

Landesanstalt für Bienenkunde  
Universität Hohenheim

Institut für Phytomedizin  
Fachgebiet: Angewandte Entomologie (360c)  
Prof. Dr. Dr. Claus P.W. Zebitz

**Freisetzung von Neonicotinoiden aus der Saatgutbeizung in Guttation von Kulturpflanzen und deren Auswirkungen auf Honigbienen *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)**

Kumulative Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Allgemeinen Agrarwissenschaften  
(Dr. sc. agr.)

vorgelegt  
der Fakultät Agrarwissenschaften

von  
**Jana Elin Reetz**  
aus Meerbusch

September 2015

Tag der mündlichen Prüfung: 06. August 2015

Berichterstatter, 1. Prüfer: Prof. Dr. Dr. Claus P. W. Zebitz (360c)

Mitberichterstatter, 2. Prüfer: Priv. Doz. Dr. Peter Rosenkranz (730)

3. Prüfer: Prof. Dr. Wolfgang Schwack (170a)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Ziel der Arbeit	5
<b>2 Veröffentlichungen</b>	<b>7</b>
2.1 Neonicotinoid insecticides translocated in guttated droplets of seed treated maize and wheat: a threat to honeybees?	7
2.2 A method for identifying water foraging bees by refractometer analysis: a spotlight on daily and seasonal water collecting activities of <i>Apis mellifera</i> L.	8
2.3 Notes and Comments: An optimised technique for the preparation of honey sacs of <i>Apis mellifera</i> L.	9
2.4 Uptake of Neonicotinoid Insecticides by Water Foraging Honey Bees <i>Apis mellifera</i> (Hymenoptera: Apidae) Through Guttation Fluid of Winter Oilseed Rape	10
<b>3 Allgemeine Diskussion und Schlussfolgerungen</b>	<b>11</b>
3.1 Guttation als pflanzenphysiologischer Prozess im Zusammenhang mit der jahreszeitlichen Freisetzung von Wirkstoffrückständen aus der Saatgutbeizung in Guttationstropfen	12
3.2 Jahreszeitliche Freisetzung von Wirkstoffrückständen aus der Saatgutbeizung in Guttationstropfen im Zusammenhang mit der Wassersammelaktivität der Honigbiene <i>Apis mellifera</i> L.	17
3.3 Evaluierung der Nebeneffekte von Wirkstoffrückständen auf die Honigbiene <i>Apis mellifera</i> L. und andere Nicht-Zielorganismen	21
3.4 Zulassung der Wirkstoffe Clothianidin, Imidacloprid und Thiamethoxam - Aktuelle Situation und Ausblick	27
<b>4 Zusammenfassung</b>	<b>29</b>
4.1 Zusammenfassung	29
4.2 Summary	32
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>36</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>53</b>
<b>Kongresse, Forschungsaufenthalte, Projektbeteiligungen</b>	<b>56</b>
<b>Danksagungen</b>	<b>60</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ANNEX	lat. <i>Annexum</i> ; Anhang
Art.	Artikel
CCD	Colony Collapse Disorder
BBCH	Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie; Code der morphologischen Entwicklungsstadien einer Pflanze
BienSchV	Bienenschutzverordnung
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
DIB	Deutscher Imkerbund
EFSA	European Food Safety Authority Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
EG	Europäische Gemeinschaft
EU	Europäische Union
FERA	Food and Environment Research Agency, United Kingdom
HHPs	Highly Hazardous Pesticides
IPS	Integrierter Pflanzenschutz
JKI	Julius Kühn-Institut
Mio.	Million
NAP	Nationaler Aktionsplan
NB	Kennzeichnungstexte und Auflagen des BVL hinsichtlich der Wirkung auf den Naturhaushalt - Bienen/Bestäuber
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
PflSchG	Gesetz zum Schutz der Kulturpflanzen; Pflanzenschutzgesetz
°C	Grad Celsius
%	Prozent (von Hundert)
L	Liter
mL	Milliliter
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
µg	Mikrogramm

---

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Zusätzlich für den Erwerbsanbau erlassene Bestimmungen für die Anwendung der Neonicotinoide Clothianidin und Imidacloprid	23
--------	---	----

---

## 1 Einleitung

Das mit der Saatgutbeizung einhergehende Risiko der oberirdisch in Guttationstropfen freigesetzten Wirkstoffrückstände für die Europäische Honigbiene *Apis mellifera* L. wird seit einigen Jahren kontrovers diskutiert. In Deutschland führten akute Vergiftungsschäden an rund 12.000 Bienenvölkern im Frühjahr 2008 (MLR 2008; Rosenkranz und Wallner 2008) dazu, dass die Saatgutbeizung mit Neonicotinoiden grundlegend in Frage gestellt wurde.

Im Frühjahr 2012 wurden neue wissenschaftliche Erkenntnisse über subletale Auswirkungen von Neonicotinoiden auf Bienen veröffentlicht. Aufgrund dieser Erkenntnisse beauftragte die Europäische Kommission die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) mit einer wissenschaftlichen Auswertung dieser neuen Erkenntnisse, mit dem Ziel, eine Risikobewertung der Wirkstoffe Clothianidin, Imidacloprid und Thiamethoxam in Bezug auf ihre Auswirkungen auf Honigbienen vornehmen zu können. In diesem Zusammenhang konnten „[...] inakzeptable Risiken aufgrund akuter oder chronischer Auswirkungen auf das Überleben und die Entwicklung von Bienenvölkern für mehrere Kulturen nicht ausgeschlossen werden. Zudem [wurden] [...] für jede der bewerteten Kulturen mehrere Datenlücken [ermittelt]. Dies betrifft insbesondere die Langzeitrisiken für Honigbienen aufgrund der Exposition gegenüber Staub, aufgrund von Rückständen in Pollen und Nektar und aufgrund der Exposition gegenüber Guttationsflüssigkeit“ (ABl EG Nr. L 139 v. 25.05.2013). Durch die am 24. Mai 2013 von der Europäischen Kommission erlassene und am 25. Mai 2013 in Kraft getretene Durchführungsverordnung (EU) Nr. 485/2013 (ABl EG Nr. L 139 v. 25.05.2013) ist die Anwendung der genannten Wirkstoffe in der landwirtschaftlichen und gärtnerischen Praxis bis zu der im Herbst 2015 zu erwartenden Neubewertung stark eingeschränkt.

Zum Schutz von „Mensch, Tier und Umwelt“ ist der reduzierte Einsatz von Pflanzenschutzmitteln auf ein „notwendige[s] Maß“ das vorrangige Ziel des „Gesetz[es] zum Schutz der Kulturpflanzen (Pflanzenschutzgesetz - PflSchG)“ vom 14. Februar 2012 (BGBl Teil I 2012 Nr. 7 v. 13.02.2012) und des „Nationale[n] Aktionsplan[s] zur nachhaltigen Anwendung von Pflanzenschutzmitteln“ (NAP; Art. 4, Abs. 1) (BAnz AT v. 15.05.2013 B1). Diese basieren auf der „Richtlinie Nr. 2009/128/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 21. Oktober 2009 über einen Aktionsrahmen der Gemeinschaft für die nachhaltige Verwendung von Pestiziden“, der sogenannten Pflanzenschutz-Rahmenrichtlinie (ABl EG Nr.

---

L 309/71 v. 24.11.2009). Eine Reduzierung der Wirkstoffexposition im Rahmen der Anwendung von Pflanzenschutzmitteln beinhaltet unter anderem die Optimierung der Applikationstechnik hinsichtlich der Wirkstoffexposition gegenüber Nicht-Zielorganismen. Durch die Saatgutbeizung wird die ausgebrachte Wirkstoffmenge pro Flächeneinheit und somit auch die Exposition von Nicht-Zielorganismen gegenüber dem applizierten Wirkstoff im Vergleich zur Spritz- oder Sprühapplikation deutlich reduziert. Der bei dem Verfahren der Beizung auf das Korn aufgebrauchte Wirkstoff wird erst im Boden durch die Bodenfeuchtigkeit in Lösung gebracht, wodurch sich ein Wurzel umgebendes Depot an Wirkstoff bildet. Eine systemische, akropetale und teils translaminare Verteilung des Wirkstoffs innerhalb der Pflanze über das Xylem ist eine chemisch-physikalische Voraussetzung, die den effektiven Schutz der wachsenden Pflanze gegenüber Schaderregern (Fungizid) oder Schadinsekten (Insektizid) bereits ab dem Keimlingsstadium gewährleistet.

Seit den 1990er Jahren sind die Substanzen Acetamiprid, Clothianidin, Dinetofuran, Imidacloprid, Nitenpyram, Thiacloprid und Thiamethoxam aus der Wirkstoffgruppe der Neonicotinoide auf dem Pflanzenschutzmarkt (Elbert *et al.* 2008). Diese Substanzen sind von dem aus den Wurzeln der Tabakpflanze *Nicotiana tabacum* L. gewonnenen Naturwirkstoff Nicotin synthetisch abgeleitet und wirken bei Insekten aufgrund einer hohen Affinität zu den Acetylcholin-Rezeptoren ( $I_{50}$ -Wert  $\sim 1$  nM; Nauen *et al.* 2003) als hochwirksame Nervengifte. Das Spektrum an Schaderregern, gegen die diese Wirkstoffe weltweit eingesetzt werden, ist vielfältig und reicht von Blattläusen, Weißen Fliegen, Käfern, Zikaden im Weinbau, Wanzen und Thripsen bis hin zu Drahtwürmern (Weichel und Nauen 2003; van Timmeren 2012; Wallingford *et al.* 2012; Vernon *et al.* 2013; van Rozen 2013). Neben der Spritz- und Sprühapplikation findet die Beizung von Saatgut mit diesen Wirkstoffen bislang Anwendung bei einer Vielzahl gartenbaulicher und landwirtschaftlicher Kulturpflanzen, zu denen neben Mais und Getreide unter anderem auch Raps (*Brassica napus* L.) im Sommer- sowie Winteranbau zählt. Der intensive Einsatz der Wirkstoffe hat jedoch in den vergangenen Jahrzehnten bereits zu ersten resistenten sowie kreuzresistenten Populationen geführt (Elbert und Nauen 2000, Le Goff *et al.* 2003, Nauen und Denholm 2005, Mota-Sanchez *et al.* 2006 und Alyokhin *et al.* 2007; zitiert in Wang *et al.* 2009). Die Wirkstoffe Acetamiprid und Thiacloprid aus der Gruppe der Neonicotinoide sind bislang als nicht-bienengefährlich eingestuft, wohingegen die Substanzen Clothianidin, Imidacloprid und Thiamethoxam in ihrer Anwendung als bienengefährlich kategorisiert sind (LD<sub>50</sub> oral acute: Clothianidin 3,7 ng Biene<sup>-1</sup>; Imidacloprid 3,7 ng Biene<sup>-1</sup>; Thiamethoxam 5 ng Biene<sup>-1</sup>). Die Toxizität gegenüber

---

Säugern wird als gering und die Symptome werden vergleichbar mit denen von Nicotin eingestuft (Tomizawa und Casida 2000, Tomizawa *et al.* 2001; zitiert in Tomizawa und Casida 2005). Sowohl der Naturwirkstoff Nicotin als auch die synthetisch abgeleiteten Substanzen und deren Metabolite (Westwood *et al.* 1998) weisen eine systemische sowie translaminare Verlagerung innerhalb des Pflanzengewebes auf und schützen somit auch das nachwachsende Gewebe über einen lang anhaltenden Zeitraum (Rouchaud *et al.* 1994; Westwood *et al.* 1998).

Der sachgerechte Pflanzenschutz hat auch den Schutz von Nicht-Zielorganismen wie der Europäischen Honigbiene und Wildbienenarten und damit den Erhalt ihrer individuellen sowie synergistischen Bestäubungsleistung bei einer Vielzahl von Wild- und Kulturpflanzen zum Ziel. Diese Bestäubungsleistung ist ein unverzichtbarer Beitrag zum Ökosystem, welcher durch den Rückgang der Bestäuber-Diversität gefährdet wird (Brittain *et al.* 2014). Aufgrund der hohen Attraktivität von Nektar und Pollen liefernden Blüten auf eine Vielzahl Blüten besuchende Insekten stellt in diesem Zusammenhang die Wirkstoffexpositionen über Pollen und Nektar eine nicht zu vernachlässigende Gefährdung dar. Eine Belastung mit Wirkstoffrückständen bei Wasser, das ebenfalls ein Sammelgut darstellt, ist in diese Betrachtungen mit einzubeziehen. Das durch Guttation (lat. *gutta*, Tropfen) abgesonderte Wasser gebeizter Pflanzen wurde bisher im Rahmen der Risikobewertung als nicht Bienen gefährdend bewertet.

Guttation ist ein physiologischer Prozess, der bei einer Vielzahl an Pflanzen in den Tropen (Sitte *et al.* 1991) und den Gemäßigten Breiten auftritt und bei dem Xylemflüssigkeit über Hydathoden (Wasserspalt) unter wasserdampfgesättigten Witterungsbedingungen abgesondert wird. Der Vorgang, bekannt bei 210 mono- sowie dikotylen Pflanzenfamilien (Perrin 1972; zitiert in Dieffenbach *et al.* 1980 a), findet abhängig (passiv) oder unabhängig (aktiv) vom Wurzeldruck statt (Haberlandt 1894, 1895, 1918; zitiert in Häusermann und Frey-Wyssling 1962; Throm 1996; Nultsch 1996). Bei Pilzen ist dieser Vorgang ebenfalls beschrieben (Nultsch 1996, Sprecher 1959). Das pflanzliche Hydathodengewebe kann Ionen und andere organische Komponenten aus der passierenden Xylemflüssigkeit aufnehmen und auch wieder resorbieren (Throm 1996), so dass aufgrund dieser Inhaltsstoffe eine Attraktivität des Guttationswassers auf Honigbienen nicht grundlegend auszuschließen ist. Demzufolge wurde das Augenmerk bei den zugrunde liegenden Untersuchungen auf die in Deutschland im

---

Anbau befindlichen landwirtschaftlichen Kulturen gelegt, deren Saatgut mit Substanzen dieser Wirkstoffgruppe standardmäßig gebeizt wird.

In Deutschland stellt Raps eine wirtschaftlich bedeutende Kulturpflanze dar, deren Anbau hinsichtlich des Pflanzenschutzes einen Konflikt zwischen Landwirtschaft und Imkerei birgt: Bedeutende Kriterien des Absatzmarktes werden durch die Bestäubungsleistung von Insekten beeinflusst (Jauker *et al.* 2012; Holzschuh *et al.* 2012; Garratt *et al.* 2014 a,b), da eine gleichmäßige Bestäubung sowohl die Fruchtausbildung als auch die Abreife begünstigt (Free und Nuttall 1968 und Williams 1978; zitiert in Mesquida *et al.* 1988; Garibaldi *et al.* 2009, 2013). Obwohl einige Kulturpflanzen als Windbestäuber nicht auf die Bestäubungsleistung von Insekten angewiesen sind, wirkt sich das Auftreten von Blüten besuchenden Insekten dennoch positiv aus. Die hohen Qualitätsanforderungen an das Erntegut bedingen zugleich den Einsatz von Fungiziden und Insektiziden für die Gesunderhaltung des Bestandes. Als wichtigste Ölpflanze im deutschen Anbau gilt Raps, der zur Gewinnung von Rapsöl als Lebensmittel sowie von Biodiesel als Kraftstoff angebaut wird. Neben Raps sind Sonnenblume und Sojabohne bedeutende Kulturen zur Gewinnung von Biodiesel, deren Anbaufläche in den EU-Mitgliedstaaten signifikant zugenommen hat (Breeze *et al.* 2014).

Aus Sicht der Imkerei stellt die Rapsblüte im Frühjahr für die Honigbienen sowie für viele andere Blüten besuchende Insekten, u.a. Hummeln (*Bombus sensu stricto* L., Steinhummel *B. lapidarius* L.) und Schwebfliegen der Gattung *Eristalis* (Stanley *et al.* 2013), aufgrund der täglichen Nektarproduktion von 0,6 mg pro Blüte bei einem durchschnittlichen Zuckergehalt von 44 bis 59 % und einer Pollenproduktion von 90 bis 174 kg pro Hektar (Maurizio und Grafl 1980) eine wichtige Nahrungsgrundlage dar (Stanley *et al.* 2013). Zum Zeitpunkt der Rapsblüte nimmt die Population eines Bienenvolkes stetig zu, so dass der Anteil der zu versorgenden Brut innerhalb kurzer Zeit stark ansteigt. Eine zunehmende Herstellung von Futtersaft für die aufzuziehenden Larven ist die Folge (Park 1946; Lindauer 1954). Nach von Rhein (1951; zitiert in Lindauer 1954, S. 409) weist der Futtersaft zunächst einen Wassergehalt von 78,8 % bei Arbeiterinnenbrut auf, der je nach Alter der Larven auf 54,6 % sinkt. Der für Drohnenbrut hergestellte Futtersaft enthält zwischen 73,5 % und 52,3 % Wasser. Dies macht deutlich, dass im Frühjahr mit zunehmendem Brutumfang innerhalb eines Bienenvolkes der Bedarf an Flüssigkeit ansteigt, und erklärt, warum Wassersammlerinnen im Frühjahr bereits bei Umgebungstemperaturen von 5 bis 10 °C ausfliegen (Stabentheiner und Kovac 2004; zitiert in Stabentheiner 2005). Um den täglich sowie saisonal schwankenden Flüssigkeitsbedarf eines Bienenvolkes innerhalb kurzer Zeit ausgleichen zu können, wird

---

unter anderem das im Nektar enthaltene Wasser hierfür verwendet (Lindauer 1954; Kühnholz und Seeley 1997; Seeley 2009). Steigende Temperaturen außerhalb des Bienenstockes veranlassen die Honigbienen aufgrund der wärmeausgleichenden Wirkung des eingelagerten Honigs zeitlich verzögert dazu, neben Nektar vermehrt auch reines Wasser in den Stock einzutragen (Lindauer 1954), um die Temperatur im Brutbereich auf 34,5 bis 35,5 °C (Hess 1926; zitiert in Lindauer 1954, S. 392) und die Luftfeuchtigkeit auf 30 bis 50 % (Büdel 1948; zitiert in Lindauer 1954, S. 403) regulieren zu können. Zur Steigerung der Verdunstungsrate wird das Wasser in einem dünnen Film oberflächlich auf bereits verdeckelte Zellen, offene Brutzellen, leere Zellen oder Wabenrähmchen aufgetragen (Lindauer 1954).

Anhand der vorausgegangenen Schilderungen wird deutlich, dass Guttationswasser sautgutbehandelter Pflanzen, welches Wirkstoffrückstände enthält, eine Gefährdung einerseits für die Sammlerinnen außerhalb des Bienenvolkes und andererseits durch den Eintrag und die anschließende stockinterne Verwendung eine Gefährdung auf Populationsebene darstellen kann.

## 1.1 Ziel der Arbeit

Ziel der Versuchstätigkeit war es, das Auftreten von Guttation in Kulturbeständen und das Verhalten von Wasser sammelnden Honigbienen im Halbfreiland und Freiland zu erfassen, um eine Risikobewertung der von Beizmittelwirkstoffen freigesetzten Rückstände in Guttationstropfen auf Wasser sammelnde Honigbienen vornehmen zu können.

Zur Klärung der Fragestellung, inwieweit ein systemischer Transport der aktiven Beizsubstanzen innerhalb der Pflanze auch zu einer oberirdischen Freisetzung in Guttationswasser führt, wurde als methodischer Ansatz die regelmäßige Beprobung des Guttationswassers von Mais (*Zea mays* L.),  $\alpha$ Wintertriticale (Tschem.-Seys. ex Müntzing) sowie Winterraps während der jeweiligen Kulturdauer herangezogen.

