

Effekte von Neonicotinoiden  
auf die Aktivität des Muskels M17  
und das Lernverhalten der Honigbiene

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich der Biowissenschaften

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

Martina Kabrede

aus München

Frankfurt am Main 2015

(D 30)

vom Fachbereich der Biowissenschaften der

Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekanin: Prof. Dr. Meike Piepenbring

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Grünewald

2. Gutachter: Prof. Dr. Paul Dierkes

Datum der Disputation: 25.11.2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Allgemeine Einleitung</b> .....	<b>3</b>
1.1 Gefährdung der Honigbiene.....	3
1.2 Proboscis Extension Reflex (PER) und der Muskel M17 .....	4
1.3 Muskel und Elektromyogramm (EMG) .....	6
1.4 Lernen und Lernformen .....	7
1.5 Neuronale Grundlagen.....	11
1.5.1 Acetylcholinrezeptoren .....	11
1.5.2 Cholinerge Signalübertragung.....	12
1.5.3 Duftlernen.....	12
1.6 Insektizide und Neonikotinoide .....	14
1.6.1 Clothianidin.....	15
1.6.2 Thiacloprid .....	16
1.6.3 Imidacloprid.....	16
1.7 Fragestellungen .....	16
<b>2 Applikation von Neonikotinoiden in die Kopfkapsel</b> .....	<b>18</b>
2.1 Einleitung.....	18
2.2 Material und Methoden.....	18
2.2.1 Vorbereitung der Bienen .....	18
2.2.2 Einzelapplikationen .....	21
2.2.3 Zeitversetzte Doppelapplikationen .....	23
2.2.4 Auswertung.....	25
2.3 Ergebnisse .....	25
2.3.1 Einzelapplikationen .....	25
2.3.2 Zeitversetzte Doppelapplikationen .....	30
2.4 Diskussion.....	42
2.4.1 Einzelapplikationen .....	42
2.4.2 Zeitversetzte Doppelapplikationen .....	47
<b>3 Akute Fütterung mit Clothianidin bzw. Thiacloprid</b> .....	<b>51</b>
3.1 Einleitung.....	51
3.2 Material und Methoden.....	51
3.3 Ergebnisse .....	53
3.3.1 Akute Fütterung mit 1 ng Clothianidin .....	53
3.3.2 Akute Fütterung mit 250 ng Thiacloprid .....	57
3.4 Diskussion.....	60

3.4.1	Clothianidin.....	60
3.4.2	Thiaclopid .....	61
3.4.3	Allgemeine Aspekte .....	63
<b>4</b>	<b>Chronische und zusätzliche akute Fütterung mit Clothianidin bzw. Thiaclopid .....</b>	<b>64</b>
4.1	Einleitung.....	64
4.2	Material und Methoden.....	65
4.2.1	Clothianidin.....	65
4.2.2	Thiaclopid .....	68
4.3	Ergebnisse .....	69
4.3.1	Clothianidin.....	69
4.3.2	Thiaclopid .....	77
4.4	Diskussion.....	85
4.4.1	Clothianidin.....	85
4.4.2	Thiaclopid .....	89
4.4.3	Allgemeine Aspekte und Analyseergebnisse beider Substanzen.....	91
<b>5</b>	<b>Duflernen beim positiven Patterning unter Einfluss von Clothianidin .....</b>	<b>97</b>
5.1	Einleitung.....	97
5.2	Material und Methoden.....	98
5.2.1	Vorbereitung der Bienen .....	98
5.2.2	Konzentration der Substanzen .....	98
5.2.3	Injektion.....	99
5.2.4	Düfte .....	100
5.2.5	Versuchsaufbau und -ablauf.....	100
5.2.6	Auswertung.....	104
5.3	Ergebnisse .....	105
5.3.1	Sterberaten.....	105
5.3.2	Versuchsreihe 1: 0,25 ng Clothianidin vor Akquisitionstest injiziert.....	106
5.3.3	Versuchsreihe 2: 1 ng Clothianidin vor Akquisitionstest injiziert.....	110
5.3.4	Versuchsreihe 3: 1 ng Clothianidin vor Abrufttest 3 h injiziert .....	115
5.4	Diskussion.....	119
5.4.1	Sterberaten.....	119
5.4.2	Lernversuche .....	121
<b>6</b>	<b>Allgemeine Diskussion .....</b>	<b>125</b>
<b>7</b>	<b>Fazit und Ausblick.....</b>	<b>131</b>
<b>I</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>132</b>

<b>II</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>143</b>
<b>III</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>146</b>
<b>IV</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>147</b>
<b>V</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>148</b>
<b>VI</b>	<b>Eigenständigkeitserklärung .....</b>	<b>149</b>
<b>VII</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>150</b>

## Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Auswirkung von Neonikotinoiden auf die Muskelspikeaktivität des Muskels M17 und auf das Lernvermögen in einer komplexen Aufgabe an der Honigbiene (*Apis mellifera carnica*) durchgeführt. Dabei wurden drei verschiedene Substanzen verwendet: Clothianidin, Thiacloprid und Imidacloprid. Neonikotinoide stehen häufig im Verdacht, für das Sterben von Bienenvölkern verantwortlich zu sein, da die Bienen bei ihrer Nahrungssuche an behandelten Pflanzen den Substanzen ausgesetzt sind und diese möglicherweise damit auch an ihr Volk weitergeben. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, diese mögliche Gefährdung der Honigbiene durch Neonikotinoide weiter aufzuklären und deren Risiken zu beurteilen. Der Hintergrund für die Versuche zur Muskelspikeaktivität waren vorangegangene Versuche, die Auswirkungen von Neonikotinoiden auf die Motorik von sich frei bewegenden Individuen dokumentierten. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich diese Effekte auch an der Spikeaktivität des Muskels M17 widerspiegeln. Dafür wurden Elektromyogramme des Muskels M17 zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Gabe der Substanzen erstellt und deren mediane Anzahl mit einer Kontrollgruppe verglichen.

In einem ersten Versuch wurden Clothianidin (1  $\mu$ M), Thiacloprid (1  $\mu$ M), Imidacloprid (1  $\mu$ M) oder eine Kontrollsubstanz (PBS) in die Kopfkapsel appliziert. Beim Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigten sich für Imidacloprid keine Auswirkungen. Clothianidin verursachte eine deutlich erhöhte mediane Spikerate des Muskels M17, während Thiacloprid diese absenkte, beides im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch bei einer um 30 Minuten versetzten Doppelapplikation von Clothianidin (1  $\mu$ M) und Thiacloprid (10  $\mu$ M) stellten sich diese Effekte ein, wobei Clothianidin eine dominante Rolle einzunehmen scheint. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen zur Laufaktivität, welche sich ebenfalls durch Clothianidin erhöhte und durch Thiacloprid absenkte.

Ein weiteres Experiment untersuchte die Auswirkung einer akuten Fütterung mit Clothianidin (1 ng in 1  $\mu$ l) bzw. Thiacloprid (250 ng in 1  $\mu$ l) auf die Anzahl der Muskelaktionspotenziale. Auch hier zeigt sich eine deutliche Erhöhung der Spikeanzahl durch Clothianidin und eine Absenkung der Spikeanzahl durch Thiacloprid, was die Ergebnisse des ersten Versuchs nochmals bestätigt.

Des Weiteren wurden Untersuchungen zur Auswirkung einer chronischen Fütterung mit Clothianidin (50 ppb) bzw. Thiacloprid (5000 ppb) auf die Anzahl an Spikes durchgeführt. Die Bienen wurden dabei über mehrere Wochen im Volk mit den jeweiligen Substanzen gefüttert. Dabei zeigte sich, dass auch eine chronische Fütterung der Bienen mit Clothianidin ihre Anzahl an Muskelaktionspotenzialen deutlich erhöht, während eine chronische Fütterung mit Thiacloprid diese absenkt. In einer Kombination der chronischen Fütterung mit einer zusätzlichen akuten Fütterung des jeweils anderen Neonikotinoids zeigte sich, dass auch hier Clothianidin eine dominante Rolle gegenüber Thiacloprid einnimmt und auch keine synergistischen oder Gewöhnungseffekte der beiden Substanzen eintreten. Die chronisch eingefütterten Völker entwickelten sich dagegen wie die Kontrollvölker, sodass die hier beschriebenen Auswirkungen auf die Einzelbiene keine sichtbaren Effekte auf ganze Völker zu haben scheinen.

Zusätzlich wurden Versuche zum Duftlernen in einer komplexen Lernaufgabe, dem positiven Patterning, unter Einfluss von Clothianidin durchgeführt. Die Bienen müssen dabei zwischen unbelohnten Einzeldüften und einem belohnten Duftgemisch, bestehend aus den beiden Einzeldüften, unterscheiden. In verschiedenen Versuchsdurchläufen wurden 0,25 ng oder 1 ng Clothianidin (jeweils 1 µl) in den Thorax injiziert, entweder vor der Akquisitionsphase oder vor dem ersten Abrufttest nach drei Stunden. In keinem der Versuchsdurchläufe zeigten sich Effekte des Clothianidins auf den Lernvorgang, weder in der Akquisitionsphase noch in den Abrufttests. Somit wurden weder das Lernen an sich, noch die Konsolidierung und damit die Überführung des Gelernten in das Langzeitgedächtnis durch das Clothianidin beeinflusst. Allerdings könnte die Immunabwehr der Bienen nach längerer Einwirkung des Clothianidins (24 h) in der höheren Konzentration herabgesetzt sein, da viele Bienen starben.

Insgesamt ergaben sich Effekte von Clothianidin und Thiacloprid auf die Anzahl der Aktionspotenziale des Muskels M17, die sich aber im gesamten Volk nicht widerspiegeln. Der Lernvorgang in der hier durchgeführten komplexen Lernaufgabe wird durch Clothianidin nicht beeinflusst. Möglicherweise entsteht dieser Unterschied in den Ergebnissen durch eine Bindung der Substanzen an verschiedene Rezeptorsubtypen, die pharmakologisch unterschiedliche Eigenschaften besitzen und somit auch unterschiedliche Auswirkungen zeigen.

## 1 Allgemeine Einleitung

### 1.1 Gefährdung der Honigbiene

Die Honigbiene war schon immer von großer Faszination für den Menschen. Als soziales Insekt lebt sie in ihrem Volk, in dem Tausende von einzelnen Individuen so effizient zusammenarbeiten. Jede Biene scheint genau zu wissen, was ihre Aufgabe ist und was sie zu tun hat. In den vergangenen Jahren mussten Imker in Europa und Nordamerika mit steigenden Verlusten der Honigbiene *Apis mellifera* zurechtkommen, ohne dass ein wirklicher Grund für diese Völkerverluste ausgemacht werden konnte. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Verluste auf ein Zusammenspiel verschiedener Gefährdungen für die Biene zurückzuführen sind (Le Conte et al., 2010). Zu diesen Gefährdungen zählen beispielsweise die Milbe *Varroa destructor* oder auch die Darmparasiten *Nosema apis* und *Nosema ceranae*. Ein weiteres Risiko für die Honigbiene stellen die Insektizide dar, die Nutzpflanzen, zum Beispiel Obstbäume oder Raps, vor Schadinsekten schützen. Da die Biene an solchen Pflanzen Nektar und Pollen sammelt, ist auch sie als Nutzinsekt von diesen Substanzen betroffen. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf den sogenannten Neonikotinoiden, die seit den 1990er Jahren auf dem Markt sind und häufig für das Bienensterben, sprich die Verluste ganzer Bienenvölker, verantwortlich gemacht werden. Seit dem 1. Dezember 2013 dürfen in der Europäischen Union drei dieser Substanzen (Clothianidin, Imidacloprid und Thiamethoxam) über einen Zeitraum von zwei Jahren nicht mehr an von Bienen bestäubten Pflanzen eingesetzt werden und wurden damit in ihrer Anwendung stark limitiert, da sie als ein hohes Risiko für Bienen eingestuft wurden (Durchführungsverordnung (EU)). Aufgrund der Wichtigkeit der Honigbiene als Nutzinsekt und ihrer offensichtlich hohen Gefährdung durch Neonikotinoide ist es von großer Bedeutung, die Auswirkungen dieser Substanzen auf die Biene zu erforschen. Die vorliegende Arbeit soll zur Einschätzung des Risikos für Bienen (*Apis mellifera carnica*) durch Neonikotinoide beitragen. Alle Versuche wurden mit subletalen Dosen durchgeführt, um die Auswirkungen der Substanzen Clothianidin, Thiacloprid und Imidacloprid auf die Biene und deren Verhalten zu untersuchen, in diesem Fall speziell auf die Spikeaktivität des Muskels M17 und auf das Duftlernen in einer komplexen Lernaufgabe. Auch soll die Kombination verschiedener Neonikotinoide untersucht werden, da bisher nicht klar ist, ob sich diese Substanzen gegenseitig beeinflussen und damit verstärken oder abschwächen könnten (Hawthorne & Dively, 2011).



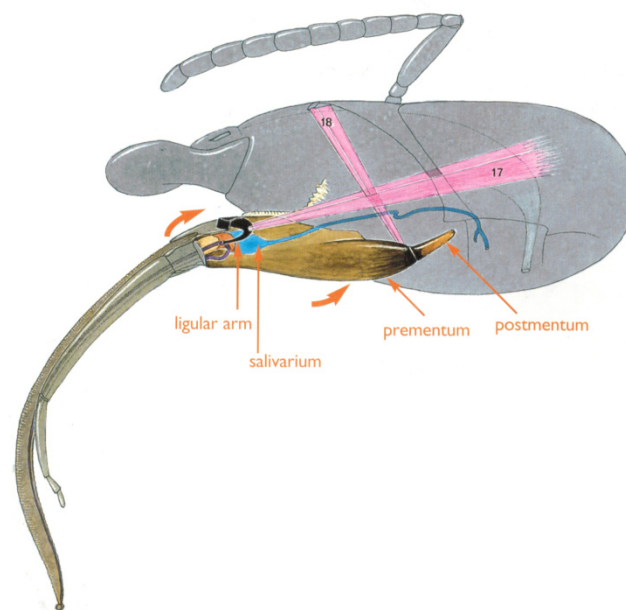
Zunächst soll eine kurze Einführung in die betreffenden Strukturen der Biene, die verwendeten Neonikotinoide und die Biene als Lernmodell gegeben werden.

## **1.2 Proboscis Extension Reflex (PER) und der Muskel M17**

Da in vorangegangenen Versuchen (zum Beispiel Schneider et al., 2012) ein Effekt von Neonikotinoiden auf die Motorik festgestellt werden konnte, soll dieser Effekt hier näher untersucht werden. Für Versuche, die die Motorik der Biene betreffen, eignet sich der Rüsselreflex der Biene, da er einen leicht auszulösenden und gut untersuchten Reflex darstellt. Der **Proboscis Extension Reflex (PER)** beschreibt den Vorgang, in dem eine Biene ihren Rüssel ausstreckt, um damit Nahrung aufzunehmen, und anschließend auch wieder einfaltet. Zunächst soll aber der Begriff „Rüssel“ bzw. „Proboscis“ näher betrachtet werden. Der Rüssel der Biene besteht aus zwei Hauptkomponenten: den Maxillen und dem Labium. Das Labium wiederum besteht aus dem Postmentum, dem Prementum, den Labialpalpen und der langen Glossa, die man zum Verständnis als „Zunge“ bezeichnen könnte. Wenn der Rüssel ausgestreckt ist, wird die Glossa von den Labialpalpen umschlossen, welche wiederum von den Maxillen umschlossen werden. So bilden diese drei Einheiten einen Kanal, um die flüssige Nahrung aufzunehmen. Das bedeutet auch, dass dieser Kanal nur besteht, wenn der Rüssel ausgestreckt ist und keine feste Einheit bildet wie bei anderen Insekten. Dies hat seinen Grund darin, dass der Rüssel bei der Biene zu anderen Zwecken (zum Beispiel zum Zellenausbau) nicht hinderlich sein darf, sprich, er muss einfaltbar sein. So wird der Rüssel bei der Biene nur dann ausgestreckt, wenn die Biene einen Reiz aufnimmt, der flüssige Nahrung verspricht (Goodman, 2003). Der Rüssel der Biene ist damit ein sehr komplexes Organ, das sich bei Bedarf aus mehreren Einzelstrukturen zusammensetzt, die für sich gesehen nicht in der Lage wären, die wichtige Funktion der flüssigen Nahrungsaufnahme zu bewältigen (Snodgrass, 1956).

Dieses Ausstrecken des Rüssels, der PER, wird beispielsweise dann ausgelöst, wenn eine der Antennen, die beide gustatorische Rezeptorneuronen besitzen, mit Zuckerlösung berührt wird (Frings, 1944), woraufhin mehrere Bewegungen der Biene folgen: Die Antennen werden nach vorne in Richtung der Zuckerlösung bewegt, die Mandibeln werden geöffnet, und der Rüssel wird ausgestreckt. Darauf folgen mehrere Leckbewegungen, sodass der gesamte PER aus Streckung, Lecken und Retraktion besteht (Rehder, 1987). Dies lässt sich in einem vom zugehörigen Muskel M17 aufgenommenen

Elektromyogramm sehr gut darstellen. Der Muskel M17 (Nomenklatur nach Snodgrass, 1956) ist ein paariger Muskel, der vom dorsalen Ende der Kopfkapsel zur sogenannten Ligula, dem Bereich, an dem die Basis der Glossa auf das Prementum trifft, verläuft (siehe Abbildung 1). Der Muskel M17 wird von zwei Motoneuronen innerviert, deren Axone über den Labialnerv in das Subösophagealganglion (siehe Kapitel 1.5) führen (Rehder, 1989).



**Abbildung 1:** Verlauf des Muskels M17.

Der paarige Muskel M17 verläuft vom dorsalen Ende der Kopfkapsel zu dem Bereich, in dem die Basis der Glossa auf das Prementum trifft, das heißt von der Seite gesehen schräg durch die Kopfkapsel der Biene (Abbildung: Goodman, 2003; reproduced by permission of the International Bee Research Association).

Der Muskel M17 ist hauptsächlich für die Retraktion des Rüssels verantwortlich: Wird er kontrahiert, wird das Prementum zurückgezogen, wodurch der ganze Rüssel eingezogen wird (Goodman, 2003). Der Muskel M17 ist aber auch am gesamten Vorgang des PERs beteiligt. Somit können in Aufnahmen des Muskels M17 alle drei Phasen des PERs sehr anschaulich dargestellt werden (siehe Abbildung 2). Der PER lässt sich gut in Versuchen mit Muskelableitungen (Kapitel 1.3) sowie in Duftkonditionierungsversuchen (Kapitel 1.4) einsetzen. Beides ist Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

### 1.3 Muskel und Elektromyogramm (EMG)

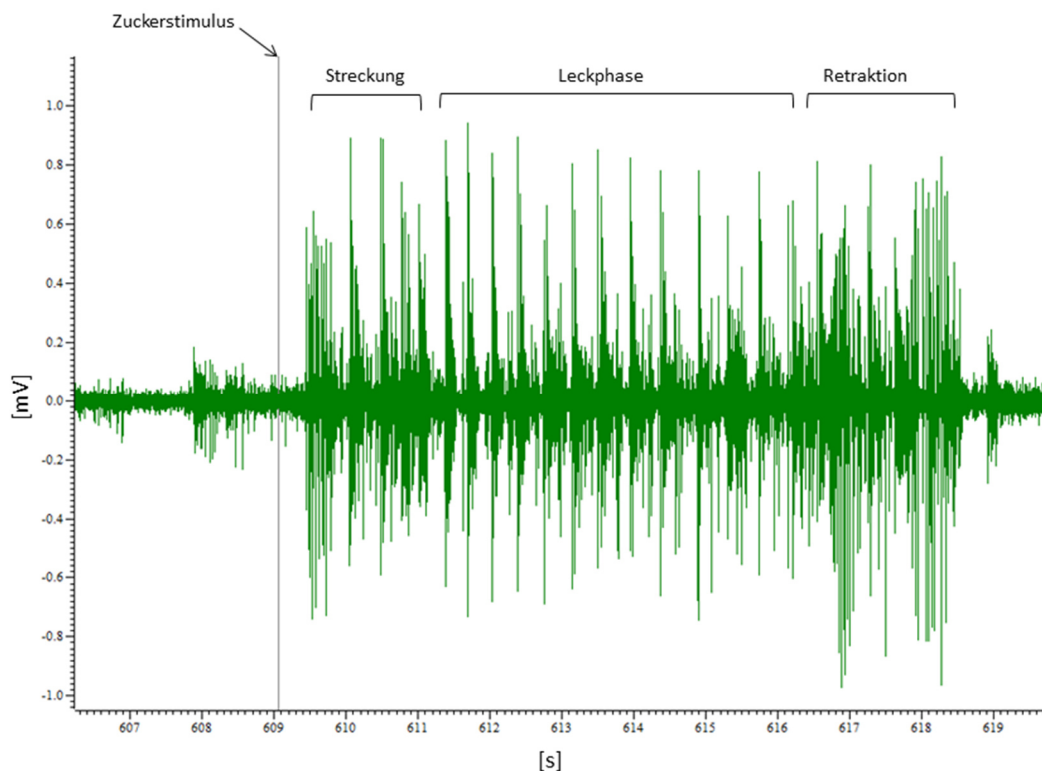
Die Muskeltätigkeit ist in nahezu alle physiologischen Funktionen involviert und daher unentbehrlich für viele Aktivitäten, zum Beispiel für die Bewegung, die Kommunikation oder auch den Herzschlag (Belzunces et al. 2012). Insekten besitzen nur wenige Motoneurone im Vergleich zu Wirbeltieren. Dafür kann bei Insekten eine Muskelfaser von mehreren Motoneuronen innerviert werden, man spricht deswegen von polyneuraler Innervation. Ein Motoneuron endet nicht wie bei Wirbeltieren an einer motorischen Endplatte, sondern bildet viele Synapsen entlang der Muskelfaser. Aus diesem Grund gilt bei Muskeln von Insekten nicht das Alles-oder-nichts-Prinzip, denn das Aktionspotenzial muss nicht der Faser entlang weitergeleitet werden. Vielmehr bilden sich entlang der Muskelfaser viele einzelne Potenziale (Wendler, 1999). Diese elektrischen Potenzialschwankungen, die mit der Muskelkontraktion verbunden sind, können in einem Elektromyogramm aufgezeichnet werden.

Ein Elektromyogramm (EMG) misst die elektrische Aktivität in einem Muskel, die sich ändert, abhängig davon, ob sich der Muskel zum Beispiel im Ruhe- oder in einem kontrahierten Zustand befindet. Wird ein Muskel bewegt, ziehen sich dessen Muskelfasern zusammen, und das elektrische Potenzial ändert sich. Man misst im EMG also die elektrische Signalleitung in den Muskelfasern.

Rehder (1987) war der Erste, der das EMG zur Aufzeichnung des PERs nutzte, um damit den motorischen Ablauf und die tatsächliche Bewegung des Rüssels exakter darstellen und bewerten zu können, zum Beispiel während eines Konditionierungsvorganges. Mithilfe eines EMGs des Muskels M17 kann die Stärke des Reflexes und auch der zeitliche Ablauf genauer beurteilt werden. Durch die hohe Korrelation in den Aufnahmen der beiden Muskel M17 (rechts und links) wird von einer Ko-Aktivierung der Muskeln ausgegangen (Rehder, 1987). Insgesamt registriert ein EMG mehrere verschiedene Aspekte und mehr Details des PERs, die mehr Aufschluss geben als die bloße Beobachtung des Reflexes (Smith & Menzel, 1989; Hammer et al., 1994).

Betrachtet man nun den Muskel M17 der Biene und die damit verbundene Bewegung, den PER, lässt sich im EMG ein typisches Muster für die Muskelbewegungen erkennen (siehe Abbildung 2). Direkt nach dem Zuckerstimulus beginnt die Streckung des Rüssels,

anschließend folgen mehrere Leckbewegungen, bei denen die Biene Zuckerwasser aufnimmt, und zum Schluss erfolgt die Retraktion des Rüssels.



**Abbildung 2:** Elektromyogramm des Muskels M17 während des PERs.

Die drei Phasen – Streckung, Leckphase, Retraktion – sind gut voneinander zu unterscheiden. Der senkrechte Strich bei ca. Sekunde 609 steht für den Beginn des Zuckerstimulus.

#### 1.4 Lernen und Lernformen

Ein Tier muss grundsätzlich in der Lage sein, auf seine sich ständig wandelnde Umwelt in einer solchen Weise zu reagieren, dass seine eigene Existenz und die seiner Artgenossen für die Zukunft gesichert sind. Wäre das Tier nicht in Übereinstimmung mit seiner Umgebung, wären seine Überlebenschancen sehr gering. Diese Reaktionen auf die Umwelt beinhalten in großem Maße verschiedene Formen des Lernens (Pavlov, 1927). Nachdem von Frisch (1914) erste Lernversuche mit Bienen durchführte, indem er sie auf verschiedene Farben trainierte, wurde später auch das Duftlernen bei der Honigbiene eine gängige Form der Lernexperimente. Hier soll nun näher auf das Duftlernen bei der Biene eingegangen werden.

Das Duftlernen ist für die Biene eine fundamentale Fähigkeit, weil sie dadurch lukrative und lebenswichtige Nahrungsquellen finden bzw. wiederfinden kann. Landet sie auf einer

Blüte, lernt sie, den Duft dieser Blüte mit der darin enthaltenen Nahrung zu verbinden, und ist damit in der Lage, sich diese als Nahrungsquelle im Gedächtnis abzuspeichern, wiederzuerkennen und diese Information an die anderen Bienen in ihrem Volk weiterzugeben (Menzel et al., 1993). Durch ein Gedächtnis für die Effizienz der jeweiligen Nahrungsquelle kann sie ihre Sammelflüge optimieren, was vor allem in Zeiten, in denen die Nahrung knapp ist, von enormem Vorteil ist (Gil, 2010). Da sich diese Nahrungsquellen in kürzester Zeit und vor allem auch jahreszeitlich stark verändern, muss die Biene fortlaufend neu erlernen, wo sie Nahrung finden kann und ob diese ertragreich ist.

Lernen lässt sich in höhere Lernformen (wie Spracherwerb) und einfache Lernformen einteilen. Die einfachen Lernformen wiederum beinhalten das nicht-assoziative und das assoziative Lernen. Zu den nicht-assoziativen Lernformen zählen zum Beispiel die Habituation und die Sensitivierung. In beiden Fällen ist jeweils nur ein Stimulus involviert. Die Habituation beispielsweise stellt eine stufenweise Abnahme einer angeborenen Reaktion auf einen monotonen und wiederholten Stimulus dar. Der Stimulus enthält dabei keine bzw. nur wenig Information, sodass sich die Reaktion darauf fortwährend vermindert, was für das Tier insofern von Vorteil ist, als es sowohl seine Aufmerksamkeit auf biologisch relevante Ereignisse fokussiert als auch wichtige Energie sparen kann (Braun & Bicker, 1992).

