

Methodenentwicklung zur Risikobeurteilung

Zurzeit werden an verschiedenen europäischen Auftragsforschungsinstituten und der Agrarindustrie neue Methoden getestet, um das Risiko neu zugelassener Pflanzenschutzmittel auf Honig- und Wildbienen besser beurteilen zu können.

LUKAS JEKER, CLAUDIA VOLLES, PASCAL HERREN, AGROSCOPE, ZENTRUM FÜR BIENENFORSCHUNG, BERN

Die Zulassung von Pflanzenschutzmitteln (PSM) ist in der Schweiz durch die Schweizer Pflanzenschutzmittelverordnung (SR 916.161) geregelt. Das Zentrum für Bienenforschung von Agroscope überprüft und beurteilt die Auswirkungen von PSM

auf die Honigbiene. Auf der Grundlage der fachlichen Risikobewertung vom ZBF entscheidet das Bundesamt für Landwirtschaft (BLW) über die Zulassung eines PSM. Falls nötig, werden manchen Produkten Anwendungsbeschränkungen (Vorsichtsmassnahmen)

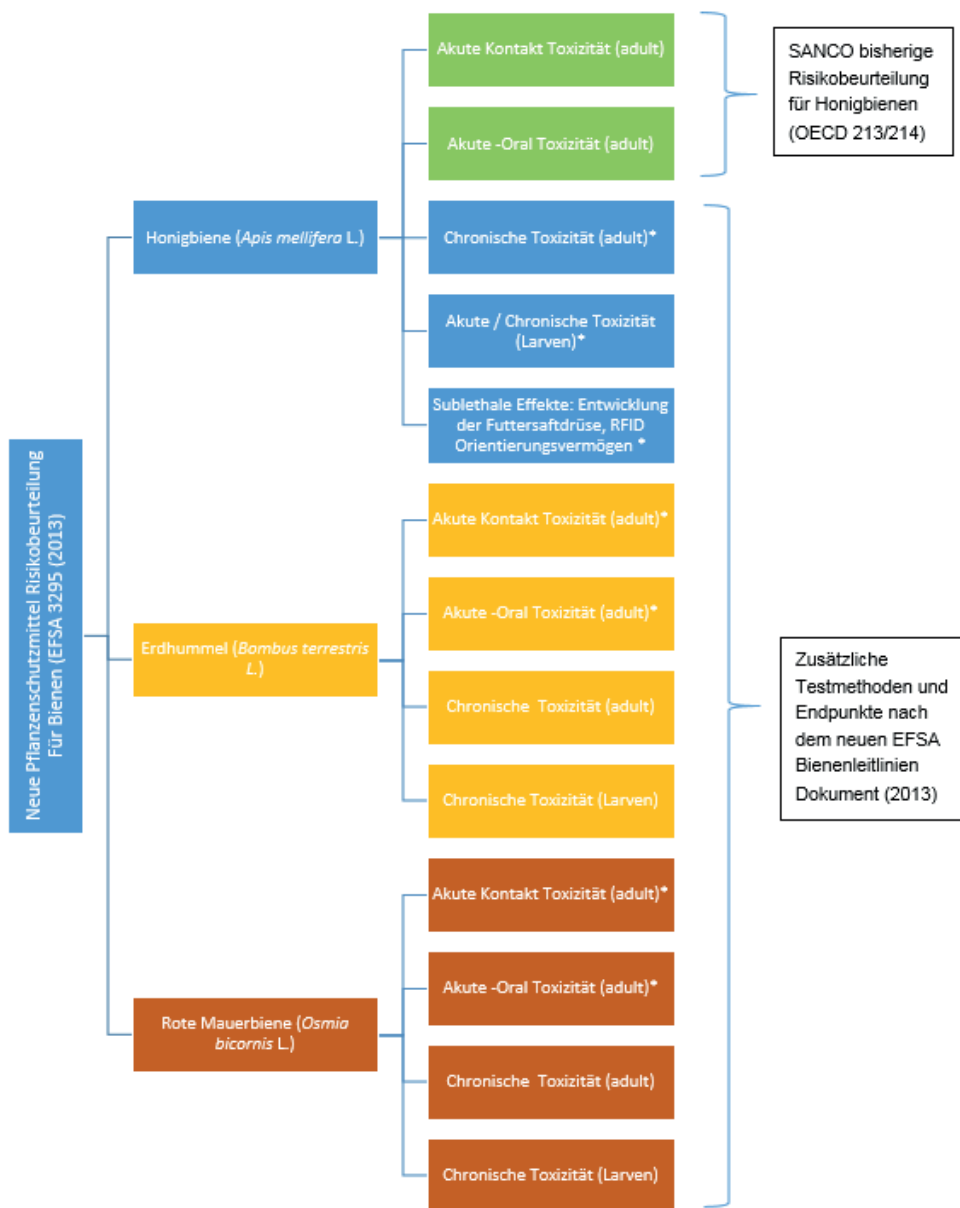
auferlegt, um mögliche Risiken für Honig- und Wildbienen bei der Anwendung des PSM auszuschliessen. Dieses Risikomanagement für den Bienenschutz erfolgt konkret durch die Verwendung von Auflagen (Sicherheitsätze Spe 8, mit dem Sicherheitscode «Spe 8» zur Kennzeichnung von für bienengefährlichen Substanzen): «Anwendungsvorschriften, um das Risiko für Bienen bei der Anwendung von bienengefährlicher PSM auf ein vertretbares Mass zu reduzieren», welche auf der Etiketle, Packungsbeilage und/oder dem Behälter des Produktes angebracht sind.

