

Schlussbericht

Referenzsystem für ein vitales Bienenvolk „FIT BEE“ - Modul 7

Zuwendungsempfänger: IS Insect Services GmbH	Förderkennzeichen: 2817101310
Berichtszeitraum: 1.4.2011 bis 31.8.2015	

I. Kurzdarstellung

1. Aufgabenstellung

Es sollte ein Verfahren entwickelt werden, um mit den identifizierten (und zu patentierenden) weiblichen Sexualduftstoffen der Varroa-Milbe die Paarung des Parasiten innerhalb der Brutzelle der Bienen zu stören. Dies hatte zum Ziel, ein unkontrolliertes Populationswachstum der Milben im Bienenvolk während der Saison zu verhindern und den Varroabefall auch während der Brutsaison unterhalb der Schadensschwelle zu halten.

Unser Teilprojekt beinhaltete Analysen zum chemischen Verhalten der einzelnen Pheromonsubstanzen, insbesondere Recherchen zu den bereits bekannten Daten und deren Bewertung hinsichtlich chemischer Stabilität und deren Toxikologie, Untersuchungen zur Löslichkeit der Substanzen in Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität und deren Abdampfungsraten von verschiedenen Materialien, vor allem Bienenwachs. In diesem Zusammenhang sollte auch die Durchgängigkeit der Substanzen durch Nymphenhäutchen bzw. durch den Zelldeckel der Brutzellen untersucht werden. Um Letzteres zu untersuchen sollte eine Headspaceanalyse zur Bestimmung der Konzentration der Substanzen innerhalb der Brutzelle entwickelt werden. In Zusammenarbeit mit unserem Projektpartner sollte dann eine geeignete, praxistaugliche Applikationsform entwickelt werden. Hierzu gab es zwei zentrale Ansätze: (1) Die Applikation von Substanzen über das Bienenwachs, das als Mittelwand (flache Wachsplatte mit eingestanzten Zellumrissen) den Bienen zum Bau von neuen Waben vorgegeben wird, und (2) eine Applikation durch Sprühen auf bereits verdeckelte Brutwaben. Bei positivem Verlauf sollte gegen Ende der Projektphase parallel bereits die Produktentwicklung begonnen werden, u.a. Fragen zur Zulassung geklärt, eine Produktbeschreibung und Gebrauchsanweisung in Grundzügen entwickelt werden.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Voraussetzung für unser Teilvorhaben war die Identifizierung der verschiedenen Komponenten des Sexualpheromons der Varroamilbe durch unseren Hohenheimer Projektpartner und die Möglichkeit einer Patentierung dieses Pheromons durch den Projektpartner. Das Pheromon musste toxikologisch unbedenklich sein (Nahrungsmittelproduktion) und das Bienenvolk nicht nachteilig beeinflussen. Zumindest für einige Komponenten waren die vorliegenden Kenntnisse hierzu vielversprechend. Ein wichtiger Punkt war die Frage der Applikation des Pheromons und dessen Bioverfügbarkeit innerhalb der Brutzelle. Sollte hier keine geeignete Lösung gefunden werden, war eine Produktentwicklung nicht möglich. Die biologische Wirkung des Sexualpheromons gegen die Varroamilbe wurde von unserem Projektpartner an der Uni Hohenheim durchgeführt. Zur Dosisfindung musste dort ein standardisierter Test zur Erfassung des Varroa-Bruterfolgs im Brutschrank entwickelt werden. Wir sind davon ausgegangen, dass eine hohe Konzentration des Pheromons in der Brutzelle einen repellierenden Effekt auf die Milbe ausüben würde. Letztendlich musste eine signifikante Reduzierung des Populationswachstums der Varroamilbe bei Anwendung des Pheromons in einem Bienenvolk nachgewiesen werden. Ohne den Nachweis eines solchen Effektes stellt sich die Frage zur Sinnhaftigkeit der Weiterentwicklung eines entsprechenden Produktes.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Vorhaben begann am 1.4.2011. Im Jahr 2011 konnte die ursprüngliche Arbeits-, Zeit- und Kostenplanung vollumfänglich umgesetzt werden, so dass auch die weiteren Arbeiten nach Plan voranschreiten konnten. In den Jahren 2012 und 2013 konnte die ursprüngliche Arbeits- und Zeitplanung dagegen nicht vollständig umgesetzt werden. Dies lag u.a. an einer längeren Erkrankung des Projektleiters (HD). Zudem stellten sich die Methodenentwicklungen, insbesondere zur Headspaceanalyse und der Abdampfraten komplizierter dar als erwartet. Dies lag vor allem an der außerordentlich geringen Volatilität der Substanzen des Sexualpheromons, was eine exakte Messung der Abdampfraten sehr erschwerte. Die Versuche mussten daher unter anderen Bedingungen wiederholt werden. Dies betraf auch einen Teil der Untersuchungen zur Löslichkeit. Die Untersuchungen zu Applikationstechniken wurden ebenfalls um ein Jahr verschoben, da von unserem Partner von der UHOH (siehe dessen Bericht) für die Applikationsmethode in der Saison 2012 noch Entwicklungsarbeit nötig war. Wir hielten es für sinnvoll, detaillierte Tests zur Applikationsmethode erst dann zu beginnen, nachdem deren Wirksamkeit nachgewiesen wurde. Labortests zur Wirksamkeit zeigten allerdings auch bei sehr hohen Konzentrationen des Pheromons keinen Repellenteffekt auf die Varroamilbe. Daraufhin wurde versucht, die sog. Verwirrmethode mittels hoher Konzentrationen des Pheromons innerhalb der Brutzelle anzuwenden bzw. zu entwickeln. Die hierfür notwendigen Untersuchungsmethoden waren jedoch deutlich aufwendiger als die im

Projektplan vorgesehenen Methoden, denn es mussten aus den einzelnen Milben die Spermatheken herauspräpariert und die Spermien gezählt werden, um den jeweiligen Begattungserfolg zu quantifizieren.

