Dall'Olio R, Franceschetti S, Tesoriere D, Giacomo D (2014) Impact of control strategies for *Varroa destructor* on colony survival and health in northern and central regions of Italy. *J Apic Res* 53:155–164. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.1.17>
- Mitton GA, Merio Arcerito F, Cooley H, Fernández de Landa G, Eguaras MJ, Ruffinengo SR, Maggi MD (2022) More than sixty years living with *Varroa destructor*: a review of acaricide resistance. *Int J Pest Manag*:1–18. <https://doi.org/10.1080/09670874.2022.2094489>
- Mondet F, Parejo M, Meixner MD, Costa C, Kryger P, Andonov S, Servin B, Basso B, Bieńkowska M, Bigio G, Cúia E, Cebotari V, Dahle B, Dražić MM, Hatjina F, Kovačić M, Kretavicius J, Lima AS, Panasiuk B, Pinto MA, Uzunov A, Wilde J, Büchler R (2020) Evaluation of Suppressed Mite Reproduction (SMR) Reveals Potential for Varroa Resistance in European Honey Bees (*Apis mellifera* L.). *Insects* 11:595. <https://doi.org/10.3390/insects111090595>
- Mondet F, Beaurepaire A, McAfee A, Locke B, Alaux C, Blanchard S, Danka B, Le Conte Y (2020b) Honey bee survival mechanisms against the parasite *Varroa destructor*: a systematic review of phenotypic and genomic research efforts. *Int J Parasitol* 50:433–447. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.03.005>
- Mutinali F (2016) Veterinary medicinal products to control *Varroa destructor* in honey bee colonies (*Apis mellifera*) and related EU legislation – an update. *J Apic Res* 55:78–88. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1172694>
- Nixon JH, Ribbands CR (1952) Food transmission within the honey-bee community. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 140:43–50. <https://doi.org/10.1098/rspb.1952.0042>
- Park W (1925) The Storing and Ripening of Honey by Honeybees. *J Econ Entomol* 18:405–410. <https://doi.org/10.1093/ee/18.2.405>
- Pietropoli M, Formato G (2019) Acaricide efficacy and honey bee toxicity of three new formic acid-based products to control *Varroa destructor*. *J Apic Res* 58:824–830. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1656788>
- Prešern J, Kur U, Bubič J, Šala M (2020) Lithium contamination of honeybee products and its accumulation in brood as a consequence of anti-varroa treatment. *Food Chem* 330:127334. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127334>
- Qadir ZA, Idrees A, Mahmood R, Sarwar G, Bakar MA, Ahmad S, Raza MM, Li J (2021) Effectiveness of different soft acaricides against honey bee ectoparasitic *Mite Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Insects* 12:1032. <https://doi.org/10.3390/insects12111032>
- Rademacher E, Harz M, Schneider S (2017) Effects of Oxalic Acid on *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Insects* 8:84. <https://doi.org/10.3390/insects8030984>
- 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* 53:1–14. <https://doi.org/10.1007/s13592-022-00949-y>
- Rosenkranz P, Aumair P, Ziegelmann B (2010) Biology and control of *Varroa destructor*. *J Invertebr Pathol* 103(Suppl 1):96–119. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>
- Satta A, Floris I, Eguaras M, Cabras P, Garau VL, Melis M (2005) Formic acid-based treatments for control of *Varroa destructor* in a Mediterranean area. *J Econ Entomol* 98:267–273. <https://doi.org/10.1093/jee/98.2.267>
- Schur A, Tornier I, Brasse D, Müllen W, von der Ohe W, Wallner K, Wehling M (2003) Honey bee brood ring-test in 2002: method for the assessment of side effects of plant protection products on the honey bee brood under semi-field conditions. *Bull Insectol* 56:91–96
- Seidel U, Baumhof E, Hägele FA, Bös-Westphal A, Birringer M, Rimbach G (2019) Lithium-rich mineral water is a highly bioavailable lithium source for human consumption. *Mol Nutr Food Res* 63:e1900039. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900039>

- Seidel U, Jans K, Hommen N, Ipharraguerre IR, Lüersen K, Birringer M, Rimbach G (2020) Lithium content of 160 beverages and its impact on lithium status in *Drosophila melanogaster*. *Foods* 9. <https://doi.org/10.3390/foods9060795>
- Seitz N, Traynor KS, Steinhilber N, Rennich K, Wilson ME, Ellis JD, Rose R, Tarry DR, Sagili RR, Caron DM, Delaplane KS, Rangel J, Lee K, Boylis K, Wilkes JT, Skinner JA, Pettis JS, vanEngelsdorp D (2015) A national survey of managed honey bee 2014–2015 annual colony losses in the USA. *J Apic Res* 54:292–304. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1153294>
- Semkiw P, Skubida P, Pohorecka K (2013) The amitraz strips efficacy in control of *Varroa destructor* after many years application of amitraz in apiaries. *Journal of Apicultural Science* 57:107–121. <https://doi.org/10.2478/jas-2013-0012>
- Stahlmann-Brown P, Hall RJ, Prager H, Robertson T (2022) *Varroa* appears to drive persistent increases in New Zealand colony losses. *Insects* 13. <https://doi.org/10.3390/insects13070589>
- Stanimirovic Z, Glavinc U, Jovanovic NM, Ristanic M, Milejkovic-Opsenica D, Mutic J, Stevanovic J (2022) Preliminary trials on effects of lithium salts on *Varroa destructor*, honey and wax matrices. *J Apic Res* 61:375–391. <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1988377>
- Steube X, Beinert P, Kirchner WH (2021) Efficacy and temperature dependence of 60% and 85% formic acid treatment against *Varroa destructor*. *Apidologie* 52:720–729. <https://doi.org/10.1007/s13592-021-00859-5>
- Szklarska D, Rzymski P (2019) Is lithium a micronutrient? From biological activity and epidemiological observation to food fortification. *Biol Trace Elem Res* 189:18–27. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1455-2>
- Taha E-KA, Rakha OM, Elnabawy E-SM, Hassan MM, Shawer DM (2021) Comb age significantly influences the productivity of the honeybee (*Apis mellifera*) colony. *Journal of King Saud University - Science* 33:101436. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101436>
- Tariba Lovaković B, Lazarus M, Brčić Karačonić I, Jurica K, Živković Semren T, Lušić D, Brajenović N, Pelačić Z, Pizent A (2018) Multi-elemental composition and antioxidant properties of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey from the coastal region of Croatia: Risk-benefit analysis. *J Trace Elem Med Biol* 45:85–92. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.09.022>
- Travis DA, Watson RP, Tauer A (2011) The spread of pathogens through trade in wildlife. *Revue Scientifique Et Technique-OIE* 30:219
- Traynor KS, Mondet F, de Miranda JR, Techer M, Kowalik V, Oddie MAY, Chantawannakul P, McAfee A (2020) *Varroa destructor*: a complex parasite, crippling honey bees worldwide. *Trends Parasitol* 36:592–606. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.004>
- Underwood RM, Currie RW (2003) The effects of temperature and dose of formic acid on treatment efficacy against *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), a parasite of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Exp Appl Acarol* 29:303–313. <https://doi.org/10.1023/A:1025892906393>
- van der Steen J, Vejsnæs F (2021) *Varroa* control: a brief overview of available methods. *Bee World* 98:50–56. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2021.1896196>
- Vilarem C, Ploa V, Vogelweith F, Vitillard A (2021) *Varroa destructor* from the laboratory to the field: control, biocontrol and IPM perspectives—a review. *Insects* 12:800. <https://doi.org/10.3390/insects12090800>
- Ziegelmann B, Abele E, Hannus S, Beitzinger M, Berg S, Rosenkranz P (2018) Lithium chloride effectively kills the honey bee parasite *Varroa destructor* by a systemic mode of action. *Sci Rep* 8:683. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-19137-5>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

2.5 From consumption to excretion: Dynamics of lithium in honey bees (*Apis mellifera*) after the application of lithium chloride and the time-dependent effects on parasitizing *Varroa destructor*

Publiziert in *Pest Management Science*

Abstract

BACKGROUND: Owing to its systemic mode-of-action and ease of application, lithium chloride (LiCl) is an ideal varroacide for the control of *Varroa destructor* infestations in honey bee colonies. To better understand how LiCl functions within a colony, we screened different parts of honey bee anatomy for lithium accumulation. We wanted to elucidate the time-dependent effects of LiCl on *V. destructor* and its metabolism within honey bees when they were fed continuous LiCl treatments, as well as evaluate potential adverse effects such as accumulation in the hypopharyngeal glands of nurse bees, which could negatively impact queens and larvae.

RESULTS: Cage experiments reveal rapid acaricidal onset, with >95% mite mortality within 48 h of treatment. Bee hemolymph analysis supports these observations, showing a rapid increase in lithium concentration within 12 h of treatment, followed by stabilization at a constant level. Lithium accumulates in the rectum of caged bees (≤ 475.5 mg kg⁻¹ after 7 days of feeding 50 mM LiCl), reflecting the bees' metabolic and excretion process. Despite concerns about potential accumulation in hypopharyngeal glands, low lithium levels of only 0.52 mg kg⁻¹ suggest minimal risk to the queen and 1st - and 2nd-instar larvae. Cessation of LiCl treatment results in a rapid decline in mite mortality in

the first 5 days, which increases again thereafter, resulting in mite mortality of 77–90% after 10 days.

CONCLUSION: These findings help optimize LiCl application in colonies to achieve high Varroa mortality without unwanted adverse effects and provide important baseline data for future registration.

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*. DOI: 10.1002/ps.8311

From consumption to excretion: Lithium concentrations in honey bees (*Apis mellifera*) after lithium chloride application and time-dependent effects on *Varroa destructor*

Carolin Rein,^{*} Markus Grünke, Kirsten Traynor and Peter Rosenkranz

Abstract

BACKGROUND: Owing to its systemic mode-of-action and ease of application, lithium chloride (LiCl) is an ideal varroacide for the control of *Varroa destructor* infestations in honey bee colonies. To better understand how LiCl functions within a colony, we screened different parts of honey bee anatomy for lithium accumulation. We wanted to elucidate the time-dependent effects of LiCl on *V. destructor* and its metabolism within honey bees when they were fed continuous LiCl treatments, as well as evaluate potential adverse effects such as accumulation in the hypopharyngeal glands of nurse bees, which could negatively impact queens and larvae.

RESULTS: Cage experiments reveal rapid acaricidal onset, with >95% mite mortality within 48 h of treatment. Bee hemolymph analysis supports these observations, showing a rapid increase in lithium concentration within 12 h of treatment, followed by stabilization at a constant level. Lithium accumulates in the rectum of caged bees ($\leq 475.5 \text{ mg kg}^{-1}$) after 7 days of feeding 50 mM LiCl, reflecting the bees' metabolic and excretion process. Despite concerns about potential accumulation in hypopharyngeal glands, low lithium levels of only 0.52 mg kg^{-1} suggest minimal risk to the queen and 1st and 2nd instar larvae. Cessation of LiCl treatment results in a rapid decline in mite mortality in the first 5 days, which increases again thereafter, resulting in mite mortality of 77–90% after 10 days.

CONCLUSION: These findings help optimize LiCl application in colonies to achieve high *Varroa* mortality without unwanted adverse effects and provide important baseline data for future registration.

© 2024 The Author(s). *Pest Management Science* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Society of Chemical Industry.

Keywords: lithium chloride; metabolism; hemolymph; hypopharyngeal gland; *Varroa destructor*

1 INTRODUCTION

Since the mite *Varroa destructor* (Anderson & Trueman) infested the western honey bee *Apis mellifera* (Linnaeus), beekeepers have had to treat their colonies with acaricides several times a year to keep them alive. Left untreated, colonies typically die within 1–3 years.^{1,2} Unfortunately, all of the currently registered treatment agents have one or more of the following shortcomings. On the one hand, the efficacy of natural products such as organic acids varies substantially with environmental factors such as temperature,³ the presence of brood and the time of the season. On the other, synthetic acaricides may promote mite resistance^{4,5} and entail the risk of residues accumulating in bee products,^{6–8} The efficacy of currently available options is often insufficient^{9,10} and most beekeepers have to treat multiple times (e.g. Varromed^{®11}) or combine mechanical and chemical controls in an integrated pest management (IPM) strategy.^{12,13} Both options increase the workload and costs of treatment. Owing to these inherent limitations, there is considerable demand for new treatment methods to combat the *Varroa* mite.

In 2018, Ziegelmann et al.¹⁴ discovered that lithium chloride (LiCl) mixed into a sugar syrup (Aplinvert[®]) and fed to caged bees killed >95% of the introduced mites within 1–3 days, depending on the concentration used. The substantial novelty of the LiCl treatment is its systemic mode-of-action (MoA).¹⁵ Currently all registered varroacides kill mites through a contact MoA, whereby either the mite has to come in direct contact with the compound or the chemical is distributed over the body of the bees to the mite.^{16,17} By contrast, feeding LiCl syrup results in a systemic MoA, where the chemical is distributed within the bee's body and transferred to the mite during feeding. Using the natural food transmission between honey bees called trophallaxis,^{17,18} the LiCl food is distributed throughout the whole colony¹⁹ and all of the mites in the dispersal phase feeding on the bees, are easily and

* Correspondence to: C. Rein, State Institute of Bee Research, University of Hohenheim, D-70599 Stuttgart, Germany. E-mail: carolin.rein@uni-hohenheim.de

State Institute of Bee Research, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany

quickly exposed. Even though several researchers have confirmed the high acaricidal effect of lithium,^{14,18,21} adverse effects such as brood loss have also been reported.^{19,22} Little is known about how bees metabolize lithium or how quickly and where it accumulates in the host tissues. Understanding these dynamics is crucial to developing LiCl as a viable varroacide with minimal adverse effects on the honey bee brood.

In previous cage experiments, it has been shown that concentrations of 25–50 mM LiCl are well-tolerated by the bees yet highly effective in killing mites¹⁸ and might represent a suitable concentration for Varroa treatment in the field.¹⁹ To understand the rapid onset of efficacy, we recorded the commencement of mite mortality once we started feeding a 50 mM LiCl syrup in cage experiments where individual bees were paired with individual mites. In a second cage experiment, we investigated the duration of mite mortality once LiCl treatment has halted. We also quantified the lithium concentrations in the bee's hemolymph and the rectum after different feeding periods with LiCl sugar syrup that ranged in duration from 6 h to 7 days. Hemolymph serves as a crucial transport medium for nutrients, hormones and waste products throughout the honey bee's body.^{23,24} Studying the lithium concentration in the hemolymph provides valuable insights into the movement and distribution from initial uptake by the bee via sugar syrup and how it spreads throughout its body for potential transfer to the mites. In combination with the observed mite mortality, we can define the lithium concentration needed in the hemolymph to kill parasitizing Varroa mites. We also quantified the lithium concentrations in the rectum, the last part of the digestive tract,²⁵ to understand the metabolism and excretion of lithium by the bees. Following the analysis of hemolymph and rectum, we also investigated whether lithium accumulates in the hypopharyngeal glands of 7-day-old nurse bees reared in LiCl colonies. The accumulation of lithium in the royal jelly secreted by these glands could pose a danger to both the queen and the young larvae, similar to pesticide residues,^{26,27} and could be an explanation of the observed brood loss during a LiCl treatment in colonies.^{18,22}

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Origin of bees and mites

Apis mellifera carnica colonies were located in the local apiary of the State Institute of Bee Research at the University of Hohenheim, Stuttgart, Germany (48° 42' 31.8" N, 9° 12' 31.5" E), in the vicinity of the botanic gardens. Queenright colonies, headed by healthy sister queens from the local breeding stock, managed by the State Institute of Bee Research, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany, were housed in polystyrene mini-hives 'Mini-Plus' with six frames per box. Each colony consisted of two to three boxes, which held ≈3000–4000 adult bees. According to the needs of the experiments, adult bees were directly sampled from brood combs of untreated donor colonies ($n = 3$) and put in cages to measure the 'onset of efficacy' and the 'build-up rate' in our two trials. For the longer lasting 'duration' trial and the 'hypopharyngeal gland' experiment, we used newly emerged bees, as the age of the bee is important in these experiments. We took frames of emerging brood from untreated donor colonies ($n = 3$) and transferred them to an incubator overnight [30 °C, 60% relative humidity (RH); Memmert GmbH, Schwabach, Germany]. The next day, the newly emerged bees were either placed directly into cages for the 'duration' trial, or marked with a queen marking pen and released back into the test colonies ($n = 3$ / treatment) for the 'hypopharyngeal gland' trial. All experiments were carried out in 2022. The 'hypopharyngeal gland' trial was repeated in 2023.

The sugar shake method²⁸ was used to obtain viable female *V. destructor* mites for the cage trials. Highly infested colonies outside of the experimental apiary, which had not received winter treatment against Varroa, were used as mite donors. After the sugar shake, the mites were washed with lukewarm water and placed on a damp cloth. Only mites that showed normal movement upon being touched with a brush were used in the trials and placed on bees in the cages. Upon introduction, all mites immediately attached to the bees and were subsequently observed on different parts of the bees during the daily mortality check, as they are free-moving. The subsequent movements of the mite on the bee were not recorded.