Für die Evaluierung der Sammelaktivität von Wasser sammelnden Honigbienen unter Freilandbedingungen wurde im Rahmen des vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) finanzierten Kooperationsprojektes die „Entwicklung eines Verfahrens zur Bestimmung des Wasser- und Stoffeintrages durch Honigbienen - Fragen zur Relevanz von Guttation“ in Kooperation mit dem Institut für Umweltforschung (INFU),

---

Technische Universität Dortmund, angestrebt. Anhand intensiver Freilandbeobachtungen sowie der Zucker- und Rückstandsanalyse präparierter Honigblasen heimkehrender Sammlerinnen galt es zu klären, inwieweit Honigbienen Guttationswasser zur Deckung des Wasserbedarfs sammeln und in die Bienenvölker eintragen. Diese Erkenntnisse lassen Rückschlüsse auf den Stoffeintrag in Bienenvölker über kontaminiertes Wasser zu.

Im Zusammenhang mit der Aufbereitung der Bienenproben für die Rückstandsanalyse gelang es, die Technik der Honigblasenpräparation zu optimieren und diese im Labor zu etablieren. Die Methode ermöglicht durch die Verwendung einer Zentrifuge eine Zeit sparende und standardisierbare Aufbereitung von Honigblasen.

Zur Risikobewertung „[der] oberflächige[n] Freisetzung von systemischen Beiz-insektiziden durch Guttation im Rapsanbau und ihre[r] Bedeutung im Hinblick auf eine Gefährdung von Wasser holenden Bienen“ (Wallner *et al.* 2012) wurden im Rahmen eines mehrjährigen, durch die Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP) finanzierten Projektes Versuche in der Kultur Winterraps durchgeführt. Das Projekt wurde in Kooperation mit dem Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, durchgeführt. Im Rahmen dieses Projektes wurden Daten zur Freisetzung der Beizmittelwirkstoffe in Guttation und das Wassersammelverhalten von Honigbienen in Bezug auf Guttation bei gebeiztem Winterraps durchgeführt. Die Versuche hierzu erfolgten im Labor, Halbfreiland sowie Freiland und greifen damit die drei Stufen der Risikotestung zur Ermittlung der Bientoxizität auf.

Die Relevanz der Untersuchungen über die Wirkstofffreisetzung in Guttation gebeizter Kulturpflanzen und die Wassersammelaktivität der Honigbienen zeigt sich darin, dass durch die von der Europäischen Kommission erlassene Durchführungsverordnung (EU) Nr. 485/2013 die Anwendung der Neonicotinoide seit Mai 2013 zunächst für den Zeitraum von zwei Jahren eingeschränkt ist. Der genannte Zeitraum wurde zur Erarbeitung weiterer Daten bezüglich der Rückstandsbelastung in Pollen, Nektar sowie Guttation und die damit einhergehende Gefährdung für Bienen und andere Nicht-Zielorganismen angesetzt; eine zeitnahe Bewertung der Wirkstoffe durch die Europäische Kommission ist zu erwarten. Die im Rahmen der Versuchstätigkeit gewonnenen Daten und Erkenntnisse stellen somit einen bedeutenden Beitrag zu diesem Thema dar.

---

## 2 Veröffentlichungen

Die im Rahmen der kumulativen Dissertation erzielten Forschungsergebnisse wurden in Fachjournalen eingereicht, anonym begutachtet (peer-reviewed) und veröffentlicht bzw. zur Veröffentlichung angenommen:

### 2.1 Neonicotinoid insecticides translocated in guttated droplets of seed treated maize and wheat: a threat to honeybees? <sup>1</sup>

Erratum to: Neonicotinoid insecticides translocated in guttated droplets of seed treated maize and wheat: a threat to honeybees? <sup>2</sup>

The immune system of honey bees is influenced by a diversity of factors, some of which have changed in the last 10 years. One of these is the application of pesticides by seed-dressing with systemic and water-soluble active substances like the neonicotinoids. In addition to pollen, nectar and dust, guttation of seed-dressed plants might be a new source of contamination to honey bees. The experiments demonstrated that guttation gathered from neonicotinoid-dressed plants contains corresponding residues of neonicotinoids: Guttation of seed-dressed maize (clothianidin: Poncho<sup>®</sup> 0.5 mg/seed and Poncho<sup>®</sup> Pro 1.25 mg/seed) contains neonicotinoid concentrations up to 8,000 ng mL<sup>-1</sup>. This concentration decreases rapidly, but residues of the seed-dressing are measurable over several weeks. Seed-dressing with higher amount of active substance (Poncho<sup>®</sup> Pro) did not result in higher concentrations in guttation in the first stages of plant development, but the concentration decreased more slowly. The following spring after overwintering, guttation of seed-treated triticale (imidacloprid: Gasur<sup>®</sup>) showed low residues of this compound (up to 13 ng mL<sup>-1</sup>). During the sampling of guttation, no honey bees were observed collecting these droplets from triticale or maize.

---

<sup>1</sup> Reetz JE, Zühlke S, Spitteller M and Wallner K, *Apidologie* **42**(5):596-606 (2011).

<sup>2</sup> Reetz JE, Zühlke S, Spitteller M and Wallner K, *Apidologie* **42**(6):797 (2011).

<http://link.springer.com>

---

## 2.2 A method for identifying water foraging bees by refractometer analysis: a spotlight on daily and seasonal water collecting activities of *Apis mellifera* L.<sup>3</sup>

The relevance of guttation of seed-coated crops as a water source for honey bees (*Apis mellifera* L.) is currently discussed and draws attention to the activity of water foraging honey bees. Due to the wide foraging range, targeted observations of water foraging honey bees under field conditions are difficult to carry out. Therefore, returning honey bees were collected in the morning as well as during the day in summer and autumn 2010. In the laboratory, honey sacs of potential water foraging honey bees (without pollen or propolis) were examined. Honey sacs with a weight of  $\geq 0.005$  g were classified as successful foragers. For the determination between water and nectar foragers, the honey sac contents of successful foragers were individually analyzed for sugar content by a refractometer. Based on the known and naturally-occurring range of sugar concentrations in nectars, the analyzed samples were divided into nectar (25-65 % sugar) and water (0-15 % sugar) foraging honey bees. The results showed that discrimination between nectar and water foraging honey bees is feasible by analyzing the honey sac extracts with a refractometer. In autumn, the water demand of honey bee colonies is almost exclusively covered by water collection, whereas during summer nectar is mainly used. In general, water collection is not restricted to certain times of the day. Thus, there might be an overlapping in time and space between the occurrence of guttation and the flight activity of honey bees in temperate zones.

---

<sup>3</sup> Reetz JE, Zühlke S, Spitzler M and Wallner K, *J Verbr Lebensm* 7(4):283-290 (2012).

<http://www.springer.com>

---

### 2.3 Notes and Comments: An optimised technique for the preparation of honey sacs of *Apis mellifera* L.<sup>4</sup>

Significant questions about the foraging behaviour of honey bees have been studied by analysing the honey-sac extract. For the preparation of the honey-sac extract, various techniques have been used in the past. In the context of the discussion about the impact of guttation from seed-treated plants on the vitality of honey bee colonies, the focus has been shifted to water foraging honey bees. But, specific observations and sampling of water foraging honey bees under field conditions are, however, nearly impossible due to the wide foraging range. Therefore, the analysis of individual honey-sac extracts of returning foragers was focused because this methodology enables specifically targeted examinations of single or pooled honey-sac extracts. An optimised technique of honey-sac preparation by centrifugation in the laboratory has been developed, which can be used in a standardized and time-efficient way to obtain single or pooled samples of honey-sac extracts.

---

<sup>4</sup> Reetz JE and Wallner K, *J Apic Res* **53**(4):500-502 (2014).

<http://www.ibrabee.org.uk>

---

## 2.4 Uptake of Neonicotinoid Insecticides by Water Foraging Honey Bees *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) Through Guttation Fluid of Winter Oilseed Rape <sup>5</sup>

The water foraging activity of honey bees on guttation fluid of seed-coated winter oilseed rape (WOR; *Brassica napus* L.) has not yet been evaluated. Therefore, the uptake of active substances (a.s.) in guttation was evaluated by measuring residues of neonicotinoids used before as WOR seed-coatings in individual honey-sac contents of returning foragers. In autumn, insecticide residues of up to 130 µg a.s. per liter are released in WOR guttation, but declined to <30 µg a.s. per liter until winter dormancy. In spring, residues are linked to pre-wintered plants and declined steadily until flowering. The maximum residues in WOR guttation occurs on the first leaves in autumn when the colonies' water demand decreases. For the first time, evidence for the uptake of guttation from seed-coated WOR by honey bees was given by measuring residues in individual honey-sac contents. In total, 38 out of 204 samples (19 %) showed residues of thiamethoxam at concentrations ranging from 0.3 to 0.95 µg per liter while the corresponding concentrations in WOR guttation varied between 3.6 to 12.9 µg thiamethoxam per liter. The detected amounts of thiamethoxam in the honey sacs of water-foraging honey bees were therefore below the thresholds in nectar and pollen that are considered to have negative effects on honey bees after chronic exposure.

---

<sup>5</sup> Reetz JE, Schulz W, Seitz W, Spittler M, Zühlke S, Armbruster W, and Wallner K  
zur Veröffentlichung akzeptiert in *J Econ Entomol* (08. September 2015).  
<http://www.entsoc.org>

### 3 Allgemeine Diskussion und Schlussfolgerungen

In den letzten Jahrzehnten wird ein erhöhter Rückgang der durch Imker betreuten Bienenvölker (Potts *et al.* 2010 a, vanEngelsdorp und Meixner 2010) sowie weiteren Blüten bestäubenden Insekten (Potts *et al.* 2010 b) berichtet; unter anderem für Europa, die USA, Japan sowie Vorderasien (vanEngelsdorp *et al.* 2009, Crailsheim *et al.* 2009, 2010, Guttierrez 2009, Haddad *et al.* 2009 und Soroker *et al.* 2009; zitiert in Neumann und Carreck 2010). Zudem wird aus den USA seit dem Winter 2006/2007 das Zusammenbrechen von Bienenvölkern, das sogenannte Colony Collapse Disorder (CCD), beschrieben. Charakteristisch für CCD ist der massive Abgang adulter Bienen, ohne dass ein entsprechender Totenfall vor den Fluglöchern der Bienenvölker auftritt, und zurückbleibende Brut (vanEngelsdorp *et al.* 2009). Bislang sind die CCD auslösenden Faktoren ungeklärt (Oldroyd 2007). Infektionen der Honigbiene durch Krankheitserreger (Paxton 2010; Fürst *et al.* 2014) und die Exposition gegenüber sublethalen sowie chronischen Wirkstoffkonzentrationen beeinträchtigen das Immunsystem der Honigbiene. Synergistische Effekte zwischen den Stressfaktoren Krankheitsbelastung, Nährstoffversorgung und Wirkstoffexposition werden ebenfalls in Betracht gezogen (vanEngelsdorp *et al.* 2009; Alaux *et al.* 2010; Vidau *et al.* 2011; Pettis *et al.* 2012, 2013). Nach Erkenntnissen von Di Prisco *et al.* (2013) wird die Abwehrreaktion des Immunsystems der Honigbiene durch die Aufnahme von Clothianidin reduziert. Mason *et al.* (2013) postulieren, dass sich die Zunahme der Infektionskrankheiten bei Honigbienen, Fischen, Amphibien, Vögeln und Fledermäusen aus der Anwendung der Wirkstoffe aus der Gruppe der Neonicotinoide ergeben, die das Immunabwehrsystem der betroffenen Organismen grundlegend schwächen. Eine effizientere Etablierung von Schadern, beispielsweise Viren, im Organismus ist dadurch gegeben. Die auf eine vorangegangene Wirkstoffexposition zeitlich verzögert stattfindende Reaktion im Bienenvolk lässt einen direkten Zusammenhang zwischen beiden Faktoren nicht erkennen. Dass akute Bienenvergiftungen in direktem Zusammenhang mit der Anwendung von Neonicotinoiden stehen können, zeigten lokal begrenzte Schadfälle in Italien (Greatti *et al.* 2003, 2006) und Deutschland (Rosenkranz und Wallner 2008, MLR 2008, Pistorius 2009 a,b, Forster 2009). Eine akute Bientoxizität der Wirkstoffe Clothianidin, Imidacloprid und Thiamethoxam ist unumstritten. Derzeit stehen durch sublethale Wirkstoffkonzentrationen hervorgerufene

Nebeneffekte auf die Gesundheit von Bienenvölkern und anderen Bestäuberinsekten in der Diskussion. In diesem Zusammenhang ist auch die Freisetzung von Wirkstoffen aus der Saatgutbeizung in Guttation vor dem Hintergrund, dass Honigbienen Wasser sammeln, kritisch zu diskutieren.

### **3.1 Guttation als pflanzenphysiologischer Prozess im Zusammenhang mit der jahreszeitlichen Freisetzung von Wirkstoffrückständen aus der Saatgutbeizung in Guttationstropfen**

Guttation ist ein natürliches und regelmäßig auftretendes Phänomen, das bei einer Vielzahl an Wildpflanzen der hiesigen Flora sowie bei Kulturpflanzen, zu denen unter anderem auch Raps zählt, zu beobachten ist. Hinsichtlich der Toxizität auf Honigbienen und andere Insekten ist die von Pflanzen in Form von Wassertropfen abgesonderte Xylemflüssigkeit grundsätzlich als nicht kritisch zu bewerten. Erst durch die Anwendung von systemisch wirkenden Substanzen in der Saatgutbeizung, z.B. der Neonicotinoiden, kann ein Risiko entstehen. Die Regelmäßigkeit, mit der Guttation auftritt, lässt den Schluss zu, dass diese Flüssigkeit als Wasserquelle von Insekten angenommen wird. Diese Annahme kann durch eigene Beobachtungen im Freiland gestützt werden. Vor dem Hintergrund, dass Insekten und insbesondere Honigbienen ihren eigenen Nährstoffhaushalt bzw. den ihres Volkes über Pollen, Nektar und Wasser ausgleichen müssen, stellt die stoffliche Zusammensetzung des Guttationswassers einen wichtigen Aspekt hinsichtlich der Attraktivität des Guttationswassers als Wasserquelle dar. Dieser Aspekt wird ausführlich in Kapitel 3.2 diskutiert.

Wenn sich das Wasserpotential der Luft dem des feuchten Bodens annähert und gleichzeitig die Temperatur des Bodens die der Luft überschreitet, erfolgt die Wasserabgabe der Pflanzen im gasförmigen Zustand über Stomata (Transpiration) zunächst eingeschränkt und wird schließlich eingestellt; der Prozess der Guttation setzt ein (Hughes und Brimblecombe 1994). In den hiesigen Breiten stellen sich wasserdampfgesättigte Bedingungen während der nächtlichen Abkühlung ein, wenn die relative Luftfeuchte  $>75\%$  beträgt (Frey-Wyssling 1949; zitiert in Joachimsmeier *et al.* 2009) und der Taupunkt erreicht wird (Hughes und Brimblecombe 1994). Somit zeigt Guttation eine ausreichende Wasserversorgung der Pflanze sowie eine hohe Wasserverfügbarkeit im Boden an (Fahn 1979, Faiz 1983, Glenn und Takeda

1989; zitiert in Takeda *et al.* 1991). Die Witterungsbedingungen, die zur Bildung von Tau und Guttation führen, sind ähnlich, so dass beide Phänomene zumeist gleichzeitig und sowohl bei Wild- als auch Kulturpflanzen zu beobachten sind. Das Vorhandensein von Guttation in einem Pflanzenbestand wird durch Wind, steigende Temperaturen und/oder Sonneneinstrahlung beeinflusst. Je nach Jahreszeit steht Guttationswasser unterschiedlich lange über den Tag hinweg im Bestand als Wasserquelle zur Verfügung. Zwar führen Niederschläge oberirdisch zu einer Verdünnung der Guttationsflüssigkeit sowie der darin enthaltenen Wirkstoffrückstände, fördern aber zugleich die Guttationsleistung der Pflanze durch die hohe Wasserverfügbarkeit im Wurzelsystem.

Der Vorgang der pflanzlichen Guttation und deren Intensität werden von diversen physikalischen Umweltfaktoren (Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Wasserverfügbarkeit im Boden), sowie dem physiologischen Zustand der Pflanze gesteuert (Heimann 1950, Höhn 1951, Joachimsmeier *et al.* 2012 a). Bereits Engel und Heimann (1949) stellten einen Zusammenhang zwischen dem periodischen Auftreten von Guttation und dem Pflanzenwachstum fest. Anhand dieser Schilderungen wird deutlich, dass Guttation in der heimischen Flora ein weit verbreitetes, regelmäßig auftretendes und von einer Vielzahl standortbedingter Faktoren beeinflusstes Phänomen ist, dessen Prognose anhand festgelegter Schwellenwerte nicht möglich ist (Joachimsmeier *et al.* 2012 a).

Bereits ab dem Keimblatt-Stadium von Pflanzen wird Xylemflüssigkeit in Form von Guttation abgesondert (Dieffenbach *et al.* 1980 a,b, Reetz *et al.* 2011, Joachimsmeier *et al.* 2012 a, Reetz *et al.* 2015 *akzeptiert*). Das Hydathodengewebe junger, noch nicht vollständig entfalteter Blätter weist eine höhere Guttationsleistung auf als das älterer, bereits entfalteter Blätter. Dies kann auf Ablagerungen in den Wasserporen des Hydathodengewebes zurückgeführt werden, die sich im Verlauf des Pflanzenwachstums bilden (Takeda *et al.* 1991; Maeda und Maeda 1987; zitiert in Takeda *et al.* 1991). Eigenen Freilandbeobachtungen sowie den Erkenntnissen von Joachimsmeier *et al.* (2010 b, 2012 a) zufolge nimmt die Guttationsleistung bei Winterraps von der Keimung bis zur Blüte bis hin zur Samenreife kontinuierlich ab. Inwieweit es bei Winterraps ebenfalls zu entsprechenden Ablagerungen im Hydathodengewebe kommt, kann nach derzeitigem Kenntnisstand nicht beurteilt werden.

Die jeweils über Guttation freigesetzte Flüssigkeitsmenge variiert und ist abhängig von der Pflanzenart, der Klimazone und den jeweils vorherrschenden Witterungs- und Standortbedingungen. Die im tropischen Regenwald natürlich vorkommende Pflanze *Colocasia*

*nymphaeifolia* Schott (Familie der Aronstabgewächse, Araceae) sondert während der Nacht bis zu 100 mL Wasser über Guttation ab (Sitte *et al.* 1991). Diese Guttationsmenge unterscheidet sich nahezu um den Faktor 10.000 im Vergleich zu dem heimischen Wolligen Honiggras *Holcus lanatus* L. (Hughes und Brimblecombe 1994) und circa um den Faktor 77 zu Winterraps im Freiland (1,3 mL pro Pflanze bei BBCH 16/17; Wallner *et al.* 2012). Basierend auf dieser Angabe kann angenommen werden, dass ein Winterrapsbestand im Herbst bei einer Saatedichte von 50 Korn pro m<sup>2</sup> und einer Keimrate von 80 % über Guttation eine Wassermenge von bis zu 52 mL pro m<sup>2</sup> ( $\triangleq 520 \text{ L ha}^{-1}$ ) als Wasserquelle zur Verfügung stellen kann. Winterraps kann somit als Kulturpflanze mit hoher Guttationsintensität eingestuft werden (Joachimsmeier *et al.* 2012 a); ein besonders hohes Wasserangebot durch Guttation bei Winterraps besteht besonders während des Herbstes sowie im frühen Frühjahr.