Trotz der extrem untypischen Wetterbedingungen im Jahr 2013, die zu einer erheblichen verzögerten Entwicklung der Bienenvölker und damit auch der Varroamilbe führten, konnten im Jahr 2013 erstmals Tests zur Wirksamkeit der Verwirrmethode unter Praxisbedingungen durchgeführt werden. Diese zeigten, dass behandelte Milbenweibchen signifikant weniger Spermien aufwiesen und 20% sogar gänzlich unbegattet blieben. Aufgrund dieser Ergebnisse erschien ein erfolgreicher Abschluss des Projekts weiterhin vielversprechend und es wurde eine kostenneutrale Projektverlängerung beantragt und bis zum 31.8.2015 genehmigt. Zudem sollte noch eine Applikationsmethode mittels einer sprühbaren Polymerlösung, in welche das Pheromon eingebettet war, an einem Bienenvolk ausprobiert werden. Da weitere, eingehendere Arbeiten zur Applikationstechnik der Pheromone jedoch nur sinnvoll erschienen, wenn deren Wirksamkeit eindeutig belegt war, wurde in den Jahren 2013 und 2014 nur ein reduziertes Arbeitsprogramm durchgeführt. Im Jahr 2015 konnte die (teilweise) Wirksamkeit des Pheromons auf den Begattungserfolg der Varroamilbe bestätigt werden, der Nachweis der Populationsreduzierung stand jedoch aus. Entsprechende Versuche wurden im Jahr 2015 durchgeführt, leider ohne einen signifikanten Nachweis einer Populationsunterdrückung. Auch die Applikation der Pheromon-Polymerlösung erbrachte kein besseres Ergebnis. Nachdem im Jahr 2014 noch eine eingehende Recherche zu Zulassungsfragen durchgeführt wurde, wurden im Jahr 2015 bis zur Ermittlung der Wirkung im Praxisversuch keine weitergehenden Untersuchungen durchgeführt.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Die Gesundheit des Bienenvolkes wird von Umweltfaktoren, verschiedenen Bienenkrankheiten und Maßnahmen im imkerlichen Management beeinflusst. Unter den Bienenkrankheiten spielt die Varroa-Milbe eine entscheidende Rolle (Nazzi & Conte 2015). Der Varroabefall steigt während der Saison an und schädigt u.a. die im Spätsommer gebildeten Winterbienen sowohl direkt als auch indirekt, z.B. durch Übertragung bienenpathogener Viren (Ryabov et al. 2014; Francis et al. 2013; Dainat et al. 2012; Rosenkranz et al., 2010).

Die Varroa-Bekämpfung erfolgte bisher ausschließlich mit chemischen (verschiedene Akarizide, organische Säuren, ätherische Öle) und biotechnischen (Ablegerbildung, Drohnenbrutentnahme, „Fangwabe“) Methoden, die entweder einen hohen Arbeitsaufwand erfordern und/oder keine ausreichende Wirkung zeigen.

Insbesondere fehlen bisher Anwendungen, um den Parasiten während der Tracht- und Brutsaison zu bekämpfen. Verschiedene mathematische Populationsmodelle (Fries et al. 1994; Martin 1998, DeGrandi-Hoffman & Curry 2004) postulierten einen großen Effekt wenn die

Reproduktionsraten der Varroa-Weibchen reduziert werden. Geringere Varroa-Reproduktionsraten zeigten sich auch bei den wenigen belegten Beispielen für Varroa-tolerante Bienenpopulationen (Rosenkranz 1999, Locke & Fries 2010).

Varroa-Milben reproduzieren ausschließlich innerhalb der verdeckelten Bienenbrutzelle. Der Ablauf der Paarung wurde erstmalig von Donzé et al. (1996) in durchsichtigen Kunststoffzellen im Labor untersucht. Danach paart sich das Männchen mehrmals mit den frisch gehäuteten weiblichen Milben. Keinerlei Informationen gab es hingegen zu der Frage, wie die Varroa-Männchen die jungen Weibchen finden und ob die Kopulation durch spezifische Signale gesteuert wird. Die bisher einzigen konkreten Nachweise für die Steuerung der Varroa-Reproduktion zeigten, dass wirtsabhängige Duftstoffe der Bienenlarve die Milbenoogenese aktivieren (Garrido & Rosenkranz, 2004) und dass auch der weitere Verlauf der Reproduktion durch spezifische Signale der Bienenbrut gesteuert wird (Garrido & Rosenkranz, 2003).

Ein neu entwickelt Labor-Biotest eröffnete die Möglichkeit, das Verhalten der Varroa-Milben vor, während und nach der Paarung zu beobachten und quantitativ zu beurteilen (Fahle, 2004; Fahle & Rosenkranz, 2005). Dieser erbrachte weitere Einsichten in das Paarungsverhalten der Milbe Ziegelmann et al., 2008; Ziegelmann & Rosenkranz, 2010) und über Extraktionen und Fraktionierungen die Biotest-geleitete Identifizierung von 6 Substanzen, dem Sexualpheromon der Varroa-Milbe. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass nur die begatteten Varroamilben später im Bienenvolk gefunden werden; unbegattete Varroa-Weibchen sind demnach offensichtlich subvital und „verschwinden“ aus dem Bienenvolk. Eine Störung bzw. gar Verhinderung der Kopulation würde also zu einer nachhaltigen Reduzierung der Varroa-Population führen (Garrido, 2004; Weller, 2008; Frey, 2009, nicht veröffentlichte Daten).

Über diesen Stand und diese Überlegungen hinaus gab es jedoch weder eine Behandlungsmethode noch eine Applikationstechnik für Bienenparasiten, die sich in einer verdeckelten Brutzelle befanden.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Neben der Arbeit mit unserem Kooperationspartner war keine Zusammenarbeit mit anderen Stellen notwendig. Es erfolgten Kontaktaufnahmen zu anderen Firmen bzgl. Applikationstechnik, und ein vielversprechender Ansatz ergab sich mit der Fa. Epinamics GmbH, die uns ein Muster für eine Prüfung zur Verfügung stellte.

II. Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Die Zuwendung wurde ausschließlich dazu verwendet, die genannten Ziele des Vorhabens zu erreichen. Dort, wo die Weiterverfolgung eines Zieles nicht zweckmäßig erschien, z.B. weil Zwischenergebnisse dem entgegenstanden, wurde das Ziel entweder abgeändert (so wechselte die Zielrichtung auf die Entwicklung einer Verwirrmethode statt der ursprünglich geplanten repellierenden Wirkung), oder zurück- oder ganz eingestellt. Dies wird im Folgenden detailliert erläutert. So wurde insgesamt das ursprünglich bewilligte Fördervolumen aus ökonomischen Gründen nicht ganz ausgeschöpft.


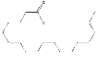



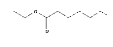
Inhaltlich wurden die wichtigsten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Pheromonkomponenten durch Recherche und eigene Untersuchungen (Versuche zur Löslichkeit) ermittelt (s. Tabelle 1). Es handelt sich um die drei Fettsäuren Palmitin-, Stearin- und Ölsäure, die bei Reaktion mit Alkohol (Ethanol) unter Esterbildung den jeweiligen Fettsäureethylester (FEE) bilden. Diese FEEs sind ebenfalls als Pheromone der Varroamilbe identifiziert worden.

Zunächst wurden die physikalisch-chemischen Daten zu den Pheromonen v.a. hinsichtlich der geplanten Anwendung als gut bis sehr gut bewertet. Insbesondere die drei Fettsäuren sind sehr stabil (Ölsäure mit Einschränkungen, da sie an Luft oxidiert), so dass sowohl eine längere Lagerung als auch ihre Anwendung im Bienenstock (bei 35 °C) kein Problem darstellen dürfte. Im Vergleich dazu dürften die FEEs etwas weniger stabil sein (vielleicht mit Ausnahme des Ölsäureethylesters).

Alle drei Fettsäuren wie auch die drei FEEs sind lipophil und damit unlöslich in polaren Lösungsmitteln wie Wasser. Eine gute Löslichkeit ist dagegen in unpolaren oder wenig polaren Lösungsmitteln gegeben. Gleiches gilt für ein mögliches Einbringen der Substanzen in Bienenwachs, wie es ursprünglich geplant war. Letzteres besteht aus Estern höherer Carbonsäuren mit höheren Alkoholen (Fettsäuren und Alkohole mit überwiegen 26 und 28 C-Atomen) und weist damit Polaritäten auf, die weitgehend denen der Pheromon-Komponenten entsprechen. Die sehr ähnliche Polarität der Pheromonkomponenten zu Bienenwachs, wie auch ihre Stabilität sollten daher ein einschmelzen in Bienenwachs problemlos ermöglichen.

Sollte das Pheromon dagegen aufgesprüht werden und sollten dabei alle sechs Komponenten gleichzeitig angewendet werden, wäre es vorteilhaft, ein gemeinsames Lösungsmittel für alle zu haben. Hierzu wurden Untersuchungen mit Isopropanol (70% und 99,8%), ein Alkohol der häufig auch als Lösungsmittel in medizinischen Präparaten dient, durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass reines (aber nicht 70%iges) Isopropanol für eine solche Anwendung geeignet sein dürfte (Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht über die physikalisch-chemischen Eigenschaften der untersuchten Sexualpheromone.

	Palmitin- säure	Stearin- säure	Ölsäure	Palmitin- säure- ethylester	Stearin- säure- ethylester	Ölsäure- ethyl- ester
CAS-Nummer	57-10-3	57-11-4	112-80-1	628-97-7	111-61-5	111-62-6
Summenformel	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	C ₂₀ H ₃₈ O ₂
Molmasse (g/ mol)	256,43	284,48	282,46	284,48	312,53 g	310,51
Dichte (g/cm³)	0,85	0,94	0,89	0,86	1,057	0,87
Struktur						
Zustand (35 °C)	fest	fest	flüssig	flüssig	flüssig	flüssig
Schmelzpunkt (°C)	61-64 °C	69 °C	17°C	24-26 °C	34-38°C	-32 °C
Siedepunkt (°C)	351	370	360	192-193	213-215	210
Dampfdruck (Pa bei 25 °C)	1,3*10 ⁻⁷	9,5*10 ⁻⁸	1,9*10 ⁻⁶	5946 (20°C)	k.A.	k.A.
Unlöslich in	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser
Eingeschränkt löslich in	EtOH, DCM, Isopropanol (70%)	EtOH, DCM	EtOH	EtOH, DMSO, DMF*	Isopropanol (70%)	EtOH, Isopropanol (70%)
Gut löslich in	Et ₂ O, Propanol, TCM,	Et ₂ O, Laugen, TCM, TTC,	MeOH, DCM, Isopropanol (70%)	Heptan, TCM, DCM	EtOH, Et ₂ O, DMF, Heptan, TCM, DCM	Heptan, TCM, DCM
Löslichkeit in Iso- propanol (mg/ml)	79,86	28,20	≥890	≥850	112,18	≥870
Lagertemperatur	≤20 °C		20°C	-20 °C	2-8 °C	15-25 °C
Haltbarkeit	stabil	stabil	oxidiert langsam			Lichtempfindlich, stabil*

EtOH: Ethanol; Et₂O: Diethylether; DCM: Dichlormethan; TCM: Chloroform; TCC: Tetrachlorkohlenstoff; DMF: Dimethylformamid; DMSO: Dimethylsulfoxid *: (Löslichkeit jeweils 20 mg/ml)

Im weiteren Projektverlauf ergaben jedoch die Versuche unseres Projektpartners dass nicht sämtliche genannten Pheromonkomponenten für eine entsprechende Wirksamkeit notwendig sind, sondern die Hauptkomponente Ölsäure allein einen ähnlich großen Effekt erzielt wie in Kombination mit den Einzelkomponenten. Dies erleichtert die Lösung der technischen Fragen und dürfte insbesondere die Zulassung eines künftigen Mittels vereinfachen.