Die Datenanforderungen von PSM für die Schweiz entsprechen den rechtlichen EU-Verordnungen. Laut der festgelegten Kriterien darf ein PSM nur zugelassen werden, wenn in einer geeigneten Risikobewertung festgestellt wird, dass unter Praxisbedingungen keine unannehmbaren Nebenwirkungen auf die Bienen, deren Larven, das Verhalten und Überleben und die Entwicklung von Bienenvölkern eintreten.

Die PSM-Tests werden mit Honigbienen (*Apis mellifera* L.) in bis zu drei Prüfstufen (Labor, Halbfreiland und Freiland) durchgeführt. Diese vorgeschriebenen Standardtests erfolgen nach den von der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) und Pflanzenschutzorganisation für Europa und den Mittelmeerraum (EPPO) anerkannten Methoden. Die Details zum Zulassungsverfahren in der Schweiz sind von Claudia Volles in dieser Zeitung bereits vorgestellt worden.¹

Neue Anforderungen für die Risikobeurteilung mit Bienen

Nach Zwischenfällen von PSM-Anwendungen, der Einführung von PSM mit neuen Wirkungsmechanismen (systemische Mittel, Saatbeizung mit Insektiziden), Publikationen neuer Erkenntnisse über Neonicotinoide sowie dem weltweit beobachteten Bienenrückgang veröffentlichte die European Food Safety Authority (EFSA) neue Leitlinien für die Bewertung von



*Internationaler Ringtest (OECD Methoden-Entwicklung) Validierungsphase

Grafik 1: Geforderte zusätzliche Endpunkte für die Risikobeurteilung von Pflanzenschutzmitteln für Bienen.

von Pflanzenschutzmitteln in der Schweiz

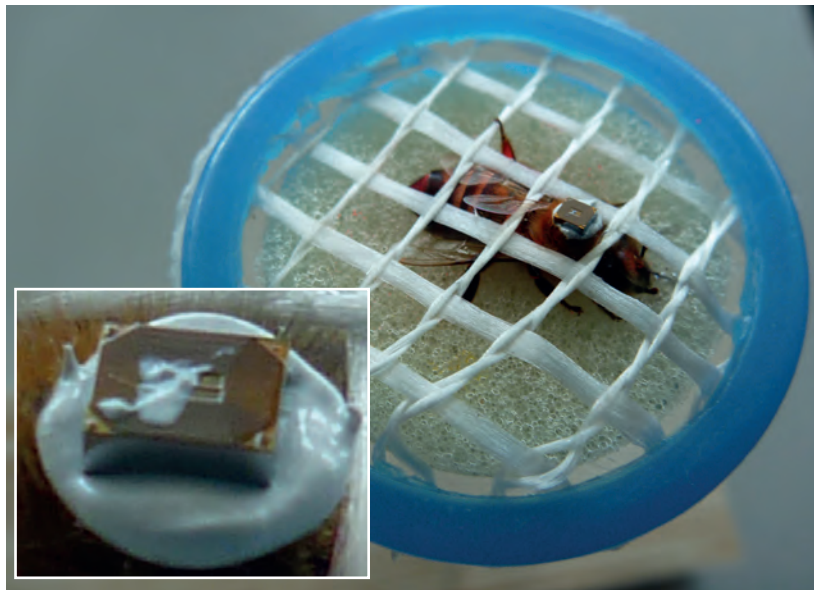
Risiken durch PSM für Honigbienen, Hummeln und Solitärbiene.²