Die im Rahmen der Saatgutbehandlung applizierte Pro-Korn-Aufwandmenge der aktiven Substanz/-en nimmt Einfluss auf die im Guttationswasser freigesetzten Rückstände. Die höchsten Wirkstoffrückstände im Guttationswasser treten unabhängig von der Kultur stets während der frühen Entwicklungsstadien und bereits ab dem Keimblatt-Stadium auf (Wallner 2009; Reetz *et al.* 2011; Joachimsmeier *et al.* 2012 a; Reetz *et al.* 2015 akzeptiert). Im Verlauf des Pflanzenwachstums nehmen diese kontinuierlich ab (Reetz *et al.* 2011; Joachimsmeier *et al.* 2010 b; Reetz *et al.* 2015 akzeptiert). Einerseits ist dies darauf zurückzuführen, dass fortlaufend neues Pflanzengewebe zuwächst und durch die Einlagerung von Wirkstoff effektiv geschützt wird, und andererseits darauf, dass der Anteil an pflanzenverfügbarem Wirkstoff im Boden im Verlauf der Kulturperiode abnimmt. Es ist davon auszugehen, dass der Rückgang der Wirkstoffverfügbarkeit für die Pflanzenwurzeln unter anderem mit Adhäsionskräften zwischen dem Wirkstoff und verschiedenen Bodenkolloiden zusammenhängt. Nach Cox *et al.* (1997) wird die Sorption von Imidacloprid im Boden durch chemisch-physikalische Eigenschaften der vorherrschenden Bodenart beeinflusst, wie beispielsweise dem Anteil organischer Kohlenstoffverbindungen und dem Anteil an Ton. Inwieweit vergleichbare Effekte bei Thiamethoxam und Clothianidin im Boden auftreten, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht belegt werden, dennoch sollte dieser Aspekt nicht unbeachtet bleiben. Weitere Einflussgrößen stellen das Wurzelwachstum aus dem Wirkstoffhorizont in andere Bodenschichten sowie die durch Niederschläge bedingten Auswaschungsprozesse des Wirkstoffhorizontes im Boden dar. Die Persistenz aktiver Substanzen in der Umwelt wird neben den chemisch-physikalischen Substanzeigenschaften auch von den jeweils

vorherrschenden Standortbedingungen, beispielsweise der mikrobiellen Bodenaktivität, beeinflusst (Dai *et al.* 2006, Anhalt *et al.* 2007, Chen *et al.* 2008, Pandey *et al.* 2009, Zhao *et al.* 2009, Liu *et al.* 2011).

Im Hinblick auf das Expositionsrisiko der in Guttation gebeizter Kulturpflanzen auftretenden Wirkstoffrückstände auf Honigbienen ist die Jahreszeit, in der die Aussaat erfolgt, ein nicht außer Betracht zu lassender Aspekt, denn die maximalen Wirkstoffrückstände werden je nach Kultur und Anbauform (Sommer-, Winterkultur) zu unterschiedlichen Jahreszeiten freigesetzt. Da ein Bienenvolk aufgrund der jahreszeitlich angepassten Entwicklung stets den Umweltbedingungen unterliegt und die Bienenaktivität somit saisonal schwankt, wird die im Zusammenhang mit der Saatgutbeizung diskutierte Bienengefährdung im Folgenden differenziert zwischen der Winter- und Sommerkultur betrachtet:

Bei der Sommerkultur Mais erfolgt die Aussaat im Frühjahr des jeweiligen Erntejahres. Zu dieser Jahreszeit befinden sich Bienenvölker in einem exponentiellen Wachstum, das mit einem steigenden Bedarf an Flüssigkeit zur Herstellung des Futtersaftes sowie zur Thermoregulation (Temperatur, Luftfeuchtigkeit) einhergeht. Wasser sammelnde Bienen beginnen im Sommer bereits in den frühen Morgenstunden zwischen 5:00 und 6:00 Uhr mit ihrer Sammelaktivität, so dass mit einer zeitlichen und räumlichen Überschneidung zwischen dem Auftreten von Guttation und der Sammelaktivität von Wassersammlerinnen zu rechnen ist. Eigene Beobachtungen im Freiland zeigten, dass die von Mais abgesonderten Guttations-tropfen aufgrund der warmen und strahlungsreichen Witterung bereits innerhalb kurzer Zeit verdunstet sind, so dass die Sammelaktivität von Bienen in Bezug auf Guttationswasser bei Mais lediglich auf einen kurzen, frühmorgendliche Zeitraum beschränkt ist. Das im Kelch der Fahnenblätter zusammengelaufene Guttationswasser steht jedoch aufgrund der geschützten Lage und der damit einhergehend verzögerten Verdunstung über einen deutlich längeren Zeitraum für die Bienen als Wasserquelle zur Verfügung (Wied 2010). Die im Guttationswasser von Mais freigesetzten Wirkstoffrückstände (bis zu 8 mg a.s. L<sup>-1</sup>) weisen über einen mehrwöchigen Kulturzeitraum Konzentrationen auf, die bereits bei einer geringen Wasseraufnahme eine akute Schädigung einzelner Sammlerinnen bewirken (Wied 2010) und die hinsichtlich der Bientoxizität als kritisch einzustufen sind (Reetz *et al.* 2011). Die Zulassung von Clothianidin zur Saatgutbeizung in Mais ruht seit 2008.

Bei den als Winterkultur angebauten Pflanzen erfolgt die Aussaat im Spätsommer, so dass die Pflanzen Anfang des Herbstes keimen und bis zum Eintritt in die Winterruhe bereits sechs bis acht Laubblätter entwickelt haben. Dadurch sind die kritischen Entwicklungsstadien des Nachauflaufens bis zum folgenden Frühjahr bereits abgeschlossen, wenn der Befall durch pilzliche Schaderreger und Schadinsekten ansteigt. Im Rahmen der zugrunde liegenden Versuche wurden als Winterkultur *xTriticale* (Reetz *et al.* 2011) und Raps (Reetz *et al.* 2015 *akzeptiert*) in die Untersuchungen integriert. Maximale Wirkstoffrückstände im Guttationswasser der genannten Kulturen treten während des Herbstes im Nachauflauf auf ( $\sim 1 \text{ mg a.s. L}^{-1}$  bei *xTriticale*;  $\sim 0,1 \text{ mg a.s. L}^{-1}$  bei Winterraps). Die von den Winterkulturen freigesetzten Maximalkonzentrationen unterschreiten die von Mais über Guttationswasser freigesetzten Wirkstoffrückstände. Während der Vernalisation sind die pflanzenphysiologischen Prozesse herabgesetzt und die Konstitution der Pflanze ist verändert, z.B. durch die veränderte Konzentration an Phytohormonen (Simming-Annefeld 1967). Die Guttationsleistung einer Pflanze wird in Verlauf und Menge gemessen und ist maßgeblich durch die Dauer des Kältereizes während der Vernalisation beeinflusst (Simming-Annefeld 1967). Die im Frühjahr nachgewiesenen Wirkstoffrückstände im Guttationswasser unterschreiten sowohl bei Winterraps als auch *xTriticale* die Ausgangskonzentration des Herbstes (Reetz *et al.* 2011, Joachimsmeier *et al.* 2010 b, Reetz *et al.* 2015 *akzeptiert*), was einerseits mit einer Zunahme an Pflanzengewebe (Längenwachstum) und andererseits mit der physiologisch veränderten Konstitution der Pflanze nach der Vernalisation begründet werden kann. Im Rahmen der Freilandversuche, die in Winterraps durchgeführt wurden, konnte beobachtet werden, dass Guttation im Herbst und im Frühjahr bis in die Mittagsstunden im Bestand vorhanden ist. Sobald die Guttationstropfen aufgrund ihres Gewichtes abgeperlt oder verdunstet sind, stellt Winterraps aufgrund seiner Blattstruktur im Vergleich zu Mais kein weiteres Guttationswasser als Wasserquelle zur Verfügung. Zudem ist der Wasserbedarf von Bienenvölkern im Herbst als vergleichsweise gering einzuschätzen, da die Winterauffütterung in der Regel mit Zuckersirup erfolgt. Bei dieser Form der Fütterung entziehen die Bienen dem Sirup das Wasser vor dem Wintereinbruch, so dass im Herbst tendenziell von einem Wasseraustrag bei Bienenvölkern auszugehen ist. Eine Ausnahme stellt jedoch die Winterauffütterung mit Zuckerteig (Apifonda) dar, der die Bienen zum vermehrten Wassereintrag in die Völker veranlasst. Da diese Form der Winterauffütterung ebenfalls Anwendung in der Imkerpraxis findet, bleibt in diesem Falle eine geringe Wahrscheinlichkeit des Stoffeintrags über

Guttationswasser gebeizter Kulturpflanzen bestehen, wenn sich der Bienenstand in unmittelbarer Nähe zu Flächen mit gebeizten Kulturpflanzen befindet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Guttationsleistung einer Pflanze jahreszeitlichen Schwankungen unterliegt und bedingt wird durch physikalische, standortabhängige Faktoren (Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Windgeschwindigkeit, UV-Strahlung, Wasserverfügbarkeit im Boden) und die Pflanzenphysiologie (Pflanzenart, Entwicklungsstadium und Anzahl guttierender Blätter). Die Freisetzung von Wirkstoffrückständen im Guttationswasser wird beeinflusst durch Pflanzenart und Entwicklungsstadium, Jahreszeit und Anbauform, Pro-Korn-Aufwandmenge und chemisch-physikalische Stoffeigenschaften, Bodentyp und -art sowie Witterung und Wasserverfügbarkeit im Boden. In die Risikoabschätzung sind die Jahreszeit, in der die Maximalkonzentrationen im Guttationswasser auftreten, und das jeweilige Entwicklungsstadium der Bienenvölker im Hinblick auf den saisonal variierenden Wasserbedarf einzubeziehen.

### **3.2 Jahreszeitliche Freisetzung von Wirkstoffrückständen aus der Saatgutbeizung in Guttationstropfen im Zusammenhang mit der Wassersammelaktivität der Honigbiene *Apis mellifera* L.**

Das von Pflanzen über Guttation abgesonderte Xylemwasser kann neben Calciumhydrogencarbonat (Sitte *et al.* 1991) und verschiedenen Zuckern wie Glucose, Fructose sowie Galactose auch Aminosäuren wie beispielsweise Asparaginsäure (Goatley und Lewis 1966, Simmling-Annefeld 1976), Makro- und Mikronährstoffe sowie Vitamine (Goatley und Lewis 1966) oder Phytohormone wie Auxin oder Cytokinin (Wheeler 1973) enthalten. Der bei Verletzung abgesonderte Blutungssaft unterscheidet sich qualitativ und quantitativ von Guttation (Simmling-Annefeld 1976), da dieser ungefiltert aus dem verletzten Gewebe austritt, wohingegen das im Hydathodengewebe lokalisierte Epithem eine filternde Funktion übernimmt. Goatley und Lewis (1966) untersuchten das Guttationswasser von Weizen, Gerste und Reis hinsichtlich der Zuckerzusammensetzung (Arabinose, Fructose, Galactose, Glucose, Ribose, Sucrose, Xylose) und des jeweiligen Zuckergehaltes (Gesamtzucker: 27,1 mg L<sup>-1</sup> Weizen; 48,4 mg L<sup>-1</sup> Reis; 59,8 mg L<sup>-1</sup> Gerste). Die von von Frisch (1927, 1928, 1930, 1934) für Honigbienen ermittelten Schwellenwerte verschiedener Zuckerarten sind gering. Einige

der von Goatley und Lewis (1966) in Guttation erfassten Zuckerarten sind zudem für Bienen geschmacklos (von Frisch 1927, 1928, 1930, 1934, Wykes 1952 a,b). Anhand der von von Frisch und Wykes ermittelten Schwellenwerte und Präferenzen kann eine von Guttation auf Bienen ausgehende Attraktivität als lukrative Zuckerquelle ausgeschlossen werden.

Die Intensität, mit der Honigbienen reines Wasser sammeln und in den Stock eintragen, weist auf den aktuellen Bedarf an Flüssigkeit innerhalb des Bienenvolkes hin. Im Gegensatz zu Nektar oder Pollen wird das Sammelgut Wasser bedarfsorientiert gesammelt und anschließend der jeweiligen Verwendung zugeführt (Futtersaftherstellung; Temperaturregulierung). Um kurzfristig auf den steigenden stockinternen Flüssigkeitsbedarf reagieren zu können, agieren Wassersammlerinnen in der Regel in einem Aktionsradius mit Flugdistanzen von lediglich 250 bis 500 Metern (Visscher *et al.* 1996, Kühnholz und Seeley 1997); nur in Ausnahmefällen, beispielsweise bei Abwesenheit von Wasserquellen, legen Wasser sammelnde Bienen Distanzen bis zu 2000 Meter zurück (Visscher *et al.* 1996). Um den Nährstoffhaushalt ausgleichen zu können, wird Nektar und Wasser verschiedener Qualitäten und Zusammensetzungen eingetragen (Butler 1940, Piscitelli 1959, Kiechle 1961). Tages- und jahreszeitliche sowie populations- und standortspezifische Schwankungen bezüglich des Wasserbedarfs (Lindauer 1954, Reetz *et al.* 2012) machen deutlich, dass reines Wasser (25 L pro Jahr pro Bienenvolk) im Vergleich zu Nektar (120 kg) und Pollen (20 kg; Seeley 1996) ein geringeres, aber nicht zu vernachlässigendes Bedarfsmuster für ein Bienenvolk darstellt.

Die an einem Standort vorherrschende Landschafts- sowie Landwirtschaftsstruktur stellt einen wichtigen Aspekt bei der Versorgung von Bienenvölkern mit Pollen und Nektar dar (Power *et al.* 2012), jedoch auch in Bezug auf die Verfügbarkeit von Wasserquellen und die Wahlmöglichkeit zwischen diesen. Je gleichmäßiger die Struktur eines Standortes ist, desto geringer ist die Diversität der zur Verfügung stehenden Wasserquellen und umso diffiziler wird es für Honigbienen und andere Nicht-Zielorganismen einer Wasserquelle auszuweichen. Wiesen, Gärten und naturnahe Lebensräume stellen wegen des reichhaltigen Angebotes an Nektar und Pollen eine gute Überlebensgrundlage für Wild- und Honigbienen dar (Goulson *et al.* 2008, Hernandez *et al.* 2009, McFrederick und LeBuhn 2009, Cameron *et al.* 2011); eine vergleichbare Vielfalt ist bei einer Struktur- und Habitatdiversität auch in Bezug auf Wasserquellen zu erwarten. Hingegen bieten besonders Regionen mit intensiver und flächendeckender Landwirtschaft wenig Diversität. Während der Freilandversuche in Mecklenburg-Vorpommern konnten - im Vergleich zu den vorherigen Versuchen auf kleinstrukturierten Flächen in Süddeutschland - häufig Wassersammlerinnen beim Sammeln von Guttations-

wasser im Winterraps beobachtet werden. Es zeigte sich außerdem, dass Bienen die Blattränder von Winterraps gezielt nach Wasser absuchen - selbst nach Verdunsten des Guttationswassers. Inwieweit Guttation als eine attraktive Wasserquelle im direkten Umfeld eines Bienenstandes gespeichert und bei Bedarf wiederholt angefliegen wird, kann anhand der zugrunde liegenden Versuche nicht abschließend bewertet werden.

Um Aussagen über den Eintrag von kontaminiertem Guttationswasser in Bienenvölker treffen zu können, sind gezielte Beobachtungen von Wasser sammelnden Bienen im Freiland erforderlich. Obwohl deren Aktionsradius im Vergleich zu Nektar- oder Pollensammlerinnen auf einen Umkreis von bis zu 500 Metern um ein Bienenvolk begrenzt ist (Visscher *et al.* 1996), sind gezielte Beobachtungen ohne den Einsatz spezieller Technik wie beispielsweise RFID-Chips (Schneider *et al.* 2012) oder Radar (Fischer *et al.* 2014) kaum möglich. Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Klärung dieser Frage herangezogene Versuchsansatz bestand in der Rückstandsanalyse von Honigblaseninhalten heimkehrender Sammlerinnen mittels HPLC-MS-Analyse, einer Methodik, die Rückstandsdaten auf der Basis von Einzelproben liefert. Eine Optimierung der bislang beschriebenen Methoden zur Präparation von Honigblasen konnte darüber hinaus erzielt werden (Reetz und Wallner 2014). Erstmals im Rahmen der Guttationsforschung gelang mit Hilfe dieser Methode der Nachweis, dass Guttationswasser von gebeiztem Winterraps von Honigbienen als Wasserquelle angenommen wird (Reetz *et al.* 2015 *akzeptiert*). An dem Versuchsstandort, der wegen einer intensiven und großflächigen Landwirtschaft eine geringe Anzahl alternativer Wasserquellen zur Verfügung stellte, waren die Bienen unmittelbar der Wasserquelle Guttation von gebeiztem Winterraps (Crusier®OSR; BBCH 11-13) ausgesetzt. Unter diesen „worst case“-Bedingungen zeigte sich anhand der Rückstandsanalytik der Honigblasen (n= 204), dass diese Wasserquelle von Bienen angenommen wird: In 19 % (n= 38) der analysierten Honigblasen wurden Rückstände des verwendeten Beizmittels detektiert (Thiamethoxam 0,3-0,95 µg L<sup>-1</sup>; LOQ= 0,3 µg L<sup>-1</sup>). In weiteren 12 % der Proben (n= 24) wurde Thiamethoxam in Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze gemessen. Aufgrund der stockinternen Verwendung des Guttationswassers, beispielsweise zur Futtersaftherstellung, können nach derzeitigem Wissensstand sublethale Effekte nicht ausgeschlossen werden, insbesondere im Hinblick auf die empfindliche Bienenbrut. Obgleich die ermittelten Wirkstoffrückstände in den Honigblasen niedrig sind, konsumieren Arbeiterinnenlarven während der ersten drei Lebensstage bis zu 30 mg (Nelson 1924) des Futtersaftes, der einen Wassergehalt von circa 67 % aufweist (Lindauer 1954).

Die vorherrschende Landwirtschaftsstruktur stellt einen wichtigen Aspekt im Zusammenhang mit dem Verlust an Diversität dar, da die Intensivierung der Landwirtschaft auch das Ausmaß, mit dem Wirkstoffe durch Pflanzenschutzmaßnahmen in die Umwelt gebracht werden, beeinträchtigt. Die Belastung der Umwelt durch Wirkstoffe als Folge von Pflanzenschutzmaßnahmen betrifft neben Luft und Boden auch das Element Wasser. Den Erkenntnissen von Sánchez-Bayo und Hyne (2014) zufolge sind in 93 % der Proben von australischen Gewässern Rückstände von mindestens zwei Neonicotinoiden nachweisbar. Johnson und Pettis (2014) konnten Rückstände von Imidacloprid ( $7\text{-}131\text{ ppb} \triangleq \mu\text{g L}^{-1}$ ) in stehenden sowie langsam fließenden Gewässern aus landwirtschaftlichen bis hin zu städtischen Habitaten nachweisen. Dies macht deutlich, dass der Schutz von terrestrischen und aquatischen Nicht-Zielorganismen aufgrund des nahezu ubiquitären Vorkommens von Wirkstoffexpositionen ein komplexer Vorgang ist, der eine differenzierte Analyse erfordert. Sowohl die Rückstände von Pflanzenschutz- als auch Düngemitteln sind auf landwirtschaftlich konventionell genutzten Flächen präsenter als im extensiven Landbau. So stellten Rouchaud *et al.* (1994) fest, dass eine organische Düngung bei Zuckerrüben die Wirkstoffrückstände im Boden und im Blattgewebe steigern kann. Ein vergleichbarer Effekt eines Düngemittels auf eine veränderte Freisetzung von Beizmittelrückständen in der Guttationsflüssigkeit bei Winterraps konnte im Rahmen dieser Forschungstätigkeit nicht berücksichtigt werden. Dennoch unterstützen diese Erkenntnisse die These, dass Nicht-Zielorganismen in landwirtschaftlich intensiv geprägten Regionen einem höheren Risiko der Wirkstoffexposition ausgesetzt sind.