2.2 Cage trials

2.2.1 Onset of efficacy on mites

The onset of the active effect of LiCl on mites was evaluated in cage trials consisting of 40-mL containers [Rotilabo[®]; Roth, Karlsruhe, Germany; Fig. 1(A)]. A single bee was employed in each cage to assess the direct effect of LiCl feeding on the mite. The containers were sealed with breathable paraffinose that was secured with rubber bands instead of a plastic lid. A hole was drilled into the containers and a 10-mL feeding syringe (Injekt[®]; Roth) was inserted. The syringes were filled with Apinvert[®] sugar syrup (Suedzucker Group, Mannheim, Germany) spiked with 50 mM LiCl (> 99.9% p.a., ultra quality; Roth). This concentration has been shown to be effective for treating mites in brood-free colonies.¹⁹ To reach this concentration, we mixed 212 g of LiCl-salt in 1 L of syrup. Syringes of control cages were filled with pure Apinvert[®] syrup. We placed one hive bee taken directly from a MiniPlus brood frame and one mite into each cage, which was then placed into an incubator [28 °C, 60% RH; Memmert GmbH]²⁹ for the observation period. The mortality of the mites was recorded after 12 h, 24 h and 48 h. After 48 h, the cages were frozen at –20 °C and the bees were checked for mites to ensure that before freezing, the mite was still alive and in the cage at the end of the

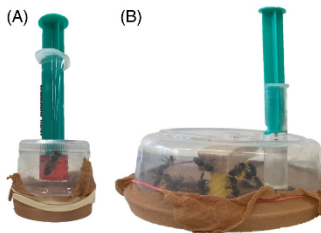


Figure 1. (A) Small cages (40 mL) equipped with a 10-mL feeding syringe containing one bee and one mite, used for the 'onset of active effect' trial. (B) Large cages (600 mL) equipped with wax foundation and a 10-mL feeding syringe, used for the 'duration' and 'build-up rate' trial.

experiment. Cages in which the bee died or the mite was not found dead during the trial or was not found on the bee after 48 h were excluded from the analysis.

2.2.2 Duration of mite mortality

In order to assess the duration of the active effect of LiCl on mites following a change in diet from lithium to control sugar syrup, we used 600-mL plastic containers [Lock and Lock®, Frankfurt, Germany; Fig. 1(B)]. We attached a strip of pure beeswax foundation (8 cm × 3.5 cm) in the middle of the container. The cages were sealed with pantyhose and equipped with 10-mL syringes (Njekt®, Roth). Newly emerged bees ($n = 35 \pm 1$) were transferred into cages and placed in an incubator (28 °C, 60% RH; Memmert).²⁹ Bees were fed for 48 h with 50 mM LiCl syrup (2.12 g LiCl-salt / litre), then the diet was changed to pure sugar syrup (Apinvert®). Female *V. destructor* mites ($n = 11$) were introduced into the cage at different time intervals after switching from LiCl syrup to sugar syrup (Fig. 2). For each time interval (0 h, 24 h, 48 h, 72 h and 96 h) four cages were used. Bees in the control group were fed with sugar syrup over the whole observation period. Mite mortality was documented daily after mite introduction and dead mites were removed. Additionally, the cages were checked for the presence of any dead bees, which were not counted. Upon removal, the bees were found to be free of mites. The cages were frozen at -20 °C 10 days after mite introduction and the remaining mites on bees were counted.

2.2.3 Build-up rate of lithium in hemolymph and rectum

This experiment aimed to understand the distribution of lithium within the honey bee body and the pathway lithium could take to reach mites feeding on these bees. To assess the rate of digestion and how quickly the lithium is excreted, we analyzed the concentration of lithium in both the hemolymph and the rectum. We exclusively measured the lithium levels in the samples since the chloride anion has no effect on mite mortality.⁴

Adult honey bees ($n = 50 \pm 2$) were kept in 600-mL cages [Fig. 1(B)] in an incubator at 28 °C and fed *ad libitum* with 50 mM LiCl syrup

until hemolymph extraction and dissection of the rectum, with samples taken for different feeding periods (Table 1). Eight cages were used for each feeding period, resulting in a total of 104 cages.

At the end of the defined feeding period, the bees were anaesthetized with CO₂ for 5 min. All dead bees were removed before hand. Wings were removed and a slit was cut with a small scissor into the 3rd abdominal tergite of the bee into the dorsal sinus [Fig. 3(A)]. Then a 10- μ L capillary pipette (ringcaps; Hirschmann, Eberstadt, Germany) was gently pressed against the abdomen [Fig. 3(B)]. Owing to capillary forces, 5–6 μ L hemolymph per bee could easily be extracted. The hemolymph from 40 \pm 5 bees per cage were pooled to reach a sample volume of 200 μ L. For the rectum samples, another 5–10 bees per cage were used to gain a sample volume of 200 μ L. The rectum can be easily exposed by pulling the stinger with forceps [Fig. 3(C)]. The concentration of lithium in both hemolymph and rectum was analyzed using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS).

2.3 Semi-field trials

2.3.1 Lithium in hypopharyngeal glands of nurse bees

In order to determine whether LiCl exposure causes lithium to accumulate in the hypopharyngeal gland (HPG) of nurse bees, we conducted semi-field trials in which young bees were reared in different test colonies (or 7 days to develop HPGs in the presence of brood).^{30,31}

A frame of newly emerging bees from one of the donor colonies was placed in an incubator overnight (30 °C, 60% RH; Memmert). The next day, the newly emerged bees were marked on the thorax with a queen marking pen (Posca) and then released into test colonies ($n = 3$ / treatment / year). The colonies were either fed with 2 L control sugar syrup (Apinvert®) or LiCl syrup (Apinvert® spiked with 25 mM LiCl, which refers to 1.06 g LiCl-salt L⁻¹) which was applied once on the day of bee release into colonies. This lower concentration of 25 mM LiCl has been used in previous experiments evaluating the effects of LiCl on brood development.²⁷ After 7 days, the marked bees were collected from the colonies and stored in a freezer at -20 °C until dissection of the HPGs.

For dissection, bees were defrosted, decapitated and the head was pinned down in a wax petri dish filled with deionised water. With a scalpel we cut between eyes and forehead and gently pulled with forceps on the exoskeleton to expose the HPG [Fig. 4(A)]. The glands from 10 bees were pooled into a 200- μ L tube for later analysis of lithium concentration with ICP-MS. In total we dissected 120 honey bees from control colonies ($n = 6$) and 110 honey bees from LiCl colonies ($n = 6$) in two consecutive years ($n = 3$ colonies / treatment / year). In the 2nd year, we additionally dissected the honey stomach (crop) from the same bees for lithium analysis, to clarify whether they consumed LiCl food. To dissect the honey crop, the abdomen was gently pulled with forceps while holding onto the thorax. This results in the crop being exposed [Fig. 4(B)]. Here, in total 80 control bees and 60 LiCl bees were dissected. Again 10 bees were pooled per sample.

2.4 Lithium analysis with ICP-MS

The samples were first weighed and then put into glass tubes to which nitric acid (HNO₃; 2 mL) was added. The tubes were then filled with double-distilled water to reach a final volume of 10 mL. The mixture was homogenized using a vortex. Microwave digestion was performed using an Ultra Clave III (MLS Mikrowellen-Labor-Systeme GmbH, Leutkirch, Germany), with

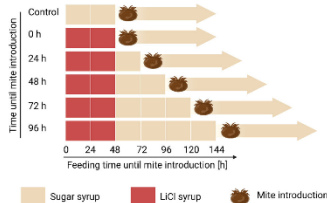


Figure 2. Feeding plan for caged bees and time until mite introduction. Bees ($n = 35 \pm 1$) were fed with 50 mM LiCl for 48 h ($n = 4$ cages / group), then the diet was changed to sugar syrup. *Varroa destructor* mites ($n = 11$ /cage) were introduced into the cages either directly after LiCl feeding ceased (0 h) or at different time intervals during the sugar syrup feeding (24–96 h). The group names indicate the time intervals between the switch to sugar syrup and the introduction of mites. After the mites were introduced, feeding with sugar syrup continued until the end of the 10-day observation period. The bees in the control group were fed with sugar syrup over the whole observation period, before and after mite introduction.

Table 1. Feeding periods of caged bees ($n = 50 \pm 2$) with 50 mM LiCl syrup until extraction of hemolymph and rectum ($n = 8$ cages / feeding period):

Feeding period with LiCl until extraction												
6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	48 h	60 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h

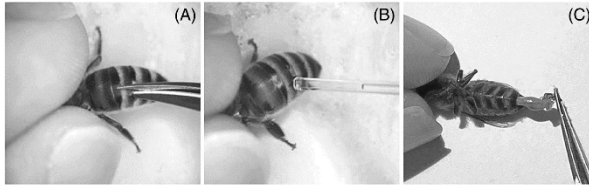


Figure 3. Extraction of hemolymph and rectum: (A) cutting into 3rd tergite of the abdomen, (B) pressing capillary pipette against abdomen to extract hemolymph and (C) exposing rectum by pulling the stinger with forceps.

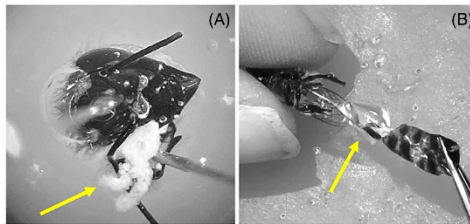


Figure 4. Dissection of the hypopharyngeal gland (A) and honey stomach (crop) (B) of a 7-day-old nurse bee.

the temperature gradually increasing from 80 °C to 200 °C at 900 W and 100 bar. The samples were analyzed using ICP-MS (NexION 300 X; PerkinElmer, Waltham, MA, USA) after being cooled and diluted. Calibration was performed using a multi-element standard solution (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) prepared with double-distilled water and HNO₃ at concentrations of 0.1, 0.2, 1, 10 and 20 µg L⁻¹. An internal standard of CertiPUR Rhodium ICP standard solution ($c = 1000 \text{ mg L}^{-1} \text{ Rh}$; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was used [limit of quantification (LOQ) < 0.025 mg kg⁻¹].

2.5 Statistics

The collected data were statistically analyzed using the programs JMP Pro17 and IBM SPSS Statistics 27. For the 'onset of efficacy' trial we used a χ^2 test to compare the groups. The survival probability of the mites in the 'duration' trial was analyzed using a Kaplan-Meier test with pairwise log-rank and a Bonferroni correction for multiple comparisons. To analyze the increase in lithium concentration in hemolymph and rectum samples over time, we fitted

quadratic polynomial curves with least-squares and tested their slope and curvature. We also compared the mean value per feeding period with the mean value of the following feeding period to analyze significant increases using an ANOVA with pairwise Tukey's honestly significant difference (HSD) test and Bonferroni correction. We tested the lithium concentration in both the honey crop and HPG for normal distribution using the Shapiro-Wilk test. As the data had nonparametric properties, we used the Mann-Whitney *U*-test to compare the groups.

3 RESULTS

3.1 Onset of efficacy on mites

Within 12 h of feeding individual bees with 50 mM LiCl syrup, 38% of the introduced mites were dead on the cage floor (Fig. 5). After an additional 12 h, an additional 40% of the mites were killed. Overall, 95% of the mites died within the first 48 h after commencing the LiCl treatment, significantly higher mortality than in the control group [$\chi^2(3) = 147.72$, $P < 0.001$]. In the control

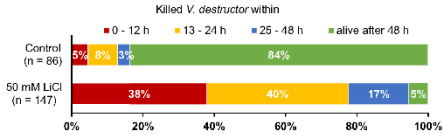


Figure 5. Timing of *Varroa destructor* mortality owing to the active effect of LiCl after application via feeding. Individual cages with one honey bee and one mite were fed with 50 mM LiCl syrup. Bees in the control group were fed with pure sugar syrup. Mite mortality was recorded after 12 h, 24 h and 48 h. Remaining mites on bees after 48 h were identified as 'alive'. Number of mites used per group are given in brackets. The χ^2 test revealed significantly higher mortality in the treatment group compared to control ($\chi^2(3) = 147.72, P < 0.001$).

group only 16% of the mites died within the whole observation period while 84% survived till the end of the cage trial. Two bees from the LiCl group were excluded from the analysis as they died during the trial.

3.2 Duration of mite mortality

In this experiment, 24 cages containing a total of 820 bees and 254 mites were examined to assess the duration of the active effect of LiCl on the mites after the diet was changed to pure sugar syrup.

Mite mortality in the control group was the lowest at 3–4% per day, resulting in a total survival probability of 77% at the end of the experiment (Fig. 6). Mites placed directly on the bees at the end of LiCl feeding (0 h) had the highest mortality rate with 88% of the mites dying within the first day. In subsequent days, mites continued to die in these cages, and within 5 days the maximum mortality rate of 98% was reached, differing significantly from all other LiCl groups and the control group ($P < 0.001$, log-rank; Fig. 6).

An interval of 24 h from the cessation of LiCl feeding and the introduction of the mites into the cages significantly reduced the miticidal effect of LiCl. In this group only 36% of the mites died during the first 5 days, thus significantly differing from the 0 h

group ($P < 0.001$, log-rank until Day (D)5] but not from the control group ($P = 0.852$, log-rank). However, during the following days, the mite mortality of this 24 h group increased, resulting in an overall mortality rate of 86% measured on D10, which was significantly higher than that of the control group ($P < 0.001$, log-rank). A similar course of mite mortality was observed in the groups with longer intervals from diet change to mite introduction of 48 h, 72 h and 96 h. In all of these test groups, no significant difference was observed compared to the control group up to D5, thereafter the mite mortality increased and at the end of the 10-day observation period, all LiCl groups had a significant lower survival probability than the control group ($P < 0.001$, log-rank).

3.3 Build-up rate of lithium in hemolymph and rectum

The concentration of lithium in the extracted hemolymph increased after the start of LiCl feeding, with a significant difference between 6 h ($0.5 \pm 0.3 \text{ mg kg}^{-1}$) and 12 h ($5.2 \pm 3.2 \text{ mg kg}^{-1}$) of feeding ($P = 0.034$, Tukey's HSD test; Fig. 7). After 24 h and 48 h the lithium concentration was 7.1 ± 1.7 and $8.4 \pm 2.1 \text{ mg kg}^{-1}$, respectively. The lithium concentration at 12 h did not differ significantly from later time periods, indicating that as of this time point there was no significant accumulation of lithium in the hemolymph ($P = 1$, Tukey's HSD test). The highest

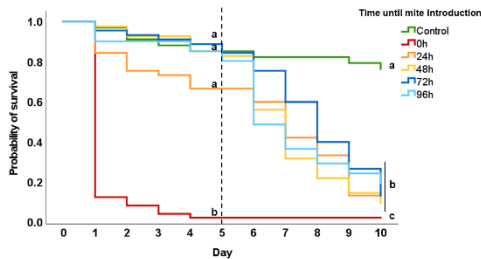


Figure 6. Duration of active effect of LiCl on *Varroa destructor* after diet change (feeding plan in Fig. 2). Observation of mite mortality started after the introduction of the mites on Day 0. Bees ($n = 35 \pm 1$) were fed for 48 h with 50 mM LiCl syrup, then the diet was changed to sugar syrup. Mites ($n = 1$) were introduced into each cage after time intervals of 0 h, 24 h, 48 h, 72 h and 96 h after diet change ($n = 4$ cages / group). Bees in the control group received sugar syrup over the whole observation period. Mortality of mites was documented daily. Kaplan-Meier survival analysis with pairwise comparison showed significant differences between the groups, as indicated by different letters. Log-rank test ($\alpha = 0.05$) with Bonferroni correction was carried out for the first 5 days and over the whole observation period of 10 days.

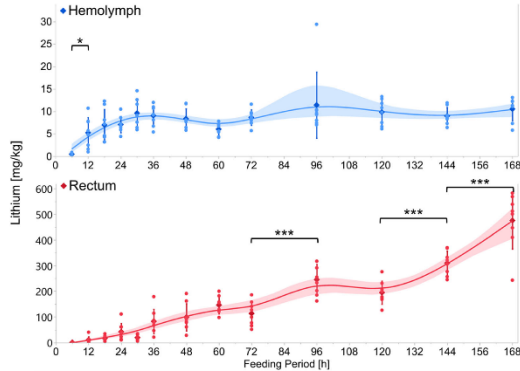


Figure 7. Lithium concentration in hemolymph and rectum extracted after different feeding periods from 6 h to 168 h. Fifty bees were fed with 50 mV LiCl in cages, $n = 8$ cages per feeding period, each given as mean \pm SD. Asterisks indicate significant differences between two consecutive feeding periods (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ (Tukey's HSD test). Polynomial fit revealed a significant effect of the feeding period on lithium concentrations for the rectum samples ($P < 0.001$), which continued to accumulate higher concentrations of lithium throughout the feeding experiment. Hemolymph samples increased significantly at 12 h, but then remained at steady-state. Note that the y-axes are thus of different scales for rectum and hemolymph samples.

lithium concentration was measured after 96 h with $11.4 \pm 6.9 \text{ mg kg}^{-1}$. Polynomial fitting, used to look for significant differences over a factor such as time, did not reveal any significant effect of the feeding period on lithium accumulation, indicating a steady state of lithium in the hemolymph throughout all feeding periods.

In comparison, we measured twice as much lithium in the rectum samples within 12 h of commencing the feeding, a concentration of $12.2 \pm 11.9 \text{ mg kg}^{-1}$. In the rectum, the lithium accumulated continuously, with a significant effect of the feeding period on the concentration ($P < 0.001$, polynomial fit), there were significant increases in lithium concentrations after 72 h, 120 h and 144 h of feeding ($P < 0.001$, Tukey's HSD test; Fig. 7). The maximum concentration of $475.5 \pm 103.4 \text{ mg kg}^{-1}$ was reached after 168 h of LiCl feeding.

3.4 Lithium in hypopharyngeal glands of nurse bees within honey bee colonies

In this semi field experiment, feeding LiCl syrup at a concentration of 25 mV to colonies resulted in an average lithium concentration of $0.52 \pm 0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ in HPG of 7 day old nurse bees (Table 2). In the honey crop of these bees, we determined an average lithium concentration of $58.1 \pm 11.8 \text{ mg kg}^{-1}$, which is ≈ 100 -fold higher. In the control colonies, seven of 12 HPG samples from nurse bees reared without LiCl feeding were below the LOQ ($< 0.025 \text{ mg kg}^{-1}$), whereas in the other five samples concentrations of $0.09\text{--}0.335 \text{ mg kg}^{-1}$ were detected. The average concentration of lithium in samples was $0.09 \pm 0.1 \text{ mg kg}^{-1}$ and thus significantly lower than the LiCl group ($P < 0.001$, Mann-Whitney U -test, Table 2). A similar pattern was seen in the honey crop of control bees, which had

an average lithium concentration of $4.07 \pm 1.3 \text{ mg kg}^{-1}$, significantly lower compared to LiCl bees ($P = 0.0024$, Mann-Whitney U -test).