In der bisherigen Schweizer Risiko- beurteilung (EU-Risikobewertungs- modell) für Honigbienen wurden die Risiken von PSM durch chronische Expositionen und möglichen suble- talen Effekten, beziehungsweise das potenzielle Risiko für Larven, nur teil- weise berücksichtigt. Die wichtigsten Änderungen für die neue Risikobe- urteilung von PSM sind eine bessere Abschätzung der neuen Expositions- wege, der chronischen Risiken, des Risikos durch den Verbrauch von aufgenommenem Wasser, des Risi- kos von PSM-Abbauprodukten (Me- taboliten), der Risikobewertung für Wildbienen (Hummeln und Solitär- bienen) sowie subletale Effekte wie z. B. Auswirkungen auf die Futter- saftdrüse oder Effekte auf das Erin- nerungsvermögen (Kognition) oder der Orientierung der Bienen. Demzu- folge werden neue Erfordernisse und Testmethoden von der EFSA für die Honigbienen, Hummeln und Solitär- bienen vorgeschlagen und gefordert.

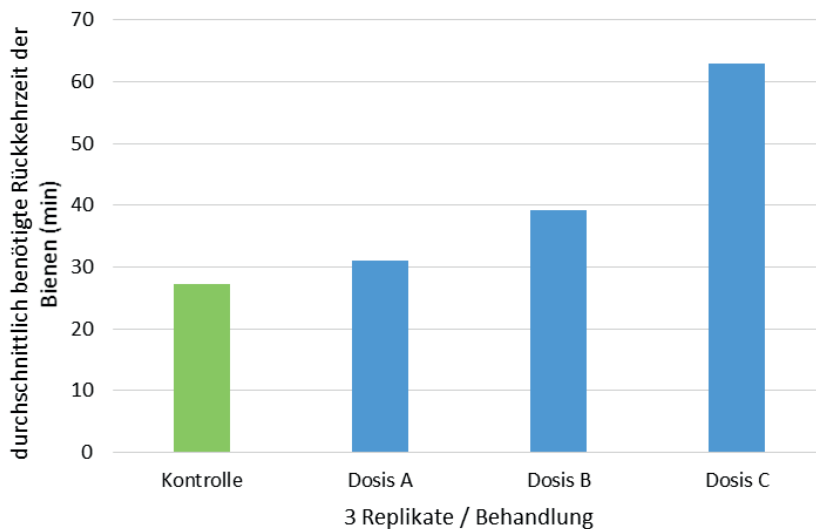
Die neuen zusätzlichen toxikolo- gischen Endpunkte (toxikologische Daten, welche die Behörden ver- langen, um die Toxizität eines PSM gegenüber Bienen zu berechnen und zu beurteilen) erfordern die Entwick- lung und Validierung neuer Testme- thoden (siehe Grafik 1).

Radio Frequency Identification (RFID)

Zurzeit werden international neue Testmethoden für die Risikobeurteilung mit Hummeln, Solitärbiene und Honigbienen in einem sogenannten Ringtest entwickelt und validiert. In einem Ringtest wird eine Methode nach einem einheitlichen Versuchsplan und Validitätskriterien an ver- schiedenen Laboratorien getestet. Die erhobenen Daten werden dann mitei- nander verglichen. Agroscope ZBF ist bei der Entwicklung dieser Methoden beteiligt. Die Validierung der Metho- den ist nötig, um einen Test interna- tional anerkennen zu lassen.