Beim assoziativen Lernen verhält es sich ganz anders. In diesem Fall wird ein neutraler Reiz mit einem Belohnungs- oder einem Strafreiz verknüpft. Es handelt sich also nicht mehr nur um einen Stimulus, sondern um zwei, die miteinander verknüpft werden. Zu dieser Lernform gehören die Konditionierungen, zum einen die operante oder instrumentelle Konditionierung, zum anderen die klassische Konditionierung.

Bei der operanten Konditionierung lernt ein Tier, sein eigenes Verhalten bzw. eine eigene Verhaltensweise mit einer Strafe oder einer Belohnung zu verknüpfen (Giurfa, 2007). Das Lernen erfolgt damit durch Versuch und Irrtum. Das Tier lernt relativ schnell, eine belohnte Verhaltensweise zu wiederholen bzw. eine Verhaltensweise, die bestraft wird, zu vermeiden. Der Experimentator hat bei der operanten Konditionierung keinen Einfluss auf die Art der Verhaltensweise, es kann nur belohnt oder bestraft werden, was das Tier zufälligerweise an Verhalten zeigt. Beispielsweise lernt die Biene, eine besonders ergiebige Nahrungsquelle, die sie durch Zufall angefliegen hat, mit ihrem jeweiligen Duft

zu assoziieren, und wird diese infolgedessen vermehrt anfliegen, da sie durch den Nektar belohnt wurde (Lindauer, 1970).

Bei der klassischen Konditionierung lernt ein Tier, einen ursprünglich neutralen Stimulus mit einem biologisch relevanten Stimulus zu verknüpfen. Der biologisch relevante Stimulus muss ein Stimulus sein, der ganz natürlich im Leben des Tieres vorkommt, ein sogenannter unkonditionierter Stimulus (US), der eine unkonditionierte Reaktion (UR) hervorruft. Der neutrale Stimulus ist, wie der Name schon sagt, für das Tier von keinerlei Bedeutung und ruft damit auch keine Reaktion hervor. Er ist sozusagen ein Stimulus, der erst noch konditioniert werden muss, also ein zu konditionierender Stimulus (CS). Werden nun diese beiden Stimuli miteinander verknüpft und gelingt diese Assoziation, löst letztlich allein der CS die UR aus, wobei die UR in genau gleichem Maße ausfällt, wie wenn sie durch den US ausgelöst worden wäre (Pavlov, 1927). Die Biene kann auf eine Vielzahl verschiedener Duftstoffe konditioniert werden (Vareschi, 1971) und auch lernen, diese voneinander zu unterscheiden (Menzel & Bitterman, 1983). Einer der Ersten, der Konditionierungen an der Biene unter Verwendung des PERs durchführte, war Kuwabara (1957). Er trainierte Bienen auf Licht und Wasserdampf, indem er eine gleichzeitige Zuckerbelohnung präsentierte. Kuwabaras Mitarbeiter Takeda (1961) begann daraufhin als Erster mit der olfaktorischen Duftkonditionierung bei der Biene, die ebenfalls dem Prinzip der klassischen Konditionierung folgt. Wie oben beschrieben wird durch die Stimulation mit Zuckerwasser (US) der PER (UR) ausgelöst. Diesen Reflex macht man sich zunutze, um die Biene auf einen Duft zu konditionieren. Die Biene wird mit einem Duft (CS) konfrontiert, der zunächst keine Reaktion bei ihr auslöst. Dieser Duft wird nun aber mit einem Zuckerstimulus (als Belohnung) kombiniert, wodurch diese beiden Stimuli (Duft und Zuckerwasser) miteinander verknüpft werden. Letztlich löst allein der CS (Duft) die CR (PER) aus (Takeda, 1961).

Das assoziative Lernen lässt sich nochmals unterteilen in einfache und komplexe Formen. Zu den einfachen Formen des assoziativen Lernens gehören zum Beispiel die absolute Konditionierung, die im Prinzip wie oben bei der klassischen Konditionierung beschrieben abläuft (ein Duft wird belohnt ( $A^+$ ) und damit gelernt), oder auch die differenzielle Konditionierung, bei der ein Duft belohnt wird ( $A^+$ ) und ein anderer Duft unbelohnt bleibt ( $B^-$ ), wodurch die Biene lernt, diese beiden Düfte voneinander zu unterscheiden. Diese

Lernaufgaben sind für die Biene einfach zu bewältigen und gehören somit zum elementaren Lernen (Giurfa, 2007). Zu den komplexen und damit schwierigeren Formen des assoziativen Lernens gehören die sogenannten „Patterning“-Lernformen (positives und negatives Patterning), die damit zum nicht-elementaren Lernen zählen. Dabei werden zwei Einzeldüfte nicht belohnt, das Duftgemisch aus diesen beiden Einzeldüften hingegen wird belohnt (positives Patterning) oder umgekehrt (negatives Patterning). Diese Lernformen sollen später noch genauer beschrieben werden (siehe Kapitel 5).

Bei allen Lernvorgängen in der Biene lässt sich zwischen verschiedenen Gedächtnisformen unterscheiden, die vor allem durch ihre Dauer der Erinnerung charakterisiert sind: Kurzzeitgedächtnis (STM, engl. **short term memory**), Mittelzeitgedächtnis (MTM, engl. **mid term memory**) und Langzeitgedächtnis (LTM, engl. **long term memory**), wobei sich STM und LTM jeweils noch in eine frühe (e, engl. **early**) und eine späte (l, engl. **late**) Phase einteilen lassen (Menzel, 1999). Das eSTM, oder auch als Arbeitsgedächtnis bezeichnet, ist charakterisiert durch eine Erinnerungsdauer von wenigen Sekunden und recht unspezifisch, was den Inhalt der Erinnerung betrifft (Menzel, 2012). Das lSTM hat eine Erinnerungsdauer von bis zu mehreren Minuten und weist einen wesentlich spezifischeren Erinnerungsinhalt auf. Durch weitere Festigung bzw. Konsolidierung wird ein MTM aufgebaut, das stabiler ist als das STM, vor allem wenn es um neu gemachte Erfahrungen geht. Für den Aufbau eines STM bzw. MTM reicht bei der Biene ein einziger Lernvorgang (trial) aus. Nach mehreren Lernvorgängen erreichen die Erinnerungen eine Dauer von ein bis zwei Tagen (eLTM) bzw. mehr als drei Tagen (lLTM). Der Transfer vom STM in das LTM ist sowohl zeit- als auch ablaufabhängig, sodass es stark darauf ankommt, in welcher Form die Lernvorgänge stattfinden (Menzel, 1999). Entscheidend scheint dabei der Abstand zwischen den Trials zu sein, also das sogenannte „Inter-Trial-Intervall“ (ITI). Es konnte gezeigt werden, dass ein ITI von mindestens zehn Minuten positiven Einfluss auf das LTM hat, wodurch sich die Biene die gelernte Information deutlich länger merken kann (Menzel et al., 2001). Des Weiteren gibt es ein sogenanntes „Inter-Stimulus-Intervall“ (ISI), welches den zeitlichen Abstand zwischen dem CS und dem US bezeichnet. Es ist unbedingt notwendig, dass sich diese beiden Stimuli zeitlich überlappen. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass eine CS-US-Paarung am effektivsten ist, wenn der CS ca. ein bis drei Sekunden dem US vorausgeht (Menzel & Müller, 1996). Treten der CS und der

US in umgekehrter Reihenfolge auf oder überlappen sie sich nicht, stellt sich kein Lernerfolg ein (Bitterman et al., 1983; Szyszka et al., 2011).

## 1.5 Neuronale Grundlagen

Das Gehirn einer Biene hat in etwa ein Volumen von  $1 \text{ mm}^3$  und beinhaltet ca. 960.000 Neuronen (Witthöft, 1967). Damit ist es zwar klein, aber für ein Insekt doch sehr beachtlich. Das Bienenhirn ist symmetrisch angelegt und besteht aus verschiedenen Strukturen: dem Subösophagealganglion (SOG), den optischen Loben, den Antennalloben (AL), den Pilzkörpern (MB, engl. mushroom bodies), und dem lateralen Protocerebrum (LP) mit dem lateralen Horn (LH) (Menzel & Giurfa, 2001). Allein in den Pilzkörpern befinden sich jeweils ca. 170.000 Neuronen (Witthöft, 1967), die visuelle, olfaktorische, mechanosensorische oder auch gustatorische Sinnesinformationen verarbeiten (Mobbs, 1982). Die Pilzkörper sind die entscheidenden Strukturen beim Lernvorgang (Heisenberg, 1998) und werden auch mit der Steuerung der Motorik in Verbindung gebracht (Martin et al., 1998).

### 1.5.1 Acetylcholinrezeptoren

Acetylcholin ist der hauptsächliche exzitatorische Transmitter im Gehirn von Insekten. Es gibt zwei verschiedene Arten von Acetylcholinrezeptoren: den muscarinischen Acetylcholinrezeptor (mAChR) und den nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAChR). Der mAChR ist ein metabotroper Rezeptor, das heißt er ist G-Protein-gekoppelt. Er besteht aus sieben Transmembrandomänen und befindet sich bei Insekten in allen Teilen des Nervensystems. Der nAChR ist ein ionotroper Rezeptor, was bedeutet, dass er ein Ionenkanal ist, der unter anderem von Acetylcholin und Nikotin geöffnet werden kann, wenn diese daran binden. Bei Vertebraten befindet sich der nAChR an der motorischen Endplatte und im Nervensystem. Bei Insekten dagegen befindet er sich nur im zentralen Nervensystem (Kreissl & Bicker, 1989; Matsuda et al., 2001). Er besteht aus fünf Untereinheiten, die wiederum jeweils vier Transmembrandomänen beinhalten (Dupuis et al., 2012). Die Zusammensetzung der Untereinheiten unterscheidet sich aber je nach nAChR-Subtyp, auch innerhalb einer Art. Nach Jones et al. (2006) gibt es in der Honigbiene elf verschiedene Typen von Untereinheiten (zwei  $\beta$ , neun  $\alpha$ ), wodurch jeder Subtyp auch verschiedene funktionelle Eigenschaften besitzt. Die verschiedenen Zusammensetzungen der Rezeptor-Untereinheiten sind bis jetzt nicht geklärt. Der nAChR



ist nicht nur für eine schnelle Erregungsübertragung zwischen den Nervenzellen verantwortlich, er ist auch eine wichtige Bindestelle für Neonikotinoide (Tomizawa et al., 2000; Tomizawa & Casida, 2003).

### 1.5.2 Cholinerge Signalübertragung

Die bereits erwähnte schnelle Erregungsübertragung soll im Folgenden beschrieben werden. Erreicht ein Aktionspotenzial die cholinerge Präsynapse, bewirkt es dort einen Calciumioneneinstrom. Die sich in der präsynaptischen Membran befindenden synaptischen Vesikel, in denen sich Acetylcholin befindet, verschmelzen daraufhin mit der präsynaptischen Membran, und der Neurotransmitter wird dadurch in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. An der Postsynapse bindet der Neurotransmitter an den entsprechenden nACh-Rezeptor, der dadurch eine Konformationsänderung durchläuft, sich öffnet und den Ausstrom von Kaliumionen sowie den Einstrom von Natriumionen bewirkt. Dies geschieht aufgrund des elektrochemischen Gradienten. Durch diesen Einstrom positiv geladener Ionen kommt es zu einer Depolarisation der postsynaptischen Membran, die man als exzitatorisches postsynaptisches Potenzial (EPSP) bezeichnet. Das EPSP breitet sich über die gesamte postsynaptische Zellmembran aus und summiert sich mit anderen EPSPs (aus gleichzeitig aktivierten exzitatorischen Synapsen) zu einem Aktionspotenzial auf, das wiederum weitergeleitet wird. Das sich noch im synaptischen Spalt befindende Acetylcholin wird durch die ACh-Esterase hydrolytisch gespalten, wodurch ein Acetylrest und Cholin entsteht, die in dieser Form nicht mehr in der Lage sind, den Rezeptor zu aktivieren.

### 1.5.3 Dufterlernen

Wie oben bereits erwähnt ist das Dufterlernen für die Biene von essenzieller Wichtigkeit. In diesem Abschnitt wird nun beschrieben, was beim Lernen im Gehirn der Biene passiert. Beim Dufterlernen spielen zwei Dinge eine wichtige Rolle: der Duft (CS) und eine dazugehörige Belohnung (US), im Fall der Biene Nektar (in der Natur) bzw. Zuckerlösung (im Versuch). Zunächst soll der olfaktorische Verarbeitungsweg im Gehirn nachgezeichnet werden, der sogenannte CS Verarbeitungsweg.

Die olfaktorische Wahrnehmung beginnt bei den Antennen der Biene. An ihnen befinden sich die sogenannten Sensillen, spezialisierte Haarzellen, in denen sich wiederum olfaktorische Rezeptorneuronen befinden (Sandoz, 2012). Von dort wird die

Duftinformation über sensorische Neuronen, die mit olfaktorischen Rezeptoren ausgestattet sind, zu den Antennalloben weitergegeben. Diese sind das primäre olfaktorische Verarbeitungszentrum auf dem CS-Verarbeitungsweg. Ein Antennallobus bildet eine kugelförmige Struktur und besteht bei Honigbienen aus 156 Glomeruli (Joerges et al., 1997). In diesen Glomeruli findet die synaptische Interaktion zwischen den olfaktorischen Rezeptoren statt. Des Weiteren befinden sich hier inhibitorische Interneuronen, die die Glomeruli lateral verbinden, sowie Projektionsneuronen, die hier beginnen und die bearbeiteten Duftinformationen an höhere Verarbeitungszentren wie das laterale Horn und die Pilzkörper weiterleiten (Giurfa, 2007). Die Pilzkörper bestehen aus den Calyces, dem Pedunkulus und den ventralen Loben. Jeder Pilzkörper hat jeweils ein Paar becherförmiger Calyces, die wiederum aus Lippe, Kragen und Basalring bestehen. Für die olfaktorischen Informationen ist die Lippenregion der Calyces verantwortlich. Die ventralen Loben lassen sich in den medialen, den vertikalen und den  $\gamma$ -Lobus unterteilen (Strausfeld, 2002; Bicker et al., 1987). Wie oben erwähnt enthalten die Pilzkörper ca. 170.000 Neuronen, die sogenannten Kenyonzellen, die durch nAChRs eine schnelle synaptische Übertragung garantieren (Goldberg et al., 1999). An die Pilzkörper erfolgt eine cholinerge synaptische Übertragung der olfaktorischen Informationen von den Antennalloben (Wüstenberg & Grünewald, 2004).

Der US-Verarbeitungsweg beschreibt die Repräsentation des unconditionierten Stimulus, in diesem Fall des belohnenden Zuckerstimulus, im Gehirn der Biene. Auch die gustatorische Wahrnehmung beginnt bei den Antennen der Bienen. Diese besitzen neben ihren olfaktorischen Rezeptorneuronen auch gustatorische Rezeptorneuronen, die sich ähnlich den anderen Neuronen in Haarzellen befinden. Diese müssen allerdings direkt mit einer Substanz in Berührung kommen, um erregt zu werden, im Gegenteil zum Duft, wo Moleküle durch die Luft zu den olfaktorischen Rezeptoren getragen werden (Goodman, 2003). Die weitere Verarbeitung des US wird hauptsächlich von einem bekannten Neuron übernommen, das VUMmx1-Neuron (ventral unpaired median cell of maxillary neuromere 1). Wie Hammer (1993) entdeckte, ist dieses Neuron ein gleichwertig effektiver US wie die Zuckerlösung selbst: Es konnte gezeigt werden, dass Bienen auf einen Duft konditioniert werden können, wenn als Belohnung das VUMmx1-Neuron elektrisch stimuliert wird (Hammer, 1993). Damit ist dieses Neuron notwendig und gleichzeitig ausreichend, um die Zuckerbelohnung zu repräsentieren (Giurfa, 2007). Das

VUMmx1-Neuron hat seinen Ursprung im SOG und trifft an drei Stellen mit dem CS-Verarbeitungsweg aufeinander: den Antennalloben, dem lateralen Horn und den Calyces der Pilzkörper (Mauelshagen, 1993; Giurfa & Sandoz, 2012). Die gustatorischen Informationen gelangen also von den Rezeptorneuronen in den Antennen in das SOG, wo sie über das VUMmx1-Neuron bis in die Pilzkörper geleitet und dort verarbeitet werden. Bei der Kreuzung mit dem CS-Verarbeitungsweg scheinen für die appetitive olfaktorische Erinnerung dabei nur die Verknüpfungen mit den Antennalloben und Pilzkörpern relevant zu sein (Menzel, 1999).

Die Weiterleitung und Verarbeitung des olfaktorischen Signals in den Antennalloben und den Pilzkörpern geschieht mithilfe der nAChRs (Bicker, 1999; Barbara et al., 2008), weshalb die Vermutung nahe liegt, dass eine Beeinflussung der nAChRs gleichzeitig auch eine Beeinflussung von Lernvorgängen im Bienenhirn nach sich zieht.

## **1.6 Insektizide und Neonikotinoide**

Insektizide werden schon seit Langem eingesetzt, um zum Beispiel die wertvolle Ernte von Nutzpflanzen vor vielerlei sogenannten Schadinsekten zu schützen. Die meisten Insektizide sind Nervengifte, was den Vorteil hat, dass sie gezielt und schnell wirken. Das Ziel der Insektizide ist es, gegen die schädlichen Insekten effektiv zu wirken, dabei aber die nützlichen Insekten, wie die Honigbiene, weitestgehend unbehelligt zu lassen. Unter den Insektiziden gibt es verschiedene Substanzklassen, zum Beispiel Phosphorsäureester, Carbamate oder Pyrethroide. Ein aktuelles Kapitel der Insektizide stellen dabei die Neonikotinoide dar, die Ende der 1970er Jahre entwickelt wurden und zu Beginn der 1990er Jahre erstmals auf den Markt kamen (Tomizawa & Casida, 2003). Neonikotinoide werden synthetisch hergestellt und ähneln in ihrer Struktur dem Nikotin. Sie sind Agonisten des nAChRs, werden aber nicht (wie das Acetylcholin) durch die Acetylcholinesterase abgebaut, wodurch sie sich im synaptischen Spalt ansammeln und für eine verlängerte Aktivität sorgen (Simon-Delso et al., 2015). Neonikotinoide weisen eine hohe Selektivität für den nAChR von Insekten auf. Dies ist auf die verschiedenen Ladungen der Rezeptor-Bindungsdomänen von Insekten bzw. Vertebraten zurückzuführen, wodurch Neonikotinoide besser an den nAChR von Insekten, Nikotine dagegen besser an den nAChR von Vertebraten binden (Matsuda et al., 2001). Im Falle der Neonikotinoide liegt dies an der negativ geladenen Region ihrer Nitro- oder Cyano-

Gruppe, die mit einem positiv geladenen Aminosäurerest am Rezeptor der Insekten interagiert (Tomizawa et al., 2000; Iwasa et al., 2004). Nikotin dagegen liegt ionisiert vor. Diese Tatsache erschwert es dem Nikotin, in das zentrale Nervensystem der Insekten vorzudringen. Bei Vertebraten hat es dadurch wiederum einen Vorteil und kann besser an die anionische Rezeptor-Bindungsdomäne bei Vertebraten binden (Stenersen, 2004). Neonikotinoide, die wie oben beschrieben eine negativ geladene Region besitzen, sind damit aufgrund ihrer Bindungseigenschaften weniger toxisch für Vertebraten (Tomizawa & Casida, 2003). Neonikotinoide wirken vornehmlich systemisch, das heißt dass sich die Substanzen in der gesamten Pflanze verteilen, welche somit von der Wurzel bis zur Blüte gegen die meist saugenden Schadinsekten wie die Blattlaus geschützt ist. Erreicht wird dies am häufigsten durch Saatgutbeizung, aber auch durch Hinzufügen der Neonikotinoide in die Erde oder durch Besprühen der Pflanzen (Tomizawa & Casida, 2005; Jeschke & Nauen, 2008). Durch die systemische Wirkung sind die Bienen in der Natur meist über mehrere Wochen den Neonikotinoiden ausgesetzt (Decourtye & Devillers, 2010). In ihrer Struktur können die Neonikotinoide anhand ihrer pharmakophoren Gruppe unterschieden werden: Substanzen wie Imidacloprid oder Clothianidin sind nitro-substituierte Neonikotinoide, wohingegen zum Beispiel Thiacloprid ein cyano-substituiertes Neonikotinoid ist. Letztere sind dabei für Bienen weniger toxisch, da sie besser durch die Cytochrome P450 metabolisiert werden können (Iwasa et al., 2004).

#### 1.6.1 Clothianidin

Clothianidin ( $C_6 H_8 ClN_5 O_2 S$ ) gehört wie oben bereits erwähnt zu den nitro-substituierten Neonikotinoiden. Seine  $LD_{50}$  (oral) beträgt  $0,00379 \mu g$  a.s. pro Biene (European Commission, 2005). Sein Molekulargewicht beträgt  $249,68 g/mol$ . Clothianidin gilt nach Brown et al. (2006) in *Drosophila melanogaster* als „Super-Agonist“ des nAChR. Das bedeutet, dass Clothianidin den nAChR stärker als der natürliche Ligand Acetylcholin aktiviert. Palmer et al. (2013) bestätigten diese Ergebnisse für Kenyonzellen der Honigbiene. Clothianidin ist ein Metabolit von Thiamethoxam, welches ebenfalls zu der Gruppe der Neonikotinoide gehört (Nauen et al., 2003). Die feldrelevante Dosis, also die Dosis, die tatsächlich in der Landwirtschaft zum Schutz der Pflanzen ausgebracht wird, beträgt ca. 1,8 bis 2,5 ppb (Williamson et al., 2014).

### 1.6.2 Thiacloprid

Thiacloprid ( $C_{10}H_9ClN_4S$ ) gehört der Gruppe der cyano-substituierten Neonikotinoide an. Sein Molekulargewicht beträgt 252,72 g/mol, seine  $LD_{50}$  (oral) beträgt 17,32  $\mu\text{g}$  a.s. pro Biene (European Commission, 2004). Damit ist es für die Biene weit weniger toxisch als Clothianidin bzw. Imidacloprid. Thiacloprid gilt nach Tan et al. (2007) in *Periplaneta americana* als partieller Agonist des nAChR. Das bedeutet, dass Thiacloprid den nAChR schwächer als der natürliche Ligand Acetylcholin aktiviert. Die feldrelevante Dosis von Thiacloprid beträgt ca. 200 ppb (Genersch et al., 2010). Es wird angenommen, dass Thiacloprid relativ schnell durch die Cytochrome P450 abgebaut wird. Acetamiprid, welches auch ein cyano-substituiertes Neonikotinoid ist, wurde in Versuchen von Brunet et al. (2005) innerhalb von 30 Minuten zu über 50 % abgebaut.

### 1.6.3 Imidacloprid

Imidacloprid ( $C_9H_{10}ClN_5O_2$ ) gehört wie Clothianidin zur Gruppe der nitro-substituierten Neonikotinoide. Sein Molekulargewicht ist dem der beiden anderen Substanzen sehr ähnlich und beträgt 255,66 g/mol. Seine  $LD_{50}$  (oral) beträgt 4,5 ng pro Biene (Cresswell, 2011) bzw. 5,4 ng pro Biene (Suchail et al., 2000). Imidacloprid gilt nach Brown et al. (2006) in *Drosophila melanogaster* und nach Tan et al. (2007) in *Periplaneta americana* als partieller Agonist des nAChR. Nauen et al. (2001), Déglise et al. (2002) und Palmer et al. (2013) konnten dieses Ergebnis an Antennallobenzellen bzw. an Kenyonzellen der Honigbiene bestätigen. Imidacloprid bindet mit hoher Affinität an den nAChR der Biene (Schmuck et al., 2003). Die Halbwertszeit von Imidacloprid liegt bei 4,5 bis 5 Stunden, nach 20 Minuten sind bereits ca. 30 % des Imidacloprids abgebaut. Imidacloprid wird dabei in seine Metabolite 5-hydroxyimidacloprid und Olefin abgebaut (Suchail et al., 2003).

## 1.7 Fragestellungen

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen der Neonikotinoide sowohl auf die Muskelspikeaktivität des Muskels M17 als auch auf das Lernvermögen in einer komplexen Lernaufgabe. Da in vorangegangenen Versuchen festgestellt wurde, dass die Motorik der Bienen durch Neonikotinoide beeinflusst werden kann (Schneider et al., 2012; Kabat vel Job, Bachelorarbeit, 2012), soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob sich diese Effekte auch in der Muskelspikeaktivität widerspiegeln, indem sich die Anzahl

an Muskelaktionspotenzialen (Spikeanzahl) erhöht bzw. absenkt. In Versuchen mit *Periplaneta americana* wurde eine erhöhte Spikeaktivität im Nervengewebe nach Applikation von Clothianidin festgestellt (Thany, 2009). Für die Biene wurde daher ebenfalls von einer Erhöhung der Spikeaktivität nach Gabe von Clothianidin ausgegangen. Um die Auswirkung der Substanzen auf die Spikeaktivität zu betrachten, wurden verschiedene Verabreichungsformen (Applikation, akute Fütterung, chronische Fütterung) getestet. Zusätzlich stellte sich die Frage, ob sich eventuelle Auswirkungen auf die Einzelbiene im gesamten Volk widerspiegeln oder ob das Volk in der Lage ist, diese Effekte aufzufangen und die Bienen sich somit weiterentwickeln können und überleben. Ebenfalls wurde in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob Bienen nach einer Injektion von Clothianidin noch in der Lage sind, eine komplexe Lernaufgabe wie das positive Patterning zu bewerkstelligen. Da die Verarbeitung der Informationen in den Pilzkörpern für diese schwierige Lernaufgabe nötig ist, stellte sich die Frage, ob ein Neonikotinoid diese Verarbeitung aufgrund seiner Bindung an den nAChR in einer Weise stören kann, dass ein Erlernen der Aufgabe nicht mehr möglich ist.

Die Versuche zur Doppelapplikation in Kapitel 2 wurden zusammen mit Viola Schützmann durchgeführt, der Versuch zur komplexen Lernaufgabe in Kapitel 5 zusammen mit Annkathrin Hausmann, beides jeweils im Rahmen einer Bachelorarbeit.

## **2 Applikation von Neonikotinoiden in die Kopfkapsel**

### **2.1 Einleitung**

In diesem Versuch geht es um die Auswirkungen verschiedener Neonikotinoide auf die Spikeaktivität des Muskels M17. Die Substanzen werden dabei einzeln oder doppelt zeitversetzt durch eine kleine Öffnung direkt in die Kopfkapsel appliziert. Da sich im Gehirn der Biene viele nAChRs befinden, geht man davon aus, dass die Neonikotinoide an diese binden sowie die Funktion der Zellen beeinflussen und damit auch Auswirkungen auf physiologische Vorgänge wie die Muskelaktivität aufweisen (Belzunces et al., 2012). In der Natur begegnen die Bienen nicht immer nur einem bestimmten Neonikotinoid, sondern sind verschiedenen Substanzen ausgesetzt, die sie eventuell auch mehrmals nacheinander aufnehmen. In diesem Versuch sollen daher nicht nur einzelne Neonikotinoide appliziert werden, sondern auch zweierlei Substanzen zeitlich versetzt. Damit sollen eventuelle Wechselwirkungen oder synergistische Effekte untersucht werden, die vom eigentlichen Wirkprofil der Substanzen abweichen.