4 DISCUSSION

The acaricidal effect of lithium salts, specifically lithium chloride, on *V. destructor* has been demonstrated by multiple independent research groups^{14,21,32,33} and has been confirmed even under realistic field conditions with different concentrations and applications.^{19,20,37} Unlike any other treatment currently available, LiCl has a systemic MoA and can be mixed into sugar syrup and

Table 2. Lithium concentration in hypopharyngeal glands (HPG) and honey crops of 7-day-old nurse bees from colonies fed with 25 mV LiCl syrup or control colonies, fed with sugar syrup

Origin of nurse bees	Lithium (mg kg^{-1})	
	HPG ***	Crop **
LiCl colonies	0.52 ± 0.3 ($n = 11$)	58.1 ± 11.8 ($n = 6$)
Control colonies	0.09 ± 0.1 ($n = 12$)	4.07 ± 1.3 ($n = 8$)

Values are given as mean \pm SD, number of analyzed samples are given in brackets. Samples were analyzed with inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS), values below the limit of quantification ($< 0.025 \text{ mg kg}^{-1}$) were included in the calculation with a value of 0.025 mg kg^{-1} . Significant differences between LiCl and control colonies within the sample group are indicated with asterisks (***) $P < 0.001$ and ** $P = 0.0024$, respectively; Mann-Whitney U -test).

applied by feeding to bees. This simplifies the possible use as a veterinary medicine and ensures the efficacy is independent from environmental factors such as the weather. Because treatment of *V. destructor* by a systemic MoA is a new approach for varroacides, the details of how quickly it acts when fed as a syrup solution were unknown. Two key questions must be answered to establish an effective treatment plan: (i) How long does it take from commencing LiCl feeding of the bees to the death of the mites? And (ii) How long does the active effect last once the LiCl application is ceased?

In our first experiment, we determined the duration required to achieve a lethal LiCl concentration for mites in the honey bee. We specifically used individual bees paired with a single mite to determine the onset of efficacy, as larger groups of individuals could influence the dynamic of food distribution and transmission. These cage experiments showed a strikingly fast onset of LiCl induced mortality on *V. destructor* mites via honey bee feeding. Almost 40% of the mites were killed within 12 h, this mortality reached 80% by 24 h and within 48 h over 95% of the mites were dead. Both Ziegelmann et al.¹⁴ and Stanimirovic et al.²¹ showed that in bigger cages with 30 bees and 25 mites it took >4 days to reach a mite mortality of >95%, however they used half the LiCl concentration of our experiment.

Our hemolymph extracted from bees fed a 50 mM LiCl syrup clearly demonstrates that the lithium concentration increases rapidly once feeding starts and then plateaus after 12 h to a steady state. Despite continuous feeding of LiCl syrup, an equilibrium is reached within the bee between the uptake and catabolism of lithium in the hemolymph. Other studies with different substances have demonstrated that the metabolism of bees could be even faster. For example, the toxins amygdalin and quinine were detected in bee hemolymph extracted just 1 h after feeding it to the bees.²⁴

We measured the lithium concentration in the hemolymph of the host bees, although Ramsey et al.³⁵ described the fat body as the primary nutrient from their hosts for dispersing *V. destructor* mites. We chose hemolymph for several reasons. (i) The extent to which hemolymph or fat body provides the crucial nutrition for the parasitizing mites remains controversial. Recently, Piou et al.³⁶ succeeded in rearing *Varroa* mites for long periods of time under *in vitro* hemolymph feeding conditions and mentioned that 'we do not know whether the necessary nutrients come mostly from lysed hemocytes or fat body cells or directly from molecules circulating in the hemolymph'. The authors suggested that *Varroa* mites consume both hemolymph and fat body cells. Meanwhile, Han et al.³⁷ showed through biostaining and proteomic analysis that the life history stage affects the proportion of hemolymph and fat body in the *Varroa* mite's diet. (ii) As mentioned in the introduction, the hemolymph is the transport medium in the honey bee's body and the intention of our experiments was to follow the path from the uptake of lithium by the bee in the gut to its transfer to the mites that feed on these bees. The fat body is also bathed in hemolymph, which is important for the secretion and absorption of molecules between the tissues and the circulating fluid.³⁸ (iii) We have established a method for separating the hemolymph and fat body of adult bees (Grünke M, unpublished), but this method is extremely time-consuming and not suitable for serial analysis and sampling in the quantities required for the ICP-MS method. However, a first comparison of the lithium concentration in fat body and hemolymph after 3 days of feeding 50 mM LiCl to adult bees showed an almost identical lithium concentration of ≈ 11 mg kg⁻¹. Respective of the proportion of hemolymph and fat body consumed by the

Varroa mite, the hemolymph data should be suitable for reflect the miticidal threshold of lithium concentration in the bee body.

Owing to the rapid effect of the consumed lithium on the parasitizing mites – 38% mortality after 12 h and 95% after 48 h – we could here for the first time quantify the threshold needed to induce mortality. A concentration of 5–8 mg kg⁻¹ lithium in the hemolymph is sufficient to kill mites that parasitize these bees. This is an important parameter for the development of lithium applications in full-sized colonies under field conditions. To achieve a 95% acaricidal efficacy, the concentration, dosage and composition of lithiated food should be designed so that the majority of bees in a colony achieve a hemolymph concentration of >5 mg kg⁻¹ for ≈ 48 h.

Our bee rectum samples show that the concentration of lithium in the rectum rises with the duration of feeding. In contrast to the hemolymph, there is a continuous increase without a steady state. After just 12 h, the concentration of lithium in the rectum at 12.2 mg kg⁻¹ is twice that in the hemolymph, and peaks at 475 mg kg⁻¹ at the end of the experiment on D7 of feeding. As caged bees do not defecate, waste products, including lithium, accumulate in the rectum over time. We cannot exclude that the absence of defecation in cage trials may have slightly influenced the lithium build-up in the hemolymph due to the absorption of some water and salts through the rectal pads.³⁹ However, the continuous increase in lithium concentration over the week suggests that there is no particular absorption of LiCl from the rectum to the hemolymph. More important, the accumulation of lithium in the rectum is a useful result, as it means that the lithium is continuously metabolised and then excreted outside the colony by the bees, ensuring that it does not accumulate when applied to free-flying colonies. A similar course was shown by Du Rand,⁴⁰ who fed nicotine nectar to caged worker bees and measured the concentration of nicotine and its metabolites in the hemolymph, digestive tract and rectum over time. Nicotine concentration decreased in the crop, remained constant in the hemolymph and increased in the rectum,⁴⁰ mimicking what we saw with lithium in our study.

Our knowledge of the lithium metabolism in insects is generally poor. We can only speculate which physiological factors contribute to the here observed dynamic of uptake, degradation and excretion of lithium. First, food is ingested and temporarily stored in the honey stomach (crop). It then enters the midgut through the proventriculus.⁴¹ It is likely that the epithelial cells located in the midgut absorb lithium and carry it to the hemolymph, while the Malpighian tubules clean the hemolymph by removing waste metabolites and toxins.⁴² A similar working hypothesis of lithium homeostasis has been described by Jans et al.⁴³ in the model organism *Drosophila melanogaster*. In honey bees, the detoxifying system consists of enzymes such as cytochrome P450 monooxygenases, which are responsible for the metabolism of toxins such as drugs, pesticides or chemicals,^{44,45} and other xenobiotics such as lithium. The constant exchange of the hemolymph with the surrounding tissues, together with this enzymatic detoxification activity might allow for the steady state of the lithium concentration in the hemolymph, but also the accumulation in the rectum.

Our second cage experiment on the duration of the active effect of LiCl on mites is consistent with this assumption of lithium metabolism, showing that the active effect decreases rapidly when LiCl feeding is halted. A 24-h interval between the cessation of LiCl feeding and introduction of mites into the cages significantly reduced and delayed mite mortality, whereas most of the

mites placed directly on bees after the diet change (0 h group) died within a day. This can be explained by (i) the dilution of lithium in the hemolymph once bees can feed on pure sugar syrup and (ii) the fast metabolism of the bees, as explained above. The hemolymph data from the build-up trial illustrates that within 12–18 h the concentration of lithium remains widely stable with *ad libitum* feeding. Nevertheless, switching to a lithium-free diet results in a clear and rapid stop of mite mortality, at least for the first 5 days after ceasing the lithium feeding. With this change in diet, the concentration of lithium in the honey bee seems to be reduced below the threshold of 5–8 mg kg⁻¹, as otherwise we would see high levels of mite mortality (see above). However, there must still be a small amount of lithium circulating in the bee's body, sufficient to cause a kind of chronic effect on the mites that feed on these bees for >5 days, as mite mortality increases with longer observations. The caged bees did not have a chance to defecate inside the cages, and therefore could not excrete the accumulated lithium. To complement our build-up analysis, it would be helpful to have clearance rates for lithium. This would answer the question of how long lithium remains in crops, hemolymph and rectums once LiCl syrup feeding is halted.

Our data demonstrate that to function as a rapidly working varroacide, LiCl needs to circulate through full-sized and free-flying colonies for >48 h with the aim of establishing a steady-state concentration of ~5 mg kg⁻¹ in the hemolymph, which should result in 95% mortality of mites. However, it is important to remember that this only applies to broodless colonies where only mites in the dispersal phase are present, and that in colonies, unlike cage trials, there are options for food storage and additional external food sources, which are likely to dilute the LiCl food applied. Further field experiments should therefore focus on how to distribute LiCl food quickly and effectively in a large colony of >10 000 bees. The social exchange of food, called trophallaxis, is crucial for the rapid spread within a colony.^{17,18}

From a prior field experiment, we know that during a 5-day treatment with 50 mM LiCl candy, lithium was detected in the honey crop of pooled bees, sampled from the center of the colony, as early as 1 day postapplication.¹⁹ However, this 5-day treatment with 50 mM LiCl candy was only able to kill 77.5% of the mites, whereas a prolonged treatment of 9 days with the same concentration killed >98%.¹⁹ It is likely that under field conditions a major part of the crop content will be stored in food combs and only a small part will be consumed and digested by the bees. To clarify this, field experiments on LiCl application should be combined with hemolymph analysis from individual bees engaged in different tasks and collected from different parts of the hive over numerous time points during a LiCl treatment trial. Such approaches would provide more insight into how widespread LiCl treatments are shared within a colony, and allow adaptations of treatment intervals to achieve a faster and better distribution of lithium.

Another possible way to reach higher lithium concentrations in a shorter timeframe in the treated bees is to increase the applied LiCl concentration. Kolics et al.³² found that by trickling 40 mL of a 500 mM LiCl solution in brood-free colonies, mite mortality reached 79.7% within 3 days; this increased to 97.3% with repeated trickling. Although their colonies were broodless at the time of treatment, subsequent brood viability was not assessed. Rein et al.¹⁹ demonstrated that a 50 mM LiCl concentration resulted in high removal of honey bee brood, probably because LiCl food is temporarily stored in combs, then mixed with worker

and royal jelly and used for larval feeding. Therefore, it is questionable whether a 10-fold greater concentration, such as 500 mM, is safe for the bee brood. It is also unclear if the amount of LiCl used during a trickling treatment is sufficiently low to prevent accumulation in the bees or hives, which could potentially harm the bee brood.

This study aimed to investigate whether lithium accumulates in the HPG of nurse bees reared in colonies with LiCl treatment. The accumulation of Lithium in HPG could pose a risk to young larvae and the queen if the worker and royal jelly becomes contaminated. Our ICP-MS analyses showed that the HPG had the lowest lithium concentration of all bee organs and fluids which we investigated, with 0.09 mg kg⁻¹ in bees from control colonies and 0.52 mg kg⁻¹ in bees from LiCl-treated colonies. Analysis of the crop samples from the same bees confirmed their LiCl consumption. As we did not perform a wash of the extracted HPG before analysis, the slightly higher lithium concentrations in the samples could be a consequence of slight contamination with lithium from the hemolymph or other parts of the head, where for example, concentrations of <80 mg kg⁻¹ lithium have been found.¹⁶ Still, the lithium concentration in the HPG is very low and only 5% of that found in the hemolymph. Additionally, we found low concentrations of lithium in the crop of bees from the control colonies, which could be attributed to robbing, as the colonies were located next to each other in the same apiary. Nevertheless, when considering the data from Rein et al.¹⁹ which shows only traces of lithium in 2-day-old larvae, and Kolics et al.³⁰ which detected no lithium in the queens, it can be assumed that a LiCl treatment does not contaminate the worker or royal jelly to an extent that could cause damage to either queens or young larvae which are exclusively fed with jelly from the HPG. The use of stored LiCl food incorporated into the brood food fed to older larvae could result in brood loss during treatment in free-flying colonies,¹⁹ should be prevented. Without strategies to minimize brood exposure, the use of lithium in brood-rearing colonies cannot be recommended.

5 CONCLUSION

LiCl has excellent potential as a new treatment for honey bee colonies infested with *V. destructor*. Our findings indicate that LiCl is effectively consumed by the bees, reaching a miticidal concentration in the hemolymph within 12–24 h of commencing to feed the treatment and resulting in the death of >95% of the mites within 48 h. Low concentrations were detected in the analyzed HPG, making such treatments presumably safe for the queen and young larval stages, which are fed exclusively on the secreted jelly. In addition, the metabolism of bees results in a rapid depletion of lithium in their bodies, which minimises any potential long-term effects.

AUTHOR CONTRIBUTION

CR: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data Curation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing, Visualization, Project administration, Funding acquisition. **MG:** Conceptualization, Methodology, Investigation. **KT:** Writing - Review & Editing, Supervision. **PR:** Conceptualization, Methodology, Validation, Writing - Review & Editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.



ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Sandra Renz and Andrea Ruf from the Analytical Chemistry Unit of the Core Facility Hohenheim for the ICP-MS lithium analysis of our samples. We would also like to thank Karsten Schweikert from the Data and Statistical Consulting of the Core Facility Hohenheim for his statistical expertise and support. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

FUNDING INFORMATION

The project was supported by funds of the Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) based on a decision of the Parliament of the Federal Republic of Germany via the Federal Office for Agriculture and Food (BLE) under the innovation support program (grant no. 281C301A19).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated during and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Guzmán-Novoa E, Eccles L, Calvete Y, McGowan J, Kelly PG and Correa-Benítez A. *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada. *Apidologie* **41**:443–450 (2010).
- Fries I, Imdorf A and Rosenkranz P. Survival of mite infested (*Varroa destructor*) honey bee (*Apis mellifera*) colonies in a Nordic climate. *Apidologie* **37**:564–570 (2006).
- Underwood RM and Currie RW. The effects of temperature and dose of formic acid on treatment efficacy against *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), a parasite of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Exp Appl Acarol* **29**:303–313 (2003).
- Martin SJ. Acaricide (pyrethroid) resistance in *Varroa destructor*. *Bee World* **85**:67–69 (2004).
- Higes M, Martín-Hernández R, Hernández-Rodríguez CS and González-Cabrera J. Assessing the resistance to acaricides in *Varroa destructor* from several Spanish locations. *Parasitol Res* **119**:3595–3601 (2020).
- Martel AC, Zegane S, Auréres G, Drajnadel P, Faucon JP and Aubert M. Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar® or Asutol® SD. *Apidologie* **38**: 534–544 (2007).
- Albero B, Miguel E and García-Valcárcel AI. Acaricide residues in beeswax. Implications in honey, brood and honeybee. *Environ Monit Assess* **195**:454 (2023).
- Kast C, Kilchenmann V and Charrière J-D. Long-term monitoring of lipophilic acaricide residues in commercial Swiss beeswax. *Pest Manag Sci* **77**:4026–4033 (2021).
- Gracia MJ, Moreno C, Ferrer M, Sanz A, Peribáñez MÁ and Estrada R. Field efficacy of acaricides against *Varroa destructor*. *PLoS One* **12**: e0171633 (2017).
- Lodesani M, Colombo M and Spreafico M. Ineffectiveness of Apistan® treatment against the mite *Varroa jacobsoni* Oud in several districts of Lombardy (Italy). *Apidologie* **26**:67–72 (1995).
- Smoldi Škerl M, Rivera-Gomis J, Tlak Gajger I, Bubiň J, Talakić G, Formato G *et al.* Efficacy and toxicity of VarroMed® used for controlling *Varroa destructor* infestation in different seasons and geographical areas. *Appl Sci* **11**:8564 (2021).
- Büchler R, Uzunov A, Kovačič M, Prešern J, Pietropoli M, Hatjina F *et al.* Summer brood interruption as integrated management strategy for effective *Varroa* control in Europe. *J Apic Res* **59**:764–773 (2020).
- Jack CJ and Ellis JD. Integrated pest management control of varroa destructor (Acari: Varroidae), the most damaging pest of (*Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)) colonies. *J Insect Sci* **21**:1–32 (2021).