Des Weiteren wurde eine Recherche zur Toxizität der Pheromonkomponenten durchgeführt. Sollten die Pheromonkomponenten ungünstige toxikologische Eigenschaften aufweisen, konnte dies u.U. ein Knock Out Kriterium für das weitere Vorhaben sein. Bei den drei Fettsäuren handelt es sich allerdings ausnahmslos um Naturprodukte, die natürlicherweise in vielen Pflanzen und Tieren vorkommen und für den Menschen sogar einen nicht unbedeutenden Anteil der Nahrung ausmachen. So bestehen 10-20% des mit der menschlichen Nahrung aufgenommenen Fetts aus Palmitinsäure, Ölsäure ist zu einem hohen Anteil in Olivenöl enthalten und Stearinsäure ist als Lebensmittelzusatzstoff ohne Höchstmengenbegrenzung zugelassen. Aus diesem Grund ist auch das toxikologische Profil dieser Stoffe, soweit bekannt, denkbar günstig und mit derzeitigem Kenntnisstand dürfte einer Anwendung unter rein toxikologischen Gesichtspunkten im Bienenstock nichts entgegen sprechen.

Zur Toxikologie der FEEs gibt es dagegen nur wenige Untersuchungen. Lediglich zum Ölsäureethylester bestehen Werte zur akuten Toxizität, die allerdings ebenfalls sehr günstig aussehen (LD50 (oral Ratte): >5.000 mg/kg). Alle drei FEEs werden im Körper (z.B. beim Menschen) synthetisiert, so dass davon auszugehen ist, dass diese Substanzen zumindest in physiologischen Konzentrationen nicht schädlich sein dürften.

Eine weitere wichtige Frage, die zu klären war, betraf die für eine Verwirrmethode notwendigen Konzentrationen der Pheromonkomponenten in der Brutzelle. Hierzu wurden parallel Versuche zur (1) maximalen Verdampfungsrate der einzelnen Komponenten durchgeführt und es wurde (2) eine Methode zur Messung dieser Komponente in der Gasphase in kleinsten Volumina entwickelt. Letzteres hatte zum Ziel, entsprechende Messungen möglicherweise direkt innerhalb der Brutzelle durchführen zu können.

Hinsichtlich ihres Dampfdrucks unterscheiden sich die drei Fettsäuren und FEEs, soweit bekannt, sehr deutlich bei gegebener Temperatur (Tabelle 1). Die Messungen der (maximalen) Abdampfraten erwiesen sich jedoch aufgrund der niedrigen Dampfdrücke der Komponenten als sehr schwierig und mussten unter verbesserten Bedingungen wiederholt werden. Die über jeweils mehrere Wochen in einem Durchflusssystem mit gereinigter und getrockneter Luft gemessenen Abdampfraten waren bei Stearinsäure mit $0,53 \mu\text{g}/\text{cm}^2/24 \text{ Std.}$ am niedrigsten,

gefolgt von Palmitinsäure und Stearinsäureethylester mit jeweils $1,59 \mu\text{g}/\text{cm}^2/24 \text{ Std.}$ Darauf folgten Ölsäureethylester mit $23,33 \mu\text{g}/\text{cm}^2/24 \text{ Std.}$ und Palmitinsäureethylester mit $40,83 \mu\text{g}/\text{cm}^2/24 \text{ Std.}$ Für die Ölsäure konnten keine Abdampfraten bestimmt werden, da diese eine kontinuierliche Massezunahme zeigte. Dieser zunächst sehr ungewöhnliche Befund war nur durch Autooxidation zu erklären. Dabei bindet sich der Luftsauerstoff an die Doppelbindung des Ölsäuremoleküls. Da auch Ölsäureethylester eine solche Doppelbindung aufweist sollten die Ergebnisse mit diesem Stoff ebenfalls mit Vorsicht betrachtet werden. Weitere Versuche zur Messung der Abdampfrate von Ölsäure unter modifizierten Bedingungen wurden jedoch nicht durchgeführt, da sie mit einem erheblichen Mehraufwand verbunden gewesen wären und zum damaligen Zeitpunkt als nicht (mehr) zielführend betrachtet wurden, zumindest solange kein deutlicher Effekt auf den Reproduktionserfolg der Varroamilbe in der natürlichen Brutzelle nachgewiesen werden konnte.

Parallel dazu wurde, wie bereits erwähnt, eine Nachweismethode für einige Varroa-Pheromonkomponenten im Headspace kleinster Volumina entwickelt. Herausfordernd war hierbei nicht nur das für einen quantitativen Nachweis extrem kleine Volumen sondern auch die zu erwartenden sehr geringen Mengen an Pheromon. Ausgehend davon, dass Varroa-Männchen im Laborversuch auf eine Menge von etwa 10 ng einer einzelnen Pheromonkomponente eine maximale Verhaltensantwort zeigten, erwarteten wir, dass die entsprechenden Mengen in der kleineren Brutzelle deutlich darunter liegen. So gingen wir davon aus, dass Pheromonmengen in der Größenordnung von 1 ng oder darunter (die jeweils mit dem darüber befindlichen Headspace im Gleichgewicht liegen), detektierbar sein müssen. Als empfindliche Methode wurde die Gas-Chromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC-MS) eingesetzt.

Da Fettsäuren für den Nachweis in der GC-MS derivatisiert werden müssen, konzentrierten sich unsere Untersuchungen zunächst auf die entsprechenden drei FEEs (Ethylester dieser Fettsäuren), die ja ebenso Bestandteil des Varroa-Pheromons sind. Außerdem zeigen diese höhere Verdampfungsraten als die Fettsäuren, sollten also, rein quantitativ gesehen, einfacher zu detektieren sein. Die Probennahme erfolgte mittels Solid Phase Micro-Extraction (SPME).