Die vorangegangenen Ausführungen belegen, dass das Sammelgut Wasser neben Pollen und Nektar einen zusätzlichen Eintragspfad für Wirkstoffrückstände in Bienenvölker darstellt. Die Guttationsflüssigkeit gebeizter Kulturpflanzen ist eine weitere Quelle für den Eintrag von Wirkstoffen in Bienenvölker. Im Zusammenhang mit der bedarfsorientierten Versorgung eines Bienenvolkes mit Wasser ist jedoch davon auszugehen, dass einerseits stets mehrere, natürlich auftretende Wasserquellen wie Tau, Regen und Pfützen sowie künstlich angelegte Quellen von Wassersammlerinnen genutzt werden und andererseits Wasser auch zu solchen Tageszeiten in die Bienenvölker eingetragen wird, zu denen Guttation als Wasserquelle nicht mehr zur Verfügung steht. Der Wasserbedarf ist abhängig von der Jahreszeit, der Stärke des Bienenvolkes und damit einhergehend dem Anteil an offener und zu versorgender Brut, der Nektarverfügbarkeit sowie der Witterung außerhalb des Bienenvolkes und des Stockklimas

(Lindauer 1954). Kleinflächige Landschafts- und Landwirtschaftsstrukturen bieten Honigbienen und anderen Insekten eine Vielzahl an Nektar- und Pollen- sowie Wasserquellen; Alternativen sind in diesen Biotopstrukturen gegeben.

Es ist davon auszugehen, dass die von Pflanzen abgesonderte Guttationsflüssigkeit wegen des geringen Gesamtzuckergehaltes keine attraktive Zuckerquelle für Bienen darstellt. Durch die „worst case“-Versuche, bei denen Bienenvölker unmittelbar der Guttation gebeizten Winterrapses ausgesetzt waren und wenig alternative Wasserquellen in direkter Umgebung vorfanden, konnte die Annahme von Guttation durch Honigbienen als Wasserquelle grundlegend belegt werden. Wassersammlerinnen, die das kontaminierte Guttationswasser von gebeizten Kulturen mit den darin enthaltenen sublethalen Wirkstoffkonzentrationen in den Honigblasen transportieren, fliegen zum Bienenstock zurück und übergeben das Wasser dort an Stockbienen, die es anschließend innerhalb des Bienenvolkes mit vielseitigen Interaktionen den verschiedenen Verwendungszwecken zuführen. Obwohl die in 19 % der Honigblasen gemessenen Konzentrationen gering waren ( $0,3\text{-}0,95 \mu\text{g L}^{-1}$  Thiamethoxam; Reetz *et al.* 2015 akzeptiert), kann der Eintrag des belasteten Guttationswassers und die stockinterne Verarbeitung zu Futtersaft eine sublethale Gefährdung für adulte Honigbienen und die empfindliche Brut darstellen, deren Nachweis bislang nicht erbracht ist. Sandrock *et al.* (2014) und Dively *et al.* (2015) konnten bei Honigbienen als Konsequenz einer chronischen Fütterung von Pollen, der mit umweltrelevanten Konzentrationen von Neonicotinoiden (Clothianidin, Imidacloprid bzw. Thiamethoxam) versetzt war, eine kurzweilige Beeinträchtigung auf Populationsebene feststellen. Mit diesen Erkenntnissen ist der Nachweis erbracht, dass feldrealistische, auf Bienen sublethal wirkende Konzentrationen der kontrovers diskutierten Wirkstoffe aus der Gruppe der Neonicotinoide negative Effekte auf Einzelbienen sowie auf Populationsebene hervorrufen.

### **3.3 Evaluierung der Nebeneffekte von Wirkstoffrückständen auf die Honigbiene *Apis mellifera* L. und andere Nicht-Zielorganismen**

Der Schutz von terrestrisch und aquatisch lebenden Nicht-Zielorganismen ist eines der Ziele des Integrierten Pflanzenschutzes. Die Umsetzung dieser Zielvorgabe ist aufgrund des nahezu ubiquitären Vorkommens von Wirkstoffen in der Umwelt, die unter anderem aus Anwendungen von Pflanzenschutzmitteln herrühren können, ein äußerst komplexer Vorgang.

In diesem Kapitel wird die Diskussion um Nebeneffekte von Pflanzenschutzmitteln auf weitere Nicht-Zielorganismen wie beispielsweise Wildbienen und andere Blüten besuchende Insekten ergänzt.

Mommaerts *et al.* (2010) wiesen negative Effekte auf das Sammelverhalten der Dunklen Erdhummel *Bombus terrestris* L. in Folge einer Exposition gegenüber Imidacloprid, Thiamethoxam sowie Thiacloprid nach, die sich in einer erhöhten Mortalität von Arbeiterinnen sowie einem signifikanten Anstieg unbefruchteter Eier äußerten, wodurch die Vitalität des Hummelvolkes in der Folge beeinträchtigt wird. Für Wildbienen, die ihre Nester im Boden anlegen, besteht ein weiteres Expositionsrisiko durch die Wirkstoffapplikation auf bzw. in den Boden (Stoner und Eitzer 2012). Eine Bodenapplikation der Wirkstoffe Imidacloprid und Thiamethoxam bei Gartenkürbis *Cucurbita pepo* L. führt neben der Wirkstoffbelastung im Boden auch zu einer Wirkstofffreisetzung über Nektar ( $10 \pm 3$  ppb bzw.  $11 \pm 6$  ppb) und Pollen ( $14 \pm 8$  ppb bzw.  $12 \pm 9$  ppb) (Stoner und Eitzer 2012). Über eine vergleichbare Wirkstofffreisetzung von Neonicotinoiden in Pollen und Nektar wird bei Gartenkürbis *C. pepo* (Dively und Kamel 2012) und bei Apfel (Škerl *et al.* 2009) berichtet - zwei für Honigbienen und andere Blüten bestäubende Insekten attraktive Pflanzen. Da die Wirkstoffe bei einer Vielzahl gärtnerisch und landwirtschaftlich kultivierter Pflanzen Anwendung finden, ist davon auszugehen, dass die Wirkstofffreisetzung über Pollen und Nektar auf diverse Kulturen übertragen werden kann, wobei die freigesetzten Wirkstoffkonzentrationen entsprechend der Pflanzenart variieren. Die im April 2014 veröffentlichte europaweite Greenpeace-Studie über die Belastung blühender Zierpflanzen mit Pflanzenschutzmittelrückständen zeigte auf, dass „von 86 analysierten Proben [...] 97,6 % [der im Handel erworbenen] blühenden Pflanzen [...] Rückstände“ aus vorherigen Pflanzenschutzmaßnahmen aufwiesen (Greenpeace 2014; Studie v. 15.04.2014). Der Nachweis von Clothianidin, Imidacloprid bzw. Thiamethoxam erfolgte in 7 %, 43 % bzw. 8 % der untersuchten Proben (Greenpeace 2014; Studie v. 15.04.2014). Diese Erkenntnisse verdeutlichen, dass neben den landwirtschaftlichen Kulturen auch Zierpflanzen, Stauden und Baumschulgehölze sowie Pflanzen im Haus- und Kleingarten in die Rückstandsbetrachtung einzubeziehen sind. Die vom BVL erteilten Anwendungsaufgaben zur gewerblichen Anwendung von Neonicotinoiden in der gartenbaulichen Produktion greifen diese Erkenntnisse wie folgt auf (BVL 2013; Fachmeldung v. 12.07.2013):

**Tab. 1: Zusätzlich für den Erwerbsanbau erlassene Bestimmungen für die Anwendung der Neonicotinoide Clothianidin und Imidacloprid (Quelle: nach BVL 2013)**

Auflage	Auflagentext	Pflanzenschutzmittel (Wirkstoff)
NB501	Die Behandlung darf nur an Pflanzen erfolgen, die im Jahr der Behandlung nicht mehr zur Blüte kommen.	Confidor WG 70 (Imidacloprid) Warrant 700 WG (Imidacloprid) Dantop (Clothianidin)
NB502	Eine Behandlung vor der Blüte ist nur zulässig, wenn danach keine Verwendung der Pflanzen im Freiland vorgesehen ist.	Confidor WG 70 (Imidacloprid) Dantop (Clothianidin)
NB503	Die Behandlung darf nur an Weinreben erfolgen, die im Jahr der Behandlung nicht mehr zur Blüte kommen. Gegebenenfalls sind vor der Behandlung alle Blütenanlagen zu entfernen.	Confidor WG 70 (Imidacloprid)
NB504	Eine Behandlung vor der Blüte ist nur zulässig, wenn danach im Jahr der Behandlung keine Verwendung der Pflanzen im Freiland vorgesehen ist.	Confidor WG 70 (Imidacloprid) Warrant 700 WG (Imidacloprid)

Für die Anwendung der Wirkstoffe Imidacloprid und Thiamethoxam im Haus- und Kleingarten hat das BVL zum 01. Oktober 2013 für unbestimmte Zeit das Ruhen angeordnet. Nach neuen Erkenntnissen ist das mit der Anwendung von Neonicotinoiden einhergehende Risiko der Wirkstofffreisetzung über Nektar, Pollen und Guttation um weitere Nicht-Zielorganismen und Arthropoden zu ergänzen. Desneux *et al.* (2007) zeigen die Vielfältigkeit an Nebeneffekten bei Nicht-Zielorganismen auf. Diese können sowohl die physiologische sowie verhaltensspezifische Ebene als auch biochemische und neurophysiologische Effekte bis hin zu Nebenwirkungen auf Entwicklung, Lebensdauer, Immunabwehr und Fruchtbarkeit sowie Geschlechterverhältnis der Nachkommenschaft betreffen. In Bezug auf die Verhaltensbiologie sind bislang Effekte hinsichtlich der Mobilität (direkt durch Knock-Down-Effekte oder indirekt durch Bildung von Kairomonen), der chemischen sowie visuellen Navigation und Orientierung besonders im Zusammenhang mit der Nahrungssuche, dem Lernvermögen (Repellent-, Antifraße-Effekte, Reduzierung der olfaktorischen Fähigkeiten) sowie dem Eiablageverhalten beschrieben. Diese Erkenntnisse machen deutlich, dass Nebeneffekte multifunktional einzelne Insekten, aber auch Populationen bis hin zu Insektengesellschaften betreffen können.

---

In der derzeitigen Diskussion um die Nebeneffekte auf Honigbienen und Nicht-Zielorganismen durch die Anwendung der bienengefährlichen Neonicotinoide Clothianidin, Imidacloprid und Thiamethoxam mehren sich die Erkenntnisse über negative Effekte bei Wildbienen durch sublethale Konzentrationen, die über Nektar und Pollen regelmäßig konsumiert werden: Laycock *et al.* (2012) ermittelten einen Rückgang der Reproduktionsrate um 42 % bei *B. terrestris* durch die Exposition gegenüber Imidacloprid ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Whitehorn *et al.* 2012 stellten fest, dass sich eine zweimonatige Exposition von *B. terrestris* gegenüber feldrealistischen Imidacloprid-Konzentrationen in Pollen ( $6\text{-}12 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) bzw. in Zuckerwasser ( $0,7\text{-}1,4 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) signifikant auf die Entwicklung der Population auswirkt, in Form einer um 85 % reduzierten Königinnenproduktion sowie einer verringerten Sammelaktivität. Gill *et al.* (2012) konstatierten einen Rückgang der Nachkommenschaft bei *B. terrestris* um 22 % durch feldrealistische Konzentrationen an Imidacloprid in Nektar und Pollen. Goulson (2015) konnte im Rahmen der erneuten Analyse der von FERA (Food and Environment Research Agency, UK) erhobenen Daten einen signifikanten Zusammenhang zwischen den feldrealistischen Konzentrationen an Clothianidin und Thiamethoxam in Pollen und Nektar und der reduzierten Populationsentwicklung und Königinnenproduktion in Völkern von *B. terrestris* nachweisen. Zwar konnten Laycock und Cresswell (2013) bei Hummelvölkern eine konzentrationsabhängige Regenerationsfähigkeit nach einer zeitweiligen Exposition gegenüber kontaminiertem Futter nachweisen, jedoch bleibt ungeklärt, ob diese Regeneration nach einer länger andauernden Exposition, beispielsweise der Vorratshaltung von Nektar und Pollen in Hummel- und Bienenvölkern über das Jahr hinweg, in gleichem Maße zutrifft. Eine reduzierte Sammelaktivität und Vorratshaltung, eine höhere Arbeiterinnen- und Brutmortalität sowie die ausbleibende Königinnenproduktion bei *B. impatiens* führten Larson *et al.* (2013) auf Clothianidin-Rückstände ( $171\pm 44 \text{ ppb}$ ) in Nektar von Weißklee zurück. Bei der Roten Mauerbiene *O. bicornis* L. konnte festgestellt werden, dass eine chronische Exposition gegenüber feldrealistischen Konzentrationen an Thiamethoxam bzw. Clothianidin ( $2,87$  bzw.  $0,45 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) zu einer um 50 % verringerten Reproduktionsleistung und gleichzeitig zu einem signifikanten Anstieg männlicher Nachkommen führt (Sandrock *et al.* 2013). Da die Reproduktionsphase bei *O. bicornis* zum Zeitpunkt der Rapsblüte stattfindet, ist mit einer entsprechenden Wirkstoffexposition und dadurch mit langfristig negativen Effekten auf Populationsebene zu rechnen. Nach Easton und Goulson (2013) zeigen deutlich niedrigere Konzentrationen ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$  Imidacloprid) bereits eine Repellentwirkung auf Blüten besuchende Fliegen und Käfer. Neuesten Erkenntnissen von Kessler *et al.* (2015) zu folge,

sind Honigbienen und Hummel nicht in der Lage, eine Futterquelle, die mit feldrealistischen Konzentrationen an Clothianidin, Imidacloprid oder Thiamethoxam versetzt ist, wahrzunehmen und dieser konsequent auszuweichen. Entgegen dieser Annahme war der Konsum der mit Imidacloprid und Thiamethoxam versetzten Futterlösungen sogar erhöht. Ein bislang nicht in diesem Ausmaß erfasstes Risiko in Bezug auf populationsdynamische Parameter durch sublethale Konzentrationen von Clothianidin besteht laut Rundlöf *et al.* (2015) aufgrund der hohen Attraktivität von Pollen und Nektar bei gebeiztem Sommerraps für Wildbienen und Hummeln. Nach Cutler *et al.* (2014) und Rundlöf *et al.* (2015) konnten jedoch keine vergleichbaren Effekte bei Honigbienen ermittelt werden. Dennoch sollte in Betracht gezogen werden, dass weitere Blüten besuchende Insekten durch die Wirkstofffreisetzung in Pollen und Nektar beeinträchtigt sein können. Im Rahmen des Integrierten sowie Biologischen Pflanzenschutzes im Gewächshaus ist der Einsatz von natürlichen Gegenspielern, sogenannte Nützlinge, eine wichtige Maßnahme zur Bekämpfung von Schadinsekten. Doch auch Nützlinge wie beispielsweise die Gemeine Florfliege *Chrysoperla carnea* Stephens werden durch die direkte Exposition gegenüber Neonicotinoiden oder indirekt durch sublethale Konzentrationen negativ in ihrer Vitalität und Nahrungssuche beeinträchtigt (Rogers *et al.* 2007). Dies ist ein Erklärungsansatz für unzureichende Bekämpfungserfolge im Rahmen des Nützlingseinsatzes.

Die Entwicklung zur heutigen Intensivierung der Landnutzung hat bereits Einfluss auf die Biodiversität genommen (Allan *et al.* 2014), denn bis zum Zeitpunkt der Intensivierung der Agrarlandschaft war die Bestäubungsleistung durch vorherrschende heimische Wildbienenarten ausreichend und effizient (Batra 1995). Innerhalb des Zeitraumes von 2005 bis 2010 ist die Nachfrage an Bestäubungsleistung innerhalb der EU um den Faktor 4.9 angestiegen (Breeze *et al.* 2014), weshalb zunehmend Bienenvölker zur Unterstützung wildlebender Bestäuber eingesetzt werden müssen (Batra 1995). Obwohl die Pflanzenzüchtung zunehmend Kultivare hervorbringt, die nicht durch Insekten bestäubt werden müssen, sondern selbst- oder windbefruchtend sind (Biesmeijer *et al.* 2006), ist eine Vielzahl von Wildpflanzen und über 70 % der weltweit wichtigsten Kulturpflanzen auf die Bestäubung durch Blüten besuchende Insekten angewiesen (Klein *et al.* 2007, Ollerton *et al.* 2011, Holzschuh *et al.* 2012, Leonhardt *et al.* 2013). Aufgrund der hohen Bestäubungsleistung wird die Europäische Honigbiene daher in Deutschland nach Rind und Schwein als dritt wichtigstes Nutztier angesehen. Für die landwirtschaftliche und gartenbauliche Produktion ist die Förderung der Artenvielfalt von sehr großer Bedeutung, weil die Effektivität der Bestäubung von

synergistischen Effekten zwischen Wild- und Honigbienen abhängt (Holzschuh *et al.* 2012). Ein Rückgang der Artenvielfalt wird die vorherrschende Kulturlandschaft ökologisch und ökonomisch nachhaltig beeinträchtigen (Watanabe 1994, Ghazoul 2005, Klein *et al.* 2007, Carvalheiro *et al.* 2010, Stanley *et al.* 2013, Albrecht *et al.* 2014).

Die mit der Intensivierung der Agrarlandschaft einhergehende Variation der Landnutzung steht im Zusammenhang mit der Veränderung von Habitatstrukturen und der vorzufindenden Biodiversität in Flora und Fauna. Die Vielfalt der in einem Ökosystem beheimateten Insektenarten sowie die Anzahl der in einer Agrarlandschaft vorkommenden Ökosysteme werden maßgeblich durch die Habitatdiversität beeinflusst (Dietkötter und Crist 2013). Eine Maßnahme für die nachhaltige Nützlings- und Insektenförderung und den Erhalt der Biodiversität in Regionen intensiver Landwirtschaft stellt daher die konsequente Anlage von Ausgleich- und Ausweichflächen dar (Nicholls und Altieri 2013), denn der lokale Verlust der Artenvielfalt und der funktional verbundenen Pflanzenfamilien steht im Zusammenhang mit dem Vorkommen der heimischen Bestäuberinsekten (Biesmeijer *et al.* 2006, Carvalheiro *et al.* 2010, Bommarco *et al.* 2012). Von Habitatveränderungen sind zunächst die Spezialisten der Tier- und Pflanzwelt bedroht, da diese spezifisch angepasst und nur bedingt zu Veränderungen befähigt sind (Biesmeijer *et al.* 2006). Generalisten hingegen sind im Hinblick auf Habitatveränderungen anpassungsfähiger, was wiederum zu einer weiteren Verdrängung spezialisierter Arten beitragen kann. Als Beispiel sei die Verdrängung der ursprünglichen Hummelarten in Schweden und die gleichzeitige Förderung von *B. terrestris* und *B. lapidarius*, sogenannte Super-Generalisten, angeführt. Diese Hummelarten profitieren von dem verringerten Anbau von Fabaceen, deren reichhaltiges Pollen- und Nektarangebot eine bedeutende Grundlage für vormals vorherrschende Hummelarten darstellte (Goulson *et al.* 2005; zitiert in Bommarco *et al.* 2012). Auch der Einsatz synthetischer Dünge- und Pflanzenschutzmittel ist hierbei in Betracht zu ziehen. Die optimale Anpassungsfähigkeit von Hummelarten an eine neue Flora wird durch die Faktoren Größe, Behaarung, Schnelligkeit, Lebensdauer, Lernvermögen, Flugradius, Kältetoleranz sowie saisonale Aktivität und Blütenstetigkeit beeinträchtigt (Batra 1995). Obwohl Dietkötter *et al.* (2014) eine vergleichbare Entwicklung der Artenzusammensetzung bei Hummeln durch den vermehrten Rapsanbau beschreibt, fördert ein reichhaltiges Angebot an Pollen und Nektar spendenden Pflanzen im Frühjahr andererseits auch solitär lebende Wildbienen (Holzschuh *et al.* 2013) und Wespen (Dietkötter *et al.* 2014). Nicht zuletzt hat auch das Angebot ausreichender Nistmöglichkeiten Einfluss auf die Förderung bzw. Ansiedlung von Wildbienen und anderer

Bestäuberinsekten. Bereits ab einer Distanz von einem Kilometer zwischen dem natürlichen Habitat und der blühenden Pflanze ist der Fruchtansatz um 16 % reduziert (Garibaldi *et al.* 2011). Die Förderung von nahegelegenen Ausgleichsflächen und Saumstrukturen stellt eine wichtige Maßnahme der heutigen Landwirtschaft dar.