- Ziegelmann B, Abele E, Hannus S, Beitzinger M, Berg S and Rosenkranz P. Lithium chloride effectively kills the honey bee parasite *Varroa destructor* by a systemic mode of action. *Sci Rep* **8**:683 (2018).
- Rosenkranz P, Aumeier B and Ziegelmann B. Biology and control of *Varroa destructor*. *J Invertebr Pathol* **103**:96–119 (2010).
- van der Steen J and Vejsnæs F. *Varroa* control: a brief overview of available methods. *Bee World* **98**:50–56 (2021).
- LeBoeuf AC. Trophallaxis. *Curr Biol* **27**:R1299–R1300 (2017).
- Craihheim K. Trophallactic interactions in the adult honeybee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* **29**:97–112 (1998).
- Rein C, Blumenschein M, Traynor K and Rosenkranz P. Lithium chloride treatments in free flying honey bee colonies: efficacy, brood survival, and within-colony distribution. *Parasitol Res* **123**:67 (2024).
- Kolics E, Spezzali A, Teller J, Mátyás KK and Kolics B. Lithium chloride outperformed oxalic acid sublimation in a preliminary experiment for *Varroa* mite control in pre-wintering honey bee colonies. *Acta Vet Hung* **68**:370–373 (2021).
- Štaniširović Z, Glavinic U, Jovanović NM, Ristić M, Milojković-Opsenica D, Mutić J *et al.* Preliminary trials on effects of lithium salts on *Varroa destructor* honey and wax matrices. *J Apic Res* **61**:375–391 (2022).
- Rein C, Makosch M, Benz J and Rosenkranz P. Lithium chloride leads to concentration dependent brood damages in honey bee hives (*Apis mellifera*) during control of the mite *Varroa destructor*. *Apidologie* **53**:1–14 (2022).
- Strachecka A, Kuszewska K, Olszewski K, Skowronek P, Grzybek M, Grabowski M *et al.* Activities of antimicrobial and proteolytic systems and biomarkers in the fat body and hemolymph of young *Apis mellifera* females. *Animals* **12**:1121 (2022).
- Kanost MR, Chapter 117 - Hemolymph. In *Encyclopedia of Insects*, ed. by Resh VH and Cardé RT. Amsterdam, Academic Press Elsevier, pp. 446–449 (2009).
- Terra WR and Ferreira C, Chapter 74 - digestive system. In *Encyclopedia of Insects*, ed. by Resh VH and Cardé RT. Amsterdam, Academic Press Elsevier, pp. 273–281 (2009).
- Böhme F, Bischoff G, Zebitz CPW, Rosenkranz P and Wallner K. From field to food – will pesticide-contaminated pollen diet lead to a contamination of royal jelly? *Apidologie* **49**:112–119 (2018).
- Wueppenhorst K, Eckert JH, Steinert M and Erler S. What about honey bee jelly? Pesticide residues in larval food jelly of the Western honey bee *Apis mellifera*. *Sci Total Environ* **8501**:58095 (2022).
- Dietemann V, Nazzi F, Martin SJ, Anderson DL, Locke B, Delaplane KS *et al.* Standard methods for varroa research. *J Apic Res* **52**:1–54 (2013).
- Williams GR, Alaux C, Costa C, Csáki T, Doublvet V, Eisenhardt D *et al.* Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. *J Apic Res* **52**:1–36 (2013).
- Deseyn J and Billen J. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie* **36**:49–57 (2005).
- Huang Z-Y, Otis GW and Teal PE. Nature of brood signal activating the protein synthesis of hypopharyngeal gland in honey bees, *Apis mellifera* (Apidae: Hymenoptera). *Apidologie* **20**:455–464 (1989).
- Kolics B, Kolics E, Mátyás K, Teller J and Spezzali A. Comparison of alternative application methods for anti-varroa lithium chloride treatments. *Insects* **13**:633 (2022).
- Sevin S, Bommaru V, Chen Y, Afrk O, Zarchin S, Barei S *et al.* Lithium salts: assessment of their chronic and acute toxicities to honey bees and their anti-Varroa field efficacy. *Pest Manag Sci* **78**:4507–4516 (2022).
- Hurst V, Stevenson PC and Wright GA. Toxins induce 'malaise' behaviour in the honeybee (*Apis mellifera*). *J Comp Physiol A* **200**:881–890 (2014).
- Ramsley SD, Ochoa R, Bauchan G, Gulbrunson C, Mowery JD, Cohen A *et al.* *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proc Natl Acad Sci USA* **116**:1792–1801 (2019).
- Pioui V, Vilarem C, Blanchard S, Strub JM, Bertile F, Bouquet M *et al.* Honey bee larval hemolymph as a source of key nutrients and proteins offers a promising medium for *Varroa destructor* artificial rearing. *Int J Mol Sci* **24**:12443 (2023).
- Han B, Wu J, Wei Q, Liu F, Cui L, Rueppell O *et al.* Life-history stage determines the diet of ectoparasitic mites on their honey bee hosts. *Nat Commun* **15**:225 (2024).
- Raes H, Jacobs F and Mastyn E. A preliminary qualitative and quantitative study of the microscopic structure of the dorsal fat body in adult

- honeybees (*Apis mellifera* L.), including a technique for preparation of whole sections. *Apidologie* **16**:275–290 (1985).
- 39 Bazin B, Kümmel G and Zerbst-Boroffka I, Untersuchungen an Rektalpolstern der Honigbiene *Apis mellifera* / Studies on the rectal pads of the honey bee *Apis mellifera*. *Z Naturforsch C* **31**:489–490 (1976).
- 40 Du Rand EE, Pirk CWV, Nicolson SW and Apostolides Z, The metabolic fate of nectar nicotine in worker honey bees. *J Insect Physiol* **98**:14–22 (2017).
- 41 Bailey L, The action of the proventriculus of the worker honeybee, *Apis mellifera* L. *J Exp Biol* **29**:310–327 (1952).
- 42 Farina P, Bedini S and Conti B, Multiple functions of Malpighian Tubules in insects: a review. *Insects* **13**:1001 (2022).
- 43 Jans K, Lüersen K and Rimbach G, *Drosophila melanogaster* as a model organism to study lithium and boron bioactivity. *Int J Mol Sci* **22**:11710 (2021).
- 44 Gong Y and Diao Q, Current knowledge of detoxification mechanisms of xenobiotics in honey bees. *Entomologia* **26**:1–12 (2017).
- 45 Haas J, Hayward A, Buer B, Malwold F, Nebelstok B, Glaubitz J et al., Phylogenomic and functional characterization of an evolutionary conserved cytochrome P450-based insecticide detoxification mechanism in bees. *Proc Natl Acad Sci U S A* **119**:e2205850119 (2022).
- 46 Kólcse E, Sajtos Z, Mátyás K, Szepesi K, Solti I, Németh G et al., Changes in lithium levels in bees and their products following anti-varroa treatment. *Insects* **12**:579 (2021).

3 Diskussion

3.1 Diskussion der verwendeten Methoden

Für die Beantwortung der Fragestellungen dieser Dissertation wurden sowohl Käfigversuche, als auch Freilandversuche an Kleinvölkern („Mini-Plus“) und Wirtschaftsvölkern durchgeführt. Dabei kamen standardisierte Methoden zum Einsatz, welche im internationalen „Coloss Beebook“ beschrieben sind (Dietemann et al. 2013; Human et al. 2013; Williams et al. 2013). Diese Literatur ermöglicht es Bienenforschern weltweit, Experimente nach denselben etablierten und validierten Methoden zu planen. Dadurch können reproduzierbare und valide Daten erhoben werden. Im Folgenden sollen kurz die verwendeten Methoden kritisch diskutiert und ggf. Verbesserungsvorschläge für weitere Experimente gemacht werden.

3.1.1 Käfigversuche

Die Käfigversuche dienten in erster Linie dazu, Versuche unter standardisierten Grundbedingungen durchzuführen. Hierzu gehörten eine definierte Anzahl an Bienen und Milben, welche in einen Käfig gesetzt und anschließend in einen Brutschrank mit konstanter Temperatur gestellt wurden. Es war auch möglich, die Konzentration und Dauer der LiCl-Fütterung einzustellen und je nach Experiment anzupassen. Auf diese Weise konnten die direkten Effekte auf die Varroamilben genau erfasst und klare Aussagen über den Wirkeintritt und die Wirkdauer von LiCl nach einer Fütterung an die Bienen getroffen werden. Ebenfalls konnten die Bienen aus den Käfigversuchen nach unterschiedlichen

Fütterungsperioden präpariert und analysiert werden, um Fragen zur Verteilung und zum Metabolismus von Lithium in der Biene zu beantworten.

Die in den Käfigversuch verwendeten Milben wurden mit der Puderzucker-Methode nach Diemann et al. (2013) aus stark befallenen Völkern gewonnen. Mit dieser Methode werden nur die auf den Bienen sitzenden Milben gewonnen, wodurch sich das Alter und der Status der Milben unterscheiden kann. Es kann zum Beispiel nicht differenziert werden, ob die Milbe gerade eine Biene parasitiert hat, frisch aus einer Brutzelle geschlüpft ist oder dabei war, einen neuen Reproduktionszyklus zu starten. Dadurch könnte sich folglich der Ernährungszustand der verwendeten Milben unterscheiden. Besonders in den Käfigversuchen, bei denen die Mortalität der Milben erfasst wurde, könnte dies dazu geführt haben, dass Milben, die kurz zuvor Nahrung aufgenommen hatten, erst später mit der Parasitierung an der Biene begonnen haben und somit die Aufnahme von Lithium und damit der Wirkeintritt verzögert wurde. Die Aufnahme des LiCl-Futters könnte sich auch bei den Bienen verzögert haben, welche direkt von einer Wabe aus dem Volk abgesammelt wurden und bei denen sich noch Futterreste in der Honigblase befanden. Um dies besser zu standardisieren und einheitliche Grundbedingungen zu schaffen, könnten die auf diese Weise gewonnenen Bienen und Milben nach dem Absammeln für eine kurze Zeit ohne Nahrung gehalten werden, um somit den Wirkeintritt von LiCl noch klarer zu definieren. Allerdings können sowohl Bienen als auch Milben nur wenige Stunden unbeschadet ohne Nahrung im Käfig gehalten werden, so dass eine absolute Standardisierung der Test-Organismen bei Käfigversuchen nicht möglich ist.

Aus diesem Grund wurden auch möglichst viele Wiederholungen pro Versuchsansatz durchgeführt. Eine weitere Erhöhung der Stichprobenanzahl ist zwar fast immer wünschenswert, jedoch war dies aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit der Ressourcen (Brutschränke) und der ebenfalls nur begrenzt verfügbaren Anzahl an Bienenvölkern mit hohem Varroabefall und der aufwendigen Puderzucker-Methode zur Gewinnung lebender Milben nur bedingt möglich. Zudem ist der Zeitraum, in dem größere Versuche mit einer großen Anzahl an Milben durchgeführt werden können, auf wenige Sommermonate beschränkt. Milben können erst ab Juli/August in ausreichender Anzahl aus den Bienenvölkern gewonnen werden, wenn der im Verlauf der Saison zunehmende Milbenbefall hoch genug ist, um ausreichend viele Milben in mit der o.a. Methode zu sammeln (Traynor et al. 2020).

3.1.2 Feldversuche

Die Brutprotokolle zur Beobachtung der Entwicklung der Bienenbrut während einer LiCl-Behandlung wurden in freifliegenden Kleinvölkern („Mini-Plus“) mit ca. 3.000 – 4.000 Bienen und einer Königin je Volk durchgeführt. Diese Kleinvölker haben den Vorteil, dass hier eine vergleichbare Populationsdynamik wie in großen Wirtschaftsvölkern besteht, sie jedoch einfacher in der Völkerführung sind und man mehr Völker pro Standort halten kann. Durch den geringeren Arbeitsaufwand konnte somit auch die Anzahl der Stichproben erhöht werden. Dadurch war es möglich, zum selben Zeitpunkt drei verschiedene LiCl-Konzentrationen und eine Kontrollgruppe ohne LiCl zu untersuchen. Die Kleinvölker ermöglichten darüber hinaus einen frühzeitigen Beginn der Experimente im Jahr, da diese bereits in den Frühjahrsmonaten

schnell wachsen. Ein grundsätzliches Problem beim Arbeiten mit Varroamilben ist die Tatsache, dass die Milbenpopulation in den Bienenvölkern zu Beginn der Bienenaison im Frühjahr noch sehr gering ist. Bis Mitte des Jahres nimmt zudem die Bienenpopulation schneller zu als die Milbenpopulation, so dass der relative Befall zunächst sogar abnimmt. Erst ab der Jahresmitte weisen die Bienenvölker durch Zunahme der Milbenpopulation bei gleichzeitig abnehmender Bienenpopulation Befallsraten auf, mit denen zum einen genügend Varroamilben gesammelt und zum anderen belastbare Wirksamkeitstests in Bienenvölkern durchgeführt werden können.

Für die Experimente zur Wirksamkeit und zur Bewertung verschiedener LiCl-Behandlungen unter realen Bedingungen waren freifliegende Wirtschaftsvölker mit 20.000 bis 30.000 Bienen und mit einer ausreichenden Anzahl an natürlicherweise in den Völkern vorkommenden Milben notwendig. Diese Völker wurden nach der in Hohenheim etablierten guten imkerlichen Praxis über das Jahr hinweg geführt, wobei sich nur die Art der Varroabekämpfung im Spätsommer zwischen den Gruppen unterschied. Es wurden verschiedene LiCl-Applikationen mit der im Behandlungskonzept Baden-Württemberg empfohlenen standardmäßigen Ameisensäurebehandlung verglichen (s. 1.2). Dadurch konnte die Effektivität, Nebenwirkung und Verteilung von LiCl unter realen Feldbedingungen untersucht und mit der üblicherweise praktizierten Behandlung mit Ameisensäure verglichen werden.

Allerdings lassen sich bei solchen Freilandexperimenten (sowohl mit Kleinvölkern als auch mit Wirtschaftsvölkern) nicht alle Parameter standardisieren. So können die Versuchsergebnisse sowohl durch äußere

Faktoren als auch durch bienenvolksspezifische Eigenschaften beeinflusst werden. Sich ändernde Witterungen während des Behandlungszeitraums können nicht nur die Legeleistung der Königin beeinträchtigen, sondern haben auch Auswirkungen auf das Brutpflegeverhalten der Ammenbienen und wirken sich somit auf die Mortalität der Larven aus (Abou-Shaara et al. 2017). Die in den Versuchen erfassten Ausräumraten der Brut lassen sich folglich nicht immer ausschließlich auf die LiCl-Behandlung zurückführen. Kontrollvölker am gleichen Standort sind daher zwingend notwendig, um den Einfluss solcher äußeren Faktoren zu quantifizieren. Allerdings können auch genetische Komponenten des volksspezifischen Hygieneverhaltens, welches ein Teil der sozialen Immunität ist (Cremer et al. 2007), oder der Umfang des Futtermaterials die Ausräumraten beeinflussen. Für weitere Versuche könnten die Völker zu Versuchsbeginn noch stärker standardisiert werden und z. B. eine definierte Anzahl an Bienen zusammen mit Geschwisterköniginnen auf neues Wabenmaterial mit identischen Futtermaterialien gesetzt werden. Es wäre hilfreich, in weiteren Versuchen den Brutentwicklungszyklus jedes Testvolkes zunächst ohne Einfluss von LiCl zu dokumentieren und erst anschließend mit der LiCl-Fütterung zu beginnen. Dadurch kann das volksspezifische Ausräumverhalten direkt mit dem Ausräumverhalten unter LiCl-Einfluss verglichen werden.

Allerdings lässt sich die Anzahl an Varroamilben in einem Wirtschaftsvolk nur schwer standardisieren. Daher wurde zu Beginn des Versuchs der natürliche Milbenfall der Völker erfasst und in niedrigen und hohen Milbenfall eingeteilt. Die Völker wurden anschließend den verschiedenen Behandlungsgruppen zugeteilt und es wurde darauf geachtet, dass sich sowohl Völker mit

niedrigem als auch hohem Befall in jeder Behandlungsgruppe befanden. Allerdings ist der natürliche Milbenfall nur eine Momentaufnahme und spiegelt nicht exakt die tatsächliche Anzahl an Milben in einem Volk wieder. Dies hatte zur Folge, dass sich die Völker hinsichtlich ihrer Milbenlast unterschieden, was aber auch unter imkerlichen Praxisbedingungen der Fall ist. In weiteren Versuchen könnte neben dem natürlichen Milbenfall auch der Bieneninfektionswert (= Anzahl Milben auf adulten Bienen) oder die Brutinfektionsrate (= Anzahl Milben in der Brut) hinzugezogen werden, um den tatsächlichen Befallsgrad der Versuchsvölker sicherer zu quantifizieren.

Um den Wirkungsgrad von LiCl zu berechnen, wurde bei allen Völkern eine Restentmilbung mit einem bereits zugelassenen synthetischen Akarizid durchgeführt. Damit sollten möglichst alle „Restmilben“, die nicht durch LiCl abgetötet wurden, erfasst werden. Die Anwendungszeit betrug sechs Wochen. Es ist nicht ausgeschlossen, dass in diesem Zeitraum trotz der Behandlung einige Restmilben in Brutzellen eindringen und sich dort reproduzieren. Dadurch könnte die Berechnung des Wirkungsgrades verfälscht werden, da die Nachkommen dieser Milben in die Berechnung mit einbezogen werden und im Endeffekt der Wirkungsgrad unterschätzt wird.

Ein weiteres Problem ist die durch Räuberei ausgelöste Reinvansion von Milben aus benachbarten Völkern (Frey et al. 2011; Frey und Rosenkranz 2014). Da sich in der Nähe der Versuchsvölker weitere Bienenvölker befanden und auch während des Versuchszeitraumes bearbeitet wurden, konnte Räuberei nicht vollständig vermieden werden. Dadurch könnten nachträglich während der Kontrollbehandlung weitere Milben ins Volk eingeschleppt worden sein.

Gerade bei niedrigen Gesamtmilbenzahlen kann diese Reinvation mit der anschließenden Vermehrung der Milben einen messbaren Effekt auf die Berechnung des Wirkungsgrades haben. Aber auch hier würden die tatsächlichen Wirkungsgrade durch die Reinvation eher unterschätzt werden. Da Bienen einen Aktionsradius von ca. 2 km um das Bienenvolk herum haben, lässt sich Räuberei in unserer Region mit einer hohen Honigbienendichte nicht vollständig vermeiden!

In den Richtlinien der EMA (2021), an denen sich der Zulassungsprozess für Varroabehandlungsmittel orientiert, wird ein Befall von 300 – 3.000 Varroamilben pro Volk vorgeschlagen. Dadurch soll eine valide Beurteilung der Wirkungsgrade in Bezug auf den Milbenbefall gewährleistet werden. In den hier dargestellten Versuchen von 2021 und 2022 wurde dies auch in den allermeisten Fällen erreicht. Diese Versuche waren auch noch nicht Teil eines Zulassungsverfahrens; Ziel der Feldversuche mit den Wirtschaftsvölkern war es, die Wirksamkeit verschiedener LiCl-Applikationen unter realen Feldbedingungen als Grundlage für das Zulassungsverfahren zu untersuchen. Dieses Ziel wurde mit den hier beschriebenen Methoden erreicht. Für klinische Studien im Rahmen eines Zulassungsverfahrens sollten die o.a. Vorkehrungen zur Standardisierung so umgesetzt werden, dass die geforderten Richtlinien in allen Details erfüllt werden.