### **2.2 Material und Methoden**

#### **2.2.1 Vorbereitung der Bienen**

Für die folgenden Versuche standen Bienenvölker aus institutseigener Zucht (*Apis mellifera carnica*) im Wissenschaftsgarten am Campus Riedberg in Frankfurt am Main zur Verfügung, welche mit dem Stockausgang Richtung Süden aufgestellt waren. Insgesamt befinden sich dort vier Vollvölker, allerdings wurden für diese Versuche ausschließlich Bienen aus einem dieser Völker verwendet (siehe Abbildung 3, links). Die Bienen werden am Stockeingang beim Ausfliegen abgefangen, wodurch man ausschließlich Sammlerinnen als Versuchstiere hat. Das Abfangen geschieht mithilfe einer UV-durchlässigen Plexiglaspyramide, die auf beiden Seiten zu öffnen ist (siehe Abbildung 3).

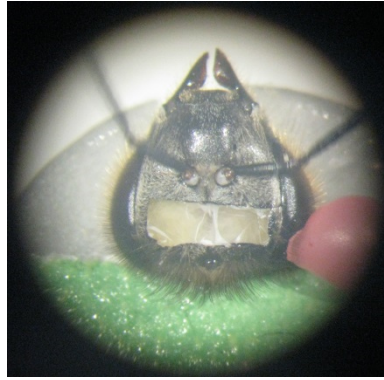


**Abbildung 3:** Abfangen der Bienen.

Links: Abfangen der Bienen am Stock mithilfe einer UV-durchlässigen Plexiglaspyramide, die oben und unten geöffnet werden kann. Rechts: abgefangene Bienen in der Plexiglaspyramide.

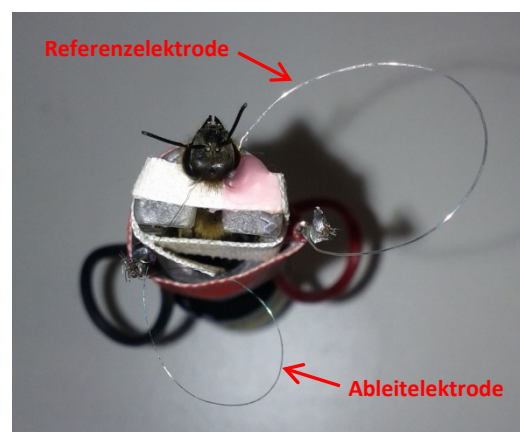
Die Pyramide wird mit der geöffneten breiten Seite vor den Stockausgang gehalten. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Öffnung auf der schmalen Seite der Pyramide geschlossen ist. Die ausfliegenden Bienen fliegen in die Pyramide hinein und können anschließend an der schmalen Seite in ein Schraubdeckelglas überführt werden. Die Gläschen mit den Bienen werden im Labor so lange auf Eis gelegt, bis die Bienen bewegungsunfähig sind. Daraufhin werden sie in kleine Plastikröhrchen überführt (Bitterman et al., 1983). Der Kopf wird seitlich mit Dentalwachs befestigt, um Störungen in den Ableitungen durch Kopfbewegungen entgegenzuwirken. Somit kann die Biene ihren Rüssel sowie ihre Antennen frei bewegen, ist aber dennoch im Röhrchen fixiert und gut händelbar. Die Bienen werden dann auf den selbstgebauten Ableitstecker gesetzt (siehe Abbildung 5, links). In die Kopfkapsel wird eine rechteckige Öffnung geschnitten, die sich zwischen den Komplexaugen, hinter den Antennen und vor dem Ocellus befindet (siehe Abbildung 4).





**Abbildung 4:** Biene mit eingeschnittener Öffnung in der Kopfkapsel. Die Öffnung befindet sich hinter den Antennen, zwischen den Komplexaugen und vor dem Ocellus. Durch diese werden im Verlauf des Versuchs die Substanzen in die Kopfkapsel appliziert.

Die Öffnung verbleibt bis zum Beginn der Versuche noch verschlossen, um eine eventuelle Austrocknung der Kopfkapsel zu vermeiden. Anschließend werden die Elektroden in den Muskel M17 platziert, wofür zunächst mit einer Minutiennadel ein kleines Loch vorgestochen werden muss. Die Ableitelektrode besteht aus Kupferdraht ( $\varnothing = 36 \mu\text{m}$  mit Isolierung, Rheinische Feindraht Industrie, Eckenhagen, Deutschland) und wird am Hinterkopf der Biene zwischen Komplexauge und Ocellus in das vorgestochene Loch eingeführt. Die Elektrode stößt in dieser Position im Kopf auf den schräg verlaufenden Muskel M17 (siehe Abbildung 1). Die Referenzelektrode besteht aus Silberdraht ( $\varnothing = 75 \mu\text{m}$ , Science Products, Hofheim, Deutschland) und wird in das mit einer Minutiennadel vorgestochene Loch im kontralateralen Komplexauge eingeführt (siehe Abbildung 5, rechts). Damit ist die Biene für die folgenden Versuche vorbereitet.



**Abbildung 5:** Bienen – vorbereitet für die folgenden Versuche.

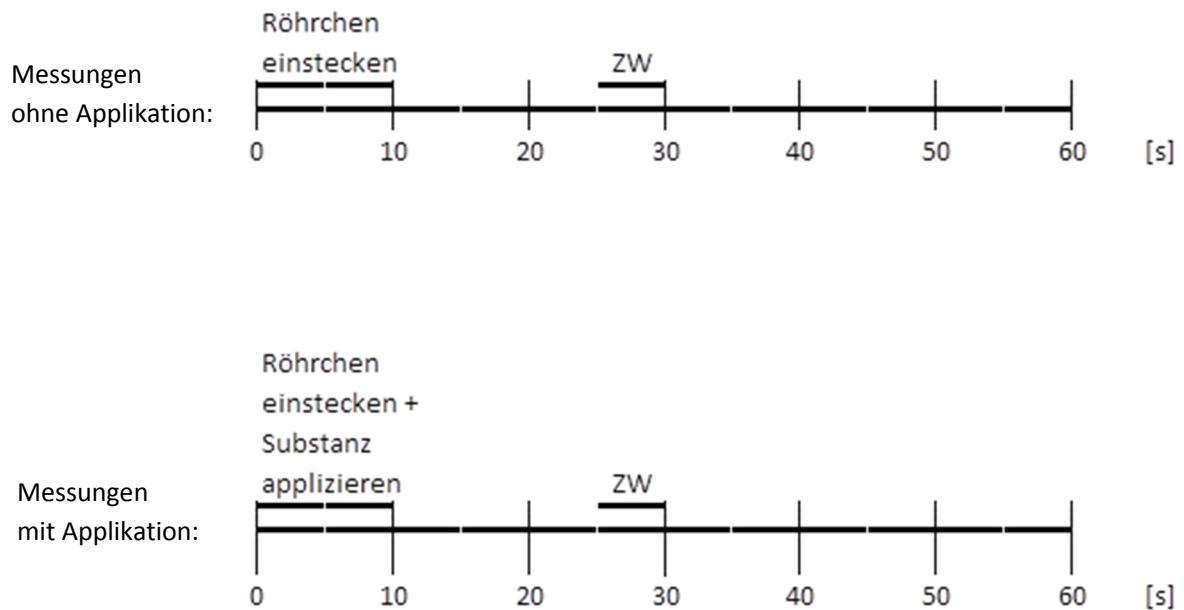
Links: Bienen eingespannt in Plastikröhrchen, auf Ableitstecker gesteckt und mit gesetzten Elektroden. Rechts: Biene von oben in Plastikröhrchen mit Ableitelektrode am Hinterkopf zwischen linkem Komplexauge und Ocellus und Referenzelektrode im kontralateralen Komplexauge.

Die Bienen werden in verschiedenen Zeitabständen getestet, das heißt sie werden an Antennen und Proboscis mit einem mit Zuckerwasser (40 %) benetzten Zahnstocher

stimuliert, die folgende Reaktion (PER vs. nicht PER) wird notiert, und während der gesamten Zeit werden Elektromyogramme erstellt. Dafür werden die Bienen auf ihren Ableitsteckern in die Ableitapparatur verbracht, welche sich in einem faradayschen Käfig befindet, um Störsignale zu minimieren. Die Signale werden dann in einen Verstärker (Differential AC Amplifier Model 1700, AM-Systems, Sequim (WA), USA) geleitet, wo sie 1000fach verstärkt werden (Tiefpassfilter 100 Hz, Hochpassfilter 5 kHz), und gelangen anschließend in einen Analog-Digital-Wandler (CED Micro 3 1401, Cambridge Electronic Design, Cambridge, England). Die Datenerfassung erfolgt mit einem PC (Betriebssystem Windows XP) mit der Software Spike 2 (Version 7.05, Cambridge Electronic Design, Cambridge, England). Die Digitalisierungsfrequenz beträgt 20.000 Hz.

### 2.2.2 Einzelapplikationen

In diesem Versuchsteil wurde jeder Biene jeweils ein Neonikotinoid (Clothianidin, Thiacloprid, oder Imidacloprid; alle Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze) bzw. die Kontrolllösung in die Kopfkapsel appliziert. Der Ablauf der Experimente ist im Folgenden dargestellt:



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung des Ablaufs der Experimente.

Oben: Für die Messzeitpunkte ohne Applikation wird jede Biene einzeln und nacheinander in die Ableitapparatur verbracht (Sekunde 0 bis 10). Die nächsten 15 Sekunden dienen der Anpassung an die Situation. Dann wird für 5 Sekunden der Zuckerstimulus präsentiert und die Reaktion notiert. Die restlichen 30 Sekunden verbringt die Biene noch in der Ableitapparatur ohne weitere Behandlung. Anschließend ist die nächste Biene an der Reihe. Die ganze Zeit über werden Elektromyogramme aufgezeichnet. Unten: Für den Messzeitpunkt, in dem die Substanz appliziert wird, wird ebenfalls jede Biene einzeln in die Ableitapparatur verbracht. Sobald das geschehen ist, wird die Substanz (entweder Clothianidin oder Thiacloprid oder Imidacloprid) oder die Kontrolllösung mit einer Pipette in die geöffnete Kopfkapsel appliziert. Beides geschieht ca. von Sekunde 0 bis 10. Der restliche Ablauf ist dem der anderen Messzeitpunkte gleich.

Jede Biene wird in einem Vortest getestet. Anschließend wird das kleine Stück Cuticula, das zuvor ausgeschnitten wurde, abgenommen, und es folgt der nächste Messdurchlauf. Dabei wird die jeweilige Substanz oder die Kontrolllösung in die Kopfkapsel appliziert, woraufhin auch hier der Biene der Zuckerstimulus präsentiert wird. Danach wird die Biene 10 Minuten, 20 Minuten, 30 Minuten und 60 Minuten nach der Applikation getestet. In jedem Test verbleibt die Biene für eine Minute in der Ableitapparatur. In den ersten ca. 10 Sekunden wird der Stecker mit der Biene in die Apparatur gesteckt. Von Sekunde 25 bis 30 wird ihr ein mit Zuckerwasser benetzter Zahnstocher als Stimulus zunächst an die Antennen gehalten. Wenn die Biene den PER zeigt, darf sie in der gegebenen Zeit an dem Zahnstocher lecken. Anschließend verbleibt die Biene in der Apparatur, bis die Minute vorbei ist. Danach ist direkt die nächste Biene an der Reihe. Bei dem Messzeitpunkt, zu dem die Substanz appliziert wird, geschieht dies direkt nach dem Einstecken des Röhrchens (siehe Abbildung 6): Die jeweilige Substanz bzw. die

Kontrolllösung wird mit einer Pipette direkt in die Kopfkapsel appliziert. Die restliche Minute verläuft wie in den Tests der anderen Zeitpunkte.

In diesen Versuchen wurde eine Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  für Clothianidin, Thiacloprid und Imidacloprid verwendet. Diese Konzentration entspricht 0,25 ng in 1  $\mu\text{l}$  Lösung und liegt damit für alle drei verwendeten Neonikotinoide deutlich unterhalb der jeweiligen  $\text{LD}_{50}$ . Die Substanzen werden in Aceton (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) vorgelöst und dann mit Phosphatpuffer (PBS, phosphatgepufferte Salzlösung, engl. **phosphate buffered saline**) auf die entsprechende Konzentration verdünnt. Als Kontrolllösung wurde PBS ohne Substanz verwendet. PBS wurde wie folgt hergestellt (für 1 l):

- 8 g NaCl (Natriumchlorid)
- 0,2 g KCl (Kaliumchlorid)
- 1,44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Dinatriumhydrogenphosphat)
- 0,24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Kaliumdihydrogenphosphat)

pH: 7,4, 276 mOsm

Die Kontrolllösung wurde mit einer den Substanzen entsprechenden Menge Aceton vermischt, damit Aceton als Grund für Veränderungen an den Muskelaktionspotenzialen ausgeschlossen werden kann. Da die höchste Konzentration an Aceton in den oben verwendeten Substanzen 0,01 % beträgt, wurde auch diese Konzentration für die Kontrolllösung mit PBS gewählt.

Es gab also drei Versuchsgruppen in diesen Versuchen: Clothianidin, Thiacloprid und Imidacloprid. Zusätzlich gab es eine Kontrollgruppe. Die Versuche wurden mit allen Gruppen parallel durchgeführt. In den Versuchen werden die Spikeanzahlen der verschiedenen Versuchsgruppen mit denen der Kontrollgruppe verglichen.

### 2.2.3 Zeitversetzte Doppelapplikationen

In diesem Versuchsteil unterlief jede Biene jeweils zwei Applikationen. Je nach Gruppe waren dies Neonikotinoide oder die Kontrollsubstanz. Zunächst findet ein Vortest statt, in dem jede Biene einzeln getestet wird. Sobald dies beendet ist, wird das kleine Stück Cuticula, das zuvor in die Kopfkapsel geschnitten wurde, abgenommen, und es folgt der nächste Messdurchlauf. Dabei wird die jeweilige Substanz oder die Kontrolllösung in die Kopfkapsel appliziert, woraufhin auch hier der Biene der Zuckerstimulus präsentiert wird.

Dieser Ablauf gilt sowohl für die 2. als auch für die 3. Messung. Die 4. Messung verläuft wieder wie der Vortest ohne Applikation (siehe Abbildung 6). Die 2. Messung wird also direkt nach dem Vortest und dem Entfernen der Cuticula durchgeführt. Die 3. und die 4. Messung finden jeweils mit 30 Minuten Abstand zur vorherigen Messung statt.

In diesen Versuchen wurden verschiedene Konzentrationen der Substanzen (alle Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze) verwendet. Für Clothianidin wurde eine Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  verwendet, was 0,25 ng in 1  $\mu\text{l}$  Lösung entspricht. Für Thiacloprid wurde eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  verwendet, was wiederum 2,5 ng in 1  $\mu\text{l}$  Lösung entspricht. Beide Konzentrationen liegen deutlich unterhalb der jeweiligen  $\text{LD}_{50}$ . Die beiden Substanzen wurden jeweils in Aceton (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) vorgelöst und dann mit PBS auf die entsprechende Konzentration verdünnt. Insgesamt ergaben sich für diese Versuche mehrere Versuchs- und Kontrollgruppen, die im Folgenden zusammengefasst dargestellt werden sollen (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Versuchs- und Kontrollgruppen, die für die Doppelapplikation getestet wurden, und jeweilige Anzahl an getesteten Bienen (n).

Die Applikationen fanden im Abstand von 30 Minuten statt. Appliziert wurde insgesamt jeweils 1  $\mu\text{l}$  (jeweilige Substanz in PBS oder nur PBS).

Nr.	Testgruppe	1. Applikation	2. Applikation	n
1_C-T	Clothianidin+Thiacloprid	Clothianidin	Thiacloprid	18
2_T-C	Thiacloprid+Clothianidin	Thiacloprid	Clothianidin	17
3_K-K	PBS+PBS	PBS	PBS	17
4_C-K	Clothianidin+PBS	Clothianidin	PBS	17
5_K-C	PBS+Clothianidin	PBS	Clothianidin	18
6_T-K	Thiacloprid+PBS	Thiacloprid	PBS	15
7_K-T	PBS+Thiacloprid	PBS	Thiacloprid	18
8_K(A)- K(A)	PBS(Aceton)+PBS(Aceton)	PBS(Aceton)	PBS(Aceton)	20
9_K-K	PBS+PBS	PBS	PBS	22

} Kontrollgruppen

Wie in Tabelle 1 dargestellt gab es neun Testgruppen für diese Versuche. Gruppe 1 und Gruppe 2 sind beide Versuchsgruppen, das heißt beiden wurden ausschließlich Neonikotinoide appliziert, lediglich in verschiedener Reihenfolge. Die Gruppen 3 bis 9 sind die dazugehörigen Kontrollgruppen, in denen entweder beide Substanzen oder eine der

beiden durch die Kontrolllösung (PBS) ersetzt wurden. Gruppe 8 (PBS mit 0,1 % Aceton) stellt einen Sonderfall dar: Da bei den Gruppen 3 bis 7 das Aceton im PBS fehlte, wurden die Versuche mit dieser Gruppe nach den eigentlichen Hauptversuchen durchgeführt, weshalb Gruppe 3 aus Vergleichsgründen parallel zu diesen Versuchen ein zweites Mal durchgeführt wurde (= Gruppe 9).

#### 2.2.4 Auswertung

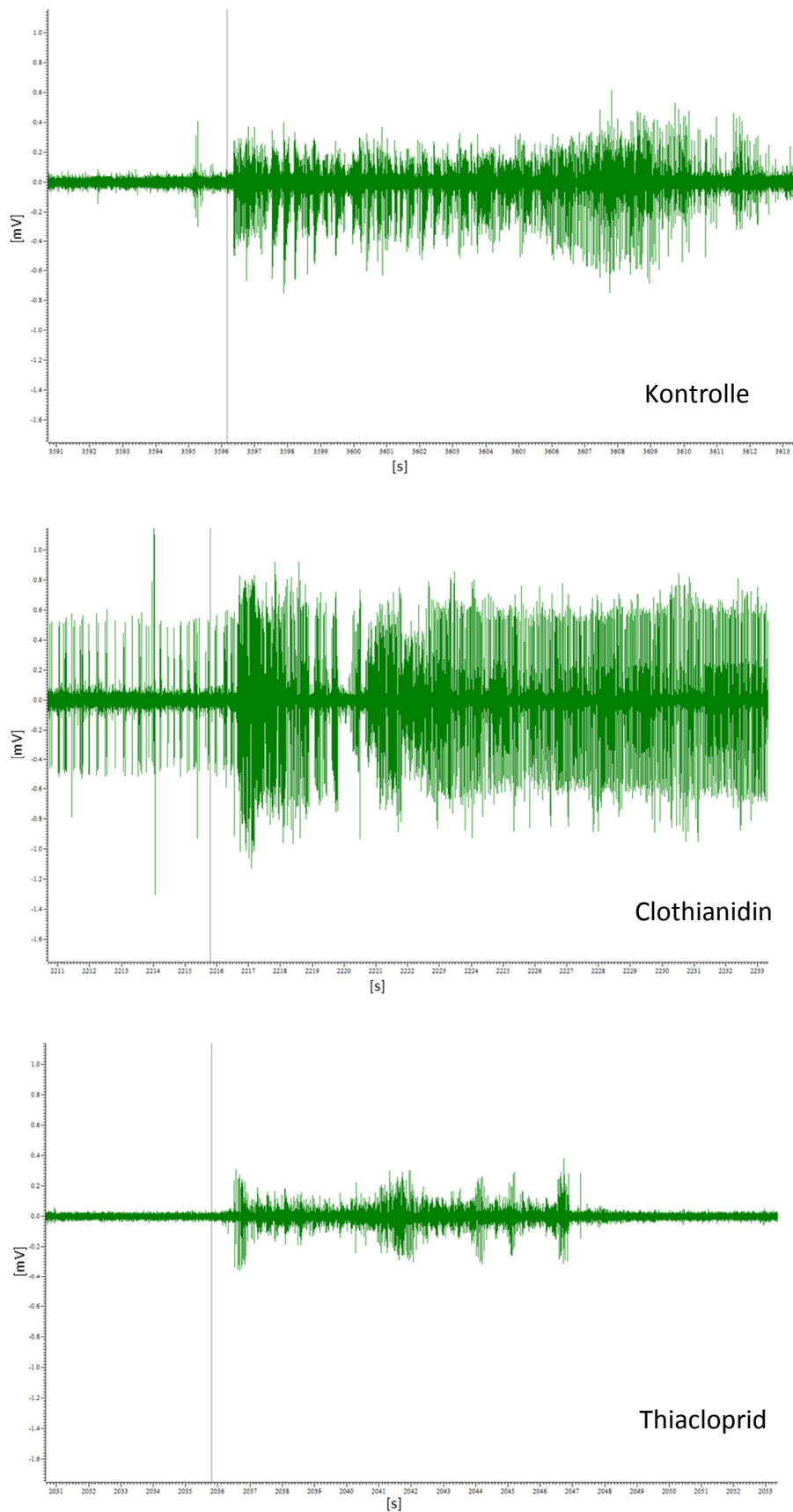
Ausgewertet wurden ausschließlich Bienen, die sowohl im Vortest als auch in allen folgenden Tests einen PER auf den Zuckerstimulus zeigten. Die Anzahl der Muskelaktionspotenziale dieser Bienen wurden ab 5 Sekunden vor Stimulusbeginn bis 20 Sekunden nach Stimulusbeginn ausgewertet (insgesamt 25 Sekunden). Die Elektromyogramme wurden aus Spike2 exportiert, wobei eine Ereignisfrequenz von 100 Hz gewählt wurde. Für jede Biene wurde eine individuelle Schwelle manuell eingestellt, die das Rauschen von den Signalen trennt. Die Daten wurden in Matlab (Version 2013b, Mathworks) zur Darstellung auf eine Frequenz von 1 Hz aufsummiert und mithilfe der Statistic Toolbox und eines in der Arbeitsgruppe Grünewald erstellten Skripts (Johannes Fischer, unveröffentlicht) statistisch weiterverarbeitet sowie grafisch dargestellt.

### 2.3 **Ergebnisse**

#### 2.3.1 Einzelapplikationen

Es wurden die Effekte von Clothianidin, Thiacloprid und Imidacloprid auf die Muskelpikerate des Muskels M17 zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Applikation untersucht.

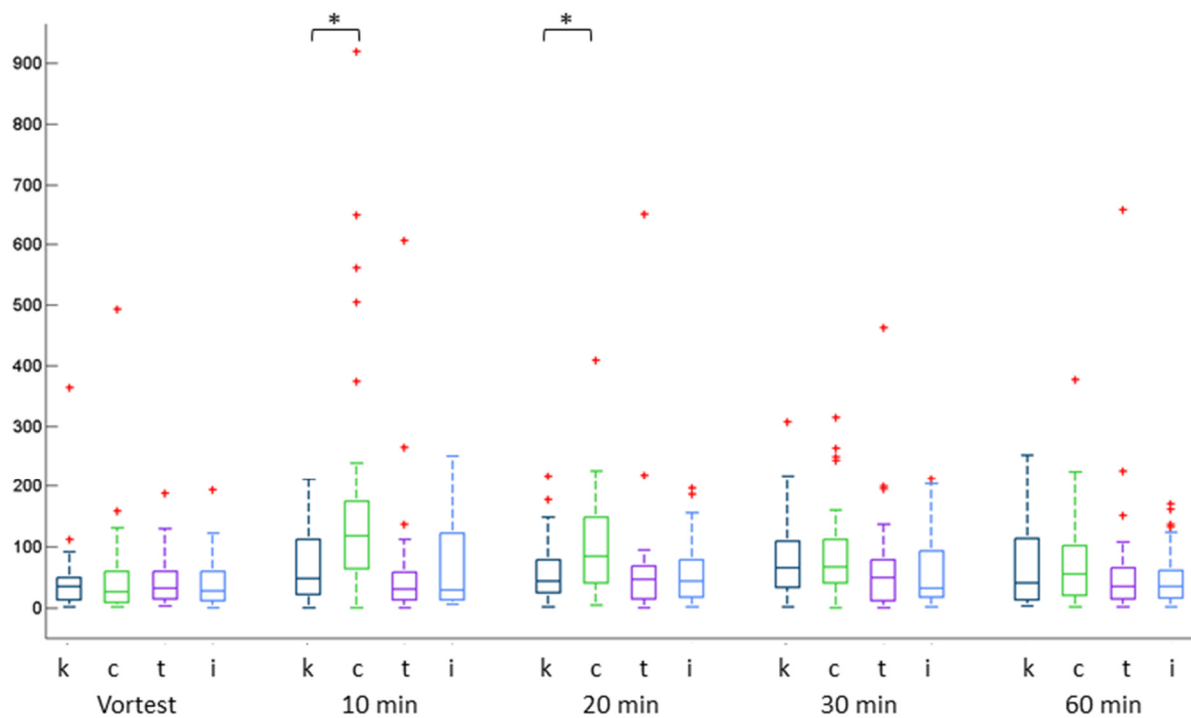
Relativ deutlich lässt sich in den Ableitungen erkennen, dass Clothianidin die Anzahl an Muskelaktionspotenzialen erhöht, während Thiacloprid für eine Absenkung der Anzahl sorgt (siehe Abbildung 7). Die Abbildung zeigt Originalableitungen des Muskels M17 nach Applikation von entweder Kontrolllösung, Clothianidin oder Thiacloprid.



**Abbildung 7:** Beispiele für Elektromyogramme des Muskels M17 während des PERs.

Oben: Kontrolle, Mitte: Clothianidin, unten: Thiocloprid; x-Achse in Sekunden, y-Achse in mV (in Schritten von 0,2 mV); senkrechter Strich: Zuckerstimulus. Clothianidin erhöht die Anzahl an Muskelaktionspotenzialen, Thiocloprid senkt sie ab.

Im Vortest ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Versuchsgruppen zur Kontrollgruppe. In den 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ergaben sich für Clothianidin zu den Messzeitpunkten 10 Minuten und 20 Minuten signifikante Unterschiede. Die Applikation von Clothianidin erhöht schon vor der Zuckergabe die Spikerate des Muskels M17 (siehe Abbildung 8).