### **3.4 Zulassung der Wirkstoffe Clothianidin, Imidacloprid und Thiamethoxam - Aktuelle Situation und Ausblick**

Vor dem Hintergrund, dass die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) im Rahmen einer wissenschaftlichen Risikobewertung zu den drei neonicotinoiden Wirkstoffen eine unzureichende Datenbasis für eine abschließende Betrachtung des Risikos gegenüber der Europäischen Honigbiene erkannte, erließ die EU-Kommission die „Durchführungsverordnung (EU) Nr. 485/2013 [...] vom 24. Mai 2013 zur Änderung der Durchführungsverordnung (EU) Nr. 540/2011 hinsichtlich der Bedingungen für die Genehmigung der Wirkstoffe Clothianidin, Thiamethoxam und Imidacloprid sowie des Verbots der Anwendung und des Verkaufs von Saatgut, das mit diese Wirkstoffe enthaltenden Pflanzenschutzmitteln behandelt wurde“ (*ABl EG Nr. L 139 v. 25.05.2013*). Im Zuge der Änderung dieser Durchführungsverordnung wurde die Anwendung der Wirkstoffe im Haus- und Kleingarten verboten und für den Erwerbsanbau mit zusätzlichen Anwendungsbestimmungen (NB501, NB502, NB503, NB504) eingeschränkt, um die Wirkstoffexposition gegenüber Honigbienen und anderen Blüten besuchenden Insekten auf ein Minimum zu reduzieren. Der zweijährige Zeitraum der Übergangsregelung, der für die Erarbeitung fehlender Daten von der EU-Kommission angesetzt wurde, läuft im Frühjahr 2015 aus.

Das Maßnahmenpaket der Europäischen Union zur nachhaltigen Nutzung von Pflanzenschutzmitteln sieht nach der Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 (*ABl EG Nr. L 309/1 v. 24.11.2009*) eine Neubewertung der zur Verwendung in Pflanzenschutzmitteln zugelassenen Wirkstoffe in regelmäßigen Zeitabständen vor. Diejenigen Wirkstoffe, deren Bewertungen diesen Kriterien nicht standhalten können und für die ausreichend Alternativen zur Verfügung stehen, bilden nach der Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 die Kategorie der zu ersetzenden Wirkstoffe, sogenannte „Substitutionskandidaten“ (Art. 24 Abs.; *ABl EG Nr. L 309/1 v. 24.11.2009*). Die für das Jahr 2015 zu erwartende Neubewertung der Wirkstoffe Clothianidin,

Imidacloprid und Thiamethoxam ist nicht als reguläre Neubewertung zu betrachten. Diese basiert auf aktuellen Erkenntnissen bezüglich negativer Effekte auf Nicht-Zielorganismen.

Gesetzt den Fall, dass die Auflagen zur Beschränkung der Wirkstoffanwendung bestehen bleiben oder ein Widerruf der Wirkstoffe als Folge der Neubewertung erteilt wird, sind aus Sicht der landwirtschaftlichen und gartenbaulichen Produktion Indikationslücken bei der Pflanzenschutzmittelzulassung zu erwarten, für die derzeit wenige Alternativen zur Verfügung stehen. Da die Forschung und Entwicklung neuer Wirkstoffe bis zur Annex I-Listung und Zulassung als Pflanzenschutzmittel viele Jahre dauert, werden voraussichtlich ältere Wirkstoffe, beispielsweise Dimethoat, wieder vermehrt zum Einsatz kommen, sofern neue Wirkstoffe wie zum Beispiel Cyazypyr (ISO Name: Cyantraniliprole, LD<sub>50</sub> oral: 0,39 µg a.s. Biene<sup>-1</sup>) in Deutschland noch nicht zur Saatgutbeizung bei Raps zugelassen sind. Zur Bekämpfung des Moosknopfkäfers *Atomaria linearis* Stephens steht für die Saatgutbeizung bei Futter- und Zuckerrüben zudem der Wirkstoff Tefluthrin (Pyrethroid) zur Verfügung.

Als Ausgleich für die ruhende Saatgutbehandlung wird voraussichtlich die nach der Pflanzenschutzmittelzulassung zur Verfügung stehende maximale Anzahl der Spritz- und Sprühanwendungen während der Kultur ausgeschöpft werden. Bei Raps wird dies wiederum eine höhere Belastung von Pollen und Nektar mit Pflanzenschutzmittelrückständen zur Konsequenz haben, die aufgrund der B4-Einstufung (bienenungefährlich) in die Blüte appliziert werden dürfen. Die Etablierung des Dropleg-Verfahrens zur Unterblüten-Behandlung in der landwirtschaftlichen Praxis stellt eine vielversprechende kulturtechnische Maßnahme im Sinne des Integrierten Pflanzenschutzes dar. Aus Sicht der Imkerei bedeutet dieses Verfahren, dass die Rückstandsbelastung in Pollen und Nektar reduziert ist und dadurch ein qualitativ hochwertiger Honig geerntet werden kann. Das Dropleg-Verfahren trägt somit dazu bei, das bestehende Spannungsfeld zwischen Landwirtschaft und Imkerei in Bezug auf das Thema Pflanzenschutz abzubauen.

Die eingeschränkte Anwendung der diskutierten Wirkstoffe stellt je nach Kultur und Schaderreger im Zusammenhang mit dem Resistenzmanagement eine Herausforderung für den Erwerbsanbau dar. Umso bedeutender wird die Umsetzung der in §2.2 PflSchG aufgeführten „biologische[n], biotechnische[n], pflanzenzüchterische[n] sowie anbau- und kulturtechnische[n] Maßnahmen“ des Integrierten Pflanzenschutzes, die sowohl Maßnahmen des Pflanzenbaues und der Pflanzenernährung als auch die Reduzierung der „Anwendung chemischer Pflanzenschutzmittel auf das notwendige Maß“ umfasst (*BGBI Teil I 2012 Nr. 7 v. 13.02.2012*).

---

## 4 Zusammenfassung

### 4.1 Zusammenfassung

Ein auf das notwendige Maß reduzierter Einsatz chemischer Pflanzenschutzmittel sowie eine durch die Einbeziehung geeigneter Applikationstechniken reduzierte Wirkstofffreisetzung zum Schutz von Mensch, Tier und Umwelt sind Ziele des Integrierten Pflanzenschutzes. Nach bisherigen Erkenntnissen stellte die Saatgutbeizung mit systemischen Wirkstoffen, zu denen Clothianidin, Imidacloprid und Thiamethoxam aus der Gruppe der Neonicotinoide zählen, ein entsprechendes Verfahren dar, von dem bislang kein Expositionsrisiko gegenüber Nicht-Zielorganismen angenommen wurde. Nachdem ein kausaler Zusammenhang zwischen dem bei der Aussaat von gebeiztem Maissaatgut entstandenen Beizmittelstaub und den akut-toxischen Bienenschäden im Rheintal im Frühjahr 2008 festgestellt worden war, ruht die Zulassung der Wirkstoffe zur Saatgutbeizung in Mais und Getreide seit 2008 in Deutschland. Für weitere Anwendungsgebiete steht die Anwendung der Wirkstoffe seit Mai 2013 entsprechend der Durchführungsverordnung (EU) Nr. 485/2013 eingeschränkt zur Verfügung.

Im Rahmen der Ursachenforschung der akuten Bienenschäden 2008 wurde die von Pflanzen periodisch abgesonderte Guttation im Zusammenhang mit der Saatgutbeizung als ein zusätzlicher Expositionspfad von Wirkstoffrückständen festgestellt und ein damit einhergehendes Risiko für Wasser sammelnde Honigbienen (*Apis mellifera* L.) aufgeworfen. Erste Versuche zur Freisetzung von Wirkstoffrückständen aus der Saatgutbeizung wurden in Mais (*Zea mays* L.) und *xTriticale* (*xTriticosecale* M.) durchgeführt (Reetz *et al.* 2011). Aufgrund der wirtschaftlichen Bedeutung für Imkerei und Landwirtschaft fokussierte sich das weitere Versuchswesen auf Winterraps (*Brassica napus* L.). Die vorliegende Forschungsarbeit basiert auf Versuchen unter Labor-, Halbfreiland- und Freiland-Bedingungen, wodurch die im Rahmen der Pflanzenschutzmittelzulassung festgesetzte Abfolge der aufeinander aufbauenden Teststufen zur Risikoabschätzung im Rahmen der Versuche umgesetzt worden sind.

Zunächst wurde unter Freilandbedingungen das Auftreten von Guttation in Mais und *xTriticale* im Verlauf einer und bei Winterraps über mehrere Vegetationsperioden beobachtet und der Verlauf der freigesetzten Wirkstoffkonzentrationen im Guttationswasser ermittelt. Das jeweils verwendete Saatgut wurde zuvor handelsüblich mit Neonicotinoiden gebeizt. Mittels der HPLC-MS-Analysen zeigte sich, dass die maximal freigesetzten Konzentrationen

---

aktiver Substanzen (a.s.) aus der Sattgutbeizung bei Winterraps mit bis zu 130 µg pro Liter deutlich unter denen von Mais (bis zu 8.000 µg a.s. L<sup>-1</sup>) und xTriticale (bis zu 1.300 µg a.s. L<sup>-1</sup>) liegen. Dies ist in unter anderem auf die geringere Pro-Korn-Aufwandmenge bei Winterraps zurückzuführen. Im Frühjahr, zum Zeitpunkt einer zunehmenden Populationsstärke eines Bienenvolkes, sind die von Winterraps freigesetzten Wirkstoffrückstände im Guttationswasser niedriger (~30 µg a.s. L<sup>-1</sup>) als im Herbst, was auf pflanzenphysiologische Prozesse während der Vernalisation zurückzuführen ist. Ein vergleichbarer Konzentrationsverlauf wurde für xTriticale als Winterkultur festgestellt, wohingegen die bei Mais (Sommerkultur) freigesetzten Konzentrationen deutlich höher sind und über einen langen Zeitraum auf diesem Konzentrationsniveau bleiben. In Laborversuchen (nach OECD-Richtlinie 213) zeigte die Fütterung einer Lösung aus gleichen Teilen Guttationswasser und Zucker an isolierte Einzelbienen, dass die in Guttation von Winterraps enthaltenen Wirkstoffrückstände bei Einzelbienen zu einer Mortalität von <20 % führen (Wallner *et al.* 2012); zur Einordnung dieser Erkenntnisse muss darauf hingewiesen werden, dass eine zuckerhaltige Lösung von Bienen verstoffwechselt wird, wohingegen Wasser aufgrund des geringen Zuckergehaltes lediglich transportiert wird und erst innerhalb des Bienenvolkes seine Verwendung findet. Somit ist die Situation während der Fütterungsversuche nicht der einer Wassersammlerin gleichzusetzen. Dieser Versuchsansatz diente einer Einschätzung der im Guttationswasser enthaltenen Wirkstoffrückstände hinsichtlich der Bientoxizität.

Aufgrund des großen Aktionsradius von Honigbienen sind gezielte Beobachtungen von Wassersammlerinnen im Freiland nicht möglich. Als methodischer Ansatz wurde daher die Rückstandsanalyse von Honigblasen heimkehrender Sammlerinnen mittels einer neuen Methode herangezogen (Reetz und Wallner 2014). Die Methode zur Präparation von Honigblasen eignet sich für Einzel- sowie Sammelproben und konnte bereits erfolgreich in der Rückstandsanalytik von Bienenproben etabliert werden. Es zeigte sich, dass das Gewicht der einzelnen Honigblasen im Herbst niedriger ist, wenn die Maximalkonzentrationen im Guttationswasser bei Winterraps auftreten. Dennoch ist zu dieser Jahreszeit der Anteil des eingetragenen Wassers im Verhältnis zu Nektar um das 25-fache erhöht, was mit den zunehmend im Herbst ausbleibenden Nektarquellen zusammenhängt (Reetz *et al.* 2012). Anhand der Untersuchungen zum Wassersammelverhalt von Honigbienen während einzelner Tage im Herbst konnte nachgewiesen werden, dass die Wassersammelaktivität bei den hiesigen Klimabedingungen über den Tag hinweg erfolgt und somit eine zeitliche und räumliche Überschneidung zwischen dem Auftreten von Guttationswasser und der Sammel-

---

aktivität von Honigbienen unter feldrealistischen Bedingungen standortspezifisch gegeben ist. Während des Sommers bzw. zu Zeiten eines reichhaltigen Nektarangebotes stellt Nektar ein übergeordnetes Sammelgut dar, welcher ebenfalls in einem gewissen Umfang Flüssigkeit für ein Bienenvolk liefert; reines Wasser wird dennoch in geringeren Mengen eingetragen. Somit besteht in dieser Jahreszeit in Bezug auf kontaminiertes Guttationswasser von Winterraps ein geringeres Risiko für Stoffeinträge.

Dass Guttation in Winterraps von Honigbienen als Wasserquelle angenommen wird, zeigten bereits gelegentliche Beobachtungen auf Flächen einer kleinstrukturierten Landschaft und kleinparzellierten Landwirtschaft. Hingegen führt eine unmittelbare Exposition von Bienen gegenüber gebeizten Winterrapsschlägen in Regionen intensiver Landwirtschaft und einer damit einhergehenden reduzierten Vielfalt an Wasserquellen zu einer höheren Frequenz, mit der Bienen in Stocknähe Guttationswasser sammeln. Dadurch kommt es auch zu einem Eintrag von Wirkstoffrückständen über das Guttationswasser in die Bienenvölker. Dies zeigte sich anhand der HPLC-MS-Analyse von Honigblasen heimkehrender Sammlerinnen (n= 204) aus Versuchen, die in einer Region mit intensiver Landwirtschaft durchgeführt wurden (Reetz *et al.* 2015 *akzeptiert*). In 19 % (n= 38) der analysierten Honigblasen wurde Thiamethoxam, die Ausgangssubstanz der verwendeten Saatgutbeizung, in Konzentrationen von 0,3 bis 0,95 µg pro Liter (LOQ= 0,3 µg L<sup>-1</sup>) detektiert. In weiteren 12 % der Proben (n= 24) wurde Thiamethoxam unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ) festgestellt. Die Substanz Clothianidin, Metabolit von Thiamethoxam, sowie dessen Metabolit TZMU konnten jeweils in einer Probe (0,5 %) festgestellt werden, wobei die Konzentrationen unterhalb der Bestimmungs- (Clothianidin) bzw. Nachweisgrenze (TZMU) waren. Anhand dieser Untersuchungen kann eine aktive Aufnahme des Guttationswassers von gebeiztem Winterraps durch Wasser sammelnde Honigbienen belegt werden. Anhand der zugrunde liegenden Versuche konnte aufgezeigt werden, dass Guttation bei fehlenden Alternativen für Wasser sammelnde Honigbiene eine Wasserquelle darstellt. Die während der jüngsten Entwicklungsstadien des Winterrapses über das Guttationswasser freigesetzten Wirkstoffrückstände können nach theoretischen Berechnungen für einzelne Wasser sammelnde Honigbienen ein Risiko darstellen. Im Vergleich zu den im Guttationswasser gemessenen Wirkstoffkonzentrationen geht von den gemessenen Konzentrationen in den Honigblasen keine akut toxische Gefährdung für einzelne Bienen bzw. auf Populationsebene aus. Die bislang im Honigblaseninhalt ermittelten Konzentrationen an Wirkstoffrückständen (<1 µg L<sup>-1</sup> ≙ <1 ppb) liegen unterhalb der Konzentrationen, die bislang als Grenzwerte einer chronischen Exposition für

---

sublethale Effekte bei Honigbienen beschrieben wurden (2-5 ppb; Sandrock *et al.* 2014, Dively *et al.* 2015). Da Guttation bei *xTriticale* und Winterraps nur temporär auftritt, ist eine dauerhaft chronische Exposition von Honigbienen gegenüber dem Guttationswasser dieser bislang gebeizten Kulturen nicht gegeben. Dem gegenüber stellt Mais neben den Guttations-tropfen auch das in den Fahnenblättern zusammengelaufene Guttationswasser über einen längeren Zeitraum des Tages zur Verfügung. Hinzu kommt, dass ein Bienenvolk im Herbst zum Zeitpunkt der Maximalkonzentrationen von *xTriticale* und Winterraps einen geringen Bedarf an Wasser hat (ausgenommen den Fall, dass die Winterauffütterung mittels Zuckerteig erfolgt), wohingegen Guttation bei Mais zu einem Zeitpunkt auftritt, an dem die Populationsstärke und damit einhergehend der Wasserbedarf eines Bienenvolkes zunimmt.

Die aktuelle Debatte zur Evaluierung von Nebenwirkungen auf Nicht-Zielorganismen durch die chronische oder sublethale Exposition gegenüber Wirkstoffrückständen zeigt darüberhinaus den Bedarf an spezifischen Versuchsdesigns auf.

## 4.2 Summary

A crucial aim of an Integrated Pest Management (IPM) is to minimize the risk to human health and the environment. Therefore, the release of active substances (a.s.) of pesticides into the environment has to be reduced to a level that fulfill both, an effective control of the respective pest and sufficient economic benefit. Up to now, the seed coating with systemic substances like the neonicotinoids clothianidin, imidacloprid, and thiamethoxam was considered environmental justifiable, due to the significant reduction of active substances in the contaminated area compared to other application methods. During the registration process of these systemic compounds, no side effects on non-target organisms such as honey bees were considered. In 2008, sowings with neonicotinoid-coated corn has caused severe damages by contaminated dust on honey bee colonies in the upper Rhine Valley, Germany. As a consequence, the seed coating with neonicotinoids in maize and wheat was suspended in Germany in May 2008. Since May 2013 there is a temporary ban of the three neonicotinoids in the EU by the EU Regulation No. 485/2013.

The release of systemic active substances in guttation fluid of seed-coated plants represents a possible contamination source for non-target organisms and could actively be used as a water source by honey bees (*Apis mellifera* L.). First experiments on the release of active substances in guttation fluid of seed-coated plants have been conducted in maize (*Zea mays*

---

L.) and *xTriticale* (*xTriticosecale* M.) (Reetz *et al.* 2011). Due to the fact that winter oilseed rape (WOR, *Brassica napus* L.) is one of the main pollen and nectar sources for honey bees in spring this research was focused on the analysis of guttation fluid in seed-coated WOR and the possible risk for honey bees foraging on WOR guttation water. For this purpose experiments were conducted in the laboratory as well as under semi-field- and field-conditions.

In the first step, the occurrence of guttation was examined under field conditions during one cultivation period in maize and *xtriticale* and during several periods in WOR. For the field trials, WOR seeds with commonly available seed coatings were used to obtain data under the common agricultural practices. The residual analysis of guttation fluid from seed-coated WOR confirmed considerable amounts of active substances mainly in autumn (up to 130  $\mu\text{g a.s. L}^{-1}$ ), however even the highest concentrations of residues in WOR are considerably lower than those in the guttation fluid of maize (up to 8,000  $\mu\text{g a.s. L}^{-1}$ ; Reetz *et al.* 2011) or *xtriticale* (up to 1,300  $\mu\text{g a.s. L}^{-1}$ ). These differences might be due to the crop specific differences in the maximum amount of active substance per seed. In spring, the released residues in WOR guttation fluid are lower than in early autumn ( $\sim 30 \mu\text{g a.s. L}^{-1}$ ) and continue to decline steadily until flowering. This decrease of residues in guttation fluid of WOR and even so in *xtriticale* as wintering crops seems to be a consequence of specific physiological processes during the overwintering of the plants (vernalisation). Considerable high amounts of residues have been released by maize (spring crop) over a long period of the crop cycle. Laboratory investigations (according to OECD-Guideline 213) showed that feeding of isolated honey bees with a sugar/guttation-solution from seed-coated WOR leads to a mortality less than 20 % (Wallner *et al.* 2012), but this way of exposure is not similar to the situation of water foraging honey bees; however these approaches cannot be extrapolated to water foraging bees under field conditions which just carry the guttation water in the honey sac and do not metabolize the fluid.