3.2 Diskussion der Ergebnisse

3.2.1 Nebenwirkungen auf die Bienenbrut

Kurz nach der Entdeckung der varroaziden Wirkung von LiCl im Jahr 2018 wurden bereits erste Versuche zur Verträglichkeit der Bienenbrut unter Laborbedingungen durchgeführt. Während der künstlichen *in-vitro* Larvenaufzucht konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von LiCl zum Larvenfutter zu einer Erhöhung der Larvenmortalität führt. Ebenfalls reduzierte sich die Verpuppungsrate und schon bei einer Konzentration von 1 mM LiCl, das dem künstlichen Larvenfutter untergemischt wurde, zeigten nur 15% der Larven eine erfolgreiche Entwicklung bis hin zur Adulthäutung der Biene (Makosch 2018). Die künstliche Aufzucht hat gezeigt, dass Larven das Lithium nicht so gut vertragen wie adulte Bienen, bei welchen bislang keine negativen Auswirkungen bei Kurzzeitfütterungen gezeigt werden konnten (Ziegelmann et al. 2018; Sprau 2019). Allerdings wurde bei der Larvenaufzucht über den gesamten Entwicklungszeitraum hinweg LiCl verabreicht, ohne Berücksichtigung der stadienspezifischen Zusammensetzung des verabreichten Larvenfutters. Ebenfalls fehlte eine weitere entscheidende Komponente: die Dynamik des Bienenvolks und die damit verbundene Verarbeitung des applizierten LiCl-Futters durch die Ammenbienen bis zur Weitergabe an die Larven. Eine Applikation von LiCl im Volk könnte daher zu anderen Ergebnissen führen.

Im Bienenvolk übernehmen die Ammenbienen die Fütterung der Larven und passen die Zusammensetzung des Futters stadienspezifisch an das Alter der

Arbeiterinnenlarven an (Haydak 1970; Patel et al. 1960). In den ersten drei Larvenstadien L1-L3 erhält die junge Larve das reine Sekret aus der Futtersaftdrüse (Hypopharynxdrüse) der Ammenbienen, auch Gelée Royale genannt (Abb. 3). Etwa ab dem 6. Entwicklungstag, wenn die Arbeiterinnenlarve das 4. Stadium erreicht hat, wird das Sekret der Hypopharynxdrüse durch die Zugabe von Pollen und Nektar ergänzt. (Brouwers et al. 1987; Haydak 1943). Die Königin wird dagegen über ihre gesamte Lebensdauer, inklusive Larvalentwicklung, mit Gelée Royale gefüttert.

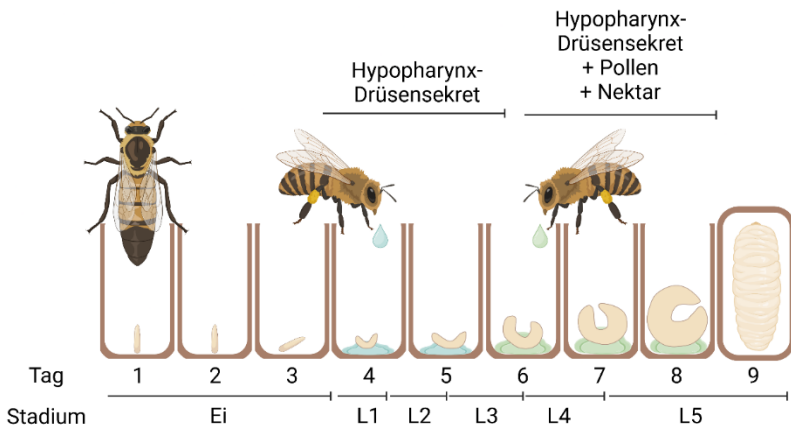


Abbildung 3: Entwicklung einer Arbeiterin mit stadienspezifischer Fütterung bis zur Verdeckelung der Zelle am neunten Tag. Nach dem Schlupf aus dem Ei am vierten Tag wird die Larve mit Hypopharynxdrüsensekret (Gelée Royale) der Ammenbienen gefüttert. Ab dem sechsten Tag und dem Erreichen des vierten Larvenstadiums (L4) wird das Futter umgestellt und durch eingelagerten Nektar und Pollen ergänzt. (Grafik wurde in biorender.com erstellt).

Dieser Arbeiterinnenfuttersaft wird nicht nur durch frisch eingetragenen Nektar ergänzt, auch bereits eingelagertes Futter aus den umliegenden Waben kann an die Larven verfüttert werden. Während einer LiCl-Behandlung lässt sich nicht ausschließen, dass zeitweise LiCl-haltiges Futter in die Waben eingelagert wird. Das LiCl-Futter kann dann von den Ammenbienen wieder aufgenommen, weiterverarbeitet und zur Larvenaufzucht verwendet werden und zu Schäden an den älteren Larven führen. Es war bislang aber fraglich ob überhaupt und wenn ja, welche LiCl-Konzentration hier weiterverfüttert wird. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde daher die Fragestellung **„Führt eine LiCl-Behandlung zu Schäden und Verlusten an der Bienenbrut und lassen sich diese Nebenwirkungen quantifizieren?“** untersucht. Dabei wurde auch ein besonderes Augenmerk auf die Auswirkungen auf unterschiedliche Larvenstadien gelegt.

Es konnte erstmals unter praxisnahen Freilandbedingungen 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 (**Veröffentlichung 1**). Während in der *in-vitro* Larvenaufzucht bereits Konzentrationen von 1 mM zu einer erhöhten Brutmortalität führten, zeigten sich bei der 10-fachen Konzentration im Volk noch keine signifikanten Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle und über 80% der Brut überlebte. Die höchste Konzentration von 25 mM LiCl – was die Mindestkonzentration für eine ausreichende varroazide Wirkung darstellt – führte dagegen zu sehr hohen Ausräumraten, wobei nur 39% der Larven den hier beobachteten Entwicklungszyklus bis Tag 16 überlebten.

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass auch das Larvenalter eine Rolle spielt. Das Überleben der Larven, die während ihrer gesamten Larvalentwicklung dem LiCl-Futter ausgesetzt waren (L1-L5), war im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. Wenn die LiCl-Applikation jedoch erst begann, als die Larven bereits das 5. Stadium erreicht hatten, unterschied sich die Mortalität nicht mehr signifikant von der unbehandelten Kontrolle (**Veröffentlichung 1**). Hier scheint die fortgeschrittene Entwicklung der Larven und die kurze Zeit bis zur Verdeckelung der Zelle dazu beigetragen zu haben, dass nur geringe Mengen LiCl zu den Larven gelangten und es dadurch kaum Schädigungen gab.

Um die durch LiCl verursachten Brutschäden zu vermeiden, wurde im Rahmen des Projekts beschlossen, zunächst ein Behandlungsverfahren für Völker ohne Brut zu entwickeln. Bei den in **Veröffentlichung 2** dargestellten Experimenten, wurde die Königin im Sommer für 3 Wochen in einen Käfig gesperrt, um sie an der Eiablage zu hindern und somit eine brutfreie Phase zu erzeugen. Mit dem Schlupf der letzten Bienenbrut am 21. Tag begann die Behandlung mit LiCl und die Königin wurde zeitgleich freigelassen. Da die Königin nach einer Brutpause erst nach 1-2 Tagen mit der Eiablage beginnt und die Eier sowie die jungen Larvenstadien theoretisch nicht mit LiCl-Futter in Kontakt kommen (Abb. 3), ergibt sich ein hypothetisches Zeitfenster von 7 Tagen. Während dieses Zeitfensters sollte eine LiCl-Behandlung ohne Schädigung der Bienenbrut möglich sein.

Bei der ersten getesteten LiCl-Behandlung mit 2,5 kg 50 mM LiCl-Teig dauerte die Behandlung allerdings 9 Tage, da sich die Futterabnahme aufgrund des extra Futtertrogs und einer kurzfristig eingetretenen Kälteperiode verzögerte.

Somit waren bereits ältere Larven im Volk vorhanden, während die Behandlung noch lief und LiCl-Futter im Volk zirkulierte. Dies resultierte in hohen Brutverlusten von über 95% (**Veröffentlichung 2**). Im Folgejahr wurde daher die Applikation optimiert und das LiCl-Futter direkt auf die Oberträger der Rähmchen gelegt, um die Futterabnahme zu erleichtern. Zudem wurde die Behandlung auf 5 Tage und 2 kg 50 mM LiCl Teig reduziert, um somit den möglichen Kontakt der Larven mit LiCl zu verhindern. Hierbei konnten die Brutverluste zwar reduziert, jedoch nicht komplett vermieden werden und es wurde eine Überlebensrate von 45% beim ersten Brutzyklus dokumentiert. Um Langzeiteffekte auszuschließen wurde ein zweiter Brutzyklus protokolliert, hierbei überlebten 82% der Brut, was den um diese Jahreszeit üblichen Brutüberlebensraten entspricht (Böhme et al. 2017).

Basierend auf den Ergebnissen aus **Veröffentlichung 1**, die zeigten, dass eine Verkürzung der Exposition der Larven mit LiCl auch die Schäden reduziert und um den Aufwand für das Auffinden und Sperren der Königin zu minimieren, wurde ein weiteres Behandlungsverfahren für Völker mit Brut untersucht. Bei der Behandlung mit wiederholten Kurzzeitfütterungen wurden nur kleine Mengen von 0,5 kg 50 mM LiCl-Teig im Abstand von sieben Tagen an die Völker verfüttert. So sollten die Larven immer nur für kurze Zeit von 24-48 Stunden dem LiCl ausgesetzt sein und durch die wiederholte Anwendung trotzdem auch diejenigen Milben erreicht und behandelt werden, die kontinuierlich mit den Jungbienen aus den verdeckelten Brutzellen schlüpfen. Leider konnten dadurch aber die Brutverluste nicht verhindert werden (52% Überlebensrate) und es zeigten sich länger anhaltende negative Effekte (8% Überlebensrate im 2. Brutzyklus, **Veröffentlichung 2**).

Die hypothetischen Zeitfenster von 7 Tagen in brutfreien Völkern und 1-2 Tagen in brütenden Völkern, in denen eine LiCl-Behandlung ohne Auswirkungen auf die Brut durchgeführt werden könnte, konnten unter Praxisbedingungen nicht bestätigt werden. Auch nach Ende der Behandlung, wenn das applizierte LiCl-Futter aufgebraucht ist, scheint das LiCl-Futter noch im Volk zu zirkulieren und kann somit an die Larven verfüttert werden. Dies kann auf den sozialen Futteraustausch durch Trophallaxis zurückgeführt werden (s.u.). Eventuell könnte bereits ein früherer Beginn der LiCl-Behandlung, z.B. 1 Woche vor dem Freilassen der Königin, helfen, den Kontakt des LiCl-Futters mit den Larven zu vermeiden.

Warum es zum Absterben der Larven bzw. Puppen kommt, ist noch nicht eindeutig geklärt. Neben einem direkten toxischen bzw. entwicklungshemmenden Effekt des Wirkstoffes könnten weitere mögliche Erklärungen sein, dass sich das Brutpflegeverhalten der Ammenbienen ändert oder komplett eingestellt wird, die Futtersaftdrüse verkümmert oder sich das Lithium in der Futtersaftdrüse anreichert, wodurch sich die Zusammensetzung des Hypopharynxdrüsensekrets verändert und die Larvenentwicklung beeinträchtigt wird. Da sich die meisten Larven bis Tag 8, also kurz vor der Verdeckelung der Zelle, entwickelt haben und wir Lithium in den Larven am 7. Tag der Entwicklung nachweisen konnten (**Veröffentlichung 1**), ist aber von einer weitgehend normalen Fütterung durch die Ammenbienen auszugehen. Wie in **Veröffentlichung 3** beschrieben, wurden in weiteren Versuchen auch die Futtersaftdrüsen der Ammenbienen aus LiCl-Völkern untersucht. Diese unterschieden sich optisch nicht von den Drüsen der Bienen aus Kontrollvölkern, wodurch eine Verkümmierung ausgeschlossen werden kann.

Anhand der quantitativen ICP-OES Analysen konnte allerdings ein minimaler Anstieg der Lithium-Konzentration in den Futtersaftdrüsen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Konzentrationen die in den L4-Larven (16,3 mg/kg) gefunden wurden, sind die Lithium-Konzentrationen in den Futtersaftdrüsen von Ammenbienen (0,52 mg/kg) aus LiCl-Völkern um mehrere 10er-Potenzen geringer und unterscheiden sich kaum von unbehandelten Kontrollvölkern, in denen vereinzelt auch Spuren von Lithium nachgewiesen werden konnten (**Veröffentlichung 3**). Dies ist wichtig, um eine klare Aussage darüber treffen zu können, ob das reine Hypopharynxdrüsensekret (Gelée Royale) tatsächlich nahezu frei von Lithium bleibt und somit die jungen Larven in den ersten 2-3 Larvenstadien als auch die Königin, die ausschließlich mit Gelée Royale gefüttert wird, keinem Lithium über das Futter ausgesetzt sind. Diese Annahme wird zum einen durch die Lithium-Analysen der verschiedenen Larvenstadien bestätigt, bei denen im Larvenstadium L2/L3 nur geringe Spuren von Lithium (0,59 mg/kg) nachgewiesen werden konnten. Zum anderen zeigen auch die Ergebnisse von Kolics et al. (2021a), dass in untersuchten Königinnen nach einer LiCl-Behandlung kein Lithium nachgewiesen werden konnte.

Die Ergebnisse und das bisherige Verständnis der Wirkungsweise von Lithium deuten eher darauf hin, dass Lithium bei den Honigbienen einen molekularen Mechanismus während der Entwicklung stört. Studien am Modellorganismus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zeigten bereits 1923, dass die Zugabe von Lithiumcarbonat zum Futter die Entwicklung der Fliegen verzögert (Mann 1923). Später untersuchte King (1953) die Toxizität verschiedener Salze, darunter LiCl, auf die Entwicklung von *D. melanogaster* und bestätigte die

entwicklungsverzögernde Wirkung. Er zeigte auch, dass bei einer Konzentration von 20 mM LiCl das Geschlechterverhältnis gestört war und deutlich mehr Männchen als Weibchen vorhanden waren (King 1953). Mittlerweile ist bekannt, dass Lithium die Aktivität der Kinase GSK-3 hemmt, die an wachstumsvermittelnden Prozessen beteiligt ist (Snitow et al. 2021). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass auch bei der Honigbiene das Vorhandensein von Lithium während der Larvalentwicklung zu einer Hemmung der Kinase und damit zur Beeinträchtigung der Entwicklung führt, wie bei *D. melanogaster* (Jans et al. 2021; King 1953; Klein und Melton 1996). Genexpressionsanalysen von Bienenlarven und Puppen, die während ihrer Entwicklung einer LiCl-Fütterung ausgesetzt waren, könnten dazu eine Antwort geben und sollten für weitere Forschungen in Betracht gezogen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Nebenwirkungen auf die Brut auch unter Feldbedingungen erheblich sind und für eine Zulassung bzw. die imkerliche Praxis derzeit nicht tolerabel sind. Aus diesem Grund empfiehlt es sich, ein Zulassungsverfahren zunächst ausschließlich für eine Applikation im brutfreien Bienenvolk in Erwägung zu ziehen. Es sollte darüber hinaus geprüft werden, ob es weitere Applikationsformen gibt, bei denen ein Kontakt der Brut mit dem Wirkstoff vermieden werden kann.

3.2.2 Wirksamkeit

Die zweite Forschungsfrage **„Wie schnell wirkt LiCl nach einer Applikation und wie kann eine praxistaugliche LiCl-Applikation in Völkern mit und**

ohne Brut aussehen, wenn die für eine Zulassung notwendigen Wirkungsgrade von über 95% erreicht werden sollen?“ wurde anhand von Käfigversuchen unter Laborbedingungen und in Freilandversuchen untersucht.

In den Käfigversuchen mit je einer Biene und einer darauf parasitierenden Milbe konnte der Eintritt der Wirkung von LiCl auf die Milbe in Bezug auf den Beginn der LiCl-Fütterung zeitlich exakt definiert werden: innerhalb von 12 Stunden starben bereits 38% der Milben und in den nächsten 12 Stunden starben weitere 40% (**Veröffentlichung 3**). Bei einer kontinuierlichen Fütterung konnten innerhalb von 48 Stunden 95% der Milben getötet werden. Ein vergleichbar rascher Wirkeintritt konnte auch unter Freilandbedingungen beobachtet werden. Hier stieg der Milbenfall aus den mit LiCl behandelten Völkern ebenfalls innerhalb eines Tages nach Start der Behandlung signifikant an, erreichte aber erst nach 5 Tagen das Maximum (**Veröffentlichung 2**). In diesen Feldversuchen konnte bestätigt werden, dass trotz der großen Anzahl von 20.000 bis 30.000 Bienen, die ein gutes Bienenvolk im August üblicherweise umfasst, das applizierte LiCl-Futter schnell aufgenommen, relativ gleichmäßig verteilt und auf die Milben übertragen wird. Eine durchschnittliche Milbenmortalität von > 95% konnte im Volk innerhalb von 48 Stunden jedoch nicht erreicht werden. Dies lässt sich durch den Verdünnungseffekt des applizierten LiCl-Futters aufgrund des ständigen Futteraustausches über Trophallaxis erklären. Die systemische Wirkungsweise des LiCl hat zwar den Vorteil, dass theoretisch alle parasitierenden Milben erreicht werden können, inklusive derjenigen, die sich zwischen den Tergiten der Bienen verstecken und somit vor anderen organischen

Behandlungsmitteln weitgehend geschützt sind. Diese 100 %-ige Verteilung konnte aber in der Praxis und mit den hier verwendeten Applikationsweisen des LiCl₂ noch nicht in allen Fällen erreicht werden, weil offenbar durch die Trophallaxis eine Komponente beteiligt ist, die im Vergleich zum Käfigversuch die Wirkungsdynamik im Volk verändert (s. u.).