Für die Optimierung des Detektionssystems wurden insgesamt 90 GC-MS-Läufe durchgeführt. Neben der Aufnahme des Totalionenchromatogramms (TIC) wurden auch Single Ion Recordings (SIR) mit den Massen 55, 69, 88, 101 und 264 durchgeführt um die Empfindlichkeit des Gerätes zu erhöhen. Die so ermittelten Retentionszeiten bei Einspritzung von 10 ng lagen bei: 12.688 (Palmitinsäureethylester), 14.434 (Ölsäureethylester) und 14.685 (Stearinsäureethylester) min und es wurden folgende Retentionsindices (KI) am Gerät ermittelt:

Palmitinsäureethylester (PAE): KI 1993 (Literatur: 1980)

Ölsäureethylester (OAE): KI 2168 (Literatur: 2170)

Stearinsäureethylester (SAE): KI 2193 (Literatur: 2190)

Tabelle 2 zeigt die Empfindlichkeitsgrenzen anhand ausgewählter GC-Läufe. Demnach waren unter Ausnutzung sämtlicher Möglichkeiten der Empfindlichkeitserhöhung jeweils Mengen ab 0,1 ng detektierbar. Dies wurde als ausreichend erachtet, um in einem weiteren Schritt Headspace-Messungen durchzuführen.

Tabelle 2: Berechnete Peakfläche (künstliche Einheiten) der einzelnen Verbindungen bei unterschiedlichen Einspritzmengen und Geräteparametern.

GC-Lauf	Parameter*	Palmitinsäureethylester	Ölsäureethylester	Stearinsäureethylester
1	10 ng, Split, TIC	3.781.593	3.483.272	3.479.474
2	10 ng, Split, SIR	6.772.269	2.595.022	4.654.019
3	1 ng, ohne Split, TIC	1.000.500	766.874	786.359
4	1 ng, ohne Split, SIR	13.184.602	6.211.342	10.735.286
5	0,1 ng, ohne Split, TIC	n.d.	n.d.	n.d.
6	0,1 ng, ohne Split, SIR	n.d.	n.d.	n.d.
Detektor wurde empfindlicher eingestellt (Detektorspannung erhöht):				
7	0,1 ng, ohne Split, SIR	586.333	208.559	580.451
8	0,01 ng, ohne Split, SIR	n.d.	n.d.	n.d.
9	0,05 ng, ohne Split, SIR	Detektierbar?	n.d.	n.d.

*: ng: Nanogramm; TIC: Totalionenstromchromatogramm; SIR: Single Ion Recording. n.d.: nicht detektierbar.

Um möglichst nahe an die Bedingungen in einer Brutzelle heranzukommen wurden die Headspace-Extraktionen mittels SPME-Faser bei 35 °C und Dunkelheit für 30 min. in möglichst kleinen Probenvolumina durchgeführt. Erste Tests zeigten, dass Kunststoffgefäße (Polypropylen), wahrscheinlich wegen starker Adsorption der Pheromone an dieses Material, nicht geeignet waren. Dagegen waren die Substanzen in Glasgefäßen (1,5 ml) ausgebracht, nachweisbar.

Tabelle 3 zeigt, dass jeweils 1 ng der drei Substanzen im Headspace des Glasgefäßes wiedergefunden werden konnten. Mengen von 0,1 ng konnten dagegen nicht mehr detektiert werden. Demzufolge lag unsere Nachweisgrenze bei etwa 1 ng Substanz, die im Luftraum (1,5 ml) verdampfen konnte.

Tabelle 3: Berechnete Peakfläche (künstliche Einheiten) der einzelnen Verbindungen nach SPME-Probennahme bei unterschiedlichen Substanzmengen und Geräteparametern.

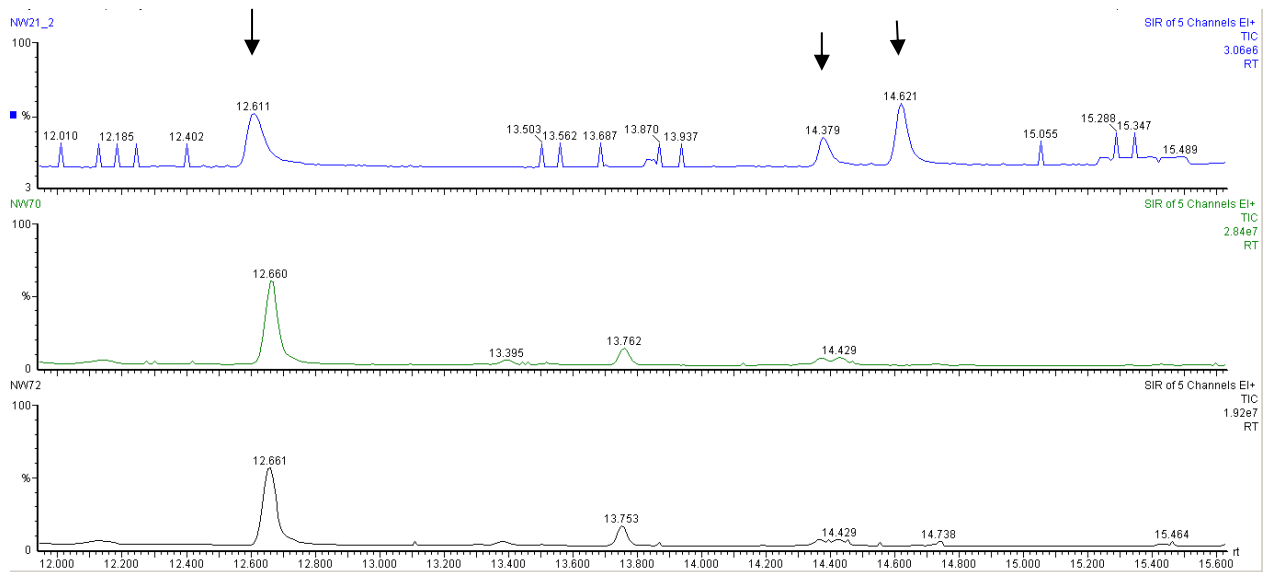
GC-Lauf	Parameter*	Palmitinsäure-ethylester	Ölsäure-ethylester	Stearinsäure-ethylester
1	10 ng, TIC	18.529.794	n.d.	n.d.
2	10 ng, SIR	238.718.848	11.274.494	9.017.797
3	1 ng, SIR	10.292.590	500.046	366.481

*: ng: Eingebrachte Menge in Nanogramm; TIC: Totalionenstromchromatogramm; SIR: Single Ion Recording. n.d.: nicht detektierbar.