Due to the wide foraging radius of honey bees, the observations and the direct sampling of water foraging honey bees in the field are nearly impossible. Therefore, a new approach by separating foragers returning to the hive into nectar- and water collecting bees was used. For this purpose, a newly developed technique for the preparation of the honey sacs was performed (Reetz and Wallner 2014), which enables the preparation of single or pooled honey-sac contents. This technique has already been established as a laboratory standard. These experiments showed that on the one side the weight of honey sacs is lower during

---

autumn at the same time when high residues in guttation fluid of seed-coated WOR occur that in summer, and on the other side, that the intake of water is increased by the factor of 25 compared to the amount of nectar, which seems to be associated with the absence of nectar sources during autumn (Reetz *et al.* 2012). There seems to be no exclusive season- or daytime-depending water collecting activity in honey bee colonies in temperate zones. Therefore, the collection of guttation fluid from seed-coated plants by foraging honey bees is likely. However, during summer and the periods of high nectar flows honey bees might gather rather runny nectar as a replacement for water than guttation fluid of WOR and therefore reduce the risk of toxic contaminations.

The comparison of two study sites - one in Southern Germany with a small-patterned landscape including agriculture and one in Northern Germany with an intensive agricultural land-use - confirmed that honey bees gathering on WOR guttation fluid were just occasionally observed in a small-patterned landscape, but more frequently in the field site with intensive agriculture and a reduced variety of alternative water sources. This leads to the assumption, that the likelihood of residue intake by guttation fluid of seed-coated plants is increased in landscapes with more agricultural land-use and a reduced variety of water sources. HPLC-MS-analysis of honey sacs (n= 204) reveal that residues of thiamethoxam used as seed coating are detectable in 19 % (n= 38) of the honey-sac contents with a range of 0.3 to 0.95 µg a.s. per litre (LOQ= 0.3 µg a.s. L<sup>-1</sup>; Reetz *et al.* 2015 *accepted*). In 12 % (n= 24) of the samples, thiamethoxam could be detected in concentrations below LOQ. Clothianidin, metabolite of thiamethoxam, and its metabolite TZMU were measured in one sample each (0.5 %) at concentrations below LOQ (clothianidin) and LOD (TZMU), respectively. Based on these experiments, it has been proven that honey bees use guttation fluid of seed-coated WOR as water source in absence of alternative nearby water sources. Thus, during a short period of about a few weeks in autumn, when the highest residues are released in WOR guttation fluid, there might theoretically be a risk for single honey bees. Guttation fluid of xtriticale and WOR is just temporary present in the field, whereas guttation of maize is present in the leaf sheaths during the day due to the funnel function of the maize leaves. Additionally to these facts, there is a low water demand in honeybee colonies during autumn (except when honey bee colonies are fed with sugar paste for overwintering) in contrast to the occurrence of maize guttation, which occurs at the same time when honey bee colonies raise and have an increasing demand of water.

---

The current evaluation of short-term effects of chronic exposure to sublethal concentrations of neonicotinoids in pollen on honey bees at colony level is based on the application of higher residue concentrations (2-5 ppb clothianidin; Sandrock *et al.* 2014, Dively *et al.* 2015) than detected in the honey-sac contents of the water foraging honey bees in this experiment ( $< 1 \mu\text{g a.s. L}^{-1} \triangleq < 1 \text{ ppb}$ ). Based on these threshold values for side effects by chronic feeding of neonicotinoids, the concentrations of residues measured in the honey sacs of water foraging honey bees seem to have still less potential for side effects on single honey bees or on colony level. Pollen and nectar are consumed more frequently by honey bees and brood than water. Therefore, field-realistic residues in pollen and nectar are more likely to affect honey bees. Moreover, there is no permanent exposition of honey bees to guttation in seed-coated WOR like to contamination in pollen or nectar.

The current discussion on the risk assessment of neonicotinoids to honey bees is already extended on other non-target organisms. Furthermore, the debate reveals an essential demand for specific experimental designs to assess side effects on beneficial insects caused by exposure to chronic or sublethal concentrations of pesticides.

---

## Literaturverzeichnis

- Allan E, Bossdorf O, Dormann CF, Prati D, Gossner MM, Tschardt T, Blüthgen N, Bellach M, Birkhofer K, Boch S, Böhm S, Börschig C, Chatzinotas A, Christ S, Daniel R, Diekötter T, Fischer C, Friedl T, Glaser K, Hallmann C, Hodac L, Hölzel N, Jung K, Klein A-M, Klaus VH, Kleinebecker T, Krauss J, Lange M, Morris EK, Müller J, Nacke H, Pašalić E, Rillig MC, Rothenwöhrer C, Schally P, Scherber C, Schulze W, Socher SA, Steckel J, Steffan-Dewenter I, Türke M, Weiner CN, Werner M, Westphal C, Wolters V, Wubet T, Gockel S, Gorke M, Hemp A, Renner SC, Schöning I, Pfeiffer S, König-Ries B, Buscot F, Linsenmair KE, Schulze E-D, Weisser WW und Fischer M, Interannual variation in land-use intensity enhances grassland multidiversity. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**:308-313 (2014).
- Alaux C, Brunet JL, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchan S, Cousin M, Brillard J, Baldy A, Belzunces LP und Le Conte Y, Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ Microbiol* **12**:774-782 (2010).
- Albrecht M, Schmid B, Hautier Y und Müller CB, Diverse pollinator communities enhance plant reproductive success. *Proc R Soc B* **279**:4845-4852 (2012).
- Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften (ABl EG) Nr. L 309/1 v. 24.11.2009 zur Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 21. Oktober 2009 über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln und zur Aufhebung der Richtlinien 79/117/EWG und 91/414/EWG des Rates. [online] <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX:32009R1107> [Stand 19.04.2015].
- Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften (ABl EG) Nr. L 309/71 v. 24.11.2009 zur Richtlinie 2009/128/EG des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 21. Oktober 2009 über einen Aktionsrahmen der Gemeinschaft für die nachhaltige Verwendung von Pestiziden. [online] <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/HTML/?uri=CELEX:32009L0128&rid=2> [Stand 19.04.2015].
- Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften (ABl EG) Nr. L 139 v. 25.05.2013 zur Durchführungsverordnung (EU) Nr. 485/2013 der Kommission vom 24. Mai 2013 zur Änderung der Durchführungsverordnung (EU) Nr. 540/2011 hinsichtlich der Bedingungen für die Genehmigung der Wirkstoffe Clothianidin, Thiamethoxam und Imidacloprid sowie des Verbots der Anwendung und des Verkaufs von Saatgut, das mit diese Wirkstoffe

- enthaltenden Pflanzenschutzmitteln behandelt wurde. [online] <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=OJ:L:2013:139:TOC> [Stand 19.04.2015].
- Anhalt JC, Moorman TB und Koskinen WC, Biodegradation of imidacloprid by an isolated soil microorganism. *J Environ Sci Health, Part B* **42**:509-514 (2007).
- Batra SWT, Bees and pollination in our changing environment. *Apidologie* **26**:361-370 (1995).
- BBCH Monograph, Growth stages of mono- and dicotyledonous plants, 2. Aufl., ed. by Meier U, Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Berlin und Braunschweig, Germany, S. 29-33 (2001).
- Becher MA, Scharpenberg H und Moritz RFA, Pupal developmental temperature and behavioral specialization of honeybee workers (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A* **195**:673-679 (2009).
- Biesmeijer JC, Roberts SPM, Reemer M, Ohlemüller R, Edwards M, Peeters T, Schaffers AP, Potts SG, Kleukers R, Thomas CD, Settele J und Kunin WE, Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* **313**:351-354 (2006).
- Bommarco R, Lundin O, Smith HG und Rundlöf M, Drastic historic shifts in bumble-bee community composition in Sweden. *Proc R Soc B* **279**:309-315 (2012).
- Bortolotti L, Sabatini AG, Mutinelli F, Astuti M, Lavazza A, Piro R, Tesoriero D, Medrzycki P, Sgolastra F und Porrini C, Spring honey bee losses in Italy. In: 10<sup>th</sup> International Symposium of the ICP-Bee Protection Group, 08.-10.10.2008, Bucharest, Romania. *Julius-Kühn-Archiv* **423**:148-152 (2009).
- Breeze TD, Vaissière BE, Bommarco R, Petanidou T, Seraphides N, Kozák L, Scheper J, Biesmeijer JC, Kleijn D, Gyldenkerne S, Moretti M, Holzschuh A, Steffan-Dewenter I, Stout JC, Pärtel M, Zobel M und Potts SG, Agricultural policies exacerbate honeybee pollination service supply-demand mismatches across Europe. *PLoS ONE* **9**:e82996 (2014).
- Brittain C, Williams N, Kremen C und Klein A-M, Synergistic effects of non-*Apis* bees and honey bees for pollination services. *Proc R Soc B* **280**:20122767 (2013).
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), Fachmeldung vom 12.07.2013: Änderungen bei Pflanzenschutzmitteln mit neonicotinoiden Wirkstoffen. [online] [http://www.bvl.bund.de/DE/04\\_Pflanzenschutzmittel/05\\_Fachmeldungen/2013/2013\\_07\\_12\\_Fa\\_Aenderung\\_Neonicotinoide.html?nn=1400938](http://www.bvl.bund.de/DE/04_Pflanzenschutzmittel/05_Fachmeldungen/2013/2013_07_12_Fa_Aenderung_Neonicotinoide.html?nn=1400938) [Stand 19.04.2015].

- 
- Bundesanzeiger (BAnz AT) vom 15.05.2013 B1 zur Bekanntmachung des Nationalen Aktionsplans zur nachhaltigen Anwendung von Pflanzenschutzmitteln vom 10.04.2013 durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV). [online] [https://www.bundesanzeiger.de/ebanzwww/wexsservlet?session.sessionid=b60126c38646ac57cd43879bef67be48&page.navid=detailsearchlisttodetailsearchdetail&fts\\_search\\_list.selected=f2ef164669da9259&fts\\_search\\_list.destHistoryId=59381](https://www.bundesanzeiger.de/ebanzwww/wexsservlet?session.sessionid=b60126c38646ac57cd43879bef67be48&page.navid=detailsearchlisttodetailsearchdetail&fts_search_list.selected=f2ef164669da9259&fts_search_list.destHistoryId=59381) [Stand 19.04.2015].
- Bundesgesetzblatt (BGBl) Teil I 2012 Nr. 7 vom 13.02.2012 Gesetz zur Neuordnung des Pflanzenschutzrechtes. [online] [http://www.bgbl.de/banzxaver/bgbl/start.xav?start=//\\*\[@attr\\_id=%27bgbl113002.pdf%27\]#\\_\\_bgbl\\_\\_%2F%2F\\*\[%40attr\\_id%3D'bgbl112s0148.pdf'\]\\_\\_1429694553068](http://www.bgbl.de/banzxaver/bgbl/start.xav?start=//*[@attr_id=%27bgbl113002.pdf%27]#__bgbl__%2F%2F*[%40attr_id%3D'bgbl112s0148.pdf']__1429694553068) [Stand 19.04.2015].
- Butler CG, The choice of drinking water by the honeybee. *J exp Biol* **17**:253-261 (1940).
- Byrne A und Fitzpatrick Ú, Bee conservation policy at the global, regional and national levels. *Apidologie* **40**:194-210 (2009).
- Cameron SA, Lozier JD, Strange JP, Koch JB, Cordes N, Solter LF und Griswold TL, Patterns of widespread decline in North American bumble bees. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**:662-667 (2011).
- Carvalho LG, Seymour CL, Veldtman R und Nicolson SW, Pollination services decline with distance from natural habitat even in biodiversity-rich areas. *J Appl Ecol* **47**:810-820 (2010).
- Casaulta G, Krieg J und Spiess W, Der Schweizerische Bienenvater - Fachbuch für Imker. Bd. 4: Bienenprodukte und Apitherapie, ed. By Matzke A, Lehnerr M, 17., neue Aufl., *Fachschriftenverlag VDRB*, S. 8 (2001).
- Chen T, Dai Y-J, Ding J-F, Yuan S und Ni J-P, N-demethylation of neonicotinoid insecticide acetamiprid by bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* CGMCC 1.1788. *Biodegradation* **19**:651-658 (2008).
- Cox L, Koskinen WC und Yen PY, Sorption-desorption of imidacloprid and its metabolites in soils. *J Agric Food Chem* **45**:1468-1472 (1997).
- Curtis LC, The exudation of glutamine from lawn grass. *Plant Physiol* **19**:1-5 (1944).
- Cutler GC und Scott-Dupree CD, Exposure to clothianidin seed-treated canola has no long-term impact on honey bees. *J Econ Entomol* **100**:765-772 (2007).
- Cutler GC, Scott-Dupree CD, Sultan M, McFarlane AD und Brewer L, A large-scale field study examining effects of exposure to clothianidin seed-treated canola on honey bee colony health, development, and overwintering success. *PeerJ* **2**:e652 (2014).

- 
- Dai Y-J, Yuan S, Ge F, Chen T, Xu S-C und Ni J-P, Microbial hydroxylation of imidacloprid for the synthesis of highly insecticidal olefin imidacloprid. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**:927-934 (2006).
- Decourtye A, Devillers J, Genecque E, Le Menach K, Budzinski H, Cluzeau S und Pham-Delègue M-H, Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Arch Environ Contam Toxicol* **48**:242-250 (2005).
- Desneux N, Decourtye A und Delpuech J-M, The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol* **52**:81-106 (2007).
- Diefflenbach H, Kramer D und Lüttge U, Release of guttation fluid from passive hydathodes of intact barley plants. I. Structural and cytological aspects. *Ann Bot* **45**:397-401 (1980).
- Diefflenbach H, Lüttge U und Pitman G, Release of guttation fluid from passive hydathodes of intact barley plants. II. The effects of abscisic acid and cytokinins. *Ann Bot* **45**:703-712 (1980 a).
- Dietkötter T und Crist TO, Quantifying habitat-specific contributions to insect diversity in agricultural mosaic landscapes. *Insect Conserv Diver* **6**:607-618 (2013).
- Dietkötter T, Peter F, Jauker B, Wolters V und Jauker F, Mass-flowering crops increase richness of cavity-nesting bees and wasps in modern agro-ecosystems. *GCB Bioenergy* **6**:219-226 (2014).
- Di Prisco G, Cavaliere V, Annoscia D, Varricchio P, Caprio E, Nazzi F, Gargiulo G und Pennacchio F, Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**:18466-18471 (2013).
- Dively GP und Kamel A, Insecticide residues in pollen and nectar of a cucurbit crop and their potential exposure to pollinators. *J Agric Food Chem* **60**:4449-4456 (2012).
- Dively GP, Embrey MS, Kamel A, Hawthorne DJ und Pettis JS, Assessment of chronic sublethal effects of imidacloprid on honey bee colony health. *PLoS ONE* **10**(3):e0118748 (2015).
- Easton AH und Goulson D, The neonicotinoid insecticide imidacloprid repels pollinating flies and beetles at field-realistic concentrations. *PLoS ONE* **8**:e54819 (2013).
- Elbert A, Haas M, Springer B, Thielert W und Nauen R, Mini-review: Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Manage Sci* **64**:1099-1105 (2008).

- 
- Engel H und Heimann M, Weitere Untersuchungen über periodische Guttation. *Planta* **37**:437-450 (1949).
- European Food Safety Authority Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance clothianidin. *EFSA Journal* **11**:3066, S. 58 ff. (2013).
- European Food Safety Authority Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance thiamethoxam. *EFSA Journal* **11**:3067, S. 68 ff. (2013 a).
- European Food Safety Authority Panel on plant protection products and their residues scientific opinion on the developmental neurotoxicity potential of acetamiprid and imidacloprid. *EFSA Journal* **11**:3471, S. 47 ff. (2013 b).
- Fischer J, Müller T, Spatz A-K, Greggers U, Grünewald B und Menzel R, Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. *PLoS ONE* **9**:e91364 (2014).
- Forster R, Bee poisoning caused by insecticidal seed treatment of maize in Germany in 2008. In: 10<sup>th</sup> International Symposium of the ICP-Bee Protection Group, 08.-10.10.2008, Bucharest, Romania. *Julius-Kühn-Archiv* **423**:126-131 (2009).
- Fürst MA, McMahon DP, Osborne JL, Paxton RJ und Brown MJF, Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators. *Nature* **506**:364-366 (2014).
- Gallai N, Salles J-M, Settele J und Vaissière BE, Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol Econ* **68**:810-821 (2009).
- Garibaldi LA, Aizen MA, Cunningham SA und Klein A-M, Pollinator shortage and global crop yield: Looking at the whole spectrum of pollinator dependency. *Commun Integr Biol* **2**:37-39 (2009).
- Garibaldi LA, Steffan-Dewenter I, Kremen C, Morales JM, Bommarco R, Cunningham SA, Carvalheiro LG, Chacoff NP, Dudenhöffer JH, Greenleaf S, Holzschuh A, Isaacs R, Krewenka K, Mandelik Y, Mayfield M, Morandin LA, Potts SG, Ricketts TH, Szentgyörgyi H, Viana BF, Westphal C, Winfree C und Klein A-M, Stability of pollination services decreases with isolation from natural areas despite honey bee visits. *Ecology Lett* **14**:1062-1072 (2011).
- Garibaldi LA, Steffan-Dewenter I, Winfree R, Aizen MA, Bommarco R, Cunningham SA, Kremen C, Carvalheiro LG, Harder LD, Afik O, Bartomeus I, Benjamin F, Boreux V,

- 
- Cariveau D, Chacoff NP, Dudenhöffer JH, Freitas BM, Ghazoul J, Greenleaf S, Hipólito J, Holzschuh A, Howlett B, Isaacs R, Javorek SK, Kennedy CM, Krewenka KM, Krishnan S, Mandelik Y, Mayfield MM, Motzke I, Munyuli T, Nault BA, Otieno M, Petersen J, Pisanty G, Potts SG, Rader R, Ricketts TH, Rundlöf M, Seymour CL, Schüepp C, Szentgyörgyi H, Taki H, Tschardt T, Vergara CH, Viana BF, Wanger TC, Westphal C, Williams N und Klein A-M, Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science* **339**:1608-1611 (2013).
- Garratt MPD, Coston DJ, Truslove CL, Lappage MG, Polce C, Dean R, Biesmeijer JC und Potts SG, The identity of crop pollinators helps target conservation for improved ecosystem services. *Biol Cons* **169**:128-135 (2014 a).
- Garratt MPD, Breeze TD, Jenner N, Polce C, Biesmeijer JC und Potts SG, Avoiding a bad apple: Insect pollination enhances fruit quality and economic value. *Agric Ecosyst Environ* **184**:34-40 (2014 b).
- Gary NE und Lorenzen K, A method for collecting the honey-sac contents from honeybees. *J Apic Res* **15**:73-79 (1976).
- Ghazoul J, Buzziness as usual? Questioning the global pollination crisis. *Ecol Evol* **20**:367-373 (2005).
- Gill RJ, Ramos-Rodriguez O und Raine NE, Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature* **491**:105-109 (2012).
- Girolami V, Mazzon L, Squartini A, Mori N, Marzaro M, Di Bernardo A, Greatti M, Giorio C und Tappararo A, Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees. *J Econ Entomol* **102**:1808-1815 (2009).
- Goatley JL und Lewis RW, Composition of guttation fluid from rye, wheat and barley seedlings. *Plant Physiol* **41**:373-375 (1966).
- Goulson D, Lye GC und Darvill B, Decline and conservation of bumble bees. *Annu Rev Entomol* **53**:191-208 (2008).
- Goulson D, Neonicotinoids impact bumblebee colony fitness in the field; a reanalysis of the UK's Food & Environment Research Agency 2012 experiment. *PeerJ* **3**:e854 (2015).
- Greatti M, Sabatini AG, Barbattini R, Rossi S und Stravisi A, Risk of environmental contamination by the active ingredient imidacloprid used for corn seed dressing. Preliminary results. *B Insectol* **56**:69-72 (2003).