Im Zulassungsverfahren eines neuen Tierarzneimittels müssen Wirkungsgrade von mindestens 90% erzielt werden und es muss ein genaues Behandlungsverfahren angegeben werden (EMA 2021). Im Rahmen der Dissertation wurden verschiedene Applikationsformen getestet, um zu evaluieren, welche Applikationsform im Volk praktikabel und effektiv ist. Aufgrund der schädigenden Wirkung von LiCl auf die Bienenbrut (s. o.) erschien es sinnvoll, sich zunächst auf eine Applikation im brutfreien Bienenvolk zu konzentrieren. Dafür 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 es den weiteren 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 der in **Veröffentlichung 2** getesteten Applikationsvarianten konnten Milbenmortalitäten von durchschnittlich 78 – 98% erzielt werden. Die beste Wirkung erzielte dabei die 9-tägige Behandlung brutfreier Völker mit 2,5 kg 50 mM LiCl₂-Teig, 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 (s.o.).

Daher wurden im folgenden Jahr zwei weitere Ansätze untersucht. In einem Ansatz wurde die Behandlungsdauer auf fünf Tage und die Dosis auf 2 kg 50 mM LiCl-Teig 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% (**Veröffentlichung 2**). Es ist aber zu beachten, dass die Gesamtmilbenzahl in diesem Jahr mit durchschnittlich 456 Milben pro Volk deutlich geringer war als im Vorjahr, in dem durchschnittlich 2.129 Milben pro Volk abgetötet wurden. Dadurch könnte wie in 3.1.2 beschrieben die Reinvasion von Milben während der Restentmilbung einen stärkeren Effekt auf die Berechnung des Wirkungsgrades gehabt haben.

Im zweiten Ansatz wurden Völker mit Brut durch eine wiederholte Kurzzeitfütterung von viermal 0,5 kg 50 mM LiCl-Teig im Abstand von sieben Tagen behandelt. Dabei wurden höhere Milbenmortalitäten von durchschnittlich 88% erzielt. Anhand des im 2-tägigen Abstand erfassten Milbenfalls war außerdem zu erkennen, dass über den gesamten Behandlungszeitraum von insgesamt 28 Tagen Milben starben und sich der Behandlungserfolg im Wesentlichen erst nach der vierten LiCl-Applikation einstellte. Im Vergleich zu den Behandlungen in brutfreien Völkern dauert es mit dieser Applikation in Völkern mit Brut also weitaus länger, um einen zufriedenstellenden Behandlungserfolg zu erzielen. Dies liegt vor allem daran, dass sich die Milben in den Behandlungspausen immer wieder in der Brut vermehren und während dieser Reproduktionsphase auch vor der Behandlung geschützt sind. Trotzdem liegt der erreichte Wirkungsgrad von 88% nahe an den im Zulassungsverfahren geforderten 90% und es dürfte mit wenigen

Optimierungen möglich sein, diesen Wirkungsgrad innerhalb eines Zulassungsverfahrens zu erreichen.

Nicht nur der Wirkeintritt, sondern auch die Wirkdauer des applizierten LiCl-Futters sind essentiell für die Entwicklung der besten Applikation. So können Erkenntnisse zur Wirkdauer dabei helfen, die Dauer einer LiCl-Fütterung zu optimieren. In weiteren Käfigversuchen wurde daher untersucht, wie lange die Wirkung von LiCl auf die Milben anhält, nachdem das Futter der Bienen von LiCl-haltig auf LiCl-freien Sirup umgestellt wurde (**Veröffentlichung 3**). Die Ergebnisse zeigten, dass die toxische Wirkung nach Futterumstellung rasch nachließ. Bereits eine Pause von 24 Stunden zwischen der letzten LiCl-Fütterung und dem Einbringen der Milben auf die im Käfig befindlichen Bienen reduzierte die Milbenmortalität, wohingegen Milben, die direkt auf die Bienen gesetzt wurden innerhalb von einem Tag tot waren (**Veröffentlichung 3**). Das bedeutet entweder, dass die Biene das Lithium schnell verstoffwechselt und ausscheidet oder, dass die Lithium-Konzentration in der Biene durch das Fressen von LiCl-freien Sirup verdünnt wird und somit nicht mehr ausreicht, um die Milbe direkt zu töten.

Weitere wissenschaftliche Studien beweisen, dass LiCl auch auf andere Milben wie die rote Vogelmilbe *Dermanyssus gallinae* (Kolics et al. 2022b) oder die gemeine Spinnmilbe *Tetranychus urticae* (Solti et al. 2022) tödlich wirkt und unter Laborbedingungen sogar Zecken (*Dermacentor reticulatus*) tötet (Kolics et al. 2023). Die Einsatzmöglichkeit von Lithium gegen Parasiten und anderen Schädlingen scheint demnach weitaus größer zu sein, als zu Beginn erwartet.

Festzuhalten bleibt, dass Lithium ein enormes akarizides Potential hat und bei Einzelfütterung von Bienen im Käfig innerhalb von 2-3 Tagen eine fast hundertprozentige Wirkung erreicht werden könnte. Auf Bienenvolkebene konnten diese hohen Mortalitäten nicht in derselben Zeitspanne erreicht werden. Dies ist vermutlich auf die Trophallaxis zurückzuführen, welche zu einer Verdünnung der Lithium-Konzentration in der Biene führen könnte. Es ist wichtig zu beachten, dass die Trophallaxis zwingend notwendig ist, um das LiCl-Futter im ganzen Volk zu verteilen und damit möglichst alle Milben zu erreichen. Aus den Experimenten zum Wirkeintritt und zur Wirkdauer lässt sich für die Freilandversuche daher folgendes schließen: Das Lithium sollte nach einer LiCl-Applikation möglichst schnell im gesamten Volk verteilt werden aber auch ausreichend lange im Volk zirkulieren, um in der Biene eine für Milben tödliche Konzentration zu erreichen. Diese Konzentration sollte ca. 48 Stunden anhalten, um eine Milbenmortalität von über 95% zu erreichen (**Veröffentlichung 3**). Weitere Versuche sollten sich darauf konzentrieren, wie eine Optimierung der Verteilung des applizierten Lithiums im Bienenvolk erreicht werden kann. Erfolgsversprechende Ansatzmöglichkeiten hierfür könnten Veränderungen bei der Zuckerkonzentration oder Zusätze zum Futter bieten (Farina und Núñez 1995; Tezze und Farina 1999), jeweils mit dem Ziel, das applizierte Lithium länger im Futterkreislauf der Bienen zu halten. Dies dürfte die größte Chance bieten, den Wirkungsgrad der Behandlung weiter zu erhöhen ohne Zunahme der Brutschäden.

3.2.3 Verteilung von Lithium

Die dritte Forschungsfrage lautet: „**Wie verteilt sich Lithium nach einer Applikation von LiCl im Körper der Biene und innerhalb eines Volkes?**“. Hiermit soll die Dynamik des Wirkstoffs sowohl im Bienenkörper als auch im Bienenvolk verstanden und diejenige Konzentration in der Biene bestimmt werden, die erforderlich ist, um eine Milbe zu töten. Zur Beantwortung wurden Analysen mittels optischer Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) an der Core Facility der Universität Hohenheim durchgeführt. Es wurde ausschließlich die Konzentration von Lithium bestimmt, da dieses ausschlaggebend für die toxische Wirkung auf die Milben ist, wohingegen das Chlorid-Anion nicht zur Milbenmortalität beiträgt (Ziegelmann et al. 2018).

Eine gute Wirksamkeit von LiCl wird nur erzielt, wenn der Wirkstoff gleichmäßig im Volk verteilt wird und somit auf alle Milben wirken kann (siehe 3.2.2). Es war bisher unklar, in welchem Umfang und in welchem Zeitrahmen das im Futter enthaltene Lithium durch die Trophallaxis weitergegeben wird und ob tatsächlich alle Bienen eines Volkes in diesem sozialen Futteraustausch eingebunden sind. 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. Somit konnten zunächst einmal der Konsum und die Weitergabe des LiCl-Futters durch die Bienen unter Praxisbedingungen bestätigt werden (**Veröffentlichung 2**). 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 Lithium-Konzentration 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. o). Entscheidend für die Wirksamkeit gegen Milben ist jedoch nicht die Konzentration in der Honigblase, sondern die Konzentration in der Hämolymphe der Bienen, von der sich die Milben ernähren (Han et al. 2024; Ramsey et al. 2019).

Um den Weg des Lithiums in der individuellen Biene nachzuvollziehen, wurden erneut Käfigversuche durchgeführt und die Lithium-Konzentrationen in der Hämolymphe und der Kotblase nach unterschiedlichen Fütterungsperioden bestimmt. Trotz kontinuierlicher Fütterung der Bienen mit 50 mM LiCl erreichte die Lithium-Konzentration in der Bienen-Hämolymphe bereits nach 12 Stunden ein Gleichgewicht von 5 – 8 mg/kg

(Veröffentlichung 3). Da dies die maximale Konzentration im für die Milbe relevanten Bienenkompartiment ist, kann man diesen Wert auch als letale Konzentration für die Milbe annehmen. Zusammen mit den Experimenten zum Wirkeintritt, die zeigen, dass bereits eine 12-stündige Fütterung zum Tod der Milben führen kann (**Veröffentlichung 3**), lässt sich die Annahme bestätigen, dass diese Konzentration in der Biene ausreicht, um die Milben in kurzer Zeit zu töten.

Die Analysen der Kotblase der Bienen hingegen zeigen, dass die Lithium-Konzentration mit zunehmender Fütterungsdauer weiter ansteigt und die höchste Konzentration von 475 mg/kg am siebten Tag erreicht wird (**Veröffentlichung 3**). Da gekäfigte Bienen nicht abkoten können, reichert sich das Lithium in diesem Fall in der Kotblase an. Bei frei fliegenden Bienen würde die Kotblase aber regelmäßig entleert werden und das Lithium somit über den Kot ausgeschieden werden. Dies bedeutet, dass die Bienen das Lithium schnell verstoffwechseln und ausscheiden, wodurch es sich nicht dauerhaft im Körper der Biene anreichert.

Die Anforderungen für die Zulassung von Tierarzneimitteln für „Lebensmittel produzierende Nutztiere“ sind besonders hoch. Da die Honigbiene als Nutztier gilt und Bienenprodukte für den menschlichen Verzehr bestimmt sind, müssen bei der Verwendung von LiCl zur Behandlung der Varroamilben weitere Aspekte beachtet werden. So spielen z. B. Rückstände in Wachs und Honig im Zulassungsprozess eine wichtige Rolle, weshalb das Risiko von möglichen Rückständen nach einer LiCl-Behandlung frühzeitig untersucht werden sollte. In Studien anderer Forschergruppen konnte bisher keine erhöhte Lithium-

Konzentration im Wachs nachgewiesen werden. Dies ist auch durch die hygroskopischen Eigenschaften des Salzes erklärbar (Kolics et al. 2021a; Punwani et al. 1968). Allerdings wurde in Futterproben direkt nach der Behandlung Lithium nachgewiesen. Der Gehalt war dabei abhängig von der verwendeten Konzentration, Applikation und Behandlungsdauer (Kolics et al. 2021a; Prešern et al. 2020; Stanimirovic et al. 2022). Es war bislang unklar, ob sich dies auch im geernteten Honig des Folgejahres bemerkbar macht, nachdem frischer Nektar eingetragen wurde. In der vorliegenden Dissertation wurde daher auch die Frage untersucht: **„Kommt es nach einer LiCl-Behandlung im Wirtschaftsvolk zu Rückständen im Honig des Folgejahres?“**.

Die analysierten Futterproben, die während der Behandlung aus den Futterwaben entnommen wurden, wiesen bereits deutlich geringere Lithium-Konzentrationen auf als die Honigblasen der untersuchten Bienenproben. In den Futterproben konnte nur ein Fünftel der Konzentration (ca. 20 mg/kg), die in den Honigblasen gemessen wurden, nachgewiesen werden (**Veröffentlichung 2**). Aus den Erkenntnissen zum Metabolismus des Lithiums in Bienen von **Veröffentlichung 3** lässt sich schlussfolgern, dass der Großteil des applizierten LiCl-Futters von den Bienen verstoffwechselt, ausgeschieden und nur ein Bruchteil davon in den Waben eingelagert wird. Dieses eingelagerte Futter wird vermutlich weiterverarbeitet und mit Winterfutter verdünnt, da in den Futterproben des darauffolgenden Jahres – ca. 8 Monate nach der LiCl-Applikation – nur noch eine Konzentration von 3,1 – 5,4 mg/kg Lithium nachgewiesen werden konnte. Entscheiden ist jedoch, ob sich diese Rückstände auch im eingetragenen Nektar oder anschließend geernteten

Honig nachweisen lassen. Der im Rahmen der Dissertation beprobte Frühjahrshonig aus Völkern, die im Herbst des Vorjahres mit 50 mM LiCl behandelt wurden, wies lediglich Konzentrationen von 0,1 – 0,2 mg/kg Lithium auf (**Veröffentlichung 2**). Diese Werte liegen unterhalb der natürlich vorkommenden Gehalte im Honig von teilweise bis zu 15,6 mg/kg Lithium und sollten somit kein Problem für einen Zulassungsprozess darstellen (Abdulkhaliq und Swaileh 2017; Bogdanov et al. 2008; Conti et al. 2018).

4 Fazit und Ausblick

Im Rahmen der Dissertation 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. Damit konnten die in der Einleitung formulierten Ziele vollständig erreicht werden.

LiCl besitzt ein enormes akarizides Potential und tötet bei Aufnahme von wenigen Milligramm Lithium pro Honigbiene parasitierende Varroamilben innerhalb von Stunden bis wenigen Tagen zuverlässig ab (Manuskript 3), ohne dabei die adulten Bienen signifikant zu beeinträchtigen. Unter Feldbedingungen ist jedoch die schnelle und vollständige Verteilung des applizierten Wirkstoffs im Bienenvolk durch Trophallaxis entscheidend für die Wirksamkeit (Rein et al. 2024). Um Wirkungsgrade von 90 – 95 % zu erreichen, besteht hier noch Optimierungsbedarf. Der Wirkstoff müsste länger im Volk zirkulieren, um über einen längeren Zeitraum eine für Milben tödliche Konzentration in allen Bienen des Volkes zu erreichen. Die in den getesteten Applikationen erstmals erfassten Rückstandsmessungen im Honig lassen hingegen keine Probleme für eine Zulassung erwarten, zumal Lithium auch ein natürlicher Bestandteil verschiedener Honige ist. Allerdings beschränkt die sehr geringe Toleranz der Bienenbrut gegenüber dem Wirkstoff (Rein et al. 2022) die Anwendung von Lithium derzeit auf brutfreie Völker. Für brütende

Völker müssen alternative Behandlungsmöglichkeiten entwickelt werden, die den Kontakt der Brut mit dem Wirkstoff vermeiden.

Für die Imkerei würde ein Bekämpfungsmittel auf Lithiumbasis eine effektive, zuverlässige und vor allem einfach anzuwendende Methode zur Behandlung der Varroamilbe darstellen. Die Unabhängigkeit der Wirkungsweise von äußeren Faktoren erhöht zudem die Planbarkeit der Behandlung und damit die Flexibilität der Imker. Die Kombination einer brutfreien Phase (hier durch Sperren der Königin) mit der Varroabehandlung ist eine zunehmend empfohlene Strategie zur nachhaltigen Kontrolle der Varroamilbe (Büchler et al. 2020; Jack und Ellis 2021). Die Behandlung mit LiCl-Futter lässt sich dabei problemlos und ohne Mehraufwand in die normale Betriebsweise der Imkerei und der sowieso anstehenden Herbstfütterung integrieren. Diese Faktoren sind ein Alleinstellungsmerkmal im Vergleich zu allen anderen derzeit verfügbaren Akariziden.

Für ein mögliches Zulassungsverfahren stehen mit den vorliegenden Ergebnissen umfangreiche Basisdaten zur Verfügung. Diese können genutzt werden, um die hier vorgestellten Behandlungsverfahren zu optimieren und dann in klinischen Studien zu testen. Die für das Zulassungsverfahren vom Projektpartner gegründete Firma „Varolis GmbH“ kann die Datengrundlage zudem nutzen, um Investoren zu überzeugen und den Zulassungsprozess zu finanzieren. Der Finanzbedarf für eine Zulassung wird dabei auf ca. 3 Millionen € geschätzt.

Eine solche Finanzierung vorausgesetzt, könnte in wenigen Jahren ein neues Präparat zur Behandlung der Varroamilbe in der Imkerei zur Verfügung

stehen! Die neuartige systemische Wirkungsweise von Lithium würde die Bekämpfung der ektoparasitischen Milbe erleichtern und könnte die periodisch auftretenden Winterverluste von Bienenvölkern deutlich reduzieren.

5 Zusammenfassung

Honigbienen sind unverzichtbare Bestäuber sowohl für unser Ökosystem als auch für die Landwirtschaft. Die weltweit verbreitete ektoparasitische Milbe *Varroa destructor* stellt seit Jahrzehnten das größte Problem für Honigbienen und die Imkerei dar und gilt zweifellos als Hauptverursacher der periodischen Völkerverluste (Genersch et al. 2010; Le Conte et al. 2010). Derzeit gibt es kein zufriedenstellendes Behandlungsverfahren, das alle Anforderungen der Imker erfüllt. Im Jahr 2018 wurde mit Lithiumchlorid (LiCl) ein neuer Wirkstoff mit varroazider Wirkung entdeckt, welcher eine sehr gute Wirksamkeit auf Varroamilben mit einer guten Verträglichkeit für adulte Bienen verbindet (Ziegelmann et al. 2018). Aufgrund der systemischen Wirkungsweise kann er zudem sehr einfach angewendet werden und bietet dadurch großes Potential für eine effektive Varroabehandlung. Im Rahmen der Dissertation wurden verschiedene Applikationsformen von LiCl zur Behandlung von Bienenvölkern getestet und Daten zur Wirksamkeit, Nebenwirkung und Verteilung des Wirkstoffes erhoben. Die gesammelten Daten sollen dazu dienen, eine fundierte Bewertung der Chancen und Risiken für ein Zulassungsverfahren zu ermöglichen und erfolgsversprechende Strategien für die Zulassung zu entwickeln. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Feld- und Laborexperimente durchgeführt.