Im nächsten Schritt wurde die Wiederfindung der Substanzen über Bienenwachs geprüft, um die Bedingungen innerhalb einer Bienenwabe noch besser zu simulieren. Hierzu wurden 0,3 g Wachs im Wasserbad bei 50 °C erwärmt bis es schmolz und sich am Boden eines Glasgefäßes (0,8 ml) absetzte. Nach vollständiger Abkühlung wurden 10 ng der einzelnen Substanzen hinzugegeben.

Abb. 1 zeigt die Ergebnisse. Das oberste Chromatogramm zeigt die drei Substanzen (Pfeile) bei direkter Einspritzung von 0,1 ng. Das unterste Chromatogramm zeigt, dass nur Palmitinsäureethylester nachgewiesen werden konnte, nicht jedoch die beiden anderen Ester. Das mittlere Chromatogramm zeigt die unter denselben Bedingungen erhaltene Analyse des Headspaces des reinen Bienenwachses (ohne Zugabe der Substanzen). Auch hier ist ein Peak sehr ähnlicher Intensität für Palmitinsäureethylester nachweisbar. Das Massenspektrum des Peaks bei 12.660 (mittleres Chromatogramm) zeigt, dass es sich hierbei um Palmitinsäureethylester handelt. Diese Verbindung war also bereits im Bienenwachs enthalten. Dies ist nicht gänzlich unerklärlich, da die betreffenden Ethylester auch von der Bienenlarve vor der Verpuppung produziert werden und so in das Wachs gelangen können.

Abb. 1: SIR-Chromatogramm der Ethylester von Palmitinsäure, Ölsäure und Stearinsäure (Pfeile von links nach rechts) bei Direkteinspritzung (0,1 ng; oberstes Chromatogramm), oder nach Headspace-Sammlung über Bienenwachs (mittleres Chromatogramm) oder Bienenwachs plus je 10 ng der einzelnen Ester (unteres Chromatogramm)



Der Vergleich des unteren mit dem mittleren Chromatogramm (Abb. 1) zeigt jedoch auch, dass sich eine Zugabe von 10 ng je Pheromonsubstanz im Headspace nicht nachweisen lässt, wenn sie direkt auf Bienenwachs aufgegeben wird. Ein fast identisches Bild ergibt sich, wenn sogar 100 ng pro Substanz hinzugegeben werden. Dies dürfte bedeuten, dass die Ethylester stark an der Wachsoberfläche adsorbieren und daher nicht mehr im Headspace nachweisbar sind. Aus biologischer Sicht würde das sogar Sinn machen, denn im extrem kleinen Luftraum einer Bienenwabe würde ein Pheromon, das von einer weiblichen Milbe abgegeben wird, sehr schnell den gesamten Luftraum sättigen, wenn das Pheromon nicht wegdiffundieren kann oder auf andere Weise entfernt würde. In der Folge könnte die männliche Milbe keinen Duftgradienten mehr wahrnehmen, der ihr den Weg zum Weibchen weist. Wird das Pheromon jedoch effektiv von der Wachsoberfläche adsorbiert, könnte sich dagegen ein stabiler, für das Männchen wahrnehmbarer Gradient einstellen.

Die Konsequenz dieser Überlegungen ist jedoch, dass damit die Anwendbarkeit in der Praxis erheblich erschwert wird. Die ursprünglich als positiv eingeschätzten sehr ähnlichen physikochemischen Eigenschaften des Bienenwachses und der Pheromon-Komponenten sind zwar vorteilhaft, was das Einbringen der Substanzen in Bienenwachs betrifft, sie sind auf der anderen Seite jedoch sehr nachteilig was eine Evaporation der Pheromon-Komponenten vom Bienenwachs betrifft. Daraus folgerten wir, dass eine Applikation von außen auf die verdeckelte Wabe sehr wahrscheinlich nicht ausreichend ist, um nach Diffusion durch das Wachs eine wirksame Pheromonkonzentration innerhalb der Brutzelle zu erreichen. Vielmehr müsse das Pheromon wahrscheinlich direkt in die Wabe ausgebracht werden.

Unser Projektpartner ging daher dazu über, hohe Konzentrationen der Ölsäure direkt in die noch unverdeckelte Wabe zu sprühen, um daraufhin die Spermienübertragung auf die Milbenweibchen zu untersuchen. Erste positive Ergebnisse aus dem Jahr 2013 zeigten, dass mit dieser Applikation ca. 10-20% der Varroa-Weibchen nicht begattet werden. Im Folgejahr konnten die Ergebnisse bezüglich der reduzierten Spermienübertragung bestätigt werden. Allerdings zeigte eine starke Erhöhung der Pheromonkonzentration keine deutliche Wirkungsverstärkung. So gab es keinen Unterschied je nachdem ob 1 µg oder 100 µg Ölsäure pro Brutwabe eingesetzt wurden. Nach Schätzungen unseres Projektpartners, die auf einem mathematischen Modell zur Populationsentwicklung der Varroamilbe beruhen, sollte damit dennoch das Populationswachstum der Milbe um ca. 50 bis 75% reduziert werden können. Entsprechende, in der Saison 2015 durchgeführte Versuche, in denen die Population der Milbe nach Sprühapplikation direkt ermittelt wurde, erbrachten entgegen der Erwartung jedoch keine signifikante Reduktion der Milbenpopulation. In einer anderen, vielversprechenden Applikationsform wurde die Ölsäure in einer Polymermatrix eingebettet (von der Fa. Epinamics GmbH hergestellt), aufgesprüht. Ein Träger mit geringerer Bindungsstärke für Ölsäure sollte die Freisetzung der Ölsäure in der Brutwabe begünstigen. Die Ergebnisse waren jedoch nicht besser als bei Besprühung mit Ölsäure allein. Letztendlich wurde auch ein Test mit dem kompletten Pheromongemisch durchgeführt, um herauszufinden, ob im Bienenstock möglicherweise synergistische Effekte des Gemischs im Vergleich zur Einzelsubstanz auftreten, die im Labortest nicht detektiert werden konnten. Auch hier konnte jedoch keine verbesserte Wirksamkeit nachgewiesen werden.