- 
- Greatti M, Barbattini R, Stravisi A, Sabatini AG und Rossi S, Presence of the a.i. imidacloprid on vegetation near corn fields sown with Gaucho<sup>®</sup> dressed seeds. *B Insectol* **59**:99-103 (2006).
- Greenpeace, Studie vom 15.04.2014: Giftiger Garten Eden - Eine Analyse der bienenschädlichen Pestizide in Gartenpflanzen auf dem europäischen Markt [online] <http://www.greenpeace.de/files/publications/20140424-giftiger-garten-eden-zusammenfassung.pdf> [Stand 19.04.2015].
- Halm M-P, Rortais A, Arnold G, Taséi JN und Rault S, New risk assessment approach for systemic insecticides: The case of honey bees and imidacloprid (Gaucho). *Environ Sci Technol* **40**:2448-2454 (2006).
- Harries RI, Guttation - the basis of an assay for evaluating formulation behaviour in vivo. *Pestic Sci* **55**:582-584 (1999).
- Häusermann E und Frey-Wyssling A, Phosphatase-Aktivität in Hydathoden. *Protoplasma* **57**:371-380 (1962).
- Heimann M, Einfluss periodischer Beleuchtung auf die Guttationsrhythmik. (Untersuchungen an *Kalanchoë blossfeldiana*). *Planta* **38**:157-195 (1950).
- Henry M, Béguin M, Requier F, Rollin O, Odoux J-F, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S und Decourtye A, A Common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* **336**:348-350 (2012).
- Hernandez JL, Frankie GW und Thorp RW, Ecology of urban bees: A review of current knowledge and directions for future study. *Cities Environ* **2**:1-15 (2009).
- Holzschuh A, Dudenhöffer J-H und Tschardt T, Landscapes with wild bee habitats enhance pollination, fruit set and yield of sweet cherry. *Biol Conserv* **153**:101-107 (2012).
- Höhn K, Beziehungen zwischen Blutung und Guttation bei *Zea mays*. *Planta* **39**:65-74 (1951).
- Hughes RN und Brimblecombe P, Dew and guttation: formation and environmental significance. *Agric For Meteorol* **67**:173-190 (1994).
- Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT und Roe RM, Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Prot* **23**:371-378 (2003).
- Jauker F, Bondarenko B, Becker HC und Steffan-Dewenter I, Pollination efficiency of wild bees and hoverflies provided to oilseed rape. *Agric Forest Entomol* **14**:81-87 (2012).
- Jeschke P und Nauen R, Review: Neonicotinoids - from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Manage Sci* **64**:1084-1098 (2008).

- 
- Joachimsmeier I, Schenke D, Pistorius J und Heimbach U, Guttation - Nicht alles was glänzt ist Tau - ein „neuer“ Expositionsweg von systemischen Pflanzenschutzmitteln auf Honigbienen? *Julius-Kühn-Archiv* **424**:30-31 (2009).
- Joachimsmeier IP, Schenke D, Heimbach U und Pistorius J, Comparison of residues of Clothianidin in guttation droplets after seed treatment respectively granular application. In: 57<sup>th</sup> Deutsche Pflanzenschutztagung "Gesunde Pflanze - gesunder Mensch", 06.-09.09.2010, Humboldt-Universität Berlin, Germany. *Julius-Kühn-Archiv* **428**:467-468 (2010 a).
- Joachimsmeier I, Heimbach U, Schenke D und Pistorius J, Residues of different systemic neonicotinoids in guttation droplets of oil seed rape in a field study. In: 57<sup>th</sup> Deutsche Pflanzenschutztagung "Gesunde Pflanze - gesunder Mensch", 06.-09.09.2010, Humboldt-Universität Berlin, Germany. *Julius-Kühn-Archiv* **428**:468-469 (2010 b).
- Joachimsmeier I, Pistorius J, Heimbach U, Schenke D, Kirchner W und Zwerger P, Frequency and intensity of guttation events in different crops in Germany. In: 11<sup>th</sup> International Symposium of the ICP-BR Bee Protection Group, 02.-04.11.2011, Wageningen, Netherlands. *Julius-Kühn-Archiv* **437**:87-90 (2012 a).
- Joachimsmeier I, Pistorius J, Schenke D und Kirchner W, Guttation and risk for honey bee colonies (*Apis mellifera* L.): Use of guttation drops by honey bees after migration of colonies - a field study. In: 11<sup>th</sup> International Symposium of the ICP-BR Bee Protection Group, 02.-04.11.2011, Wageningen, Netherlands. *Julius-Kühn-Archiv* **437**:76-79 (2012 b).
- Johnson JD und Pettis JS, A survey of imidacloprid levels in water sources potentially frequented by honeybees (*Apis mellifera*) in the Eastern USA. *Water Air Soil Pollut* **225**:2127 (2014).
- Kessler SC, Tiedeken EJ, Simcock KL, Derveau S, Mitchell J, Softley S, Stout JC und Wright GA, Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. *Nature* **521**:74-76 (2015).
- Kiechle H, Die soziale Regulation der Wassersammeltätigkeit im Bienenstaat und deren physiologische Grundlage. *J Comp Physiol A* **45**:154-192 (1961).
- Klein A-M, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C und Tschamtko T, Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc R Soc B* **274**:303-313 (2007).

- 
- Kubik M, Nowacki J, Pidek A, Warakomska Z, Michalczyk L und Goszczyński W, Pesticide residues in bee products collected from cherry trees protected during blooming period with contact and systemic fungicides. *Apidologie* **30**:521-532 (1999).
- Kubik M, Nowacki J, Pidek A, Warakomska Z, Michalczyk L, Goszczyński W und Dwuzpnik B, Residues of captan (contact) and difenoconazole (systemic) fungicides in bee products from an apple orchard. *Apidologie* **31**:531-541 (2000).
- Kühnholz S und Seeley TD, The control of water collection in honey bee colonies. *Behav Ecol Sociobiol* **41**:407-422 (1997).
- Larson JL, Redmond CT und Potter DA, Assessing insecticide hazard to bumble bees foraging on flowering weeds in treated lawns. *PLoS ONE* **8**:e66375 (2013).
- Laycock I, Lenthall KM, Barratt AT und Cresswell JE, Effects of imidacloprid, a neonicotinoid pesticide, on reproduction in worker bumble bees (*Bombus terrestris*). *Ecotoxicology* **21**:1937-1945 (2012).
- Laycock I und Cresswell JE, Repression and recuperation of brood production in *Bombus terrestris* bumble bees exposed to a pulse of the neonicotinoid pesticide imidacloprid. *PLoS ONE* **8**:e79872 (2013).
- Leonhardt SD, Gallai N, Garibaldi LA, Kuhlmann M und Klein A-M, Economic gain, stability of pollination and bee diversity decrease from southern to northern Europe. *Basic Appl Ecol* **14**:461-471 (2013).
- Lindauer M, Temperaturregulierung und Wasserhaushalt im Bienenstaat, *J Comp Physiol A* **36**:391-432 (1954).
- Liu MY, Lanford J und Casida JE, Relevance of [<sup>3</sup>H]imidacloprid binding site in house fly head acetylcholine receptor to insecticidal activity of 2-nitromethylene- and 2-nitroiminoimidazolidines. *Pestic Biochem Physiol* **46**:200-206 (1993).
- Liu Z, Dai Y, Huang G, Gu Y, Ni J, Wei H und Yuana S, Soil microbial degradation of neonicotinoid insecticides imidacloprid, acetamiprid, thiacloprid and imidaclothiz and its effect on the persistence of bioefficacy against horsebean aphid *Aphis craccivora* Koch after soil application. *Pest Manag Sci* **67**:1245-1252 (2011).
- Maienfish P, Angst M, Brandl F, Fischer W, Hofen D, Kayser H, Kobel W, Rindlisbacher A, Senn R, Steinemann A und Widmer H, Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid. *Pest Manage Sci* **57**:906-913 (2001).
- Marzaro M, Vivan L, Targa A, Mazzon L, Mori N, Greatti M, Petrucco Toffolo E, Di Bernardo A, Giorio C, Marton D, Tapparo A und Girolami V, Lethal aerial powdering of

- 
- honey bees with neonicotinoids from fragments of maize seed coat. *B Insectol* **64**:119-126 (2011).
- Mason R, Tennekes H, Sánchez-Bayo F und Jepsen PU, Immune suppression by neonicotinoid insecticides at the root of global wildlife declines. *J Environ Immunol Toxicol* **1**:3-12 (2013).
- Maurizio A und Grafl I, Das Trachtpflanzenbuch: Nektar und Pollen - die wichtigsten Nahrungsquellen der Honigbiene. 2. überarb. Aufl., *Ehrenwirth Verlag*, München, S. 209-217 (1980).
- McFrederick QS und LeBuhn G, Are urban parks refuges for bumble bees *Bombus* spp. (Hymenoptera: Apidae)? *Biol Cons* **129**:372-382 (2006).
- Medrzycki P, Giffard H, Aupinel P, Belzunces LP, Chauzat M-P, Claßen C, Colin ME, Dupont T, Girolami V, Johnson R, LeConte Y, Lückmann J, Mazaro M, Pistorius J, Porrini C, Schur A, Sgolastra F, Simon Delso N, Van Der Steen JJF, Wallner K, Alaux C, Biron DG, Blot N, Bogo G, Brunet J-L, Delbac F, Diogon M, El Alaoui H, Provost B, Tosi S und Vidau C, Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*. In: The COLOSS BEEBOOK, Volume I: Standard methods for *Apis mellifera* research, ed. by. Dietemann V, Ellis JD und Neumann P. *J Apic Res* **52**. DOI: 10.3896/IBRA.1.52.4.14 (2013).
- Mesquida J, Renard M und Pierre J-S, Rapeseed (*Brassica napus* L.) productivity: The effect of honeybees (*Apis mellifera* L.) and different pollination conditions in cage and field tests. *Apidologie* **19**:51-72 (1988).
- Ministerium für Ernährung und Ländlichen Raum (MLR), ed. by Würfel T (2008) Abschlussbericht Beizung und Bienenschäden [online] [http://www.landwirtschaft-mlr.baden-wuerttemberg.de/pb/MLR.LTZ,Lde\\_DE/Startseite/Arbeitsfelder/Bienenschaeden](http://www.landwirtschaft-mlr.baden-wuerttemberg.de/pb/MLR.LTZ,Lde_DE/Startseite/Arbeitsfelder/Bienenschaeden) [Stand 19.04.2015].
- Mommaerts V, Reynders S, Boulet J, Besard L, Sterk G und Smagghe G, Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing foraging behavior. *Ecotoxicology* **19**:207-215 (2010).
- Nauen R, Ebbinghaus-Kintscher U, Salgado VL und Kaussmann M, Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pestic Biochem Physiol* **76**:55-69 (2003).
- Nelson JA, Sturtevant AP und Lineburg B, Growth and feeding of honeybee larvae. US Department of Agriculture, Washington DC, *Dept Bulletin* **1222**:1-37 (1924).
- Neumann P und Carreck NL, Honey bee colony losses. *J Apic Res* **49**:1-6 (2010).

- 
- Nicholls CI und Altieri MA, Plant biodiversity enhances bees and other insect pollinators in agroecosystems. A review. *Agron Sustain Dev* **33**:257-274 (2013).
- Nultsch W, Allgemeine Botanik. 10. neubearb. Aufl., *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart, Germany, S. 269-270 (1996).
- Oldroyd BP, What's killing American honey bees? *PLoS Biol* **5**:e168 (2007).
- Ollerton J, Winfree R und Tarrant S, How many flowering plants are pollinated by animals?. *Oikos* **120**:321-326 (2011).
- Pandey G, Dorrian SJ, Russell RJ und Oakeshott JG, Biotransformation of the neonicotinoid insecticides imidacloprid and thiamethoxam by *Pseudomonas* sp. 1G. *Biochem Biophys Res Commun* **380**:710-714 (2009).
- Park OW, Time factors in relation to the acquisition of food by the honeybee. *Res Bull Iowa Agric Exp Sta* **108** (1929).
- Park OW, Activities of honeybees. In: The hive and the honeybee. Kapitel IV, ed. by Grout RA, *Dadant & Sons*, Hamilton, Illinois, USA (1946). [online]  
<http://books.google.de/books?id=K84OAAAAQAAJ&pg=PA79&lpg=PA79&dq=activities+of+honeybees+park&source=bl&ots=oCS1c1uUAB&sig=RQyC5VRigJAgq9mJzs6Fw4k7VeQ&hl=de&sa=X&ei=SDhXT6CYFsTdsgaLm4GwDA&ved=0CCAQ6AEwAA#v=onepage&q=activitiesof+honeybees+park&f=false> [Stand 19.04.2015].
- Pasedach-Poeverlein K, Über das „Spritzen“ der Bienen und über die Konzentrationsänderung ihres Honigblaseninhalts. *J Comp Physiol A* **28**:197-210 (1940).
- Paxton RJ, Does infection by *Nosema ceranae* cause “Colony Collapse Disorder” in honey bees (*Apis mellifera*)? *J Apic Res* **49**:80-84 (2010).
- Piscitelli A, Über die Bevorzugung mineralstoffhaltiger Lösungen gegenüber reinem Wasser durch die Honigbiene. *J Comp Physiol A* **42**:501-524 (1959).
- Pettis JS, vanEngelsdorp D, Johnson J und Dively G, Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* **99**:153-158 (2012).
- Pettis JS, Lichtenberg EM, Andree M, Stitzinger J, Rose R und vanEngelsdorp D, Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *PLoS ONE* **8**:e70182 (2013).
- Pistorius J, Bischoff G, Heimbach U und Stähler M, Bee poisoning incidents in Germany in spring 2008 caused by abrasion of active substance from treated seeds during sowing of maize. In: 10<sup>th</sup> International Symposium of the ICP-Bee Protection Group, 08.-10.10.2008, Bucharest, Romania. *Julius-Kühn-Archiv* **423**:118-126 (2009 a).

- 
- Pistorius J, Bischoff G und Heimbach U, Bienenvergiftung durch Wirkstoffabrieb von Saatgutbehandlungsmitteln während der Maisaussaat im Frühjahr 2008. *Journal für Kulturpflanzen* **61**:9-14. ISSN 0027-7479 Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, Germany (2009 b).
- Pistorius J, Brobyn T, Campbell P, Forster R, Lortsch JA, Marolleau M, Maus C, Lückmann J, Suzuki H, Wallner K und Becker R, Assessment of risks to honey bees posed by guttation. In: 11<sup>th</sup> International Symposium of the ICP-BR Bee Protection Group, 02.-04.11.2011, Wageningen, Netherlands. *Julius-Kühn-Archiv* **437**:199-208 (2012).
- Pohorecka K, Skubida P, Miszczak A, Semkiw P, Sikorski P, Zagibajlo K, Teper D, Koltowski Z, Skubida M, Zdańska D und Bober A, Residues of neonicotinoid insecticides in bee collected plant materials from oilseed rape crops and their effect on bee colonies. *J Apic Sci* **56**:115-134 (2012).
- Potts SG, Roberts SPM, Dean R, Marris G, Brown MA, Jones R, Neumann P und Settele J, Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *J Apic Res* **49**:15-22 (2010 a).
- Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O und Kunin WE, Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution* **25**:345-353 (2010 b).
- Power EF, Kelly DL und Stout JC, Organic farming and landscape structure: Effects on insect-pollinated plant diversity in intensively managed grasslands. *PLoS ONE* **7**:e38073 (2012).
- Reetz JE, Zühlke S, Spiteller M und Wallner K, Neonicotinoid insecticides translocated in guttated droplets of seed treated maize and wheat: a threat to honeybees? *Apidologie* **42**:596-606 (2011).
- Reetz JE, Zühlke S, Spiteller M und Wallner K, A method for identifying water foraging bees by refractometer analysis: a spotlight on daily and seasonal water collecting activities of *Apis mellifera* L. *J Verbr Lebensm* **7**:283-290 (2012).
- Reetz JE und Wallner K, An optimised technique for the preparation of honey sacs of *Apis mellifera* L. *J Apic Res* **53**:500-502 (2014).
- Reetz JE, Schulz W, Seitz W, Spiteller M, Zühlke S, Armbruster W und Wallner K, Uptake of neonicotinoids by water foraging honey bees through guttation fluid of winter oilseed rape. zur Veröffentlichung akzeptiert in *J Econ Entomol* (08. September 2015).
- Robinson GE, Underwood BA und Henderson CE A highly specialized water-collecting honeybee. *Apidologie* **15**:355-358 (1984).

- 
- Rogers MA, Krischik VA und Martin LA, Effect of soil application of imidacloprid on survival of adult green lacewing, *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae), used for biological control in greenhouse. *Biol Control* **42**:172-177(2007).
- Rosenkranz P und Wallner K, The chronology of honey bee losses in the Rhine Valley during spring 2008: an example of worst case scenario. In: Proceedings of the 3<sup>rd</sup> European Conference of Apidologie, 07.-11.09.2008, Dublin, Ireland, S. 94-95 (2008).
- Rouchaud J, Gustin F und Wauters A, Soil biodegradation and leaf transfer of insecticide imidacloprid applied in seed dressing in sugar beet crops. *Bull Environ Contam Toxicol* **53**:344-350 (1994).
- Rucker RR, Thurman WN und Burgett M, Honey bee pollination markets and the internalization of reciprocal benefits. *Amer J Agr Econ* **94**(4):956-977 (2012).
- Rundlöf M, Andersson GKS, Bommarco R, Fries I, Hederström V, Herbertsson L, Jonsson O, Klatt BK, Pedersen TR, Yourstone J und Smith HG, Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature* **521**:77-80 (2015).
- Sánchez-Bayo F und Hyne RV, Detection and analysis of neonicotinoids in river waters - Development of a passive sampler for three commonly used insecticides. *Chemosphere* **99**:143-151 (2014).
- Sandrock C, Tanadini LG, Pettis JS, Biesmeijer JC, Potts SG und Neumann P, Sublethal neonicotinoid insecticide exposure reduces solitary bee reproductive success. *Agric Forest Entomol* **16**:119-128 (2013).
- Sandrock C, Tanadini M, Tanadini LG, Fauser-Misslin A, Potts SG und Neumann P, Impact of chronic neonicotinoid exposure on honeybee colony performance and queen supersedure. *PLoS ONE* **9**(8): e103592 (2014).
- Schmuck R, Schöning R, Stork A und Schramel O, Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Manage Sci* **57**:225-238 (2001).
- Schmuck R und Keppler J, Clothianidin - Ecotoxicological profile and risk assessment. *Pflanzenschutz-Nachr. Bayer (Engl. Ed.)* **56**:26-58 (2003).
- Schmuck R, Effects of a chronic dietary exposure of the honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to imidacloprid. *Arch Environ Contam Toxicol* **47**:471-478 (2004).
- Schneider CW, Tautz J, Grünewald B und Fuchs S, RFID Tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PLoS ONE* **7**:e30023 (2012).