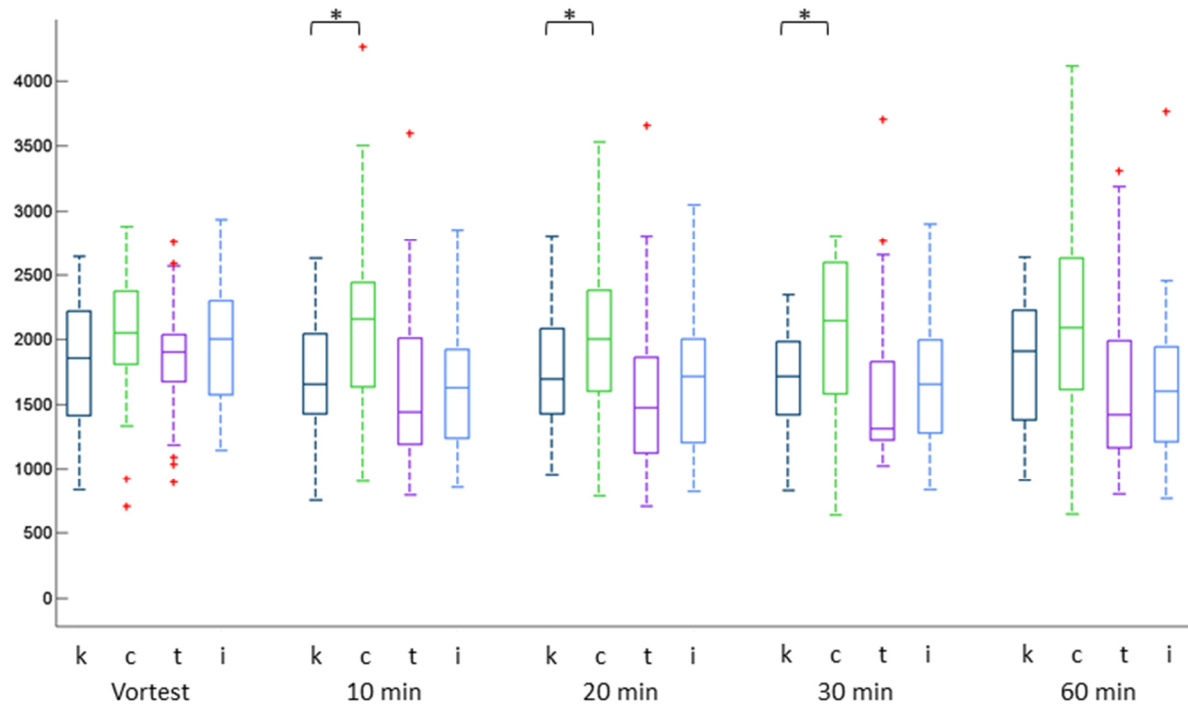
**Abbildung 8:** Verteilung der Anzahl an Spikes 5 Sekunden vor dem Zuckerstimulus zu den verschiedenen Messzeitpunkten.

k = Kontrolle (n = 30), c = Clothianidin (n = 30), t = Thiacloprid (n = 30), i = Imidacloprid (n = 30); signifikante Unterschiede ergeben sich zwischen Clothianidin und Kontrolle zu den Zeitpunkten 10 ( $p = 0,0010$ ) und 20 Minuten ( $p = 0,0351$ ) nach der Applikation; \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

Für die anderen Substanzen bzw. Messzeitpunkte sind keine Signifikanzen zu vermerken. Es lässt sich lediglich eine Tendenz erkennen, dass Thiacloprid die Spikerate senkt, dabei gibt es aber keine signifikanten Unterschiede (siehe Anhang, Abbildungen 85 bis 90).

Für die Applikation von Clothianidin ergaben sich für die Messzeitpunkte 10 Minuten, 20 Minuten, und 30 Minuten nach der Fütterung signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe, gemessen über 20 Sekunden ab Stimulusbeginn (siehe Abbildung 9). Die Spikerate der Bienen, die mit Clothianidin behandelt wurden, ist erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe.

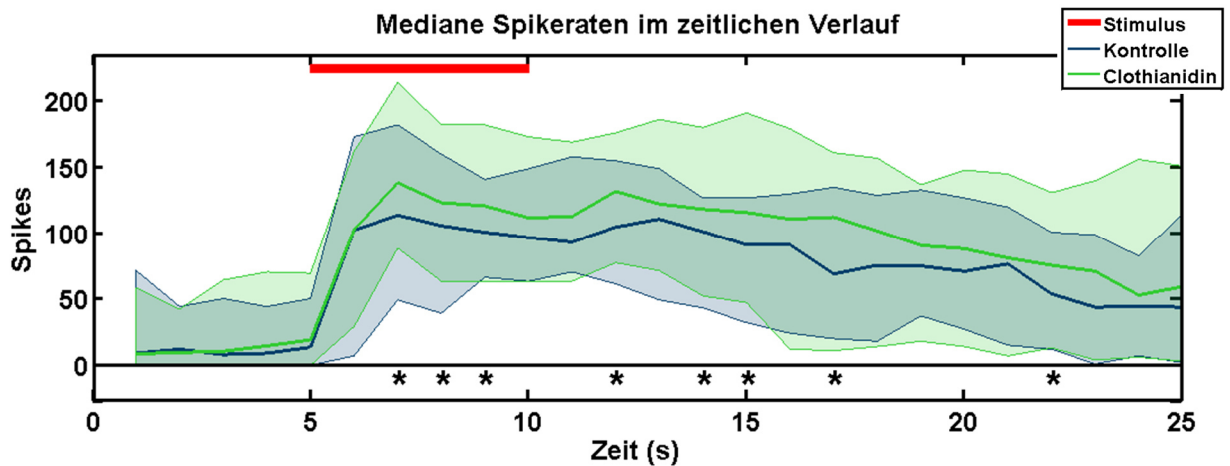




**Abbildung 9:** Verteilung der Anzahl an Spikes für 20 Sekunden ab Stimulusbeginn zu den verschiedenen Messzeitpunkten.

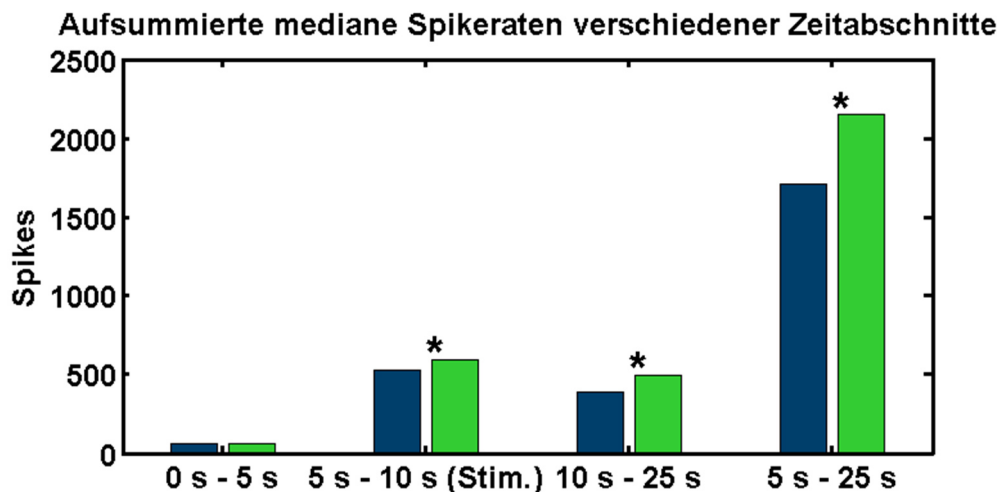
k = Kontrolle (n = 30), c = Clothianidin (n = 30), t = Thiacloprid (n = 30), i = Imidacloprid (n = 30); signifikante Unterschiede ergeben sich zwischen Clothianidin und Kontrolle zu den Zeitpunkten 10 ( $p = 0,0067$ ), 20 ( $p = 0,0224$ ) und 30 Minuten ( $p = 0,0199$ ) nach der Applikation;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

Wenn man den genauen Verlauf einer Messung betrachtet (in diesem Fall beispielhaft 30 Minuten nach der Applikation), ist zu erkennen, dass sich die Versuchsgruppe Clothianidin fast zu jedem Zeitpunkt während der Messung von der Kontrollgruppe unterscheidet und in den unterteilten Zeitabschnitten ebenfalls meist signifikant erhöht ist (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11).



**Abbildung 10:** Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Clothianidin (1  $\mu$ M), n = 30) und der Kontrollgruppe (PBS, n = 30).

30 Minuten nach der Applikation; schraffierte Flächen: in diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.



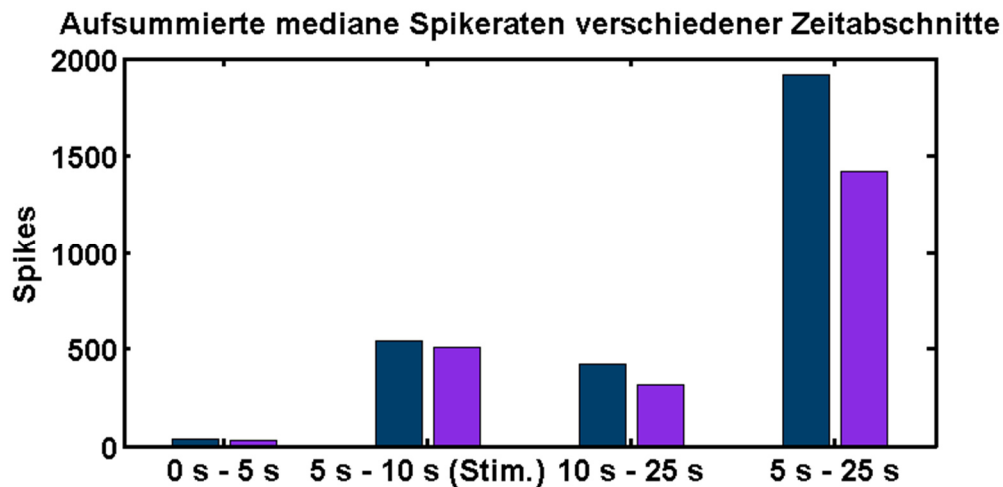
**Abbildung 11:** Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Clothianidin (1  $\mu$ M), n = 30, grün) und der Kontrollgruppe (PBS, n = 30, blau) in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

30 Minuten nach der Applikation; Signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt während des Stimulus' (5 s – 10 s,  $p = 0,0281$ ), direkt nach dem Stimulus (10 s – 25 s,  $p = 0,0195$ ), und über 20 Sekunden ab Stimulusbeginn gemessen (5 s – 25 s,  $p = 0,0199$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

Die Zeitabschnitte während des Stimulus (5 s – 10 s), direkt nach dem Stimulus (10 s – 25 s), und auch 20 Sekunden ab Stimulusbeginn (5 s – 25 s) zeigen signifikante Unterschiede, das heißt die Versuchsgruppe, die mit Clothianidin behandelt wurde, zeigt eine erhöhte mediane Spikerate im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

Für die anderen Substanzen (Thiacloprid und Imidacloprid) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe über die ausgewerteten 20 Sekunden ab Stimulusbeginn (siehe Anhang, Abbildungen 79 bis 90), allerdings sind für Thiacloprid

Tendenzen zu sehen. Das lässt sich erkennen, wenn man die Spikeanzahl in den verschiedenen Zeitabschnitten betrachtet (siehe Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Thiacloprid (1  $\mu$ M), n = 30, lila) und der Kontrollgruppe (PBS, n = 30, blau) in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 60 Minuten nach der Applikation; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ); im Zeitabschnitt 20 Sekunden ab Stimulusbeginn gemessen (5 s - 25 s) beträgt der p-Wert 0,1373, das heißt dass die Spikerate erkennbar niedriger liegt als bei der Kontrollgruppe. Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

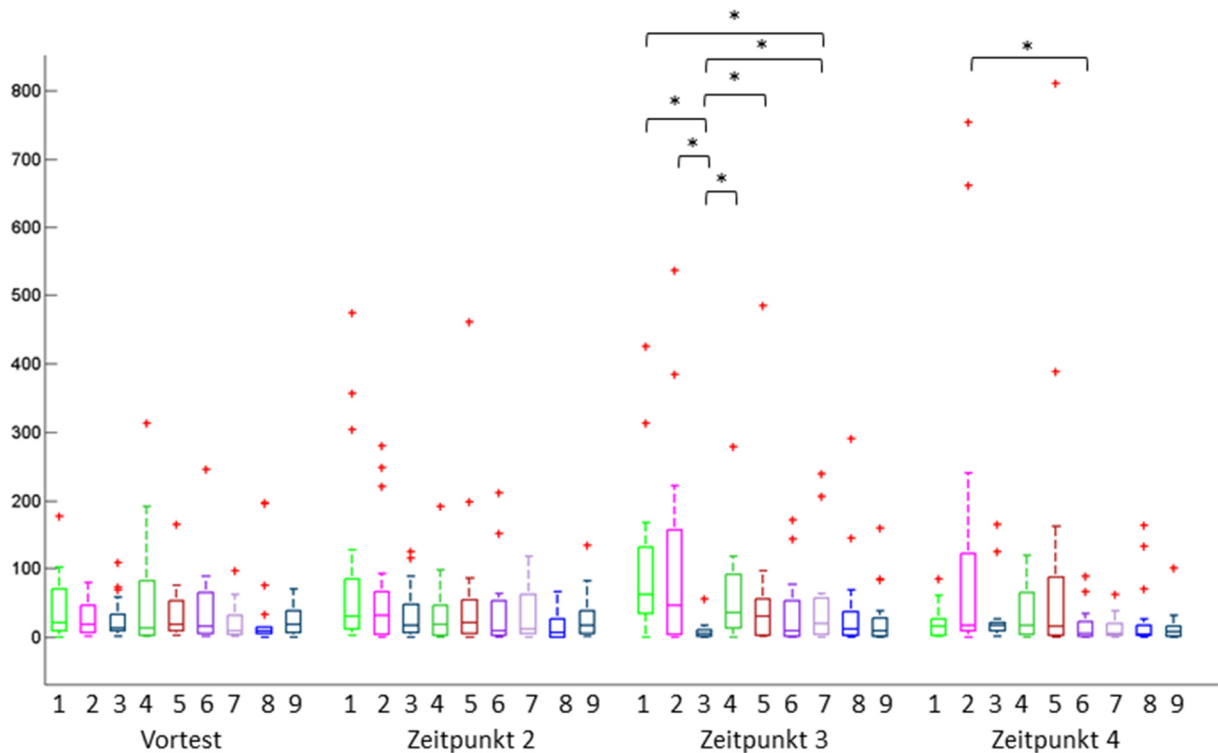
Die mediane Anzahl an Muskelaktionspotenzialen der mit Thiacloprid behandelten Bienen ist niedriger als die der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 12). Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede, aber die Tendenz ist eindeutig zu sehen. Im Gegensatz dazu ergaben sich für die Versuche mit Imidacloprid keine signifikanten Unterschiede und auch keine eindeutige Tendenz (siehe Anhang, Abbildungen 79 bis 84).

### 2.3.2 Zeitversetzte Doppelapplikationen

Es wurden die Effekte von Clothianidin (1  $\mu$ M) und Thiacloprid (10  $\mu$ M), die nacheinander in einer Doppelapplikation direkt in die Kopfkapsel appliziert wurden, auf die Muskelspikerate des Muskels M17 zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Applikation untersucht.

Statistisch verglichen wurden Versuchs- und auch Kontrollgruppen, die mit unterschiedlichen Substanzen behandelt wurden. Ebenfalls wurden nur die Zeitpunkte verglichen, zu denen sich die Behandlung unterscheidet, und keine Zeitpunkte, bis zu denen die Gruppen vollständig gleich behandelt wurden.

In den 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ergaben sich verschiedene signifikante Unterschiede zu den Messzeitpunkten 3 und 4 (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Verteilung der Anzahl an Spikes 5 Sekunden vor dem Zuckerstimulus zu den verschiedenen Messzeitpunkten.

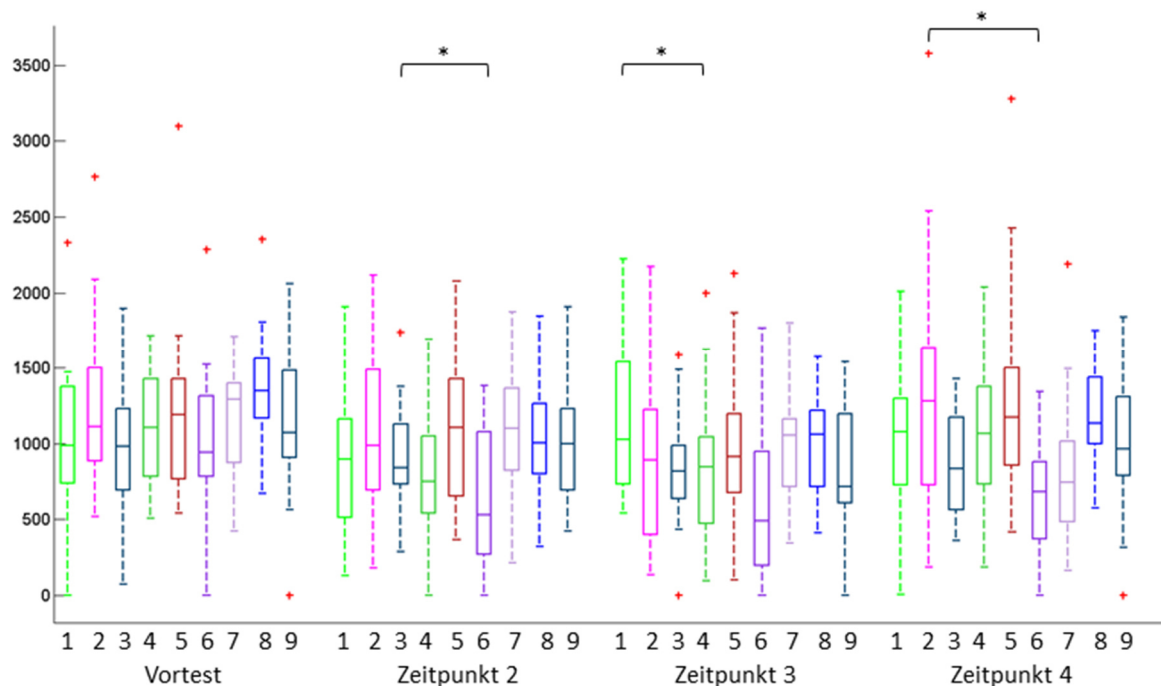
Gruppen: 1 = Clothianidin+Thiacloprid (n = 18), 2 = Thiacloprid+Clothianidin (n = 17), 3 = PBS+PBS (n = 17), 4 = Clothianidin+PBS (n = 17), 5 = PBS+Clothianidin (n = 18), 6 = Thiacloprid+PBS (n = 15), 7 = PBS+Thiacloprid (n = 18), 8 = PBS(Aceton)+PBS(Aceton) (n = 20), 9 = PBS+PBS (n = 22); signifikante Unterschiede ergeben sich zwischen Gruppe 1 und 3 zum Zeitpunkt 3 ( $p = 0,000145$ ), zwischen Gruppe 2 und 3 zum Zeitpunkt 3 ( $p = 0,0047$ ), zwischen Gruppe 3 und 5 zum Zeitpunkt 3 ( $p = 0,0120$ ), zwischen Gruppe 1 und 7 zum Zeitpunkt 3 ( $p = 0,0367$ ), zwischen Gruppe 3 und 7 zum Zeitpunkt 3 ( $p = 0,0125$ ), und zwischen Gruppe 2 und 6 zum Zeitpunkt 4 ( $p = 0,0107$ ); \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

In Abbildung 13 sind mehrere signifikante Unterschiede zum Zeitpunkt 3 zu sehen. Gruppe 1\_C-T unterscheidet sich signifikant von Gruppe 3\_K-K. Zu diesem Zeitpunkt wurden Gruppe 1\_C-T bereits sowohl Clothianidin als auch Thiacloprid appliziert, Gruppe 3\_K-K zweimal PBS. Gruppe 1\_C-T zeigt eine höhere Anzahl an Spikes als Gruppe 3\_K-K. Das Gleiche gilt für den Vergleich zwischen Gruppe 2\_T-C und Gruppe 3\_K-K. Auch hier wurden Gruppe 2\_T-C Thiacloprid und Clothianidin appliziert und Gruppe 3\_K-K zweimal PBS. Und auch in diesem Fall zeigt Gruppe 2\_T-C eine höhere Anzahl an Spikes als Gruppe 3\_K-K. Gruppe 3\_K-K und Gruppe 4\_C-K unterscheiden sich ebenfalls signifikant voneinander. Gruppe 3\_K-K wurde zweimal PBS appliziert, Gruppe 4\_C-K zuerst Clothianidin, dann PBS. Gruppe 4\_C-K zeigt eine erhöhte Anzahl an Spikes. Gruppe 3\_K-K unterscheidet sich auch signifikant von Gruppe 5\_K-C zu diesem Zeitpunkt. Gruppe 3\_K-K (zwei Mal PBS) zeigt deutlich weniger Spikes als Gruppe 5\_K-C, welcher PBS und Clothianidin appliziert wurde. Des Weiteren unterscheidet sich

Gruppe 3\_K-K signifikant von Gruppe 7\_K-T, wobei letztere eine höhere mediane Anzahl an Spikes aufweist. Zuletzt unterscheiden sich zum Zeitpunkt 3 Gruppe 1\_C-T und Gruppe 7\_K-T signifikant voneinander. Gruppe 1\_C-T weist eine höhere Anzahl an Spikes auf als Gruppe 7\_K-T.

Zum Zeitpunkt 4 unterscheiden sich die Gruppen 2\_T-C und 6\_T-K signifikant voneinander. Beiden wurde als erstes Thiacloprid appliziert, anschließend bekam Gruppe 2\_T-C Clothianidin, während Gruppe 6\_T-K PBS bekam. Gruppe 2\_T-C weist eine höhere Anzahl an Spikes auf, verglichen mit Gruppe 6\_T-K.

Im Vortest ergeben sich für den Messzeitraum 20 Sekunden ab Stimulusbeginn keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.



**Abbildung 14:** Verteilung der Anzahl an Spikes für 20 Sekunden ab Stimulusbeginn zu den verschiedenen Messzeitpunkten.

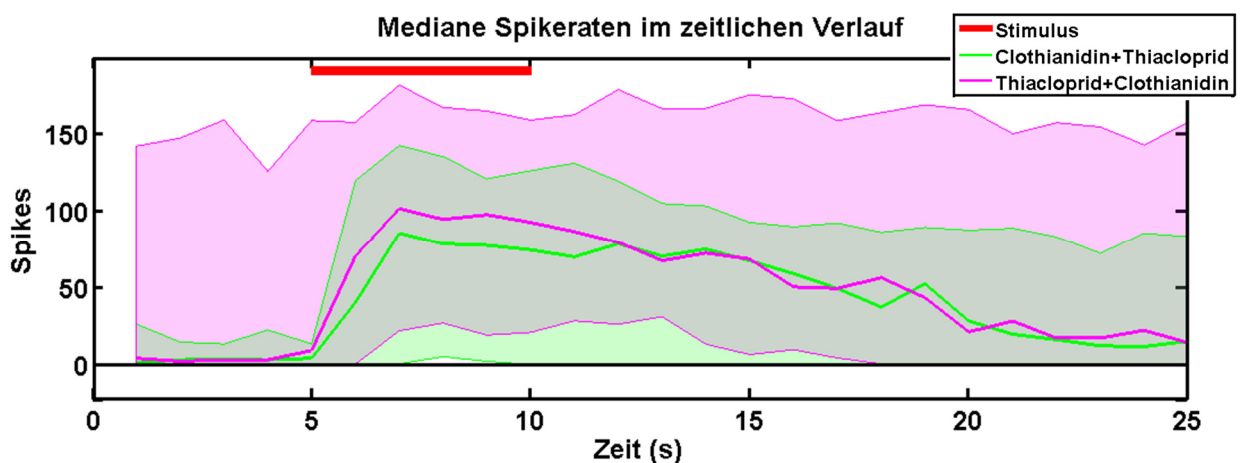
Gruppen: 1 = Clothianidin+Thiacloprid (n = 18), 2 = Thiacloprid+Clothianidin (n = 17), 3 = PBS+PBS (n = 17), 4 = Clothianidin+PBS (n = 17), 5 = PBS+Clothianidin (n = 18), 6 = Thiacloprid+PBS (n = 15), 7 = PBS+Thiacloprid (n = 18), 8 = PBS(Aceton)+PBS(Aceton) (n = 20), 9 = PBS+PBS (n = 22); signifikante Unterschiede ergeben sich zwischen Gruppe 2 und Gruppe 6 zum Zeitpunkt 4 ( $p = 0,0092$ ), zwischen Gruppe 1 und Gruppe 4 zum Zeitpunkt 3 ( $p = 0,0496$ ) und zwischen Gruppe 3 und Gruppe 6 zum Zeitpunkt 2 ( $p = 0,0496$ ); \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, zeigt sich zwischen Gruppe 2\_T-C und Gruppe 6\_T-K zum Zeitpunkt 4 ein signifikanter Unterschied. Zeitpunkt 4 liegt 60 Minuten nach der 1. Applikation und 30 Minuten nach der 2. Applikation, das heißt Gruppe 2\_T-C wurde zu

diesem Zeitpunkt bereits Thiacloprid und Clothianidin appliziert und Gruppe 6\_T-K Thiacloprid und PBS. Die Spikeanzahl von Gruppe 2\_T-C liegt dabei signifikant höher als die von Gruppe 6\_T-K. Zum Zeitpunkt 3 unterscheiden sich Gruppe 1\_C-T und Gruppe 4\_C-K signifikant voneinander, wobei erstere eine höhere mediane Anzahl an Spikes aufweist. Die Gruppen 3\_K-K und 6\_T-K unterscheiden sich zum Zeitpunkt 2 signifikant voneinander. Zu diesem Zeitpunkt fand gerade die 1. Applikation statt: Für Gruppe 3\_K-K war dies PBS, für Gruppe 6\_T-K Thiacloprid. Gruppe 6\_T-K weist zu diesem Zeitpunkt signifikant weniger Spikes auf als Gruppe 3\_K-K.

Für die folgenden Darstellungen der Versuche mit zeitversetzter Doppelapplikation wird jeweils die 4. Messung betrachtet, die 60 Minuten nach der 1. Applikation und 30 Minuten nach der 2. Applikation stattgefunden hat. Alle anderen Messungen sind dem Anhang zu entnehmen.

Beim Vergleich der beiden Versuchsgruppen (Gruppe 1\_C-T und Gruppe 2\_T-C) zeigen sich keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 15).



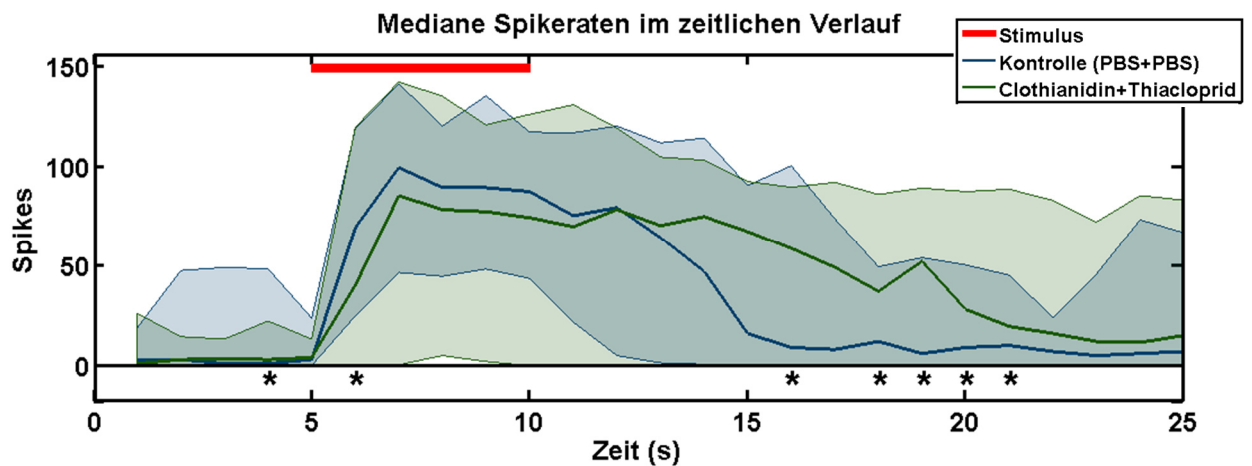
**Abbildung 15:** Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe 1 (Clothianidin (1  $\mu$ M) + Thiacloprid (10  $\mu$ M), n = 18) und der Versuchsgruppe 2 (Thiacloprid (10  $\mu$ M) + Clothianidin (1  $\mu$ M), n = 17).