Diese in der Königinnen- Markierungs- hülse fixierte Biene erhält einen Transpon- der (TAG) für die automatische und kontaktlose Kommunikationstechnik (RFID). Befestigt wird der TAG mit Zahnzement auf dem Thorax der Biene (siehe Einschaltbild).



Grafik 2: Je nach der Be- handlung, und gegenüber der unbehandelten Kontrolle, finden sich Unterschiede in der Zeitdauer, die für den Rück- flug zum Stock benötigt wird. Die Grafik zeigt, dass die Metho- de funktioniert und man auch subletale Effekte mittels RFID er- mitteln kann.

Die Teilnahme an internationalen Ringtests ist für die Schweizer Behör- de sehr wichtig und nötig, um neue Methoden sowie Erkenntnisse im Bie- nenschutz als unabhängige Instanz mit zu entwickeln, mit zu bestimmen und somit die Risikobeurteilung und Zulassung von Pflanzenschutzmitteln gegenüber Bienen anzupassen und nach den neusten Erkenntnissen zu verbessern.

Dieses Jahr beteiligt sich das Zent- rum für Bienenforschung am interna- tionalen Ringtest für die Validierung der RFID-Testmethode. Der Ringtest wird in 12 Labors in fünf verschie- denen Ländern (Deutschland, Italien, England, Frankreich und Schweiz)

durchgeführt. Bei diesem Test wird die Beeinträchtigung durch das Ver- füttern subleterer PSM-Dosen auf das Erinnerungsvermögen von Bienen untersucht. Mithilfe der RFID (Radio Frequency Identification) Technologie wird die Rückkehrzeit und -zeit der Bienen in den Stock ermittelt.

RFID ist eine automatische und kontaktlose Kommunikationstechnik und dient zur Identifikation von Per- sonen, Tieren, Waren etc. Ein RFID- System besteht aus einem Datenträger (Transponder oder TAG genannt) und einem Lesegerät. RFID funktioniert mit schwachen elektromagnetischen Wellen, welche von einem Lesegerät abgestrahlt werden. Treffen diese



Zur Vorselektionierung der Bienen mit genügend Geländekenntnissen für den Test mit der RFID-Methode werden mit Farbpulver gekennzeichnete Bienen einen Kilometer versetzt und dort freigelassen (links). Jene markierten Bienen, die genügend schnell zurückkehren, werden am verschlossenen Beobachtungsstock für den eigentlichen Test eingefangen (rechts).



Wellen auf einen Transponder, können die Informationen berührungslos von dessen Speicher gelesen und identifiziert werden. Diese Methode wird nun genutzt, um das Orientierungs- und Flugverhalten von Bienen zu bestimmen.

RFID-Testmethode

Sammlerinnen werden am frühen Morgen vor dem Flugloch einer Kolonie eingefangen und mit einem Farbpigment markiert. Anschliessend werden diese an einem definierten Standort in 1 km Entfernung vom Bienenstock gebracht und wieder freigelassen. Die mit der Umgebung vertrauten Bienen fliegen normalerweise direkt zu ihrem Bienenstock zurück. Durch die farbliche

Markierung sind die zurückkehrenden Bienen eindeutig erkennbar und werden erneut eingefangen und für den RFID-Test vorbereitet.

Diese Vorselektionierung ist notwendig, um garantieren zu können, dass nur Sammlerinnen verwendet werden, welche mit der Umgebung (mindestens bis in 1 km Entfernung vom Stock) vertraut sind. Die gesammelten Bienen werden dann in Gruppen von zehn Bienen aufgeteilt (3x10 Bienen pro Behandlung). Durch Fixieren der Bienen in Königinnen-Markierungshülsen wird jeder Biene ein TAG mit Zahnzement auf den Rückenpanzer (Thorax) aufgeklebt.