Während erste vielversprechende Ergebnisse mit der direkten Sprühapplikation erzielt wurden, wurden vorab schon Recherchen zur möglichen Zulassung eines Produktes auf Basis von (1) Ölsäure, das (2) direkt in unverdeckelte Brutzellen gesprüht wird, durchgeführt. Die ermittelten Eckpunkte sind wie folgt: Das Mittel wäre als Tierarzneimittel zuzulassen. Eine Verwirrmethode mittels Sexualpheromon gegen Ektoparasiten wäre allerdings ein völlig neuer Wirkmechanismus auf diesem Gebiet, für den es zulassungstechnisch noch keinen Präzedenzfall gibt. Zu bevorzugen wäre ein nationales Zulassungsverfahren in Deutschland über das BVL mit einer nachfolgenden dezentralen Zulassung in anderen EU-Ländern im Rahmen eines MRP-Verfahrens. Das Produkt würde unter den MUMS (Minor Use Minor Species)–Status mit geringeren Anforderungen an die Datenmenge für die Zulassung fallen. Es könnte der Verzicht auf Festsetzung von Wartezeiten beantragt werden, was als aussichtsreich erscheint, da Ölsäure als „Substance considered as not falling within the scope of regulation (EC) No 470/2009“ gelistet ist.

Nach derzeitigem Stand erscheint allerdings eine alleinige Verminderung der Spermienübertragungsrate von ca. 10-30% als nicht aussichtsreich, um eine Zulassung zu erwirken. Da in der letzten Saison der Projektphase auch keine signifikante Hemmung der Populationsentwicklung der Milbe im Bienenstock nachgewiesen werden konnte, macht eine Weiterverfolgung von Zulassungsfragen derzeit keinen Sinn.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die wichtigste Position des zahlenmäßigen Nachweises sind die Personalkosten. Das Personal wurde ausschließlich dazu eingesetzt, die geplanten Ziele zu erreichen. Hierzu gehörten die Untersuchungen zu den physiko-chemischen Eigenschaften der Pheromonkomponenten wie deren Löslichkeit, Sprühfähigkeit und Abdampfraten. Auch eine Methode zur Analyse von Pheromonkomponenten im Headspace wurde etabliert, auch wenn sich die Methodenentwicklung als etwas schwieriger als geplant erwies. Schließlich wurden auch Recherchen zur Toxikologie und zu Fragen einer möglichen Zulassung durchgeführt. Es wurde stets eine kosteneffektive Verwendung der bewilligten Mittel angestrebt. Nicht durchgeführt wurden daher Arbeiten, die aufgrund erarbeiteter Zwischenergebnisse als nicht aussichtsreich erschienen, z.B. die Einarbeitung des Pheromons in Bienenwachs. Aus diesem Grund wurden bis Projektende 23,7% der bewilligten Personalmittel nicht abgerufen. Ähnlich verhielt es sich bei den Reise- und Materialkosten, von denen 21,5% bzw. 42,7% nicht abgerufen wurden.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Es wurden nur notwendige Arbeiten durchgeführt. Auch wenn die Arbeiten bis zum Projektende zu keinem vermarktungsfähigen Produkt geführt haben, so wurden sie doch in einer logischen, aufeinander aufbauenden Reihenfolge durchgeführt. Das Ziel war es stets, eine Methode zur Reduktion des Reproduktionserfolgs der Varroamilbe zu entwickeln. Hierzu war es zunächst notwendig, grundlegende physiko-chemische Eigenschaften der Pheromonkomponenten zu ermitteln. Dies lieferte wertvolle Erkenntnisse, welche Applikationsform im Bienenstock möglicherweise funktionieren, bzw. auch nicht funktionieren könnte. In diesem Zusammenhang war auch die Etablierung einer sensitiven Nachweismethode für bestimmte Pheromonkomponenten sehr hilfreich. Der ultimative Test zur Prüfung der Wirksamkeit musste dann allerdings (von unserem Projektpartner) am Bienenstock selbst durchgeführt werden.

4. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit des Ergebnisses

Da die entwickelte Verwirrmethode letztendlich keine ausreichende Effektivität hinsichtlich einer Populationsreduzierung bei der Varroamilbe im Bienenstock nachweisen konnte, ist auch keine unmittelbare Verwertbarkeit als Tierarzneimittel möglich. Allerdings haben die Arbeiten zu

einem besseren Verständnis der Funktionsweise der Sexualpheromone im Kontext der Begattung der Varroa-Weibchen innerhalb der Brutzelle beigetragen. Wir wissen jetzt, dass Partnerfindung, Begattung und Spermienübertragung bei Varroa trotz des stark limitierten Raums innerhalb der Brutzelle (die maximale Entfernung zwischen weiblicher und männlicher Varroamilbe ist mit wenigen mm sehr gering) stark von der Anwesenheit von Sexualpheromon abhängt (s. auch Häußermann et al. 2015). Wir wissen auch, dass dieses Pheromon auf der einen Seite nur in geringer Rate abdampft, auf der anderen Seite vom Wachs der Bienenwabe stark adsorbiert wird. Beides zusammen ermöglicht erst – zumindest in der Theorie – die Etablierung eines stabilen, vom Weibchen ausgehenden Duftstoffgradienten, ohne dass eine Duftstoffsättigung in der Brutzelle entsteht. Auf der anderen Seite konnte aber auch gezeigt werden, dass eine Zugabe von Pheromon zumindest die Spermienübertragung bei der Milbe reduzieren kann. Dieses Wissen kann Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen sein, die z.B. zum Ziel haben, eine Matrix zu finden, von der das Pheromon gut abdampfen kann und die in die Brutzelle eingebracht werden kann.

5. Fortschritt des Vorhabens bei anderen Stellen

Von anderer Stelle sind keine Ergebnisse bekannt, die mit der Reproduktion der Varroamilbe in der Brutzelle oder gar einer Bekämpfung in diesem Kontext im Zusammenhang stehen. Allerdings wird derzeit intensiv an olfaktorischen Rezeptoren bei Insekten geforscht, mit dem Ziel, Kairomone oder Repellentien zu finden. Bei der Bedeutung der Varroamilbe als Bienenparasit bleibt es nicht aus, dass auch hier das Forschungsinteresse geweckt wird (Eliash et al. 2014; Singh et al. 2014, 2016) und mittel-oder langfristig zu neuen Erkenntnissen auch auf dem Gebiet der Sexualpheromone führen wird.