4. Messung; schraffierte Flächen: in diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test, \* $p \leq 0,05$ ).

Auffällig ist jedoch, dass die mediane Spikerate von Gruppe 2\_T-C meist höher liegt, und vor allem im schraffierten Bereich, in dem sich 90 % der Daten befinden, deutlich erhöht ist im Vergleich zu Gruppe 1\_C-T.

Beim Vergleich der Gruppe 1\_C-T mit der Gruppe 3\_K-K (siehe Abbildung 16) zeigt sich eine signifikant erhöhte Spikerate bei Gruppe 1\_C-T, vor allem im Zeitraum nach dem

Stimulus (10 s – 25 s). In den anderen Zeiträumen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Allerdings liegt die Anzahl der Spikes von Gruppe 1\_C-T während des Stimulus leicht unterhalb der Spikeanzahl von Gruppe 3\_K-K, jedoch ohne signifikanten Unterschied.



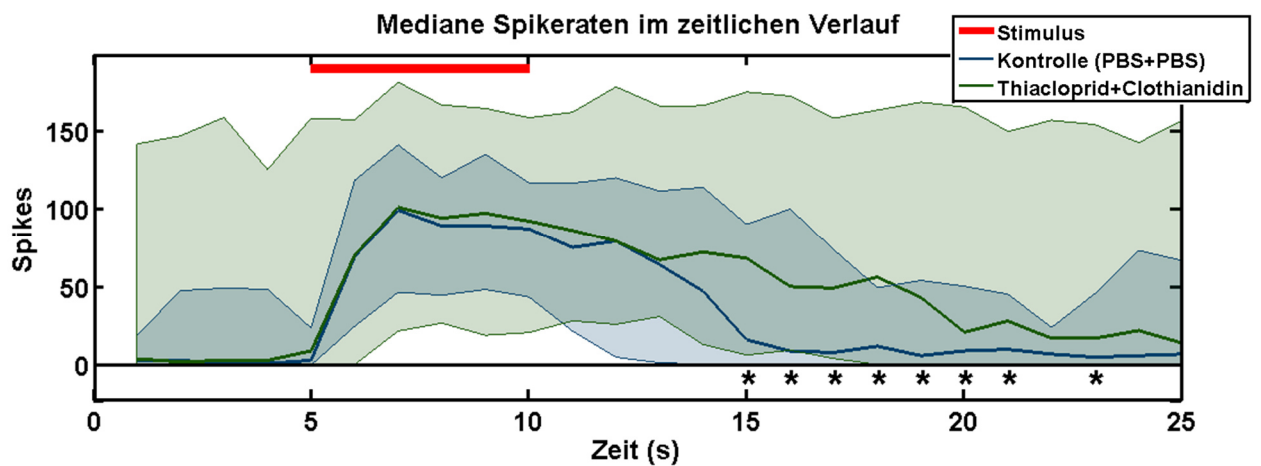
**Abbildung 16:** Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS,  $n = 17$ ) und der Versuchsgruppe 1 (Clothianidin ( $1 \mu\text{M}$ ) + Thiacloprid ( $10 \mu\text{M}$ ),  $n = 18$ ).

4. Messung; schraffierte Flächen: in diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es ergaben sich signifikante Unterschiede im Zeitraum nach dem Stimulus (10s – 25 s;  $p = 0,0391$ ; getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $*p \leq 0,05$ ).

Die Anzahl an Spikes von Gruppe 1\_C-T ist weiter gestreut als die Zahlen von Gruppe 3\_K-K, was sich an den schraffierten Flächen erkennen lässt.

Beim Vergleich von Versuchsgruppe 1\_C-T mit den beiden anderen zugehörigen Kontrollgruppen 4\_C-K und 7\_K-T zeigen sich zum 4. Messzeitpunkt keine signifikanten Unterschiede (siehe Anhang, Abbildungen 92 und 95).

Der Vergleich von Versuchsgruppe 2\_T-C mit Kontrollgruppe 3\_K-K zeigt ein ganz ähnliches Bild wie eben beschrieben (siehe Abbildung 17).



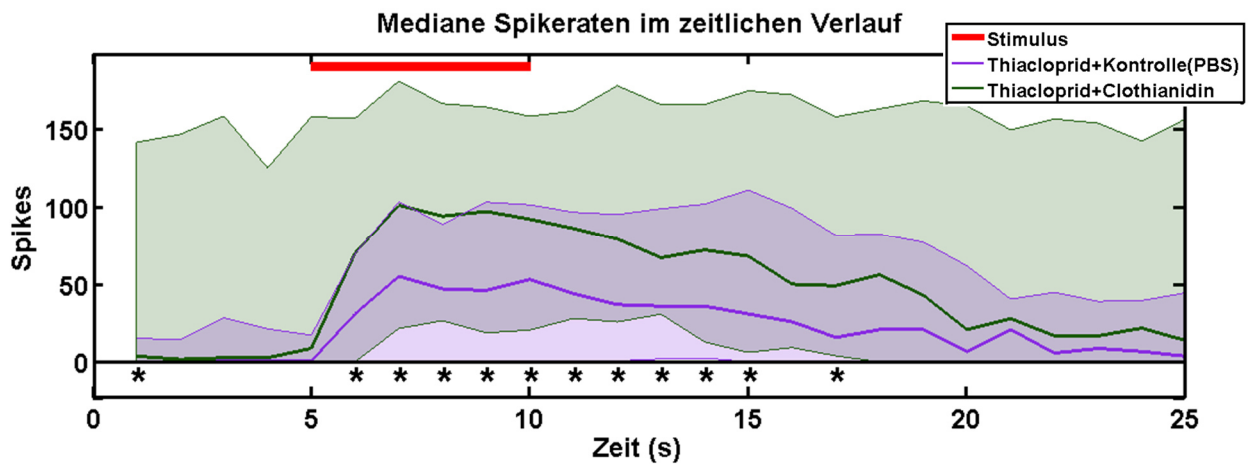
**Abbildung 17:** Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Versuchsgruppe 2 (Thiacloprid (10  $\mu$ M) + Clothianidin (1  $\mu$ M), n = 17).

4. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es ergaben sich signifikante Unterschiede im Zeitraum nach dem Stimulus (10s – 25 s;  $p = 0,0175$ ; getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $*p \leq 0,05$ ).

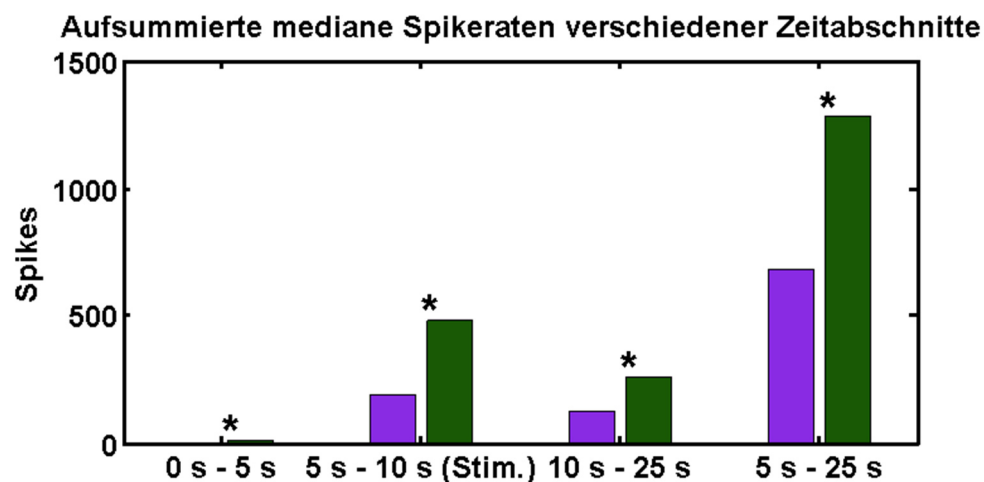
Auch hier unterscheiden sich die beiden Gruppen im Zeitraum nach dem Stimulus (10 s – 25 s) signifikant, das heißt Gruppe 2\_T-C hat eine deutlich höhere Anzahl an Muskelaktionspotenzialen als Gruppe 3\_K-K ( $p = 0,0175$ ). Diese Tendenz besteht auch während der restlichen Zeit des Messzeitraums, das heißt von Sekunde 5 bis 25 ( $p = 0,0629$ ). Wie beim Vergleich von Gruppe 1\_C-T mit Gruppe 3\_K-K zeigt auch Gruppe 2\_T-C wesentlich stärker gestreute Anzahlen als die Kontrollgruppe, was sich in der schraffierten Fläche um die Kurven erkennen lässt.

Die gleiche Gruppe 2\_T-C verglichen mit Gruppe 6\_T-K ergibt über den gesamten Messzeitraum signifikant erhöhte Spikeraten für Gruppe 2\_T-C, auch bereits vor Stimulusbeginn (siehe Abbildung 18 und Abbildung 19).





**Abbildung 18:** Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 6 (Thiacloprid (10  $\mu$ M) + PBS, n = 15) und der Versuchsgruppe 2 (Thiacloprid (10  $\mu$ M) + Clothianidin (1  $\mu$ M), n = 17).  
 4. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es ergaben sich signifikante Unterschiede über den gesamten Messzeitraum; getestet mit Wilcoxon Ranksum Test, \* $p \leq 0,05$ ).



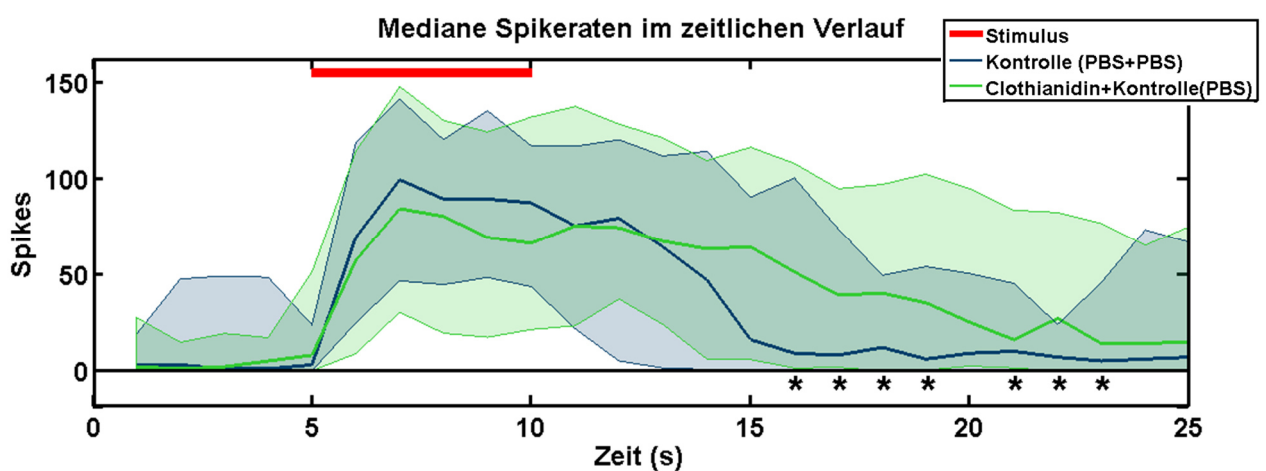
**Abbildung 19:** Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 6 (Thiacloprid (10  $\mu$ M) + PBS, n = 15, lila) und der Versuchsgruppe 2 (Thiacloprid (10  $\mu$ M) + Clothianidin (1  $\mu$ M), n = 17, dunkelgrün) in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.  
 4. Messung; es bestehen über den gesamten Messzeitraum signifikante Unterschiede (0s – 5s:  $p = 0,0107$ , 5s – 10s:  $p = 0,00083084$ , 10s – 25s:  $p = 0,0212$ , 5s – 25s:  $p = 0,0092$ ); die Anzahl der Spikes der Versuchsgruppe ist deutlich höher als bei der Kontrollgruppe. Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

In Abbildung 18 ist deutlich zu sehen, dass sich die Mediane der Spikeanzahlen der beiden Gruppen zu fast keinem Zeitpunkt berühren oder überschneiden – die Versuchsgruppe 2\_T-C hat durchweg höhere Spikeanzahlen als die Kontrollgruppe 6\_T-K. Auch hier ist anzumerken, dass die Streuung der Daten für die Versuchsgruppe größer ist als für die Kontrollgruppe.

Beim Vergleich von Gruppe 2\_T-C mit Gruppe 5\_K-C ergaben sich für den 4. Messzeitpunkt keine signifikanten Unterschiede (siehe Anhang, Abbildung 120).

Vergleicht man die Kontrollgruppen untereinander, ergeben sich zum Teil signifikante Effekte, je nachdem welche Substanz appliziert wurde. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

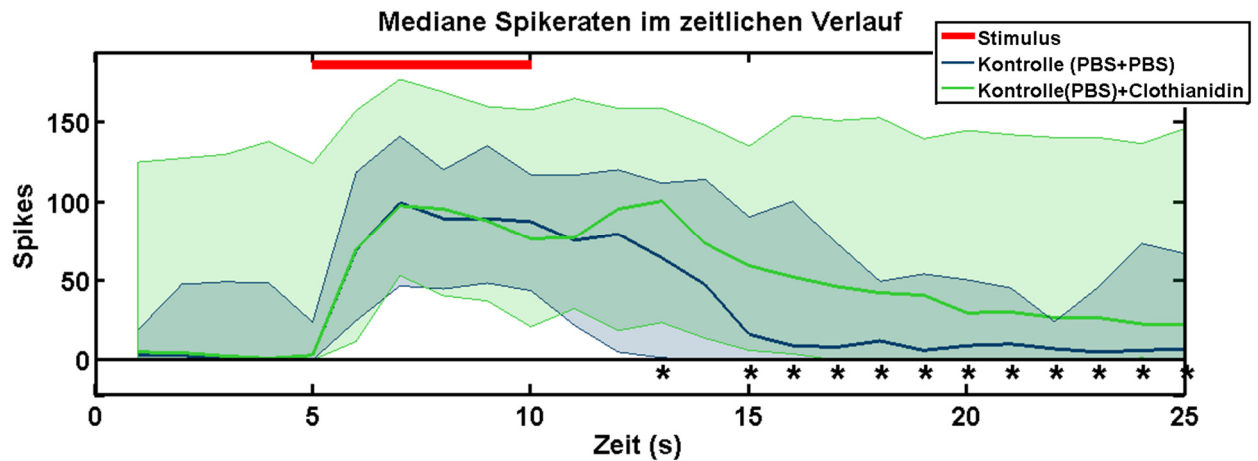
Beim Vergleich der Kontrollgruppe 3\_K-K mit der Kontrollgruppe 4\_C-K ergeben sich signifikant erhöhte Anzahlen an Spikes für Gruppe 4\_C-K im Zeitraum nach dem Stimulus (10 s – 25 s) (siehe Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Kontrollgruppe 4 (Clothianidin (1  $\mu$ M) + PBS, n = 17).

4. Messung; schraffierte Flächen: in diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es ergaben sich signifikante Unterschiede im Zeitraum nach dem Stimulus (10s – 25 s;  $p = 0,0457$ ; getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $*p \leq 0,05$ ).

In den 15 Sekunden nach dem Stimulus liegen die medianen Spikeanzahlen der Kontrollgruppe 4\_C-K zum Teil sehr deutlich höher als in der Kontrollgruppe 3\_K-K, vor allem ab Sekunde 13. Ein sehr ähnliches Bild zeigt sich beim Vergleich der Kontrollgruppe 3\_K-K mit der Kontrollgruppe 5\_K-C (siehe Abbildung 21).

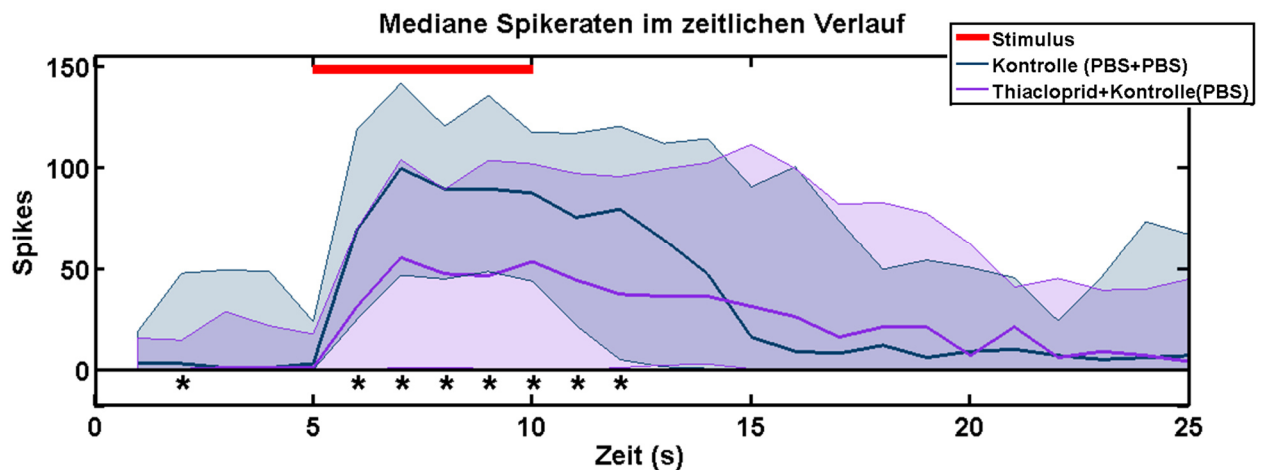


**Abbildung 21:** Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Kontrollgruppe 5 (PBS + Clothianidin (1  $\mu$ M), n = 18).

4. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es ergaben sich signifikante Unterschiede im Zeitraum nach dem Stimulus (10s – 25 s;  $p = 0,0200$ ; getestet mit Wilcoxon Ranksum Test, \* $p \leq 0,05$ ).

Auch hier lassen sich die größten und damit auch signifikanten Unterschiede nach dem Stimulus erkennen. Allerdings liegen die medianen Spikeanzahlen von Gruppe 5\_K-C in diesem Vergleich konstanter über der Anzahl von Gruppe 3\_K-K. Die mediane Anzahl an Spikes ist auch fast über den gesamten Messzeitraum ab Stimulusbeginn höher als die von Gruppe 3\_K-K, was sich in einem nahezu signifikanten Wert von  $p = 0,0535$  zeigt.

Auch bei den Thioclopid-Kontrollgruppen zeigen sich signifikante Unterschiede. Gruppe 3\_K-K und Kontrollgruppe 6\_T-K unterscheiden sich im Zeitraum während des Stimulus signifikant voneinander, wobei Gruppe 6\_T-K im Median deutlich weniger Spikes hat als Gruppe 3\_K-K (siehe Abbildung 22).

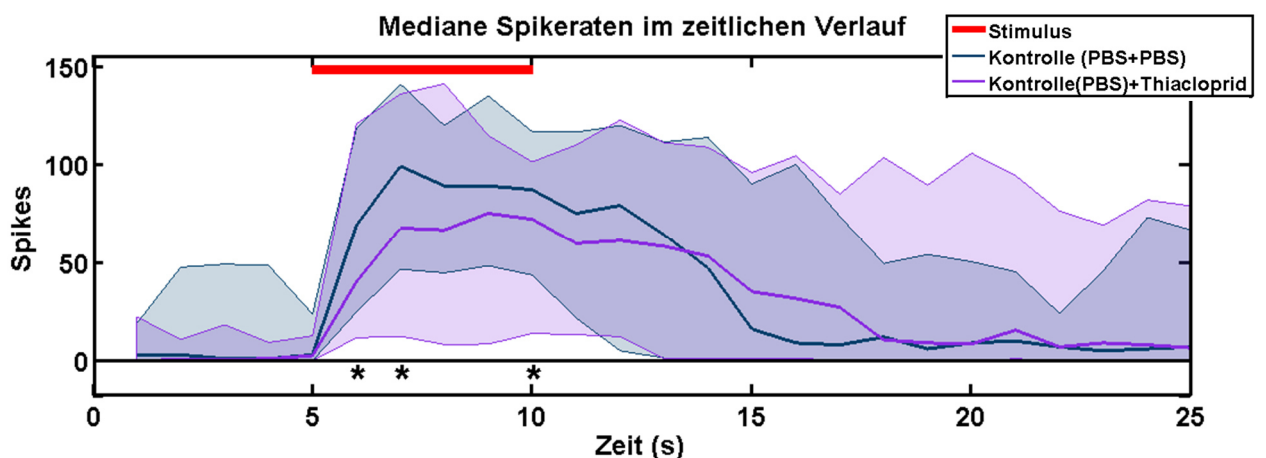


**Abbildung 22:** Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Kontrollgruppe 6 (Thiacloprid (10  $\mu$ M) + PBS, n = 15).

4. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es ergaben sich signifikante Unterschiede im Zeitraum während des Stimulus' (5s – 10 s;  $p = 0,00024897$ ; getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $*p \leq 0,05$ ).

Gruppe 6\_T-K, die als 1. Applikation Thiocloprid bekommen hat, hat während des Stimulus eine deutlich niedrigere mediane Spikeanzahl als Gruppe 3\_K-K, die in beiden Applikationen PBS bekommen hat. Das kehrt sich erst ab ca. Sekunde 15 um, dann ist der Unterschied aber auch nicht so deutlich wie während des Stimulus.

Relativ ähnlich sieht der Vergleich zwischen Gruppe 3\_K-K und Gruppe 7\_K-T aus. Auch hier hat Gruppe 7\_K-T während des Stimulus signifikant weniger Spikes als Gruppe 3\_K-K (siehe Abbildung 23).

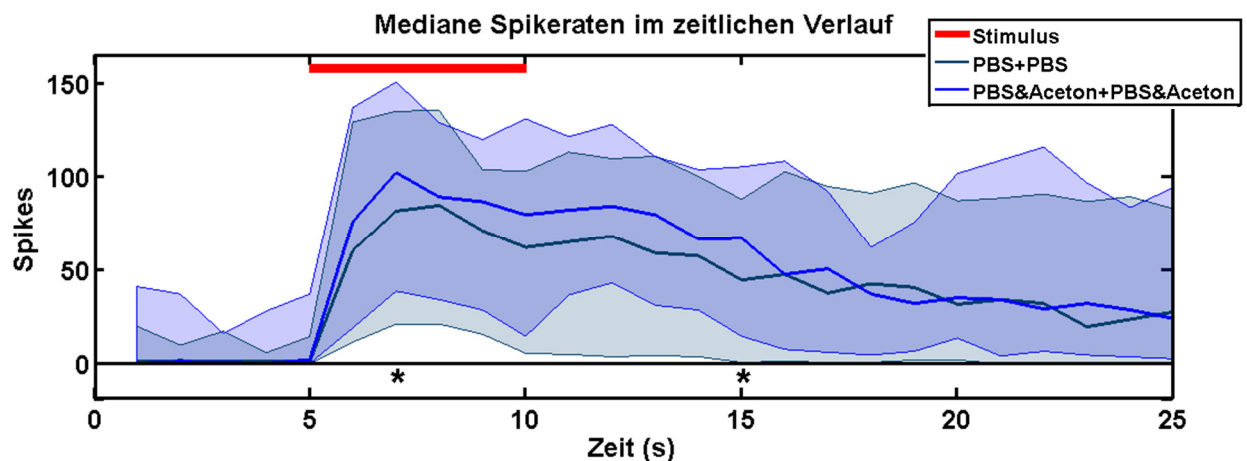


**Abbildung 23:** Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Kontrollgruppe 7 (PBS + Thiocloprid (10  $\mu$ M), n = 18).

4. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es ergaben sich signifikante Unterschiede im Zeitraum während des Stimulus' (5 s – 10 s;  $p = 0,0294$ ; getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $*p \leq 0,05$ ).

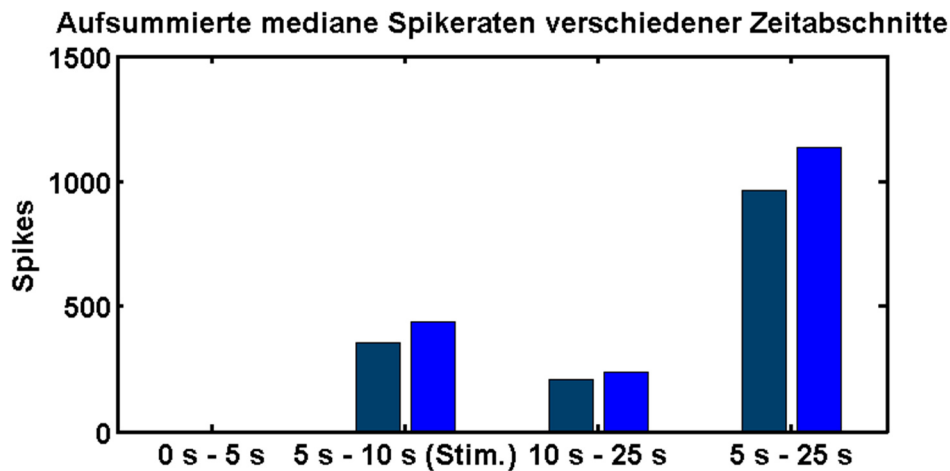
Wie im Vergleich oben kehrt sich auch hier kurz vor Sekunde 15 die mediane Spikeanzahl um, sodass kurzfristig Gruppe 7\_K-T mehr Spikes hat als Gruppe 3\_K-K. Die Spikeanzahlen laufen dann aber wieder parallel weiter und weisen keine Unterschiede mehr auf.

Wie oben beschrieben wurden die Versuche mit Kontrollgruppe 8\_K(A)-K(A) nach den eigentlichen Hauptversuchen durchgeführt. Parallel dazu wurde Gruppe 3\_K-K wiederholt und wird als Kontrollgruppe 9\_K-K bezeichnet. Im Vergleich dieser beiden Gruppen zeigen sich keine signifikante Unterschiede in der 4. Messung (60 Minuten nach der 1. Applikation und 30 Minuten nach der 2. Applikation). Gruppe 8\_K(A)-K(A) (mit Aceton) weist aber eine etwas erhöhte Spikerate im Vergleich zur Kontrollgruppe 9\_K-K auf (siehe Abbildung 24 und Abbildung 25).



**Abbildung 24:** Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 9 (PBS + PBS, n = 22) und der Kontrollgruppe 8 (PBS & Aceton + PBS & Aceton, n = 20).

4. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; während des Stimulus' (5 s – 10 s) zeigt Gruppe 8 eine tendenziell erhöhte mediane Spikeanzahl im Vergleich zu Gruppe 9 ( $p = 0,0737$ ); getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $*p \leq 0,05$ ).



**Abbildung 25:** Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 9 (PBS + PBS, n = 22, dunkelblau) und der Kontrollgruppe 8 (PBS & Aceton + PBS & Aceton, n = 20, königsblau) in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

4. Messung; es bestehen keine signifikante Unterschiede; (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ); die mediane Anzahl der Spikes der Kontrollgruppe 8 ist leicht erhöht im Vergleich mit Kontrollgruppe 9. Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

Es wird ersichtlich, dass Gruppe 8\_K(A)-K(A) eine Tendenz zu höheren medianen Spikeanzahlen zeigt, vor allem im Zeitraum während des Stimulus und weitere fünf Sekunden danach. Im weiteren Verlauf liegen die Spikeanzahlen der beiden Gruppen aber nah aneinander.

Zur besseren Übersicht sind in Tabelle 2 die eben beschriebenen Ergebnisse der Vergleichsgruppen zum 4. Messzeitpunkt zusammengefasst.

**Tabelle 2:** Zusammenfassung der Ergebnisse der zeitversetzten Doppelapplikation, 4. Messzeitpunkt.

↑: Gruppe in der 1. Spalte hat eine signifikant höhere Spikeanzahl als die Vergleichsgruppe ( $p \leq 0,05$ ; Wilcoxon Ranksum Test). ↑: Gruppe in der 1. Spalte hat eine höhere Spikeanzahl als die Vergleichsgruppe ( $p \leq 0,1$ ; Wilcoxon Ranksum Test). ↓: Gruppe in der 1. Spalte hat eine signifikant niedrigere Spikeanzahl als die Vergleichsgruppe ( $p \leq 0,05$ ; Wilcoxon Ranksum Test). ↓: Gruppe in der 1. Spalte hat eine niedrigere Spikeanzahl als die Vergleichsgruppe ( $p \leq 0,1$ ; Wilcoxon Ranksum Test).

Gruppe	Applikation	im Vergleich zu	Sekunde			
			0 - 5 (vor Stimulus)	5 - 10 (während Stimulus)	10 - 25 (nach Stimulus)	5 - 25
1	Clothianidin + Thiacloprid	2 (Thiacloprid + Clothianidin)	-	-	-	-
		3 (PBS + PBS)	-	-	↑	-
		4 (Clothianidin + PBS)	-	-	-	-
		7 (PBS + Thiacloprid)	-	-	-	-
2	Thiacloprid + Clothianidin	3 (PBS + PBS)	-	-	↑	↑
		5 (PBS + Clothianidin)	-	-	-	-
		6 (Thiacloprid + PBS)	↑	↑	↑	↑
3	PBS + PBS	4 (Clothianidin + PBS)	-	-	↓	-
		5 (PBS + Clothianidin)	-	-	↓	↓
		6 (Thiacloprid + PBS)	↑	↑	-	-
		7 (PBS + Thiacloprid)	-	↑	-	-
9	PBS + PBS	8 (PBS & Aceton + PBS & Aceton)	-	↓	-	-

## 2.4 Diskussion

### 2.4.1 Einzelapplikationen

In den Versuchen mit Einzelapplikationen zeigt sich ein deutlicher Trend sowohl für die Applikation von Clothianidin als auch für die Applikation von Thiacloprid. Clothianidin erhöhte die Spikeanzahl deutlich im Vergleich zur Kontrollgruppe, da es den Rezeptor stärker aktiviert als Acetylcholin und zusätzlich nicht von der Acetylcholinesterase im synaptischen Spalt abgebaut wird. Somit wirkt es am Rezeptor stärker und langanhaltender. Das zeigt sich in den beschriebenen Versuchen anhand einer erhöhten medianen Spikeanzahl. Die Spikeanzahl der Clothianidin-Gruppe liegt 30 Minuten nach der Applikation im Median bei 2145,5, während sie bei der Kontrollgruppe bei 1711 liegt, gemessen über 20 Sekunden ab Stimulusbeginn. Damit besteht zwischen den beiden

Gruppen ein signifikanter Unterschied. Auch in der Spikeanzahl 5 Sekunden vor Stimulusbeginn gibt es nach der Clothianidin-Applikation signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe, und zwar 10 und 20 Minuten nach der Applikation. Die mediane Spikeanzahl liegt 10 Minuten nach der Applikation bei der Versuchsgruppe bei 118, während sie bei der Kontrollgruppe bei 47,5 liegt. Entsprechend ist der Median zum Zeitpunkt 20 Minuten nach der Applikation von Clothianidin bei 84,5, nach Applikation der Kontrolllösung bei 44. Das bedeutet, dass die generelle Spikeanzahl des Muskels M17 nach der Applikation von Clothianidin erhöht ist, unabhängig davon, ob ein Stimulus präsentiert wird oder nicht, und dass der Muskel aktiviert ist, obwohl er gerade gar nicht ausgestreckt wird. Wenn dann der Stimulus präsentiert wird, unterscheiden sich die Spikeanzahlen wie oben beschrieben ebenfalls.

Diese Unterschiede in den Spikeanzahlen des Muskels lassen sich auch in der Motorik der Biene bzw. in deren Verhalten beobachten. In seiner Bachelorarbeit stellte Kabat vel Job (2012) fest, dass Bienen, die mit 0,5 ng bzw. 1 ng Clothianidin gefüttert wurden, nach der Fütterung ein deutlich und signifikant schnelleres Laufverhalten aufwiesen als vor der Fütterung mit Clothianidin. Das heißt, dass die Motorik bzw. das Laufverhalten durch Clothianidin auch in einer Weise beeinflusst wird, die durch die höhere Spikeaktivität der Muskeln erklärt werden kann: Die erhöhte Spikeanzahl spiegelt sich im erhöhten Laufverhalten der Bienen wider. Auch bei Schneider et al. (2012) ist ein verändertes Verhalten der Bienen nach Clothianidin-Gabe beschrieben. Die Bienen, die mit 2 ng Clothianidin gefüttert wurden, bewegten sich mit einem gekrümmten Abdomen hin und her oder lagen phasenweise auf dem Rücken und zappelten mit den Beinen. Die Mobilität dieser Bienen blieb dabei unbeeinträchtigt. Ähnliches wird von Williamson et al. (2014) beschrieben: Bienen, die mit Clothianidin gefüttert wurden, zeigten kaum Veränderungen in der Menge ihrer Bewegungen an sich, allerdings war die Fähigkeit, diese Bewegungen zu koordinieren, und auch das Aufsetzen, wenn sie auf der Seite oder dem Rücken lagen, beeinträchtigt. In den hier beschriebenen Versuchen laufen die Bienen nicht frei herum, sondern sind in kleinen Plastikröhrchen fixiert, sodass eine Beobachtung des Laufverhaltens oder Ähnliches nicht durchgeführt werden konnte. Allerdings zeigen die eben beschriebenen Versuche eine ähnliche Tendenz wie die Ergebnisse des hier durchgeführten Versuchs: Die Bienen sind durch Clothianidin in ihrer Motorik nicht eingeschränkt bzw. weisen erhöhtes Laufverhalten auf, was sich in den Versuchen dieser



Arbeit durch eine erhöhte Spikeanzahl widerspiegelt. Beachtet werden muss allerdings, dass im hier beschriebenen Versuch die Substanzen direkt in die Kopfkapsel appliziert wurden, während sie sowohl bei Kabat vel Job (Bachelorarbeit, 2012) als auch bei Schneider et al. (2012) verfüttert wurden. Bei der Applikation in die Kopfkapsel kann man davon ausgehen, dass die verwendete Menge der Substanz in der Biene direkt bzw. relativ schnell nach der Applikation ihre Wirkung zeigt, weil sie nicht erst durch den Verdauungstrakt der Biene verarbeitet wird, sondern sich in der Hämolymphe befindet. Dies ist auch der Grund für die relativ niedrige Konzentration in diesen Versuchen (0,25 ng), da die Substanz direkt im Körper der Biene wirken kann, ohne dass der Mitteldarm, als Hauptort der Metabolisierung (Suchail et al., 2004), die Konzentration durch den Abbau der Substanz abschwächt.

Thiacloprid, das vermutlich auch bei der Honigbiene als partieller Agonist fungiert, zeigt in diesem Versuch eine ganz andere Auswirkung auf den Muskel M17. Die mediane Spikeanzahl wurde durch Thiacloprid im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich abgesenkt. Die mediane Spikeanzahl 30 Minuten nach der Applikation liegt in der Versuchsgruppe bei 1309,5, in der Kontrollgruppe bei 1711, gemessen über 20 Sekunden ab Stimulusbeginn. Die Spikeanzahl ist nach der Thiacloprid-Applikation damit deutlich niedriger als in der Kontrollgruppe, allerdings nicht signifikant. Bei den Spikeanzahlen 5 Sekunden vor Stimulusbeginn zeigt sich ebenfalls diese Tendenz: Die mediane Spikeanzahl liegt 10 Minuten nach der Applikation bei der Versuchsgruppe bei 30, während sie bei der Kontrollgruppe bei 47,5 liegt. Entsprechend ist der Median zum Zeitpunkt 30 Minuten nach der Applikation von Thiacloprid bei 50, nach der Applikation der Kontrolllösung bei 65. Die Spikeanzahl wird durch Thiacloprid somit deutlich gesenkt, und zwar scheint diese Absenkung auch stattzufinden, wenn noch kein Stimulus präsentiert wird.

Auch hier kann ein Vergleich zu Kabat vel Job (Bachelorarbeit, 2012) gezogen werden. Dort zeigten sich nach einer Fütterung von 500 ng bzw. 1000 ng Thiacloprid signifikante Unterschiede im Vergleich zu vor der Fütterung. Die Bienen zeigten nach der Fütterung ein deutlich reduziertes Laufverhalten. Es zeigt sich also die gleiche Tendenz wie in den oben beschriebenen Versuchen, in denen die Spikeanzahl durch Thiacloprid tendenziell gesenkt wurde. Fischer et al. (2014) fanden heraus, dass die Fluggeschwindigkeit bei mit Thiacloprid behandelten Bienen (1,25 µg) deutlich reduziert ist. Dies könnte auf einen

Effekt von Thiacloprid auf die Flugfähigkeit hinweisen, was eventuell auch mit der Motorik bzw. der Muskelaktivität zusammenhängt. In den hier beschriebenen Versuchen ist die mediane Spikeanzahl reduziert, was auf eine eingeschränkte Motorik hinweisen könnte und damit auf eine reduzierte Fluggeschwindigkeit.

Dass sich keine signifikanten Unterschiede, sondern lediglich Tendenzen zeigen, könnte sich durch die niedrigere Toxizität von Thiacloprid, verglichen mit Clothianidin, erklären lassen. Die oralen LD<sub>50</sub>-Werte der beiden Substanzen unterscheiden sich stark, in den hier beschriebenen Versuchen wurden aber die gleichen Mengen der beiden verwendet (0,25 ng). Das könnte dafür gesorgt haben, dass nach der Applikation von Thiacloprid lediglich Tendenzen zu sehen sind, während nach der Applikation von Clothianidin deutliche Signifikanzen erkennbar sind. Es wird davon ausgegangen, dass sich auch nach der Applikation von Thiacloprid signifikante Unterschiede zeigten, wenn eine höhere Konzentration verwendet werden würde.

Imidacloprid ist bei der Honigbiene ein partieller Agonist des nAChRs (Nauen et al., 2001; Déglise et al., 2002; Palmer et al., 2013) und zeigt damit keine so starke Auswirkung wie der Vollagonist Clothianidin, allerdings auch keine eindeutige Tendenz wie Thiacloprid. Die mediane Spikeanzahl 30 Minuten nach der Applikation liegt in der Versuchsgruppe bei 1655, in der Kontrollgruppe bei 1711, gemessen über 20 Sekunden ab Stimulusbeginn. Die beiden unterscheiden sich damit kaum. Auch in den 5 Sekunden vor Stimulusbeginn gibt es keine Unterschiede in der Spikeanzahl zwischen Bienen, die mit Imidacloprid und Bienen, die mit Kontrolllösung behandelt wurden. Auch sind keine eindeutigen Tendenzen zu erkennen. Bei Schneider et al. (2012) zeigten sich bei einer verfütterten Menge von 0,15 ng Imidacloprid keine Effekte auf das Sammelverhalten der Bienen. Des Weiteren kamen bis zu einer verfütterten Menge von 3 ng Imidacloprid nahezu alle Bienen zurück zum Stock, allerdings nur ein Viertel der Bienen, die mit 6 ng Imidacloprid gefüttert wurden. Dies deutet darauf hin, dass die Motorfunktion, die zum Fliegen nötig ist, durch die Imidacloprid-Mengen von bis zu 3 ng nicht beeinträchtigt war. Die in diesem Versuch durch Imidacloprid (0,25 ng) unveränderten Spikeanzahlen zeigen die gleiche Tendenz. Eine größere Menge an Imidacloprid wurde in dem hier beschriebenen Versuch nicht getestet. Es ist aber gut vorstellbar, dass sich bei größeren Mengen Imidacloprid eine Auswirkung auf die Spikeanzahl des Muskels M17 zeigen könnte. Williamson et al.

(2014) zeigten, dass sich die Fortbewegungsfähigkeit der Bienen nach Fütterung mit Imidacloprid (10 bzw. 100 nM) an sich nicht verändert, nur die Koordination dieser Bewegungen war beeinträchtigt. Die genaue Koordination der Bewegungen ist in dem hier beschriebenen Versuch nicht nachzuvollziehen, da sich die Bienen in einem Plastikröhrchen befanden. Aber die Bewegungsfähigkeit des Rüssels war nach Applikation von Imidacloprid nicht eingeschränkt, und die Spikeanzahl blieb im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert. Die Ergebnisse des hier beschriebenen Versuchs bestätigen sich auch bei Ramirez-Romero et al. (2008), die keine Unterschiede in der Motorik des PERs zwischen mit Imidacloprid und mit Kontrolllösung gefütterten Bienen feststellten. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen Decourtye et al. (2004b), die ebenfalls keinen Effekt von Imidacloprid auf die PER-Antwort feststellen konnten. In Versuchen zur Bewegungsaktivität der Biene nach Aufnahme von Imidacloprid konnten Cresswell et al. (2013) keine Akkumulation des Imidacloprids im Körper der Biene feststellen und auch keine Reduzierung der Aktivität, was den hier beschriebenen Ergebnissen entspricht, in denen keine Reduzierung der Muskelaktivität nachgewiesen werden konnte. Auch bei Fischer et al. (2014) konnten nach Gabe von 7,5 ng bzw. 11,25 ng Imidacloprid keine Auswirkungen auf die Fluggeschwindigkeit festgestellt werden, was auf eine funktionierende Motorik hinweisen könnte und damit in Übereinstimmung mit dem Ausbleiben von Effekten auf die Spikeaktivität des Muskels M17 durch Imidacloprid wäre. Auch Stadler et al. (2003) stellten bei Bienenvölkern, die an mit Imidacloprid behandelten Sonnenblumenfeldern sammelten, keine Unterschiede in der Entwicklung oder der Mortalität der Bienen fest, verglichen mit Kontrollvölkern an unbehandelten Feldern. In diesem Versuch wurden zwar keine Effekte auf Einzelbienen untersucht, aber die Völker wurden durch das Imidacloprid nicht in ihrer Volksentwicklung oder ihrem Verhalten (zum Beispiel Sammeln, Brutpflege) geschädigt.

Aufgrund der von Palmer et al. (2013) festgestellten Wirkung von Imidacloprid als partiellem Agonisten des nAChRs wurde in dieser Arbeit zunächst davon ausgegangen, dass Imidacloprid (ähnlich wie Thiacloprid) eine niedrigere Spikeanzahl des Muskels M17 zur Folge hat. Diese Annahme konnte in den vorliegenden Versuchen nicht bestätigt werden. Palmer et al. (2013) berichten von Auswirkungen auf Kenyonzellen von Honigbienen bei einer Konzentration von 10 nM, was deutlich unter der hier

verwendeten Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  liegt. Dennoch ließ sich in den hier beschriebenen Versuchen kein Effekt des Imidacloprids feststellen.

Imidacloprid wird in seine Metabolite 5-hydroxyimidacloprid und Olefin abgebaut, wobei nach 20 Minuten bereits ca. 30 % des Imidacloprids abgebaut sind. Da die Halbwertszeit von Imidacloprid bei 4,5 bis 5 Stunden liegt (Suchail et al., 2003), kann auch der Abbau von Imidacloprid nicht als Erklärung für ausbleibende Effekte herangezogen werden. Die Versuchszeit von bis zu 60 Minuten nach der Applikation liegt innerhalb der Halbwertszeit, somit kann das Imidacloprid noch nicht abgebaut worden sein, ehe ein Effekt eingetreten wäre. Suchail et al. (2004) zeigten, dass die ersten Anzeichen der Toxizität von Imidacloprid innerhalb von 10 Minuten nach der Gabe der Substanz auftreten. Bei Medrzycki et al. (2003) zeigen sich Effekte von Imidacloprid im Zeitraum 30 bis 60 Minuten nach der Fütterung. Beide Zeiträume sind in den hier beschriebenen Versuchen abgedeckt, die Effekte konnten aber in den Muskelableitungen nicht bestätigt werden.

#### 2.4.2 Zeitversetzte Doppelapplikationen

Bei der zeitversetzten Doppelapplikation ergaben sich ebenfalls verschiedene Tendenzen für die verschiedenen Neonikotinoide. Beim Vergleich der beiden Versuchsgruppen, denen beiden sowohl Clothianidin als auch Thiacloprid appliziert wurde (lediglich in unterschiedlicher Reihenfolge), zeigt sich, dass sich diese beiden nicht signifikant unterscheiden. Die medianen Spikeanzahlen verlaufen ähnlich. Auffällig ist, dass in der Zeit während des Stimulus die Spikeanzahl bei Versuchsgruppe 2\_T-C leicht höher verläuft als bei Versuchsgruppe 1\_C-T. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass Gruppe 1\_C-T die Thiacloprid-Applikation zuletzt bekommen hat, sodass seit dieser erst 30 Minuten vergangen waren und sie dadurch noch stärker, mit einer Absenkung der Spikeanzahl, in den Ableitungen zu sehen ist als die Thiacloprid-Applikation von Gruppe 2\_T-C, die bereits 60 Minuten zurückliegt. Bei Gruppe 2\_T-C könnte in diesem Fall die Clothianidin-Applikation, die 30 Minuten zurückliegt, noch stärker ins Gewicht fallen. Insgesamt zeigt sich aber kein signifikanter Unterschied, und man kann demnach lediglich von einer Tendenz sprechen. Zum Abbau der beiden Substanzen in der Biene ist bisher wenig bekannt, wodurch nicht vollständig klar ist, ob eine der beiden Substanzen schneller oder langsamer als die andere abgebaut wird. Vermutet wird jedoch, dass Thiacloprid besser

durch die Cytochrome P450 metabolisiert wird (Iwasa et al., 2004), was den Abbau beschleunigen und damit die dominante Rolle des Clothianidins noch verstärken könnte. Dies würde auch erklären, warum Gruppe 2\_T-C im schraffierten Bereich, in dem sich 90 % der Daten befinden, deutlich höher liegt als Gruppe 1\_C-T (siehe Abbildung 15), da das Thiacloprid, das die Anzahl an Spikes absenken würde, bei Gruppe 2\_T-C schon teilweise abgebaut wurde, während es bei Gruppe 1\_C-T seine absenkende Wirkung noch zeigt.

Versuchsgruppe 1\_C-T unterscheidet sich im Zeitraum nach dem Stimulus (10 s – 25 s) signifikant von Kontrollgruppe 3\_K-K. Gruppe 1\_C-T hat dabei eine erhöhte Anzahl an Spikes im Vergleich zu Gruppe 3\_K-K, was auf die Wirkung des Clothianidins als Super-Agonist zurückzuführen ist: Durch Clothianidin wird die mediane Spikeanzahl erhöht. Im Vergleich von Gruppe 1\_C-T zu Gruppe 4\_C-K ergab sich lediglich ein signifikanter Unterschied zum Zeitpunkt 3, wobei erstere eine höhere mediane Anzahl an Spikes aufweist, was so nicht erwartet wurde. Da zu diesem Zeitpunkt aber erst wenige Sekunden seit der zweiten Applikation vergangen sind, scheint dieser Unterschied noch nicht unbedingt auf die Wirkung der Substanzen zurückzuführen zu sein. Ansonsten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Gruppe 1\_C-T mit den beiden Kontrollgruppen 4\_C-K und 7\_K-T, was bei Gruppe 4\_C-K vermutlich am Clothianidin liegt, das ebenfalls bei Gruppe 1\_C-T vorkommt, wodurch beide Gruppen eine erhöhte Anzahl an Spikes haben und sich damit nicht unterscheiden. Auch Gruppe 4\_C-K zeigt eine signifikant erhöhte Anzahl an Spikes im Zeitraum nach dem Stimulus im Vergleich zu Gruppe 3\_K-K. Durch diese Vergleiche wird klar, dass das Clothianidin in der Doppelapplikation von Gruppe 1\_C-T im Zeitraum nach dem Stimulus dominant zu sein scheint. Kontrollgruppe 7\_K-T unterscheidet sich wie eben erwähnt nicht signifikant von Versuchsgruppe 1\_C-T. Kontrollgruppe 7\_K-T unterscheidet sich aber durchaus signifikant von Kontrollgruppe 3\_K-K, allerdings im Zeitraum während des Stimulus, wobei Gruppe 7\_K-T eine niedrigere mediane Spikeanzahl aufweist. Dass dieser Unterschied nicht für den Vergleich von Gruppe 1\_C-T und Gruppe 7\_K-T besteht, könnte an der Wirkung des Thiacloprids liegen, das im Zeitraum während des Stimulus die Spikeanzahl zu erniedrigen scheint.

Versuchsgruppe 2\_T-C unterscheidet sich ebenfalls signifikant von Kontrollgruppe 3\_K-K, im Zeitraum nach dem Stimulus. Auch hier hat Gruppe 2\_T-C eine höhere Anzahl an Spikes, was sich wie oben beschrieben durch die Wirkung des Clothianidins als Super-Agonist erklären lässt. Vergleicht man Versuchsgruppe 2\_T-C mit Kontrollgruppe 6\_T-K, ergeben sich über den gesamten Messzeitraum (auch bereits 5 Sekunden vor Stimulusbeginn) signifikant erhöhte Spikeraten für Gruppe 2\_T-C, welche für den Messzeitraum 20 Sekunden ab Stimulusbeginn eine mediane Spikeanzahl von 1281 aufweist, während diese für Gruppe 6\_T-K bei 680 liegt. Auch in diesem Fall spricht dies für die dominante Rolle des Clothianidins. Zur Kontrollgruppe 5\_K-C ergeben sich für Gruppe 2\_T-C keine signifikanten Unterschiede, was wieder auf das Clothianidin zurückzuführen ist, das in beiden Gruppen appliziert wurde und auch in beiden Gruppen für erhöhte Spikeraten sorgt. Die dominante Rolle des Clothianidin könnte auch auf seine wesentlich höhere Toxizität zurückzuführen sein. Wie oben bereits erwähnt gehört Clothianidin zu den nitro-substituierten Neonikotinoiden, die für Bienen eine höhere Toxizität aufweisen. Die orale LD<sub>50</sub> für die Biene liegt für Clothianidin bei 0,00379 µg (European Commission, 2005), während sie für Thiacloprid bei 17,32 µg liegt (European Commission, 2004), wodurch sich die wesentlich höhere Toxizität von Clothianidin gegenüber Thiacloprid zeigt. In den hier beschriebenen Versuchen wurde zwar eine zehnfach größere Menge an Thiacloprid als Clothianidin verwendet, dies konnte aber nicht die Unterschiede in der Höhe der Toxizität ausgleichen, wodurch Clothianidin in der Doppelapplikation als dominant auftritt.

Vergleicht man Kontrollgruppe 3\_K-K mit den Gruppen 4\_C-K und 5\_K-C, zeigen sich in beiden Fällen signifikante Unterschiede im Zeitraum nach dem Stimulus, wobei die Gruppen, die mit Clothianidin behandelt wurden, eine erhöhte mediane Spikeanzahl aufweisen. Vergleicht man dagegen Kontrollgruppe 3\_K-K mit den Gruppen 6\_T-K und 7\_K-T, zeigen sich ebenfalls in beiden Fällen signifikante Unterschiede, allerdings im Zeitraum während des Stimulus. In diesem Fall haben die Gruppen, die mit Thiacloprid behandelt wurden, eine niedrigere Anzahl an Spikes als Gruppe 3\_K-K. Es besteht also eindeutig die Tendenz, dass Clothianidin eine erhöhte Spikerate im Zeitraum nach dem Stimulus hervorruft, während Thiacloprid eine niedrigere Spikerate im Zeitraum während des Stimulus verursacht. Für Clothianidin kann diese Tendenz dadurch erklärt werden, dass es eindeutig die Spikeanzahl erhöht, während des Stimulus die Spikeanzahl aber

bereits maximal ist, sodass der Super-Agonist Clothianidin die Spikeanzahl nicht mehr weiter erhöhen kann. Die Erhöhung zeigt sich infolgedessen erst nach dem Stimulus, wo in der Kontrollgruppe die Spikeanzahl wieder zurückgeht, sie aber durch das Clothianidin in der Versuchsgruppe erhöht bleibt. Thiacloprid dagegen senkt die Spikeanzahl ab, was sich am meisten während des Stimulus bemerkbar macht, weil in diesem Zeitraum normalerweise die höchste Anzahl an Spikes auftritt. Das Thiacloprid scheint aber diese hohe Spikeanzahl während des Stimulus abzusenken, indem es die Rezeptoren besetzt, dort aber als partieller Agonist nur eine niedrigere Aktivität auslöst.

Im Vergleich von Gruppe 8\_K(A)-K(A) mit Gruppe 9\_K-K zeigt sich, dass Gruppe 8\_K(A)-K(A) eine tendenziell erhöhte mediane Anzahl an Spikes im Zeitraum während des Stimulus aufweist. Aceton, das in diesen Versuchen lediglich als Lösungsmittel für die Neonikotinoide dient, könnte damit Auswirkungen, wenn auch geringfügige, auf die Spikeanzahl haben. Posokhov und Kyrychenko (2013) gehen davon aus, dass Aceton an einer Membran eine ähnliche Wirkungsweise wie DMSO (Dimethylsulfoxid) und Chloroform, welches auch beide Lösungsmittel sind, aufweist. Durch Aceton wird die Doppellipidschicht durchgängiger, da das Aceton die Lipidköpfe auseinanderschiebt, was die Membran weniger starr werden lässt. Möglich ist nun, dass in der Folge einer höheren Durchlässigkeit das Membranpotenzial steigt, was wiederum die Wahrscheinlichkeit für das Auslösen eines Aktionspotenzials erhöht. Durch diesen Effekt könnten die leicht erhöhten Spikeanzahlen in der Aceton-Gruppe erklärt werden. Gerade bei den Versuchen mit Thiacloprid könnte dies eine Auswirkung zeigen. Thiacloprid senkt die Spikeanzahl tendenziell ab, und zwar hauptsächlich im Zeitraum während des Stimulus. Da das Aceton die Spikerate leicht erhöht, ebenfalls im Zeitraum während des Stimulus, könnte es sein, dass sich die mediane Spikeanzahl leicht nach oben verschiebt. Da die PBS+PBS-Kontrolle kein Aceton enthielt, fällt der Spikeanzahl-absenkende Effekt des Thiacloprids nicht mehr so deutlich ins Gewicht, wie er es eventuell ansonsten machen könnte.