Aufgrund dieser TAGs können die Bienen bezüglich Behandlung und

Replikat identifiziert werden. Nach dem Präparieren aller Bienen mit den TAG, beginnt die orale Behandlung. Jeder Bienengruppe (10 Bienen pro Käfig) wird eine subletale Verdünnung eines PSM in 200 µl (30 %-iger Zuckerlösung) offeriert. Durch Futterweitergabe (Trophallaxis) wird die aufgenommene Zuckerlösung unter den Arbeiterinnen gleichmässig verteilt, wodurch jede Arbeiterin ungefähr die gleiche Dosis (20 µl/Biene) des PSM via Zuckerlösung konsumiert.

Nachdem die Bienen alles konsumiert haben oder nach maximal 1,5 h Exposition werden sie nach einer zusätzlichen Ruhephase zum definierten Standort des Vormittags gebracht, wobei alle wieder gleichzeitig

Im Labor in einer Versuchsanordnung mit je 10 Bienen pro Test-Container erfolgt die orale Behandlung (links). Mit Pflanzenschutzmittel (PSM) behandelte Zuckerlösung wird via Pipettenspitze verabreicht (rechts).





Freiland-Versuchsaufbau mit Testbienenstöcken vor dem Zentrum für Bienenforschung Agroscope in Liebefeld.



freigelassen werden. Nun zeigt sich, ob die Behandlung den Orientierungssinn der Bienen und somit die Rückkehrzeit beeinträchtigt. Die zurückkehrenden Bienen werden durch die Lesemodule, welche drei Tage vorher (Akklimationierung) fixiert wurden, identifiziert und registriert. Die Rückkehrzeit und -zeit wird während 24 h aufgenommen.

Wird ein Lesemodul von einer Biene mit TAG durchlaufen, wird diese erkannt und registriert. Dabei schaltet das Indikator-LED von Rot auf Grün. Die Daten werden gespeichert und können später mit einer Software ausgewertet und eine mögliche Beeinflussung des PSM auf die Orientierung, Rückkehrzeit und -zeit mit einer unbehandelten Kontrollgruppe statistisch verglichen und analysiert werden.

Pro Kolonie werden die Bienen mit verschiedenen Konzentrationen (subletalen Dosen) behandelt. Für die statistische Auswertung wird das Vorgehen an drei verschiedenen Kolonien


(drei Wiederholungen/Behandlung) wiederholt.

Die Validierungs-Phase dieser internationalen Ringtest-Methode läuft bis Ende Jahr. Danach werden alle Daten aus den verschiedenen Ländern ausgewertet und miteinander verglichen. Geplant ist, dass diese neue Methode Anfang 2017 als neue OECD-Leitlinien für eine offizielle Anerkennung von Pflanzenschutzmitteln eingereicht wird.

Nächster Schritt

Wie die RFID-Daten in eine Risikobewertung einfließen und gehandhabt werden, wird noch diskutiert. Eine wichtige Frage ist, ob es sich bei den getesteten Konzentrationen um feldrealistische Konzentrationen handelt. Das heißt, ob und in welcher Konzentration der Wirkstoff eines PSM nach der Anwendung in einer Kultur im Pollen und Nektar der behandelten Pflanzen vorkommt und einen möglichen subletalen oder toxischen Effekt durch die Aufnahme durch

Bienen bewirken kann. Dafür benötigt es Rückstandsstudien, bei welchen die Konzentration eines Wirkstoffes nach einer PSM-Applikation in verschiedenen Trachtquellen (Pollen, Nektar, Honig) gemessen wird.

Anhand solcher Daten (Versuchsergebnisse) kann eine mögliche Gefährdung (Beeinflussung) der Bienen durch subletale oder toxische Dosen evaluiert und wenn nötig entsprechende Sicherheitsauflagen für ein PSM angewendet werden. 

Literatur

1. Volles, C.; Charrière, J.-D.; Knauer, K. (2014) Pflanzenschutzmittel-Zulassungsverfahren: Risikobewertung für Bienen. *Schweizerische Bienen-Zeitung* 8: 19–22.
2. EFSA (2013) Guidance on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees) (<https://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/pub/3295>)

Die Bienen-Kästen sind für den Versuch mit vier Lesemodulen auf dem Flugbrett ausgerüstet (links). Die einzelnen TAG-Lesemodule (rechts) sind über Kabel mit einer Speichereinheit verbunden.