6. Erfolgte Veröffentlichungen

Es sind keine Veröffentlichungen zu den o.g. Arbeiten geplant. Zu den anderen Fragestellungen aus diesem Modul s. Publikationsliste unseres Projektpartners.

Verwendete Literatur:

Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L., Neumann, P. (2012) Dead or alive: Deformed Wing Virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees. Appl. Environ. Microbiol. 78, 981–987. doi:10.1128/AEM.06537-11

DeGrandi-Hoffman G., Curry R. (2004) A mathematical model of Varroa mite (*Varroa destructor* Anderson and Trueman) and honeybee (*Apis mellifera* L.) population dynamics, Int. J. Acarol. 30 (3) 259-274.

- Donzé G., Herrmann M., Bachofen B., Guerin P.M. (1996) Effect of mating frequency and brood cell infestation rate on the reproductive success of the honeybee parasite *Varroa jacobsoni*, *Ecol. Entomol.* 21, 17-26.
- Eliash, N., Singh, N.K., Kamer, Y., Pinnelli, G.R., Plettner, E., Soroker, V. (2014) Can we disrupt the sensing of honey bees by the bee parasite *Varroa destructor*? *PLoS ONE* 9, e106889. doi:10.1371/journal.pone.0106889
- Fahle N., (2004) Ein Biotest zur Untersuchung der chemischen Kommunikation bei der Begattung der Bienenmilbe *Varroa destructor* (Anderson & Trueman 2000, ehemals *Varroa jacobsoni* Oudemans), Bachelorarbeit der Allgemeinen Agrarwissenschaften an der Universität Hohenheim.
- Fahle N., Rosenkranz P. (2005) Mate choice in *Varroa destructor*: Male mites prefer young females. In IUSSI-Tagungsband, ISBN 3-901864-02-4, Halle 2005
- Francis, R.M., Nielsen, S.L., Kryger, P. (2013) *Varroa*-Virus interaction in collapsing honey bee colonies. *PLoS ONE* 8, e57540. doi:10.1371/journal.pone.0057540
- Fries I., Camazine S., Sneyd J. (1994) Population dynamics of *Varroa jacobsoni*: a model and a review, *Bee World* 75, 5-28.
- Häußermann, C.K., Ziegelmann, B., Bergmann, P., Rosenkranz, P. (2015) Male mites (*Varroa destructor*) perceive the female sex pheromone with the sensory pit organ on the front leg tarsi. *Apidologie* 46, 771–778. doi:10.1007/s13592-015-0367-9
- Locke B., Fries I. (2010) Characteristics of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in Sweden surviving *Varroa destructor* mite infestation. *Apidologie*, in Druck.
- Martin S. (1998) A population model for the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies, *Ecol. Model.* 109, 267-281.
- Nazzi, F., Conte, Y.L. (2016) Ecology of *Varroa destructor*, the major ectoparasite of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Annual Review of Entomology* 61. doi:10.1146/annurev-ento-010715-023731
- Rosenkranz P. (1999) Honey bee (*Apis mellifera* L.) tolerance to *Varroa jacobsoni* Oud. in south America, *Apidologie* 30, 159-172.
- Rosenkranz P., Aumeier P., Ziegelmann B. (2010) Biology and control of *Varroa destructor*, *J. Invertebr. Pathol.* 103, 96-119.
- Ryabov, E.V., Wood, G.R., Fannon, J.M., Moore, J.D., Bull, J.C., Chandler, D., Mead, A., Burroughs, N., Evans, D.J. (2014) A virulent strain of Deformed Wing Virus (DWV) of honeybees (*Apis mellifera*) prevails after *Varroa destructor*-mediated, or in vitro transmission. *PLoS Pathog* 10, e1004230. doi:10.1371/journal.ppat.1004230
- Singh, N.K., Eliash, N., Kamer, Y., Zaidman, I., Plettner, E., Soroker, V. (2014) The effect of DEET on chemosensing of the honey bee and its parasite *Varroa destructor*. *Apidologie* 46, 380–391. doi:10.1007/s13592-014-0330-1
- Singh, N.K., Eliash, N., Stein, I., Kamer, Y., Ilia, Z., Rafaeli, A., Soroker, V. (2016) Identification and gene-silencing of a putative odorant receptor transcription factor in *Varroa destructor*: possible role in olfaction. *Insect Mol Biol.* doi:10.1111/imb.12212
- Weller, S. (2008) Populationsdynamik der parasitischen Bienenmilbe *Varroa destructor* in vorselektierten Bienenvölkern (*A. mellifera* L.) unter besonderer Berücksichtigung der Reproduktion. Diplomarbeit Fakultät für Biologie Univ. Hohenheim.
- Ziegelmann B., Steidle H., Lindemayer A., Rosenkranz P. (2008) Sex pheromones trigger the mating behaviour of *Varroa destructor*. *Apidologie* 29, 598.

Ziegelmann B., Rosenkranz P. (2010) Age and gender specific release of sex pheromone in the honeybee mite *Varroa destructor*, In Proceedings of the 4th European Conference of Apidology, Ankara 2010.

Ziegelmann B, Lindenmayer A, Steidle J, Rosenkranz P (2013) The mating behavior of *Varroa destructor* is triggered by a female sex pheromone. Part 1: Preference behavior of male mites in a laboratory bioassay. *Apidologie* 44: 314-323

Ziegelmann B, Tolasch T, Steidle JLM, Rosenkranz P (2013) The mating behavior of *Varroa destructor* is triggered by a female sex pheromone. Part 2: Identification and dose-dependent effects of components of the *Varroa* sex pheromone. *Apidologie*, doi: [10.1007/s13592-013-0198-5](https://doi.org/10.1007/s13592-013-0198-5).

Ziegelmann B, Rosenkranz P (2014) Mating disruption of the honey bee mite *Varroa destructor* under laboratory and field conditions. *Chemoecology* 24: 137-144