Insgesamt zeigen sich unterschiedliche Effekte der Substanzen auf die Anzahl der Aktionspotenziale des Muskels M17, die bisher nicht bekannt waren und die eine entscheidende Auswirkung auf die gesamte Motorik der Biene haben könnten.

### **3 Akute Fütterung mit Clothianidin bzw. Thiacloprid**

#### **3.1 Einleitung**

In diesem Kapitel geht es um die akute Fütterung von Bienen mit einem Neonikotinoid, entweder Clothianidin oder Thiacloprid. Nach den Versuchen aus Kapitel 2 stellte sich die Frage, ob sich die Substanzen ebenfalls auf die Spikeaktivität des Muskels M17 auswirken, wenn sie nicht direkt in die Kopfkapsel appliziert, sondern über den Rüssel und somit über das Verdauungssystem aufgenommen werden. Dieser Versuchsaufbau liegt näher an der Realität, da die Bienen in der Natur den Substanzen meist über die Nahrung ausgesetzt sind und so in ihren Körper aufnehmen. Da Clothianidin und Thiacloprid systemisch in der Pflanze wirken, sind auch im Nektar und im Pollen Spuren der Substanzen vorhanden, sodass die Bienen diese beim Sammeln aufnehmen und dadurch auch im Volk zur Fütterung oder zur Einlagerung weitergeben. Des Weiteren soll untersucht werden, welche Menge der verfütterten Substanz nach den Versuchen noch in den Bienen vorzufinden ist, sprich wie viel sie tatsächlich aufgenommen haben und ob ein Anteil der Neonikotinoide bereits nach kurzer Zeit metabolisiert wurde.

#### **3.2 Material und Methoden**

Für diese Versuche standen Bienenvölker aus institutseigener Zucht (*Apis mellifera carnica*) im Wissenschaftsgarten am Campus Riedberg in Frankfurt am Main zur Verfügung, welche mit dem Stockausgang Richtung Süden aufgestellt waren. Insgesamt befinden sich dort vier Vollvölker, für diese Versuche wurden ausschließlich Bienen aus einem dieser Völker verwendet (siehe Abbildung 3, links). Das Abfangen und die Vorbereitung der Bienen erfolgte wie in Kapitel 2.2.1 und 2.2.2 beschrieben mit dem Unterschied, dass in dem hier beschriebenen Versuch keine Öffnung in die Cuticula der Kopfkapsel geschnitten wurde.

Nach der Vorbereitung wurde jede Biene in einem Vortest getestet. Anschließend wurde die jeweilige Substanz (Clothianidin bzw. Thiacloprid; beide Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze) akut gefüttert. Dies geschieht mithilfe einer Pipettenspitze, deren vorderes Ende abgeschnitten wird. Die 10 µl Flüssigkeit werden mit der Pipette aufgenommen, und die Biene kann ihren Rüssel zum Trinken in die abgeschnittene Spitze stecken (siehe Abbildung 26).





**Abbildung 26:** Biene, die akut gefüttert wird.

Die Bienen werden nacheinander einzeln mit 10  $\mu$ l Flüssigkeit gefüttert. Dies geschieht mithilfe einer vorne abgeschnittenen Pipettenspitze, woraus die Biene die Flüssigkeit mit ihrem Rüssel aufnehmen kann.

Danach wurde jede Biene 15 Minuten, 30 Minuten, 45 Minuten, 60 Minuten, 75 Minuten, 90 Minuten und 120 Minuten nach der Fütterung getestet. Der Ablauf erfolgte wie in Abbildung 6 dargestellt.

In diesen Versuchen wurde für Clothianidin eine Konzentration von 1 ng in 10  $\mu$ l Zuckerwasser verwendet. Für Thiacloprid wurde eine Konzentration von 250 ng in 10  $\mu$ l Zuckerwasser verwendet. Das entspricht für Clothianidin ca. 26 % der  $LD_{50}$ , für Thiacloprid ca. 1,44 % der  $LD_{50}$ . Die Substanzen werden in Aceton (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) vorgelöst und dann mit 30 %iger Zuckerlösung (handelsüblicher Zucker gelöst in Wasser) auf die entsprechende Konzentration verdünnt. Als Kontrolllösung wurde Zuckerwasser (30 %) mit einer entsprechenden Menge Aceton vermischt, damit Aceton als Grund für Veränderungen an den Muskelspikes ausgeschlossen werden kann.

Um zu überprüfen, wie hoch die Konzentration nach der Fütterung in den Bienen ist, wurden Bienenproben auf Substanzrückstände analysiert (Bayer CropScience, Monheim). Die Bienen wurden nach Beendigung des Versuchs, das heißt ca. 120 Minuten nach der Fütterung, bei -20 °C eingefroren und in Trockeneis verschickt.

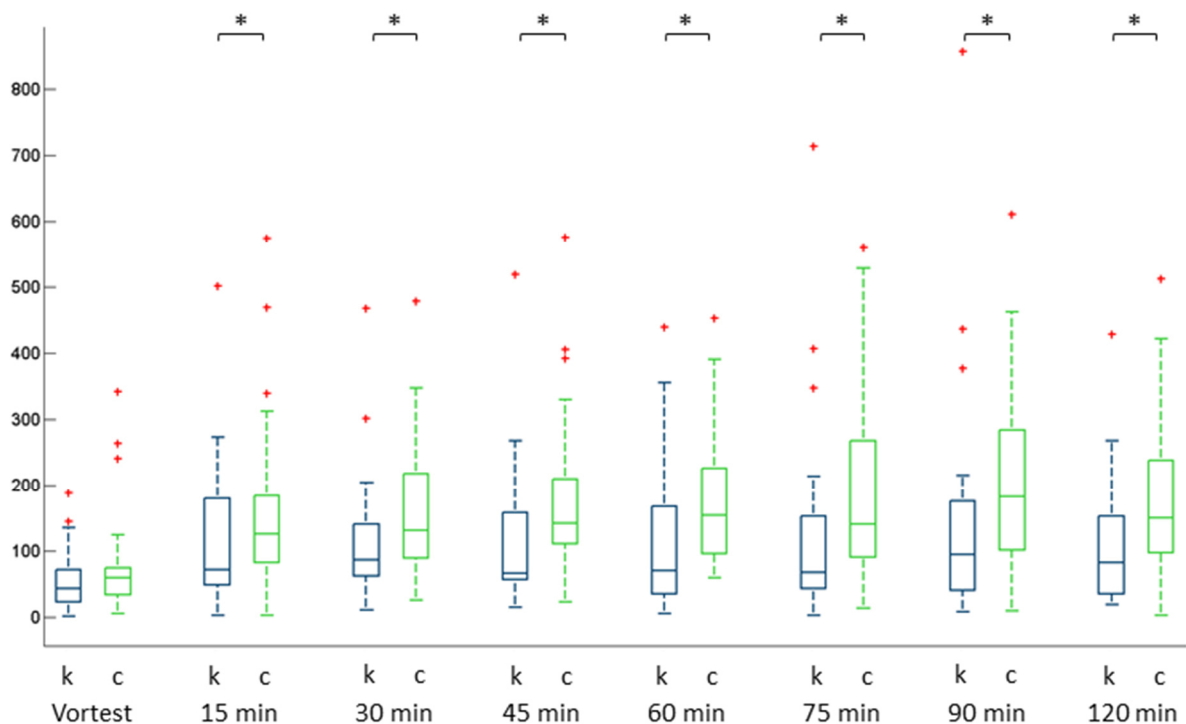
In den Versuchen werden die Spikeanzahlen der beiden Versuchsgruppen (Bienen, die mit Clothianidin bzw. mit Thiacloprid gefüttert wurden) mit denen der Kontrollgruppe verglichen.

Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben.

### 3.3 Ergebnisse

#### 3.3.1 Akute Fütterung mit 1 ng Clothianidin

Es wurden die Effekte von 1 ng Clothianidin in 10 µl Zuckerwasser akut gefüttert auf die Muskelspikerate des Muskels M17 zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Fütterung untersucht. Im Vortest ergaben sich erwartungsgemäß keine Unterschiede zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe, da dieser vor der akuten Fütterung stattfand. Im Gegensatz dazu ergaben sich in den 5 Sekunden vor Stimulusbeginn zu allen Messzeitpunkten nach der Fütterung signifikante Unterschiede, in dem Sinne, dass die Bienen, die mit Clothianidin gefüttert wurden, eine erhöhte Spikerate aufwiesen, im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abbildung 27).

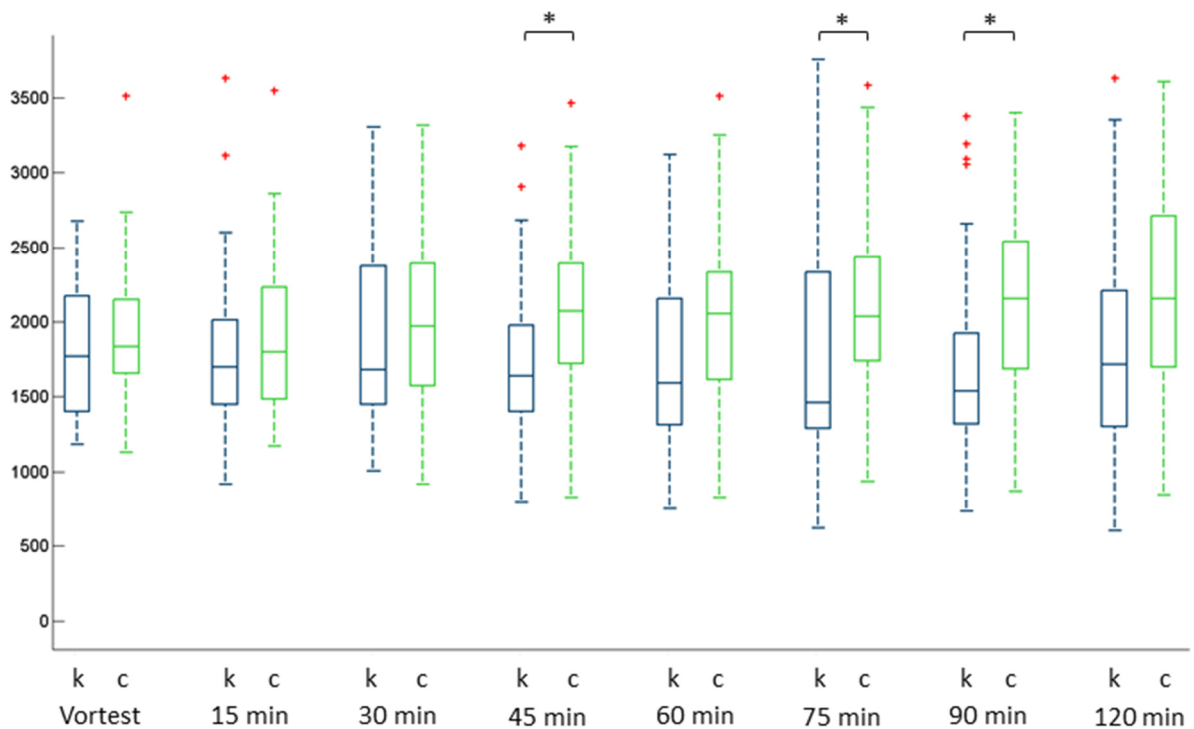


**Abbildung 27:** Verteilung der Anzahl an Spikes 5 Sekunden vor dem Zuckerstimulus zu den verschiedenen Messzeitpunkten.

k = Kontrolle (n = 30), c = Clothianidin (n = 30); signifikante Unterschiede ergeben sich zu allen Zeitpunkten nach der Fütterung (15 min:  $p = 0,0339$ , 30 min:  $p = 0,0125$ , 45 min:  $p = 0,0153$ , 60 min:  $p = 0,0036$ , 75 min:  $p = 0,0105$ , 90 min:  $p = 0,0133$ , 120 min:  $p = 0,0105$ ); \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

Die Bienen, die mit Clothianidin gefüttert wurden, zeigen also bereits vor der Stimulation mit Zuckerwasser eine erhöhte Spikerate, unabhängig von der Stimulation mit Zuckerwasser.

Über die 20 Sekunden Messzeitraum, beginnend mit Stimulusbeginn, ergaben sich zu den Messzeitpunkten 45, 75, und 90 Minuten nach der Fütterung signifikant erhöhte Spikeraten in der Versuchsgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 28).

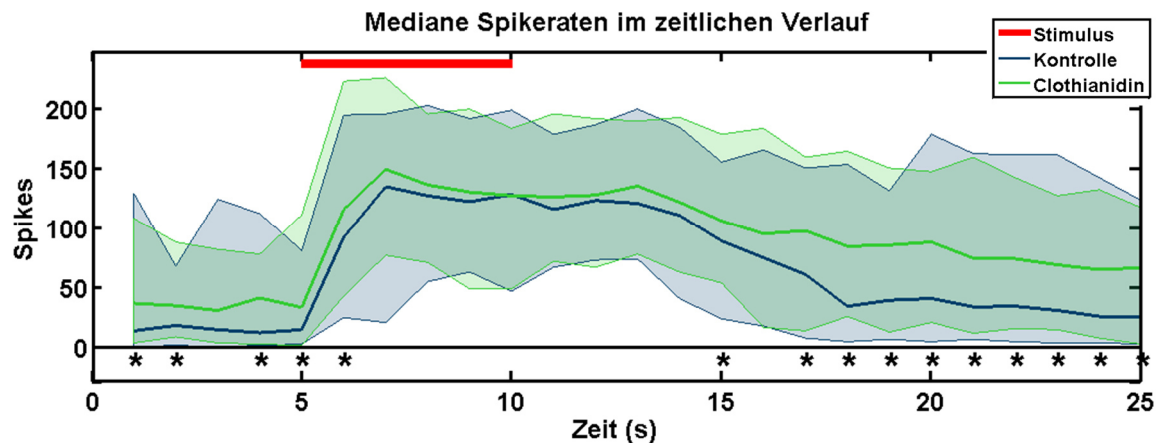


**Abbildung 28:** Verteilung der Anzahl an Spikes für 20 Sekunden ab Stimulusbeginn zu den verschiedenen Messzeitpunkten.

k = Kontrolle (n = 30), c = Clothianidin (n = 30); signifikante Unterschiede ergeben sich zu den Zeitpunkten 45 ( $p = 0,0180$ ), 75 ( $p = 0,0345$ ), und 90 Minuten ( $p = 0,0133$ ) nach der Fütterung; \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

Es gibt also drei Zeitpunkte nach der Fütterung, die signifikante Unterschiede zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe aufweisen, wobei die Tendenz zu einer erhöhten medianen Spikerate der Versuchsgruppe bereits ab 15 Minuten nach der Fütterung bis zum Ende der Tests besteht.

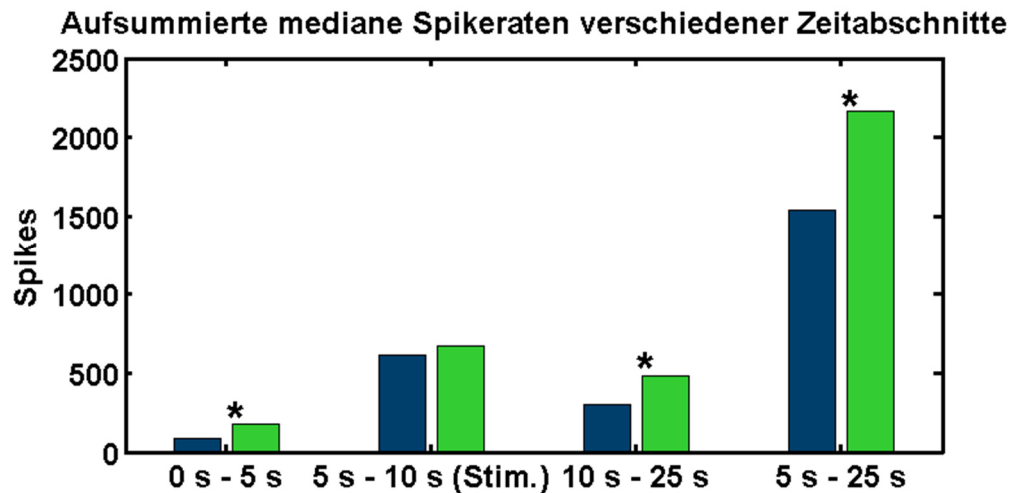
Betrachtet man die mediane Anzahl an Spikes im Verlauf der gesamten ausgewerteten 25 Sekunden, zeigt sich beispielsweise folgendes Bild:



**Abbildung 29:** Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Clothianidin (1 ng), n = 30) und der Kontrollgruppe (Zuckerwasser, n = 30).

90 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es ergaben sich signifikante Unterschiede im Zeitraum vor Stimulusbeginn (0 s – 5 s:  $p = 0,0133$ ), nach dem Stimulus (10 s – 25 s:  $p = 0,0085$ ) und im gesamten Messzeitraum ab Stimulusbeginn (5 s – 25 s:  $p = 0,0133$ ); \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

Die Spikerate steigt direkt nach Stimulusbeginn deutlich an, bleibt erhöht und sinkt langsam wieder ab (siehe Abbildung 29). Das spiegelt den bereits beschriebenen Verlauf des PER wider mit den drei Phasen der Streckung, des Leckens und der Retraktion, wobei hier die letzte Phase nicht zu sehen ist, da sie zu einem späteren Zeitpunkt stattfindet. Deutlich zu erkennen ist, dass die Spikerate der Versuchsgruppe zu fast jedem Zeitpunkt oberhalb der Spikerate der Kontrollgruppe liegt. Die Gruppe der Bienen, die Clothianidin zu sich genommen hat, zeigt also erhöhte Spikeraten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Um dies nochmals zu veranschaulichen, dient folgende Abbildung:



**Abbildung 30:** Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Clothianidin (1 ng), n = 30, grün) und der Kontrollgruppe (Zuckerwasser, n = 30, blau) in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

90 Minuten nach der Fütterung; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0133$ ), direkt nach dem Stimulus ( $p = 0,0085$ ), und über 20 Sekunden ab Stimulusbeginn gemessen ( $p = 0,0133$ ). Im Abschnitt „10s-25s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

Sowohl in der Zeit vor Stimulusbeginn (0 s – 5 s), nach dem Stimulus (10 s – 25 s) als auch in der gesamten ausgewerteten Zeit ab Stimulusbeginn (5 s – 25 s) ist die mediane Anzahl an Muskelaktionspotenzialen der Versuchsgruppe signifikant höher als bei der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 30). Clothianidin führt hier (90 Minuten nach der Fütterung) zu einer deutlichen Erhöhung der M17-Spikerate. Bei den Zeitpunkten 45 Minuten und 75 Minuten nach der Fütterung verhält sich die mediane Spikerate genauso: Auch hier zeigt die Versuchsgruppe eine signifikant erhöhte Spikerate verglichen mit der Kontrollgruppe. Auch zu den restlichen Messzeitpunkten nach der Fütterung (15, 30, 60 und 120 Minuten) zeigte sich diese Tendenz der erhöhten Spikerate nach Clothianidin-Gabe (siehe Anhang, Abbildungen 123, 124, 126 und 128).

**Tabelle 3:** Probenanalyse von Bienen der Kontroll- und der Versuchsgruppe.

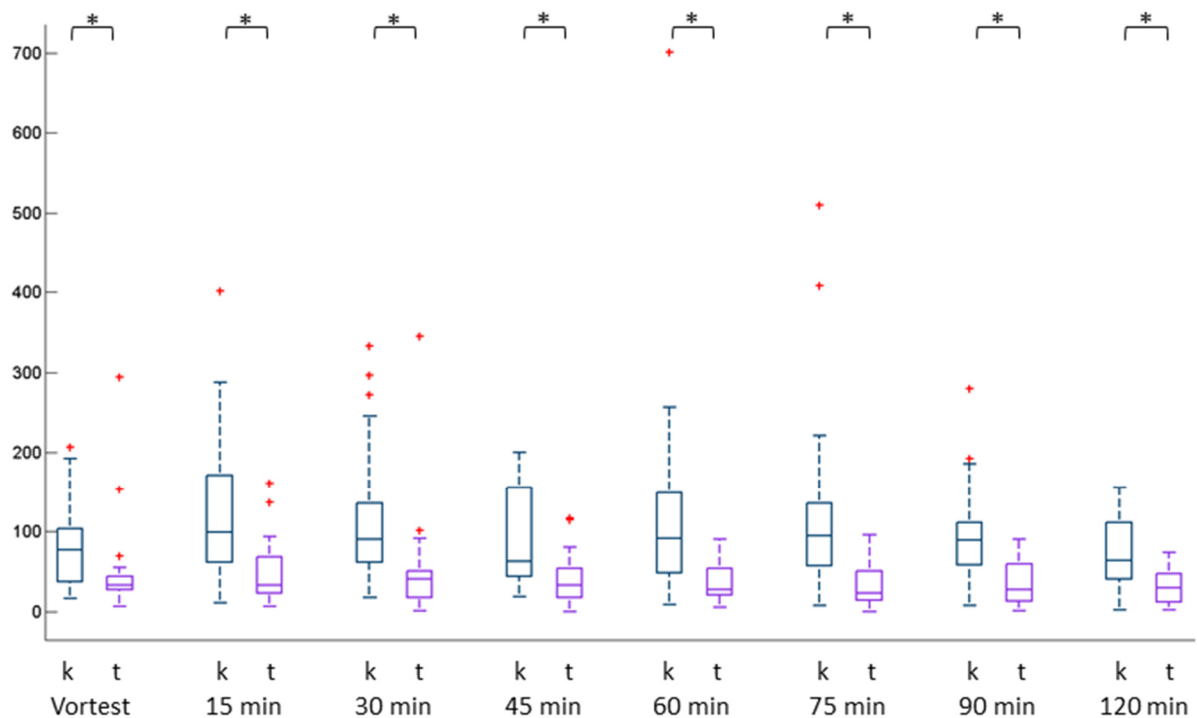
Eine Probe besteht aus fünf Bienen. Die Angabe „< LOD“ bedeutet „< Limit of Detection“ und damit, dass keine der untersuchten Substanzen in der Probe nachgewiesen werden kann ( $< 0,0003$  mg/kg). Metabolite: TZNG = N-(2-chlorothiazol-5-ylmethyl)-N-nitroguanidine, TZMU = N-(2-chlorothiazol-5-ylmethyl)-N-methylurea, beides Metabolite von Clothianidin.

Probe	Clothianidin [ng/Biene]	TZNG [ng/Biene]	TZMU [ng/Biene]
Kontrollgruppe	< LOD	< LOD	< LOD
Versuchsgruppe	0,3	< LOD	< LOD

Tabelle 3 kann entnommen werden, dass in den Bienenproben der Kontrollgruppe kein Clothianidin oder dessen Metabolite nachgewiesen werden können. In den Bienenproben der Versuchsgruppe, die mit 1 ng Clothianidin gefüttert wurden, sind zwei Stunden nach der Fütterung immer noch 0,3 ng Clothianidin pro Biene vorzufinden, also ca. ein Drittel der gefütterten Menge.

### 3.3.2 Akute Fütterung mit 250 ng Thiacloprid

Es wurden die Effekte von 250 ng Thiacloprid in 10 µl Zuckerwasser akut gefüttert auf die Muskelspikerate des Muskels M17 zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Fütterung untersucht. In diesem Versuch ergaben sich in dem Messbereich 5 Sekunden vor Stimulusbeginn zu allen Messzeitpunkten signifikante Unterschiede. In diesem Fall zeigt die Versuchsgruppe eine niedrigere mediane Spikerate im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abbildung 31).

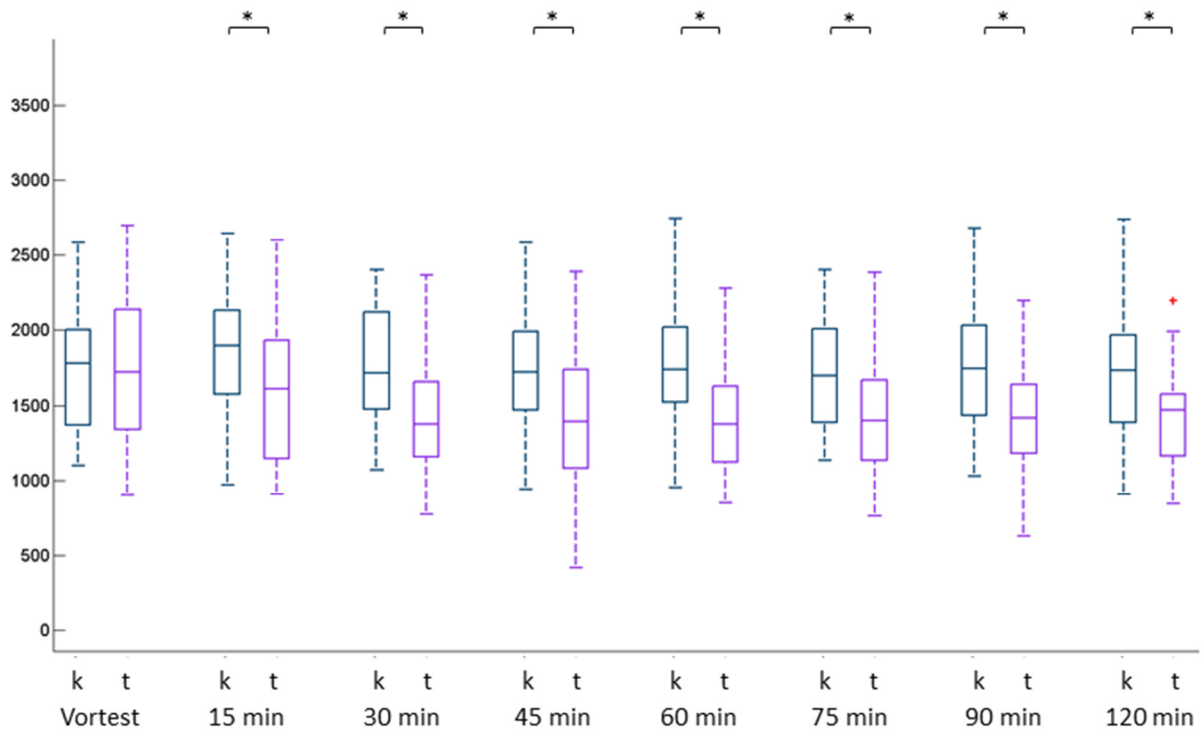


**Abbildung 31:** Verteilung der Anzahl an Spikes 5 Sekunden vor dem Zuckerstimulus zu den verschiedenen Messzeitpunkten.

k = Kontrolle (n = 29), t = Thiacloprid (n = 28); signifikante Unterschiede ergeben sich zu allen Zeitpunkten (Vortest:  $p = 0,0018$ , 15 min:  $p = 0,0000367$ , 30 min:  $p = 0,0000485$ , 45 min:  $p = 0,000471$ , 60 min:  $p = 0,0000094$ , 75 min:  $p = 0,00000037$ , 90 min:  $p = 0,0000097$ , 120 min:  $p = 0,0000752$ ); \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

Die Bienen, die mit Thiacloprid gefüttert wurden, zeigen also bereits vor dem eigentlichen Stimulus weniger Spikes als die Kontrollgruppe.