Unter praxisnahen Freilandbedingungen führt die Applikation von LiCl zu konzentrationsabhängigen Schäden und hohen Ausräumraten der Bienenbrut. Diese Brutschäden sind von der Dauer der Fütterung und dem Larvenalter abhängig (Rein et al. 2022). Bei einer Fütterung von 25 mM LiCl überleben nur

knapp 40% der Bienenbrut. Analysen der Lithium-Konzentration verschiedener Larvenstadien zeigen, dass in zwei Tage alten Larven noch kein Lithium nachgewiesen werden kann. 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 (Rein et al. 2024). 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 (Rein et al. 2022). Dies ist auf die stadienspezifische Futterumstellung von reinem Futtersaft auf gemischtes Larvenfutter zurückzuführen. Hierbei wird auch eingelagertes Futter aus den umliegenden Waben beigemischt, wodurch auch zuvor eingelagertes Lithium weitergegeben werden kann.

Aufgrund der schädigenden Wirkung von LiCl auf die Bienenbrut wurde eine Applikation für brutfreie Völker entwickelt und die Wirksamkeit unter Feldbedingungen getestet. Die Kombination einer brutfreien Phase durch Sperren der Königin mit der LiCl-Behandlung erzielte durchschnittliche Wirkungsgrade von 78 – 98% (Rein et al. 2024). Die höchsten Wirkungsgrade wurden erst bei einer Fütterungsdauer von > 5 Tagen erreicht, was zu Schäden bei der neu angelegten Brut nach der Brutpause führte. In Käfigversuchen, in denen jeweils eine Biene mit einer parasitierenden Milbe mit LiCl gefüttert wurde, konnten dagegen bereits nach 48 Stunden Milbenmortalitäten von über 95% erreicht werden (Rein et al. 2024). Offenbar verzögerte sich im Volk der Wirkungseintritt aufgrund des sozialen Futteraustauschs (Trophallaxis) und einem damit verbundenen Verdünnungseffekt des Wirkstoffs. Jedoch ist dieser Futteraustausch

notwendig, um den Wirkstoff gleichmäßig im Volk zu verteilen und alle Milben zu erreichen. Es besteht daher weiterer Optimierungsbedarf, um die für die Zulassung notwendigen Wirkungsgrade von über 90% zu erreichen, ohne die Bienenbrut zu schädigen.

Anhand von quantitativen Lithium-Analysen über ICP-OES konnte bestätigt werden, dass der Wirkstoff im Volk gleichmäßig verteilt wird. 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 (Rein et al. 2024). 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 (Rein et al. 2024). Das Lithium sollte daher nach einer LiCl-Applikation möglichst schnell im gesamten Volk verteilt werden und ausreichend lange im Volk zirkulieren, 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 im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführten Versuche bieten eine umfangreiche Basis für die Entwicklung einer zulassungsrelevanten Applikation. Es konnte gezeigt werden, dass Lithium eine hohe akarizide Wirkung besitzt und lediglich noch einige Optimierungen notwendig sind, um eine bessere Verteilung des Wirkstoffes und damit stabile Wirkungsgrade von über 90% bei brutfreien Völkern zu erreichen. Für brütende Völker müssen jedoch alternative Behandlungsmöglichkeiten entwickelt werden, um den Kontakt der Brut mit dem Wirkstoff zu vermeiden.

6 Summary

Honey bees are essential pollinators for our ecosystems as well as for our agricultural crops. The ectoparasite, *Varroa destructor*, continues to be the leading cause of colony losses worldwide (Genersch et al. 2010; Le Conte et al. 2010). Currently there are no perfect treatment options against this parasite. In 2018, Lithium Chloride (LiCl) was shown to have varroacidal effects, combining a high efficacy against the mite with a high tolerability by adult bees. Due to its systemic mode of action, it can be easily applied and thus offers excellent potential as a highly effective varroacide.

In this dissertation, different application methods for treating honey bee colonies with LiCl were investigated and data on the efficacy, side effects, and the distribution of the active agent in colonies were collected. The collected data should suffice for a well-grounded assessment of the opportunities and risks of registering this new miticide. We provide promising strategies for potential treatment methods aimed at eventual registration. In support of registration, numerous field and laboratory experiments were conducted.

Under field relevant conditions, the application of LiCl can lead to concentration dependent damage of developing larvae and high brood cannibalization. These brood losses are due to the length of treatment application and influenced by larval age (Rein et al. 2022). When colonies were fed 25 mM LiCl, approximately 40% of the brood survived. Analysis of the lithium concentration of different larval stages showed that lithium did not accumulate in the first two instars. Analysis of hypopharyngeal glands, which

nurse bees use to feed both the queen and young larvae, were almost entirely free of lithium residues (Rein et al. 2024). Thus LiCl applications pose no risk to the queen or young larvae. In older larval instars, the lithium concentration increased significantly. This can be explained through the switch from pure brood food in early larval development to a mixture with carbohydrates at later stages of larval development. As the nurse bees mix stored nectar into the brood food, residues from the lithium treatment stored near the brood nest can be incorporated into the food of the developing offspring.

Due to the damaging effect on brood, we developed a treatment method for broodless colonies to test its efficacy in the field. The combination of a broodless period, achieved through queen caging, with a LiCl treatment resulted in a mean efficacy of 78 – 98% (Rein et al. 2024). The highest efficacies were achieved with feeding durations of > 5 days, which unfortunately led to brood loss in the newly laid brood post caging. In cage trials where individual bees infested with individual mites were fed LiCl, we achieved over 95% mite mortality within 48 hours (Rein et al. 2024). This effectiveness is apparently delayed in a colony due to the social food exchange between bees known as trophallaxis and the thus ensuing dilution of lithium. Yet this food exchange is needed to evenly spread the treatment throughout the colony and treat all mites. We thus need to further optimize the treatment method to reach the needed efficacy of 90% without producing damaging effects on the brood.

Based on ICP-OES quantitative lithium analysis, we could confirm that the lithium is evenly distributed in a colony. Within one day of LiCl application we

found on average 93 mg/kg in the honey stomachs of bees, regardless of their position in the colony (Rein et al. 2024). Analysis of the bees' hemolymph showed that within 12 hours of feeding bees in cages, we reached an equilibrium of 5 – 8 mg/kg of lithium, which results in the death of mites (Rein et al. 2024). The lithium must therefore be distributed throughout the colony as quickly as possible after a LiCl application and circulate in the colony for sufficient duration to achieve a concentration in the bees that are lethal to mites. This concentration must be maintained for about 48 hours in order to achieve a mite mortality rate of over 95%.

The experiments conducted as part of this dissertation offer a solid foundation of data for the development of a treatment registration. We could show that lithium has a high acaricidal effect. Only minor optimizations are needed to achieve a better distribution of the active ingredient, resulting in a stable treatment efficacy of over 90% in broodless colonies. To minimize the contact of the brood with lithium, different treatment strategies must be developed for colonies with brood.

7 Literaturverzeichnis

Abdulhaliq, Ahed; Swaileh, Khalid M. (2017): Physico-chemical properties of multi-floral honey from the West Bank, Palestine. In: *International Journal of Food Properties* 20 (2), S. 447–454. DOI: 10.1080/10942912.2016.1166128.

Abou-Shaara, H. F.; Owayss, A. A.; Ibrahim, Y. Y.; Basuny, N. K. (2017): A review of impacts of temperature and relative humidity on various activities of honey bees. In: *Insect. Soc.* 64 (4), S. 455–463. DOI: 10.1007/s00040-017-0573-8.

Albero, Beatriz; Miguel, Esther; García-Valcárcel, Ana I. (2023): Acaricide residues in beeswax. Implications in honey, brood and honeybee. In: *Environ Monit Assess* 195 (4), S. 454. DOI: 10.1007/s10661-023-11047-6.

Aral, Hal; Vecchio-Sadus, Angelica (2008): Toxicity of lithium to humans and the environment—a literature review. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70 (3), S. 349–356. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2008.02.026.

Bogdanov, S.; Kilchenmann, V.; Imdorf, A. (1998): Acaricide residues in some bee products. In: *Journal of Apicultural Research* 37 (2), S. 57–67. DOI: 10.1080/00218839.1998.11100956.

Bogdanov, Stefan (2006): Contaminants of bee products. In: *Apidologie* 37 (1), S. 1–18. DOI: 10.1051/apido:2005043.

Bogdanov, Stefan; Jurendic, Tomislav; Sieber, Robert; Gallmann, Peter (2008): Honey for nutrition and health: a review. In: *Journal of the American College of Nutrition* 27 (6), S. 677–689. DOI: 10.1080/07315724.2008.10719745.

Böhme, Franziska; Bischoff, Gabriela; Zebitz, Claus P. W.; Rosenkranz, Peter; Wallner, Klaus (2017): Chronic exposure of honeybees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), to a pesticide mixture in realistic field exposure rates. In: *Apidologie* 48 (3), S. 353–363. DOI: 10.1007/s13592-016-0479-x.

Bowen-Walker, Peter L.; Gunn, Alan (2001): The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. In: *Entomologia*

Experimentalis et Applicata 101 (3), S. 207–217. DOI: 10.1046/j.1570-7458.2001.00905.x.

Brouwers, E. V. M.; Ebert, R.; Beetsma, J. (1987): Behavioural and Physiological Aspects of Nurse Bees in Relation to the Composition of Larval Food During Caste Differentiation in the Honeybee. In: *Journal of Apicultural Research* 26 (1), S. 11–23. DOI: 10.1080/00218839.1987.11100729.

Büchler, Ralph; Berg, Stefan; Le Conte, Yves (2010): Breeding for resistance to *Varroa destructor* in Europe. In: *Apidologie* 41 (3), S. 393–408. DOI: 10.1051/apido/2010011.

Büchler, Ralph; Uzunov, Aleksandar; Kovačić, Marin; Prešern, Janez; Pietropaoli, Marco; Hatjina, Fani et al. (2020): Summer brood interruption as integrated management strategy for effective *Varroa* control in Europe. In: *Journal of Apicultural Research* 59 (5), S. 764–773. DOI: 10.1080/00218839.2020.1793278.

Cade, John F. J. (1949): LITHIUM SALTS IN THE TREATMENT OF PSYCHOTIC EXCITEMENT. In: *Medical Journal of Australia* 2 (10), S. 349–352. DOI: 10.5694/j.1326-5377.1949.tb36912.x.

Conti, Marcelo Enrique; Canepari, Silvia; Finoia, Maria Grazia; Mele, Giustino; Astolfi, Maria Luisa (2018): Characterization of Italian multifloral honeys on the basis of their mineral content and some typical quality parameters. In: *Journal of Food Composition and Analysis* 74, S. 102–113. DOI: 10.1016/j.jfca.2018.09.002.

Cremer, Sylvia; Armitage, Sophie A. O.; Schmid-Hempel, Paul (2007): Social immunity. In: *Current Biology* 17 (16), R693–702. DOI: 10.1016/j.cub.2007.06.008.

Dainat, Benjamin; Evans, Jay D.; Chen, Yan Ping; Gauthier, Laurent; Neumann, Peter (2012): Dead or alive: deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees. In: *Applied and environmental microbiology* 78 (4), S. 981–987. DOI: 10.1128/AEM.06537-11.

Dietemann, Vincent; Nazzi, Francesco; Martin, Stephen J.; Anderson, Denis L.; Locke, Barbara; Delaplane, Keith S. et al. (2013): Standard methods for varroa research. In: *Journal of Apicultural Research* 52 (1), S. 1–54. DOI: 10.3896/IBRA.1.52.1.09.

EMA (2021): Guideline on veterinary medicinal products controlling *Varroa destructor* parasitosis in bees (EMA/CVMP/ EWP/459883/2008-Rev.1* Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). Online verfügbar unter https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-veterinary-medicinal-products-controlling-varroa-destructor-parasitosis-bees-revision-1_en.pdf.

Emmerich, Ilka Ute (2018): Zugelassene Arzneimittel für Honigbienen (*Apis mellifera*) in Deutschland. In: *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 2018 (131). Online verfügbar unter https://bienenkunde.uni-hohenheim.de/fileadmin/einrichtungen/bienenkunde/BMTW_OA_18009_Emmerich-1.pdf

Farina, W. M.; Núñez, Josué A. (1995): Trophallaxis in *Apis mellifera* : effects of sugar concentration and crop load on food distribution. In: *Journal of Apicultural Research* 34 (2), S. 93–96. DOI: 10.1080/00218839.1995.11100893.

Francis, Roy M.; Nielsen, Steen L.; Kryger, Per (2013): Varroa-virus interaction in collapsing honey bee colonies. In: *PloS one* 8 (3), e57540. DOI: 10.1371/journal.pone.0057540.

Frey, Eva; Rosenkranz, Peter (2014): Autumn invasion rates of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) into honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies and the resulting increase in mite populations. In: *J Econ Entomol* 107 (2), S. 508–515. DOI: 10.1603/EC13381.

Frey, Eva; Schnell, Hanna; Rosenkranz, Peter (2011): Invasion of *Varroa destructor* mites into mite-free honey bee colonies under the controlled conditions of a military training area. In: *Journal of Apicultural Research* 50 (2), S. 138–144. DOI: 10.3896/IBRA.1.50.2.05.

- Fuchs**, S. (1990): Preference for drone brood cells by *Varroa jacobsoni* Oud in colonies of *Apis mellifera carnica*. In: *Apidologie* 21 (3), S. 193–199. DOI: 10.1051/apido:19900304.
- Fuchs**, S. (1992): Choice in *Varroa jacobsoni* Oud. between honey bee drone or workerbrood cells for reproduction. In: *Behav Ecol Sociobiol* 31 (6), S. 429–435. DOI: 10.1007/BF00170610.
- Gallai, Nicola; Salles, Jean-Michel; Settele, Josef; Vaissière, Bernard E. (2009): Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. In: *Ecological Economics* 68 (3), S. 810–821. DOI: 10.1016/j.ecolecon.2008.06.014.
- Garbian**, Yael; Maori, Eyal; Kalev, Haim; Shafir, Sharoni; Sela, Ilan (2012): Bidirectional transfer of RNAi between honey bee and *Varroa destructor*: Varroa gene silencing reduces Varroa population. In: *PLOS Pathogens* 8 (12), e1003035. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003035.
- Genersch**, Elke; Ohe, Werner von der; Kaatz, Hannes; Schroeder, Annette; Otten, Christoph; Büchler, Ralph et al. (2010): The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. In: *Apidologie* 41 (3), S. 332–352. DOI: 10.1051/apido/2010014.
- Han**, Bin; Wu, Jiangli; Wei, Qiaohong; Liu, Fengying; Cui, Lihong; Rueppell, Olav; Xu, Shufa (2024): Life-history stage determines the diet of ectoparasitic mites on their honey bee hosts. In: *Nat Commun* 15 (1), S. 725. DOI: 10.1038/s41467-024-44915-x.
- Haydak**, Mykola H. (1943): Larval Food and Development of Castes in the Honeybee1. In: *J Econ Entomol* 36 (5), S. 778–792. DOI: 10.1093/jee/36.5.778.
- Haydak**, Mykola H. (1970): Honey Bee Nutrition. In: *Annual review of entomology* 15 (1), S. 143–156.
- Higes**, Mariano; Martín-Hernández, Raquel; Hernández-Rodríguez, Carmen Sara; González-Cabrera, Joel (2020): Assessing the resistance to acaricides in

Varroa destructor from several Spanish locations. In: *Parasitol Res* 119 (11), S. 3595–3601. DOI: 10.1007/s00436-020-06879-x.

Human, Hannelie; Brodschneider, Robert; Dietemann, Vincent; Dively, Galen; Ellis, James D.; Forsgren, Eva et al. (2013): Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. In: *Journal of Apicultural Research* 52 (4), S. 1–53. DOI: 10.3896/IBRA.1.52.4.10.

Jack, Cameron J.; Ellis, James D. (2021): Integrated Pest Management Control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), the Most Damaging Pest of (*Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)) Colonies. In: *Journal of insect science (Online)* 21 (5). DOI: 10.1093/jisesa/ieab058.

Jans, Katharina; Lüersen, Kai; Rimbach, Gerald (2021): *Drosophila melanogaster* as a Model Organism to Study Lithium and Boron Bioactivity. In: *International Journal of Molecular Sciences* 22 (21), S. 11710. DOI: 10.3390/ijms222111710.

Jovanovic, Nemanja M.; Glavinic, Uros; Ristanic, Marko; Vejnovic, Branislav; Stevanovic, Jevrosima; Cosic, Milivoje; Stanimirovic, Zoran (2022): Contact varroacidal efficacy of lithium citrate and its influence on viral loads, immune parameters and oxidative stress of honey bees in a field experiment. In: *Front. Physiol.* 13, S. 1000944. DOI: 10.3389/fphys.2022.1000944.

Kao, K. R.; Masui, Y.; Elinson, R. P. (1986): Lithium-induced respecification of pattern in *Xenopus laevis* embryos. In: *Nature* 322 (6077), S. 371–373. DOI: 10.1038/322371a0.

Kavanagh, Laurence; Keohane, Jerome; Garcia Cabellos, Guiomar; Lloyd, Andrew; Cleary, John (2018): Global Lithium Sources—Industrial Use and Future in the Electric Vehicle Industry: A Review. In: *Resources* 7 (3), S. 57. DOI: 10.3390/resources7030057.

King, R. C. (1953): Effects of Alkali Metal Ions on Development of *Drosophila*, with Special Reference to Lithium-Induced Abnormalities. In: *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America 39 (5), S. 403–407. DOI: 10.1073/pnas.39.5.403.

Klein, P. S.; Melton, D. A. (1996): A molecular mechanism for the effect of lithium on development. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (16), S. 8455–8459. DOI: 10.1073/pnas.93.16.8455.

Kolics, Balázs; Kolics, Éva; Mátyás, Kinga; Taller, János; Specziár, András (2022a): Comparison of Alternative Application Methods for Anti-Varroa Lithium Chloride Treatments. In: *Insects* 13 (7), S. 633. DOI: 10.3390/insects13070633.