- 
- Seeley TD, The wisdom of the hive: The social physiology of honey bee colonies. *Harvard University Press*, Cambridge, Massachusetts, USA, S. 42-43 (1996).
- Seeley TD, Zucker macht durstig. *Deutsches Bienenjournal* **4**:16-18 (2009).
- Sesta G und Lusco L, Refractometric determination of water content in royal jelly. *Apidologie* **39**:225-232 (2008).
- Simming-Annefeld M, Auswirkungen von Wachstumsbeeinflussung, Vernalisation und Sortenspezifität auf die Guttation. In: Dissertation, Fachgebiet Biologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, Germany, S. 62-69 (1976).
- Sitte P, Ziegler H, Ehrendorfer F und Bresinsky A, Strasburger - Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. 33. Aufl., neubearb. von P. Sitte, *Gustav Fischer Verlag*, Stuttgart, Germany, S. 331 (1991).
- Škerl MIS, Bolta ŠV, Česnik HB und Gregorc A, Residues of pesticides in honeybee (*Apis mellifera carnica*) bee bread and in pollen loads from treated apple orchards. *Bull Environ Contam Toxicol* **83**:374-377 (2009).
- Sprecher E, Über die Guttation bei Pilzen. *Planta* **53**:565-574 (1959).
- Stabentheiner A, Individuelle und soziale Thermoregulation der Honigbiene. *Entomologica Austriaca* **12**:13-22 (2005). [online]  
[http://www.landesmuseum.at/pdf\\_frei\\_remote/ENTAU\\_0012\\_0013-0022.pdf](http://www.landesmuseum.at/pdf_frei_remote/ENTAU_0012_0013-0022.pdf)  
[Stand 19.04.2015].
- Stanley DA, Gunning D und Stout JC, Pollinators and pollination of oilseed rape crops (*Brassica napus* L.) in Ireland: ecological and economic incentives for pollinator conservation. *J Insect Conserv* **17**:1181-1189 (2013).
- Stoner KA und Eitzer BD, Movement of soil-applied imidacloprid and thiamethoxam into nectar and pollen of squash (*Cucurbita pepo*). *PLoS ONE* **7**:e39114 (2012).
- Suchail S, Guez D und Belzunces LP, Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ Toxicol Chem* **20**:2482-2486 (2001).
- Suchail S, Sousa G de, Rahmani R und Belzunces LP, In vivo distribution and metabolisation of <sup>14</sup>C-imidacloprid in different compartments of *Apis mellifera* L. *Pest Manage Sci* **60**:1056-1062 (2004).
- Sylvester HA, Rinderer TE und Bolten AB, Honey sac contents: a technique for collecting and measurement in foraging honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol* **76**:204-206 (1983).

- 
- Takeda F, Wisniewski ME und Glenn DM, Occlusion of water pores prevents guttation in older strawberry leaves. *J Amer Soc Hort Sci* **116**:1122-1125 (1991).
- Tapparo A, Giorio C, Marzaro M, Marton D, Soldà L und Girolami V, Rapid analysis of neonicotinoid insecticides in guttation drops of corn seedlings obtained from coated seeds. *J Environ Monit* **13**:1564-1568 (2011).
- Throm G, Grundlagen der Botanik. 2. überarb. und erw. Aufl., *Quelle & Meyer Verlag GmbH & Co.*, Wiesbaden, Germany, S. 212-214 (1996).
- Tomizawa M und Casida JE, Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu Rev Entomol* **48**:339-364 (2003).
- Tomizawa M und Casida JE, Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**:247-68 (2005).
- vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen Y, Underwood R, Tarpay DR und Pettis JS, Colony Collapse Disorder: A descriptive study. *PLoS ONE* **4**:e6481 (2009).
- vanEngelsdorp D und Meixner MD, A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J Invertebr Pathol* **103**:80-95 (2010).
- van Timmeren S, Wise JC, VanderVoort C und Isaacs R, Comparison of foliar and soil formulations of neonicotinoid insecticides for control of potato leafhopper, *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae), in wine grapes. *Pest Manage Sci* **67**:560-567 (2011).
- van Timmeren S, Wise JC und Isaacs R, Soil application of neonicotinoid insecticides for control of insect pests in wine grape vineyards. *Pest Manage Sci* **68**:537-542 (2012).
- van Rozen K, Huiting HF, Wilhelm R, Heger M und Ester A, Efficacy of insecticides through contact and oral uptake towards four *Agriotes* wireworm species under controlled conditions. *Bull OEPP* **43**:172-179 (2013).
- Vernon RS, Van Herk WG, Clodius M und Harding C, Further studies on wireworm management in Canada: Damage protection versus wireworm mortality in potatoes. *J Econ Entomol* **106**:786-799 (2013).
- Vidau C, Diogon M, Aufauvre J, Fontbonne R, Vigue`s B, Brunet JL, Texier C, Biron DG, Blot N, El Alaoui H, Belzunces LP und Delbac F, Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS ONE* **6**:e21550 (2011).

- 
- Villa S, Vighi M, Finizio A und Serini GB, Risk assessment for honeybees from pesticide-exposed pollen. *Ecotoxicology* **9**:287-297 (2000).
- Visscher PK, Crailsheim K und Sherman G, How do honey bees (*Apis mellifera*) fuel their water foraging flights? *J Insect Physiol* **42**:1089-1094 (1996).
- von Frisch K, Versuche über den Geschmackssinn der Bienen (Erste Mitteilung). *Naturwissenschaften* **15**:321-327 (1927).
- von Frisch K, Versuche über den Geschmackssinn der Bienen (Zweite Mitteilung). *Naturwissenschaften* **16**:307-315 (1928).
- von Frisch K, Versuche über den Geschmackssinn der Bienen (Dritte Mitteilung). *Naturwissenschaften* **18**:169-174 (1930).
- von Frisch K, Über den Geschmackssinn der Biene. *Z vergl Physiol* **21**:1-156 (1934).
- Wang YH, Wu SG, Zhu YC, Chen J, Liu FY, Zhao XP, Wang Q, Li Z, Bo XP und Shen JL, Dynamics of imidacloprid resistance and cross-resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Entomol Exp Appl* **131**:20-29 (2009).
- Wallingford AK, Kuhar TP und Schultz PB, Toxicity and field efficacy of four neonicotinoids on harlequin bug (Hemiptera: Pentatomidae). *Florida Entomologist*, **95**:1123-1126 (2012).
- Wallner K, Pflanzenschutzmitteleinsatz in blühende Kulturen und der Wirkstofftransport in Bienenvölker. In: BVL - Das „Bienensterben“ im Winter 2002/2003 in Deutschland - Zum Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse. ed. by Forster R, Bode E und Brasse D, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), Braunschweig, Germany, S. 60-67 (2005).
- Wallner K und Potyka U, Bienenhonig und GC-Analyse. *Labor Praxis* **4**:48-50 (2008).  
[online]  
<http://www.laborpraxis.vogel.de/analytik/chromatographie/gaschromatographie/articles/103203>  
[Stand 22.03.2015].
- Wallner K, Sprayed and seed dressed pesticides in pollen, nectar and honey of treated oil seed rape. In: 10<sup>th</sup> International Symposium of the ICP-Bee Protection Group: Hazards of pesticides to bees (ICPBR), Bucharest, Romania, 08.-10.10.2008. *Julius-Kühn-Archiv* **423**:152-153 (2009).
- Wallner K, Reetz J, Joachimsmeier I und Pistorius J, Beizinsektizide im Guttationswasser von Winterraps und ihre Bedeutung im Hinblick auf eine Gefährdung von Wasser holenden Bienen - Projekt-Nr. 521/091 (unveröffentlichter Abschlussbericht) (2012).
- Watanabe ME, Pollination worries rise as honey bees decline. *Science* **265**:1170 (1994).

- 
- Weichel L und Nauen R, Uptake, translocation and bioavailability of imidacloprid in several hop varieties. *Pest Manage Sci* **60**:440-446 (2003).
- Wheeler AW, Longitudinal distribution of growth substances in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Planta* **112**:129-135 (1973).
- Westwood F, Bean KM, Dewar AM, Bromilow RH und Chamberlain K, Movement and persistence of [<sup>14</sup>C]imidacloprid in sugar-beet plants following application to pelleted sugar-beet seed. *Pestic Sci* **52**:97-103 (1998).
- Whitehorn PR, O'Connor S, Wackers FL und Goulson D, Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science* **336**:351-352 (2012).
- Wied H-M, Orientierende Versuche zur Guttation bei Mais (*Zea mays* L.) im Hinblick auf das Wassersammelverhalten der Westlichen Honigbiene (*Apis mellifera* L.). In: Masterarbeit, Landesanstalt für Bienenkunde und Institut für Phytomedizin, Universität Hohenheim (2010).
- Wykes GR, The sugar content of nectars. *Biochem J* **53**:294-296 (1952 a).
- Wykes GR, The preferences of honeybees for solutions of various sugars which occur in nectar. *J Exp Biol* **29**:511-519 (1952 b).
- Zhao Y-J, Dai Y-J, Yu C-G, Luo J, Xu W-P, Ni J-P und Yuan S, Hydroxylation of thiacloprid by bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* CGMCC1.1788. *Biodegradation* **20**:761-768 (2009).

## **Eidesstattliche Versicherung**

## **Eidesstattliche Versicherung**

**gemäß § 8 Absatz 2 der Promotionsordnung der Universität Hohenheim zum Dr.sc.agr.**

1. Bei der eingereichten Dissertation zum Thema  
.....  
.....  
handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.
2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.
3. Ich habe nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung oder -beratung in Anspruch genommen.
4. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und der strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich. Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erkläre und nichts verschwiegen habe.

---

Ort und Datum

Unterschrift

## **Eidesstattliche Versicherung**

### **Belehrung**

Die Universität Hohenheim verlangt eine Eidesstattliche Versicherung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistungen, um sich glaubhaft zu versichern, dass die Promovendin bzw. der Promovend die wissenschaftlichen Leistungen eigenständig erbracht hat.

Weil der Gesetzgeber der Eidesstattlichen Versicherung eine besondere Bedeutung beimisst und sie erhebliche Folgen haben kann, hat der Gesetzgeber die Abgabe einer falschen eidesstattlichen Versicherung unter Strafe gestellt. Bei vorsätzlicher (also wissentlicher) Abgabe einer falschen Erklärung droht eine Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder eine Geldstrafe.

Eine fahrlässige Abgabe (also Abgabe, obwohl Sie hätten erkennen müssen, dass die Erklärung nicht den Tatsachen entspricht) kann eine Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder eine Geldstrafe nach sich ziehen.

Die entsprechenden Strafvorschriften sind in § 156 StGB (falsche Versicherung an Eides Statt) und in § 161 StGB (Fahrlässiger Falscheid, fahrlässige falsche Versicherung an Eides Statt) wiedergegeben.

#### § 156 StGB: Falsche Versicherung an Eides Statt

Wer vor einer zur Abnahme einer Versicherung an Eides Statt zuständigen Behörde eine solche Versicherung falsch abgibt oder unter Berufung auf eine solche Versicherung falsch aussagt, wird mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.

#### § 161 StGB: Fahrlässiger Falscheid, fahrlässige falsche Versicherung an Eides Statt:

Abs. 1: Wenn eine der in den §§ 154 und 156 bezeichneten Handlungen aus Fahrlässigkeit begangen worden ist, so tritt Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe ein.

Abs. 2: Strafflosigkeit tritt ein, wenn der Täter die falsche Angabe rechtzeitig berichtigt. Die Vorschriften des § 158 Absätze 2 und 3 gelten entsprechend.

Ich habe die Belehrung zur Eidesstattlichen Versicherung zur Kenntnis genommen.

---

Ort und Datum

Unterschrift

## Kongresse, Forschungsaufenthalte, Projektbeteiligungen

### Kongresse, Forschungsaufenthalte

#### 2009

18. Arbeitstagung Biologische Schädlingsbekämpfung, 25. - 26.11.2009, Ellerhoop

*Reetz JE: Bestandsaufnahme: Neonicotinoide in Guttationstropfen*

#### 2010

Sitzung der Sektion „Ölpflanzen“ der UFOP-Fachkommission „Produktionsmanagement Öl- und Proteinpflanzen“, 04. - 05.02.2010, Berlin

*Reetz JE, Wallner K und Pistorius J: Guttation im Raps - eine Wasserquelle für die Honigbienen?*

57. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V., 27. - 29.03.2010, Herne

*Reetz JE und Wallner K: Freisetzung von Beizmittelwirkstoffen in Guttation - Eine Gefährdung für die Honigbienen?*

(Evenius-Preis zur Förderung der Bienenwissenschaft)

4<sup>th</sup> European Conference of Apidology (EURBEE), 07. - 09.09.2010, Middle East Technical University Ankara, Türkei

*Reetz JE und Wallner K: Contamination of guttated droplets after dressing of seed with neonicotinoid insecticides: a risk to honey bees?*

#### 2011

Sitzung der Sektion „Ölpflanzen“ der UFOP-Fachkommission „Produktionsmanagement Öl- und Proteinpflanzen“, 03. - 04.02.2011, Berlin

*Reetz JE, Wallner K und Pistorius J: Guttation im Raps – eine Wasserquelle für die Honigbienen?*

58. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V.,  
29. - 31.03.2011, Berlin

*Wied H-M, Reetz JE und Wallner K: Orientating experiments on guttation fluid of seed treated maize (Zea mays L.) in relation to the water collecting behaviour of honeybees (Apis mellifera L.)*

*Joachimsmeier IP, Pistorius J, Schenke D, Reetz JE und Wallner K: Translocation of neonicotinoids in guttation fluid of seed coated winter oilseed rape - Results of different locations in Germany*

11<sup>th</sup> International Symposium of the ICP-BR Bee Protection Group, 02. - 04.11.2011,  
Wageningen

*Pistorius J, Wallner K, Joachimsmeier IP, Reetz JE, Schenke D, von der Ohe W, Illies I, Maus C, Block T und Becker R: Review on activities in Germany to assess the occurrence, residues and possible risk of guttation for honeybees*

## 2012

Sitzung der Sektion „Ölpflanzen“ der UFOP-Fachkommission „Produktionsmanagement Öl- und Proteinpflanzen“, 02. - 03.02.2012, Berlin

*Reetz JE, Wallner K und Pistorius J: Guttation im Raps - eine Wasserquelle für die Honigbienen?*

59. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V.,  
27. - 29.03.2012, Bonn

*Reetz JE und Wallner K: What´s the load?*

5<sup>th</sup> European Conference of Apidology, 04. - 06.09.2012, Halle an der Saale

*Reetz JE und Wallner K: Experiments on the water foraging activity of Apis mellifera L. in relation to the relevance of guttation drops as a water source for honey bees*

## 2013

Sitzung der Sektion „Ölpflanzen“ der UFOP-Fachkommission „Produktionsmanagement Öl- und Proteinpflanzen“, 30. - 31.01.2013, Berlin

*Reetz JE, Wallner K, Joachimsmeier IP und Pistorius J: Guttation im Raps - eine Wasserquelle für die Honigbienen?*

60. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V., 19. - 21.03.2013, Würzburg

*Reetz JE und Wallner K: Experiments on the choice of water foraging honeybees (Apis mellifera L.) under semi-field conditions*

Württembergischer Imkertag, 13.04.2013, Sulz am Neckar

*Reetz JE: Guttation: Wie gefährlich sind Pestizidrückstände für Wassersammlerinnen?*

## 2014

61. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V., 19. - 21.03.2013, Marburg

*Reetz JE, Frey E, Schenke D und Wallner K: Translocation of neonicotinoids in guttation fluid of seed treated winter oilseed rape - Comparison of different seed treatments a tone field part*

## 2009 - 2013

Vorträge in Imkervereinen zur Thematik Guttation

## Forschungsaufenthalte

19.09. - 01.10.2011, Roggendorf, Mecklenburg-Vorpommern

Projektbeteiligungen

2009 - 2012

*Die oberflächige Freisetzung von systemischen Beizinsektiziden durch Guttation im Rapsanbau und ihre Bedeutung im Hinblick auf eine Gefährdung von Wasser holenden Bienen.*

Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP)

Projekt-Nr. 521/091

2010 - 2011

*Entwicklung eines Verfahrens zur Bestimmung des Wasser- und Wirkstoffeintrags durch Honigbienen in den Bienenstock - Fragen zur Relevanz von Guttation.*

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL)

Kooperationsvertrag 0310717203

## Danksagungen

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Claus P.W. Zebitz und Herrn Priv. Doz. Dr. Peter Rosenkranz für die Vergabe und Betreuung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. W. Schwack danke ich für die Berichterstattung dieser Arbeit, Herrn Dr. Klaus Wallner für die engagierte Betreuung und gute Zusammenarbeit.

Darüber hinaus danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Landesanstalt für Bienenkunde für die Diskussionen zur Entwicklung von Problemlösungen. Mein besonderer Dank gilt Frau Birgit Fritz und Frau Bozena Blind für die Einarbeitung in den Laborablauf. Für die Einblicke in die imkerliche Praxis danke ich Herrn Bernd Gieler. Für die tatkräftige Unterstützung bei der Versuchstätigkeit danke ich Frau Konstanze Baur, Herrn Raphael Buck, Frau Dr. Eva Frey, Frau Nadine Kunz, Herrn Richard Odemer, Frau Sara Senz, Herrn Joseph Teglas, Herrn Hans-Martin Wied und Frau Alexandra Woelk.

Für die Anfertigung von Spezialkonstruktionen zur Durchführung individueller Versuche danke ich den Mitarbeitern der Wissenschaftlichen Werkstätten (Zentrale Verwaltung, Referat AT 2) sowie der Betriebstechnik (Zentrale Verwaltung, Referat AT 3).

Für die langjährige, gute Zusammenarbeit und die Einarbeitung in die HPLC-MS-Analytik am Standort Langenau, die konstruktiven Besprechungen zur analytischen Vorgehensweise sowie die Durchführung der Rückstandsanalysen des Guttationswassers gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Wolfgang Schulz und Herrn Dr. Wolfram Seitz, Betriebs- und Forschungslaboratorium des Zweckverbands Landeswasserversorgung (LW).

Mein Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. Dr. Michael Spiteller und Herrn Dr. Sebastian Zühlke, Institut für Umweltforschung (INFU) der Technischen Universität Dortmund, für die langjährige Zusammenarbeit und gute Kooperation.

Für die Rückstandsanalytik der Honigblasen danke ich Herrn Dr. Wolfgang Armbruster, Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hohenheim.

Herrn Herbert Stelz und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Versuchsstation Heidfeldhof der Universität Hohenheim, die mir die Probennahmen und die Durchführung der Versuche auf den Flächen ermöglichten und mir Informationen zu den Versuchen und Einblicke in das Versuchsfeldwesen vermittelten, danke ich hiermit.

Für die Möglichkeit der Forschungstätigkeit am Standort Roggendorf in Mecklenburg-Vorpommern danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Agrar GmbH Roggendorf sowie für die Bereitstellung der Versuchsfläche und die freundliche Unterstützung des Versuchsvorhabens.

Für sein Interesse an dem Forschungsthema und seine Bereitschaft, die Bienenvölker für das Versuchsvorhaben in Mecklenburg-Vorpommern zur Verfügung zu stellen, und für seine Hilfsbereitschaft, diese an den Versuchsstandort zu wandern, danke ich dem Imkermeister Herrn Wolfgang Stöckmann.

Der Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP) danke ich für die Finanzierung des Projektes „Die oberflächige Freisetzung von systemischen Beizinsektiziden durch Guttation im Rapsanbau und ihre Bedeutung im Hinblick auf eine Gefährdung von Wasser holenden Bienen“. Das Projekt zur Guttation bei Winterraps wurde in Kooperation mit dem Julius Kühn-Institut (JKI) durchgeführt. Für die langjährige und gute Zusammenarbeit danke ich Herrn Jens Pistorius und Frau Ina P. Wirtz.

Dem Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) danke ich für die Finanzierung des Projektes „Entwicklung eines Verfahrens zur Bestimmung des Wasser- und Wirkstoffeintrags durch Honigbienen in den Bienenstock - Fragen zur Relevanz von Guttation“, welches in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Dr. Michael Spitteller und Herrn Dr. Sebastian Zühlke aus dem Institut für Umweltforschung (INFU) der Technischen Universität Dortmund durchgeführt wurde.