Kolics, Balázs; Kolics, Éva; Solti, Izabella; Bacsí, Zsuzsanna; Taller, János; Specziár, András; Mátyás, Kinga (2022b): Lithium Chloride Shows Effectiveness against the Poultry Red Mite (*Dermanyssus gallinae*). In: *Insects* 13 (11), S. 1005. DOI: 10.3390/insects13111005.

Kolics, Balázs; Mátyás, Kinga; Solti, Izabella; Bacsí, Zsuzsanna; Kovács, Szilvia; Specziár, András et al. (2023): Efficacy of in vitro lithium chloride treatments on *Dermacentor reticulatus*. In: *Insects* 14 (2), S. 110. DOI: 10.3390/insects14020110.

Kolics, Éva; Mátyás, Kinga; Taller, János; Specziár, András; Kolics, Balázs (2020): Contact Effect Contribution to the High Efficiency of Lithium Chloride Against the Mite Parasite of the Honey Bee. In: *Insects* 11 (6), S. 333. DOI: 10.3390/insects11060333.

Kolics, Éva; Sajtos, Zsófi; Mátyás, Kinga; Szepesi, Kinga; Solti, Izabella; Németh, Gyöngyi et al. (2021a): Changes in Lithium Levels in Bees and Their Products Following Anti-Varroa Treatment. In: *Insects* 12 (7). DOI: 10.3390/insects12070579.

Kolics, Éva; Specziár, András; Taller, János; Mátyás, Kinga Klára; Kolics, Balázs (2021b): Lithium chloride outperformed oxalic acid sublimation in a preliminary experiment for Varroa mite control in pre-wintering honey bee

colonies. In: *Acta veterinaria Hungarica* 68 (4), S. 370–373. DOI: 10.1556/004.2020.00060.

Kralj, Jasna; Fuchs, Stefan (2006): Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers. In: *Apidologie* 37 (5), S. 577–587. DOI: 10.1051/apido:2006040.

Lautenbach, Sven; Seppelt, Ralf; Liebscher, Juliane; Dormann, Carsten F. (2012): Spatial and temporal trends of global pollination benefit. In: *PLOS ONE* 7 (4), e35954. DOI: 10.1371/journal.pone.0035954.

Le Conte, Yves; Ellis, Marion; Ritter, Wolfgang (2010): Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses? In: *Apidologie* 41 (3), S. 353–363. DOI: 10.1051/apido/2010017.

LeBoeuf, Adria C. (2017): Trophallaxis. In: *Current biology : CB* 27 (24), R1299-R1300. DOI: 10.1016/j.cub.2017.10.047.

Luu, Brent; Rodway, George (2018): Lithium Therapy for Bipolar Disorder. In: *The Journal for Nurse Practitioners* 14 (2), S. 93–99. DOI: 10.1016/j.nurpra.2017.09.025.

Maggi, A.; Enna, S. J. (1980): Regional alterations in rat brain neurotransmitter systems following chronic lithium treatment. In: *Journal of Neurochemistry* 34 (4), S. 888–892. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1980.tb09662.x.

Makosch, Marisa (2018): In vitro- und in vivo-Effekte einer LiCl-Applikation auf Larven der Honigbiene (*Apis mellifera* L.). Masterarbeit. Universität Hohenheim, Stuttgart, Germany.

Malhi, Gin S.; Taniou, Michelle; Das, Pritha; Berk, Michael (2012): The science and practice of lithium therapy. In: *The Australian and New Zealand journal of psychiatry* 46 (3), S. 192–211. DOI: 10.1177/0004867412437346.

Mann, Margaret C. (1923): A demonstration of the stability of the genes of an inbred stock of *Drosophila melanogaster* under experimental conditions. In: *J. Exp. Zool.* 38 (2), S. 213–244. DOI: 10.1002/jez.1400380202.

Martin, S. J. (1994): Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. In: *Exp Appl Acarol* 18 (2), S. 87–100. DOI: 10.1007/BF00055033.

Martin, S. J. (1995): Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in drone brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. In: *Exp Appl Acarol* 19 (4), S. 199–210. DOI: 10.1007/BF00130823.

Martin, Stephen J. (2004): Acaricide (pyrethroid) resistance in *Varroa destructor*. In: *Bee World* 85 (4), S. 67–69. DOI: 10.1080/0005772X.2004.11099632.

Mitton, Giulia A.; Meroi Arcerito, Facundo; Cooley, Hazel; Fernández de Landa, Gregorio; Eguaras, Martín J.; Ruffinengo, Sergio R.; Maggi, Matías D. (2022): More than sixty years living with *Varroa destructor* : a review of acaricide resistance. In: *International Journal of Pest Management*, S. 1–18. DOI: 10.1080/09670874.2022.2094489.

Noël, Amélie; Le Conte, Yves; Mondet, Fanny (2020): *Varroa destructor*: how does it harm *Apis mellifera* honey bees and what can be done about it? In: *Emerging topics in life sciences* 4 (1), S. 45–57. DOI: 10.1042/ETLS20190125.

Patel, N. G.; Haydak, M. H.; Gochnauer, T. A. (1960): Electrophoretic components of the proteins in honeybee larval food. In: *Nature* 186 (4725), S. 633–634. DOI: 10.1038/186633a0.

Patorno, Elisabetta; Huybrechts, Krista F.; Bateman, Brian T.; Cohen, Jacqueline M.; Desai, Rishi J.; Mogun, Helen et al. (2017): Lithium Use in Pregnancy and the Risk of Cardiac Malformations. In: *The New England journal of medicine* 376 (23), S. 2245–2254. DOI: 10.1056/NEJMoa1612222.

Potts, Simon G.; Biesmeijer, Jacobus C.; Kremen, Claire; Neumann, Peter; Schweiger, Oliver; Kunin, William E. (2010): Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. In: *Trends in Ecology & Evolution* 25 (6), S. 345–353. DOI: 10.1016/j.tree.2010.01.007.

- Potts**, Simon G.; Imperatriz-Fonseca, Vera; Ngo, Hien T.; Aizen, Marcelo A.; Biesmeijer, Jacobus C.; Breeze, Thomas D. et al. (2016): Safeguarding pollinators and their values to human well-being. In: *Nature* 540 (7632), S. 220–229. DOI: 10.1038/nature20588.
- Prešern**, Janez; Kur, Uroš; Bubnič, Jernej; Šala, Martin (2020): Lithium contamination of honeybee products and its accumulation in brood as a consequence of anti-varroa treatment. In: *Food chemistry* 330, S. 127334. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127334.
- Punwani**, Dharamvir; Chi, C. W.; Wasan, D. T. (1968): Dynamic Sorption by Hygroscopic Salts. A Comparative Study. In: *Ind. Eng. Chem. Proc. Des. Dev.* 7 (3), S. 410–415. DOI: 10.1021/i260027a017.
- Ramsey**, Samuel D.; Ochoa, Ronald; Bauchan, Gary; Gulbranson, Connor; Mowery, Joseph D.; Cohen, Allen et al. (2019): *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (5), S. 1792–1801. DOI: 10.1073/pnas.1818371116.
- Rein**, Carolin; Blumenschein, Marius; Traynor, Kirsten; Rosenkranz, Peter (2024): Lithium chloride treatments in free flying honey bee colonies: efficacy, brood survival, and within-colony distribution. In: *Parasitol Res* 123 (1), S. 67. DOI: 10.1007/s00436-023-08084-y.
- Rein**, Carolin; Grünke, Markus; Traynor, Kirsten & Rosenkranz, Peter (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*. DOI: 10.1002/ps.8311
- Rein**, Carolin; Makosch, Marisa; Renz, Julia; Rosenkranz, Peter (2022): Lithium chloride leads to concentration dependent brood damages in honey bee hives (*Apis mellifera*) during control of the mite *Varroa destructor*. In: *Apidologie* 53 (4), S. 1–14. DOI: 10.1007/s13592-022-00949-y.

- Rinderer**, Thomas E.; Harris, Jeffrey W.; Hunt, Gregory J.; Guzman, Lilia I. de (2010): Breeding for resistance to *Varroa destructor* in North America. In: *Apidologie* 41 (3), S. 409–424. DOI: 10.1051/apido/2010015.
- Rosenkranz**, Peter (1999): Honey bee (*Apis mellifera* L.) tolerance to *Varroa jacobsoni* Oud. in South America. In: *Apidologie* 30 (2-3), S. 159–172. DOI: 10.1051/apido:19990206.
- Rosenkranz**, Peter; Aumeier, Pia; Ziegelmann, Bettina (2010): Biology and control of *Varroa destructor*. In: *Journal of invertebrate pathology* 103 Suppl 1, 96-119. DOI: 10.1016/j.jip.2009.07.016.
- Satta**, Alberto; Floris, Ignazio; Eguaras, Martin; Cabras, Paolo; Garau, Vincenzo Luigi; Melis, Marinella (2005): Formic Acid-Based Treatments for Control of *Varroa destructor* in a Mediterranean Area. In: *J Econ Entomol* 98 (2), S. 267–273. DOI: 10.1093/jee/98.2.267.
- Schou**, M. (1968): Lithium in psychiatric therapy and prophylaxis. In: *Journal of Psychiatric Research* 6 (1), S. 67–95. DOI: 10.1016/0022-3956(68)90047-2.
- Schrauzer**, Gerhard N. (2002): Lithium: occurrence, dietary intakes, nutritional essentiality. In: *Journal of the American College of Nutrition* 21 (1), S. 14–21. DOI: 10.1080/07315724.2002.10719188.
- Seeley**, Thomas D. (2017): Life-history traits of wild honey bee colonies living in forests around Ithaca, NY, USA. In: *Apidologie* 48 (6), S. 743–754. DOI: 10.1007/s13592-017-0519-1.
- Seidel**, Ulrike; Baumhof, Elena; Hägele, Franziska A.; Bosy-Westphal, Anja; Birringer, Marc; Rimbach, Gerald (2019): Lithium-Rich Mineral Water is a Highly Bioavailable Lithium Source for Human Consumption. In: *Molecular nutrition & food research* 63 (13), e1900039. DOI: 10.1002/mnfr.201900039.
- Seitz**, Nicola; Traynor, Kirsten S.; Steinhauer, Nathalie; Rennich, Karen; Wilson, Mikayla E.; Ellis, James D. et al. (2015): A national survey of managed honey bee 2014–2015 annual colony losses in the USA. In: *Journal of Apicultural Research* 54 (4), S. 292–304. DOI: 10.1080/00218839.2016.1153294.

- Snitow**, Melinda E.; Bhansali, Rahul S.; Klein, Peter S. (2021): Lithium and Therapeutic Targeting of GSK-3. In: *Cells* 10 (2), S. 255. DOI: 10.3390/cells10020255.
- Solti**, Izabella; Kolics, Éva; Keszthelyi, Sándor; Bacsi, Zsuzsanna; Staszny, Ádám; Nagy, Erzsébet et al. (2022): Evaluation of the Acaricidal Activity of Lithium Chloride against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). In: *Horticulturae* 8 (12), S. 1127. DOI: 10.3390/horticulturae8121127.
- Sprau**, Lina (2019): Nebenwirkungen von Lithiumchlorid (LiCl) auf die Lebensdauer und Flugaktivität der adulten Honigbiene (*Apis mellifera*). Masterthesis. Universität Hohenheim, Stuttgart, Germany. Landesanstalt für Bienenkunde.
- Stachel**, S. E.; Grunwald, D. J.; Myers, P. Z. (1993): Lithium perturbation and goosecoid expression identify a dorsal specification pathway in the pregastrula zebrafish. In: *Development* 117 (4), S. 1261–1274. DOI: 10.1242/dev.117.4.1261.
- Stahlmann-Brown**, Philip; Hall, Richard J.; Pragert, Hayley; Robertson, Thomas (2022): *Varroa* Appears to Drive Persistent Increases in New Zealand Colony Losses. In: *Insects* 13 (7). DOI: 10.3390/insects13070589.
- Stanimirovic**, Zoran; Glavinic, Uros; Jovanovic, Nemanja M.; Ristanic, Marko; Milojković-Opsenica, Dušanka; Mutic, Jelena; Stevanovic, Jevrosima (2022): Preliminary trials on effects of lithium salts on *Varroa destructor*, honey and wax matrices. In: *Journal of Apicultural Research* 61 (3), S. 375–391. DOI: 10.1080/00218839.2021.1988277.
- Steube**, Xenia; Beinert, Patricia; Kirchner, Wolfgang H. (2021): Efficacy and temperature dependence of 60% and 85% formic acid treatment against *Varroa destructor*. In: *Apidologie* 52 (3), S. 720–729. DOI: 10.1007/s13592-021-00859-5.
- Tariba Lovaković**, Blanka; Lazarus, Maja; Brčić Karačonji, Irena; Jurica, Karlo; Živković Semren, Tanja; Lušić, Dražen et al. (2018): Multi-elemental

composition and antioxidant properties of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey from the coastal region of Croatia: Risk-benefit analysis. In: *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)* 45, S. 85–92. DOI: 10.1016/j.jtemb.2017.09.022.

Tezze, A. A.; Farina, W. M. (1999): Trophallaxis in the honeybee, *Apis mellifera* : the interaction between viscosity and sucrose concentration of the transferred solution. In: *Animal Behaviour* 57 (6), S. 1319–1326. DOI: 10.1006/anbe.1999.1110.

Traynor, Kirsten S.; Mondet, Fanny; Miranda, Joachim R. de; Techer, Maeva; Kowallik, Vienna; Oddie, Melissa A. Y. et al. (2020): *Varroa destructor*: A Complex Parasite, Crippling Honey Bees Worldwide. In: *Trends in parasitology* 36 (7), S. 592–606. DOI: 10.1016/j.pt.2020.04.004.

van Dooremalen, Coby; Gerritsen, Lonnie; Cornelissen, Bram; van der Steen, Jozef J. M.; van Langevelde, Frank; Blacquière, Tjeerd (2012): Winter survival of individual honey bees and honey bee colonies depends on level of *Varroa destructor* infestation. In: *PloS one* 7 (4), e36285. DOI: 10.1371/journal.pone.0036285.

Wallner, Klaus (1999): Varroacides and their residues in bee products. In: *Apidologie* 30 (2-3), S. 235–248. DOI: 10.1051/apido:19990212.

Williams, Geoffrey R.; Alaux, Cédric; Costa, Cecilia; Csáki, Tamas; Doublet, Vincent; Eisenhardt, Dorothea et al. (2013): Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. In: *Journal of Apicultural Research* 52 (1), S. 1–36. DOI: 10.3896/IBRA.1.52.1.04.

Williams, R. S.; Harwood, A. J. (2000): Lithium therapy and signal transduction. In: *Trends in Pharmacological Sciences* 21 (2), S. 61–64. DOI: 10.1016/S0165-6147(99)01428-5.

Ziegelmann, Bettina; Abele, Elisabeth; Hannus, Stefan; Beitzinger, Michaela; Berg, Stefan; Rosenkranz, Peter (2018): Lithium chloride effectively kills the

honey bee parasite *Varroa destructor* by a systemic mode of action. In:
Scientific reports 8 (1), S. 683. DOI: 10.1038/s41598-017-19137-5.

Danksagung

Die Förderung des Vorhabens erfolgte aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) aufgrund eines Beschlusses des deutschen Bundestages. Die Projektträgerschaft erfolgte über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) im Rahmen des Programms zur Innovationsförderung.

Zuerst möchte ich einen besonderen Dank an meinen Doktorvater, PD Dr. Peter Rosenkranz ausrichten. Danke, dass du mir die Bearbeitung des EAsy Life Projekts anvertraut und mich ermutigt hast, eine Doktorarbeit anzufertigen. Danke, für die zahlreichen Ratschläge, dein allzeit offenes Ohr und deine Bereitschaft an stressigen Versuchstagen mit anzupacken und das auch noch nach deinem Eintritt in die Rente!

Einen großen Dank geht an Frau Prof. Dr. Ute Mackenstedt für die Übernahme der Betreuung und Zweitgutbeachtung und Ihren hilfreichen Denkanstößen während des Mentoren Gespräches.

Ebenfalls möchte ich Herrn Prof. Dr. Martin Hasselmann dafür danken, dass er als 3. Mentor während der Bearbeitung meiner Doktorarbeit zur Verfügung stand.

Bedanken möchte ich mich auch bei der neuen Leiterin der Landesanstalt für Bienenkunde Dr. Kirsten Traynor, deren Tür immer für Anfragen offen stand und welche die Teilnahme an Tagungen, Auslandsaufenthalten und sonstigen Fortbildungen immer unterstützte und ermöglicht hat.

Ein großer Dank geht auch an meine Doktorandengruppe bestehend aus Lina Fölsch, Manuel Treder und Elsa Friedrich! Danke für die tollen beruflichen und auch privaten Momente, die wir gemeinsam erleben durften. Diese Momente haben die Doktorandenzeit zu einer unvergesslichen Zeit gemacht.

Ein besonderen Dank geht dabei an meinen Bürokollegen Manuel, dafür dass er mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, egal ob bei statistischen Fragen oder emotionalen Tiefpunkten. Danke, dass du mir immer fleißig geholfen hast meine Süßigkeiten Schublade zu leeren und meine blöden Wortwitze ertragen hast.

Besonders möchte ich mich auch bei Lina bedanken. Wir kennen uns nun schon über 10 Jahre und ich bin dankbar, dass wir beide den Weg an die LAB gefunden haben, um dort unsere Doktorarbeiten zu machen. Ich konnte in den letzten Jahren immer auf dich zählen! Danke, für deine Freundschaft, die weit über die berufliche Verbundenheit rausgeht.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei allen Kolleginnen und Kollegen der Bienenkunde bedanken. Ich habe das angenehme Arbeitsklima sehr geschätzt und die zahlreichen Kuchen und Kaffeepausen sehr genossen. Besonders möchte ich hierbei noch Birgit Fritz und Karin Heisler danken. Danke für eurer allzeit offenes Ohr und eure große Hilfsbereitschaft.

Unendlich dankbar bin ich Paul, dafür, dass er mich immer unterstützt und an mich geglaubt hat und mir an großen Tagen Mut zugesprochen und motiviert hat.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie insbesondere bei meinen Eltern und meinem Bruder bedanken, die immer an mich geglaubt und mich mit ihrem Stolz motiviert haben. Danke, dass es auch gibt!