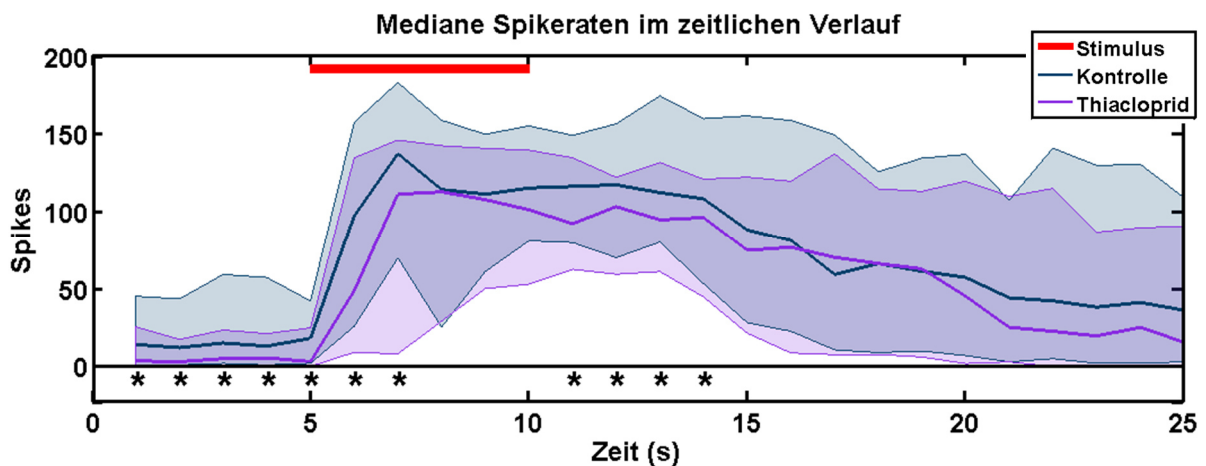
Betrachtet man den Messzeitraum ab Stimulusbeginn für die folgenden 20 Sekunden, ergeben sich auch hier zu allen Messzeitpunkten nach der Fütterung signifikante Unterschiede zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe: Die Versuchsgruppe, die mit Thiacloprid gefüttert wurde, zeigt eine deutlich niedrigere mediane Spikerate als die Kontrollgruppe (siehe Abbildung 32).



**Abbildung 32:** Verteilung der Anzahl an Spikes für 20 Sekunden ab Stimulusbeginn zu den verschiedenen Messzeitpunkten.

k = Kontrolle (n = 29), t = Thiacloprid (n = 28); signifikante Unterschiede ergeben sich zu allen Zeitpunkten nach der Fütterung (15 min:  $p = 0,0178$ , 30 min:  $p = 0,0028$ , 45 min:  $p = 0,0140$ , 60 min:  $p = 0,000952$ , 75 min:  $p = 0,0059$ , 90 min:  $p = 0,0111$ , 120 min:  $p = 0,0062$ ); \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

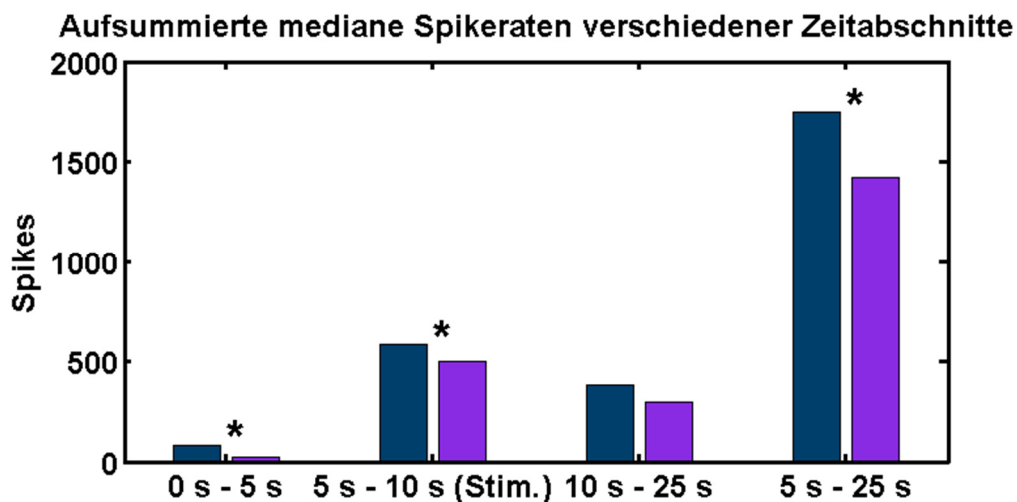
Zu allen Messzeitpunkten, die nach der Fütterung stattgefunden haben, unterscheiden sich die Spikeraten der beiden Gruppen signifikant. Auch im Verlauf der ausgewerteten 25 Sekunden ist dies gut zu erkennen.



**Abbildung 33:** Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Thiacloprid (250 ng),  $n = 28$ ) und der Kontrollgruppe (Zuckerwasser,  $n = 29$ ).

90 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es ergaben sich signifikante Unterschiede im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0000097394$ ), während des Stimulus ( $p = 0,00067279$ ), und über 20 Sekunden ab Stimulusbeginn gemessen ( $p = 0,0111$ );  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

Die Spikerate der Versuchsgruppe liegt fast durchgehend niedriger als die der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 33). Die Bienen, die mit Thiacloprid gefüttert wurden, zeigen also eine niedrigere mediane Spikerate als die Bienen, die lediglich mit Zuckerwasser gefüttert wurden. Dieser Verlauf lässt sich in verschiedenen Zeitabschnitten zusammenfassen.



**Abbildung 34:** Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Thiacloprid (250 ng),  $n = 28$ , lila) und der Kontrollgruppe (Zuckerwasser,  $n = 29$ , blau) in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

90 Minuten nach der Fütterung; Signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0000097394$ ), während des Stimulus ( $p = 0,00067279$ ), und über 20 Sekunden ab Stimulusbeginn gemessen ( $p = 0,0111$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.



In Abbildung 34 sind die signifikanten Unterschiede zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe in den verschiedenen Zeitabschnitten deutlich zu sehen. In den 5 Sekunden vor Stimulusbeginn (0 s – 5 s) ist die mediane Spikerate der Versuchsgruppe signifikant niedriger als die der Kontrollgruppe, was ebenso während des Stimulus (5 s – 10 s) und auch in den 20 Sekunden ab Stimulusbeginn (5 s – 25 s) der Fall ist. Thiacloprid führt in diesem Versuch zu einer deutlich niedrigeren M17-Spikerate. Dieser Effekt zeigt sich zu allen gemessenen Zeitpunkten nach der akuten Fütterung mit Thiacloprid (siehe Anhang, Abbildungen 130 bis 135).

**Tabelle 4:** Probenanalyse von Bienen der Kontroll- und der Versuchsgruppe.

Eine Probe besteht aus fünf Bienen. Die Angabe „< LOD“ bedeutet „< Limit of Detection“ und damit, dass keine der untersuchten Substanzen in der Probe nachgewiesen werden kann (< 0,0003 mg/kg). Die Angabe „< LOQ“ bedeutet „< Limit of Quantification“ und damit, dass die Konzentration der Substanzen in der Probe so gering ist, dass sie nicht mehr quantifiziert werden kann (< 0,001 mg/kg). Thiacloprid-Amid: Metabolit von Thiacloprid.

Probe	Thiacloprid [ng/Biene]	Thiacloprid-Amid [ng/Biene]
Kontrollgruppe	< LOD	< LOD
Versuchsgruppe	26	< LOQ

Tabelle 4 kann entnommen werden, dass in den Bienenproben der Kontrollgruppe kein Thiacloprid oder dessen Metabolit nachgewiesen werden kann. In den Bienenproben der Versuchsgruppe, die mit 250 ng Thiacloprid gefüttert wurden, sind zwei Stunden nach der Fütterung immer noch 26 ng Thiacloprid pro Biene vorzufinden, was ca. einem Zehntel der verfütterten Menge entspricht. Auch Thiacloprid-Amid, ein Metabolit von Thiacloprid, ist in den Bienen der Versuchsgruppe nachweisbar, wenn auch in einer nicht quantifizierbaren Menge.

### 3.4 Diskussion

#### 3.4.1 Clothianidin

In diesen Versuchen zeigt sich deutlich, dass Clothianidin die mediane Spikeanzahl erhöht, sowohl in den Sekunden vor Stimulusbeginn als auch über den restlichen Messzeitraum nach Stimulusbeginn. Beispielsweise liegt die mediane Spikeanzahl 90 Minuten nach der Fütterung mit Clothianidin bei 2156, während die der Kontrollgruppe bei 1540 liegt, gemessen über 20 Sekunden ab Stimulusbeginn. In den 5 Sekunden vor Stimulusbeginn

liegt die mediane Spikeanzahl 90 Minuten nach der Fütterung in der Versuchsgruppe bei 183, bei der Kontrollgruppe bei 95. Ähnlich große Unterschiede zeigen sich über den gesamten Messzeitraum. Somit lassen sich die Ergebnisse aus Kapitel 2 bestätigen. Auch nach einer Fütterung wird die Spikeanzahl durch Clothianidin erhöht. Da dieses als Super-Agonist für den nAChR der Biene gilt, entsprechen die Ergebnisse den Erwartungen.

Diese Ergebnisse stimmen dadurch mit bereits früher erhobenen Ergebnissen (Kabat vel Job, Bachelorarbeit, 2012) mit Clothianidin überein. Bienen wurden mit 1 ng Clothianidin in Zuckerwasser bzw. nur Zuckerwasser gefüttert und vor der Fütterung sowie nach der Fütterung in eine kleine Arena gesetzt, wo ihre Laufaktivität aufgenommen und ausgewertet wurde. Dabei zeigte sich für die Bienen, die mit Clothianidin gefüttert wurden, eine deutlich bis signifikant erhöhte Laufaktivität im Vergleich zu den Kontrollbienen. Williamson et al. (2014) stellten fest, dass die Motorik und Bewegungsfähigkeit der Bienen nach Fütterung mit Clothianidin nicht beeinträchtigt ist, was sich in den hier beschriebenen Versuchen widerspiegelt. Die Bienen wurden zwar nicht in ihrer Laufaktivität beobachtet, da sie in Röhrchen eingespannt waren, aber sowohl am Rüssel als auch an den Antennen konnte eine normale oder zeitweise auch erhöhte Bewegungsaktivität beobachtet werden. Da hier in allen Fällen das Clothianidin verfüttert wurde, können die Ergebnisse auch direkt verglichen werden.

An den Analyseergebnissen ist zu erkennen, dass erwartungsgemäß kein Clothianidin oder dessen Metabolite in den Bienen der Kontrollgruppe nachzuweisen waren. Im Gegensatz dazu wurde in den mit Clothianidin gefütterten Bienen 0,3 ng Clothianidin pro Biene nachgewiesen, was etwa ein Drittel der verfütterten Menge (1 ng) ist. Die Bienen wurden 120 Minuten nach der Fütterung eingefroren, das heißt, dass die Substanz in dieser Zeit metabolisiert werden konnte. Über die genaue Metabolisierung von Clothianidin in der Biene ist wenig bekannt. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass es durch die Metabolisierung von Clothianidin durchaus möglich sein könnte, dass dadurch nur noch 0,3 ng der Substanz pro Biene vorzufinden war. Allerdings konnten keine der Metabolite von Clothianidin (TZNG, TZMU) nachgewiesen werden.

### 3.4.2 Thiacloprid

Für die akute Fütterung mit Thiacloprid ergab sich ebenfalls eine eindeutige Tendenz. In diesem Fall aber genau umgekehrt, sodass Thiacloprid eindeutig die mediane Spikeanzahl

absenkt im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die mediane Spikeanzahl 90 Minuten nach der Fütterung liegt für die Versuchsgruppe bei 1417, während sie bei der Kontrollgruppe bei 1745 liegt, gemessen über 20 Sekunden nach Stimulusbeginn. Auch in den 5 Sekunden vor Stimulusbeginn liegt die Spikeanzahl 90 Minuten nach der Fütterung mit Thiacloprid lediglich bei 27, nach der Fütterung mit Kontrolllösung liegt sie bei 89. Allerdings ist in den 5 Sekunden vor Stimulusbeginn bereits beim Vortest ein signifikanter Unterschied zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe zu sehen. Dieser wurde nicht erwartet und ist auch nicht erklärbar, da die Bienen zu diesem Zeitpunkt noch keine unterschiedliche Behandlung erfahren haben und sich somit die Anzahl der Muskelaktionspotenziale nicht unterscheiden sollte. Auch hier lassen sich die Ergebnisse aus Kapitel 2 bestätigen, da sich auch dort durch die Applikation von Thiacloprid die mediane Spikeanzahl abgesenkt hat, wenn auch nur in der Tendenz. Dass sich hier nicht nur Tendenzen, sondern signifikante Unterschiede ergaben, kann an der wesentlich höheren Konzentration liegen, da in den Versuchen dieses Kapitels 250 ng Thiacloprid verfüttert wurden, während es in Kapitel 2 lediglich 0,25 ng waren, die in die Kopfkapsel appliziert wurden. Wie auch schon in Kapitel 2.4.1 beschrieben stimmen die Ergebnisse mit Kabat vel Job (Bachelorarbeit, 2012) überein, der herausfand, dass Bienen nach einer Fütterung mit Thiacloprid eine verringerte Laufaktivität aufweisen, was der geringeren Spikeaktivität des Muskels M17 entsprechen könnte.

Auch im Versuch zur akuten Fütterung mit Thiacloprid lässt sich anhand der Analyseergebnisse kein Thiacloprid oder dessen Metabolit in der Kontrollgruppe feststellen. In den mit Thiacloprid gefütterten Bienen wurden dagegen 26 ng pro Biene nachgewiesen, was ca. ein Zehntel der verfütterten Menge (250 ng) darstellt. Auch über die Metabolisierung von Thiacloprid in der Honigbiene ist bisher wenig bekannt. Zieht man allerdings Imidacloprid zum Vergleich heran, bei dem bereits nach 20 Minuten ca. 30 % der Substanz abgebaut waren (Suchail et al., 2003), wäre es durchaus möglich, dass 120 Minuten nach der Fütterung mit Thiacloprid lediglich noch ein Zehntel der Substanz in der Biene vorzufinden sind. Der Metabolit von Thiacloprid (Thiacloprid-Amid) konnte in der Analyse der Bienen der Versuchsgruppe nicht quantifiziert werden.

### 3.4.3 Allgemeine Aspekte

Insgesamt lässt sich auch bei diesen Versuchen mit akuter Fütterung feststellen, dass Clothianidin die medianen Spikeanzahlen erhöht, während Thiacloprid diese absenkt, und auch hier (wie in Kapitel 2) zeigt sich ein gewisses Muster. Clothianidin erhöht die Spikeanzahl vorwiegend im Zeitraum nach dem Stimulus (10 s - 25 s), Thiacloprid senkt die Spikeanzahl vorwiegend im Zeitraum während des Stimulus (5 s – 10 s) ab. Clothianidin, das als Super-Agonist des nAChRs der Honigbiene gilt, erhöht die mediane Spikeanzahl, was vor allem im Zeitraum nach dem Stimulus zum Tragen kommt, da die Kontrollgruppe hier eine normale Anzahl an Spikes aufweist, diese in der Versuchsgruppe aber durch das Clothianidin erhöht wird. Während des Stimulus fällt dies nicht auf, da in diesem Zeitraum die Spikeanzahl bereits maximal ist und nicht mehr erhöht werden kann. Bei Thiacloprid, das die mediane Spikeanzahl absenkt, verhält es sich anders. Während des Stimulus ist die Spikeanzahl in der Kontrollgruppe maximal, während sie in der Versuchsgruppe durch das Thiacloprid abgesenkt wird. Nach dem Stimulus sinkt auch in der Kontrollgruppe die Spikeanzahl kontinuierlich ab, wodurch hier die Absenkung des Thiacloprids nicht mehr so deutlich zu erkennen ist. Dennoch zeigen sich auch hier hin und wieder signifikante Unterschiede, im Gegensatz zu Clothianidin, das im Zeitraum während des Stimulus zu keinem der gemessenen Zeitpunkte eine Signifikanz aufweist.

## **4 Chronische und zusätzliche akute Fütterung mit Clothianidin bzw. Thiacloprid**

### **4.1 Einleitung**

In den Versuchen dieses Kapitels geht es um die chronische Fütterung von Bienen mit einem Neonikotinoid. Bienen sind in der Natur verschiedenen Insektiziden ausgesetzt und das nicht nur einmalig, sondern sehr häufig. Sie nehmen bei ihren Sammelflügen also immer wieder verschiedene Insektizide auf. Aufgrund dieser Tatsache werden die Bienen in diesem Versuch chronisch mit einem Neonikotinoid eingefüttert und teilweise mit einem anderen Neonikotinoid zusätzlich einmalig akut gefüttert. Es soll herausgefunden werden, ob die parallele Gabe zweier Neonikotinoide (chronisch und akut) zu Interaktionen zwischen den Substanzen führt. Möglicherweise könnte dies auch die Eigenschaften der Substanzen oder deren Effekte verändern (Belzunces et al., 2012) oder die Völker deutlich stärker beeinträchtigen als eine Substanz alleine (Gill et al., 2012). Außerdem soll der häufig gestellten Frage nachgegangen werden, ob sich eventuelle Auswirkungen der Substanzen auf die Muskelspikeaktivität der Bienen auch im ganzen Volk erkennen lassen oder ob das Volk Effekte auf einzelne Bienen auffangen kann (Köhler & Triebkorn, 2013), sodass sich das Volk trotz der chronischen Fütterung mit einem Neonikotinoid in gleicher Weise wie ein Kontrollvolk entwickeln kann.

Da die Bienen in diesem Versuch altersmarkiert werden und damit die Phasen der Entwicklung eine wichtige Rolle spielen, sollen diese hier kurz erläutert werden. Die Entwicklung einer Arbeiterin dauert genau 21 Tage lang. Zunächst wird von der Königin ein Ei in eine Zelle gelegt. Nach drei Tagen schlüpft aus dem Ei eine Larve, welche von den Ammenbienen gefüttert wird. Am neunten Tag wird die Zelle der Larve von den anderen Arbeiterinnen von außen verdeckelt und ist somit für die restliche Entwicklungsdauer verschlossen. In den zwölf Tagen der verdeckelten Phase verpuppt sich die Larve und entwickelt sich zu einer fertigen Biene, die am 21. Tag aus der Zelle schlüpft (Jay, 1963). Diesen exakten Zeitablauf kann man sich zunutze machen, um die Bienen direkt nach dem Schlupf zu markieren (siehe Kapitel 4.2.1). Nachdem die Bienen geschlüpft sind, beschäftigen sie sich mit dem Instandhalten und Säubern der Zellen. Später kümmern sie sich um die Brut, füttern diese und bereiten die Nahrung auf. Erst dann verlagern sich ihre Aufgaben nach außerhalb des Stockes: zunächst als Wächterbienen, anschließend fliegen sie aus und sind damit zu Sammlerinnen für Nektar oder Pollen geworden

(Pankiw & Page Jr, 2000; Page Jr & Peng, 2001). Diese Sammlerinnen werden in den folgenden Versuchen zur Spikeaktivität des Muskels M17 verwendet.

## 4.2 Material und Methoden

### 4.2.1 Clothianidin

Vier Minivölker (Mini Plus Styropor Beuten; 30 x 30 cm; bestehend aus einer Zarge, Boden, Deckel; umfasst sechs Rähmchen, jeweils mit den Maßen 251 x 159 mm; für insgesamt ca. 4.500 Bienen (<http://www.holtermann-shop.de/>)), von der Imkerei Ullmann (Erlensee) zur Verfügung gestellt, wurden unter Flugzelten (ca. 6 m x 5,60 m x 2,50 m, Autosattlerei Helmut Schumacher, Euskirchen) am Institut für Bienenkunde in Oberursel (Taunus) mit dem Stockausgang in Richtung Süd-Osten aufgestellt. Diese vier Völker beinhalten zunächst gesammelten Nektar, Pollen und Brut in den Waben und sind mit Geschwisterköniginnen ausgestattet. Unter dem Flugzelt wurden ihnen Pollen, in einem vor Regen geschützten Schälchen, und Wasser zur Verfügung gestellt. Nach ein paar Tagen der Orientierungsphase wurden die Bienen auf leere Mittelwände bzw. ausgebaute leere Waben umgesetzt. Auf bereits ausgebauten leeren Waben kann die Königin direkt mit dem Eierlegen beginnen bzw. kann direkt Futter eingelagert werden. Zeitgleich zum Umsetzen wurde den Bienen flüssiges Futter in Fütterern, die auf das Volk aufgesetzt werden, zur Verfügung gestellt. Das Futter besteht für die zwei Versuchsvölker aus Apiinvert<sup>®</sup> (Südzucker AG, Mannheim/Ochsenfurt), einem Zuckersirup, der mit Clothianidin (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze; 50 ppb = 0,05 mg/kg) versetzt wurde. Für die zwei Kontrollvölker besteht das Futter aus Apiinvert<sup>®</sup>, mit einer entsprechenden Menge (500 µl in 6 l Zuckersirup) Aceton (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) vermengt, da das Clothianidin in Aceton vorgelöst wurde, und wird im Weiteren als Kontrollfutter bezeichnet. In den Flugzelten waren die Völker so aufgeteilt, dass sich die beiden Versuchsvölker und die beiden Kontrollvölker jeweils ein Kompartiment des Zelt teilen, sodass ein Futteraustausch zwischen Kontroll- und Versuchsvölkern ausgeschlossen werden konnte (siehe Abbildung 35, links). Die Völker wurden täglich mit Pollen und Wasser im Zelt versorgt und einmal wöchentlich bonitiert (Anzahl adulter Bienen, Anzahl Brutzellen). Die Bonituren erfolgten nach der Liebefelder Schätzmethode (Imdorf et al., 1987). Da in diesem Versuch Minivölker verwendet wurden, geht man bei einer vollbesetzten Wabe von einer geringeren Anzahl, nämlich ca. 430 Bienen, auf einer

Seite aus. Von dieser Zahl ausgehend wurden die Bienen- und Brutzellenanzahlen geschätzt. Je nach Futtermittelverbrauch wurden die Völker mit neuem Futter in den Fütterern versorgt. Einmal pro Woche wurde den Völkern, zusätzlich zum täglichen Pollen, in eine Wabe, die weder mit Futter noch mit Brut besetzt ist, Pollen hineingegeben (siehe Abbildung 35, rechts). So hatten die Völker auf jeden Fall Pollen zur Verfügung, unabhängig von Wetter oder Orientierungsleistung der Bienen.



**Abbildung 35:** Unterbringung und Versorgung der Bienen im Flugzelt.

Links: Flugzelt mit zwei Kompartimenten mit jeweils zwei Minivölkern darin. Rechts: Pollen, der in Zellen auf Waben gegeben wurde, um die Bienen mit ausreichend Pollen im Volk zu versorgen.

Nach drei Wochen, wenn die erste Brut verdeckelt ist und bald schlüpfen sollte, wurde aus jedem Volk jeweils eine Wabe mit der entsprechenden Brut aus dem Volk genommen und in einen Brutschrank verbracht. Dieser wurde auf 34 °C eingestellt und mit Wasser für höhere Luftfeuchtigkeit ausgestattet. Die neu geschlüpften Bienen wurden nun jeden Tag mit einem Punkt auf den Thorax (edding 750 CREATIVE; paint marker; 2-4 mm) markiert (siehe Abbildung 36). Dabei wurde jeden Tag eine andere Farbe verwendet, um das genaue Alter der Bienen zu wissen. Des Weiteren wurde jeden Tag in etwa zur gleichen Zeit markiert, um die Bienen einem bestimmten Schlupftag zuzuordnen. Die markierten Bienen wurden vorübergehend in einem kleinen Becherkäfig gesammelt und anschließend in ihr jeweiliges Volk zurückgebracht. Das Markieren der Bienen wurde über acht bis neun Tage durchgeführt, zu diesem Zeitpunkt waren alle Bienen aus ihren verdeckelten Zellen geschlüpft.



**Abbildung 36:** Markierung der Bienen auf dem Thorax.

Links: Markierte Bienen von einem Schlupftage in einem Becherkäfig, bevor sie zurück in ihr Volk gebracht werden. Rechts: Markierte Bienen verschiedener Schlupftage zurück in ihrem Volk, auf einer Wabe sitzend.

Die Waben wurden wieder zurück in das jeweilige Volk gehängt. Nach weiteren zehn bis 14 Tagen, die die markierten Bienen in ihren Völkern verbringen, wurden die ersten markierten Bienen direkt von der Wabe abgesammelt. In diesem Alter sind die Bienen bereits erste Male ausgeflogen und damit für die Versuche zur M17-Spikeaktivität geeignet. Die abgesammelten Bienen wurden ins Labor verbracht und für die Versuche vorbereitet. Durch die Altersmarkierung weiß man zum einen genau, wie alt die jeweiligen Bienen sind und dass man im Durchschnitt in etwa gleich alte Bienen der verschiedenen Völker in den Versuchen verwendet, zum anderen weiß man, dass diese Bienen ausschließlich mit dem ihnen gegebenen Futter (Zuckersirup mit Clothianidin bzw. Aceton) aufgewachsen sind und kein anderes Futter in ihrem Leben zu sich genommen haben.

Zusätzlich zur chronischen Fütterung mit Clothianidin bzw. Kontrolllösung wurden zwei Bienengruppen akut mit Thiacloprid (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze; 250 ng in 10 µl Zuckerwasser) im Labor gefüttert. Dies dient dazu, eventuelle Gewöhnungseffekte oder synergistische Effekte bei den Bienen festzustellen, die mit einem Neonikotinoid eingefüttert wurden. Für die Versuche ergaben sich dadurch folgende Gruppen:

- Gruppe I: chronisch mit Clothianidin (50 ppb) gefüttert, keine akute Fütterung (C/-)
- Gruppe II: chronisch mit Kontrollfutter gefüttert, keine akute Fütterung (K/-)
- Gruppe III: chronisch mit Clothianidin (50 ppb) gefüttert + akut mit Thiacloprid gefüttert (C/T)



- Gruppe IV: chronisch mit Kontrollfutter gefüttert + akut mit Thiacloprid gefüttert (K/T)

Die Vorbereitung der Bienen erfolgte wie in Kapitel 2.2.1 und 2.2.2 beschrieben mit dem Unterschied, dass in dem hier beschriebenen Versuch keine Öffnung in die Cuticula der Kopfkapsel geschnitten wurde.

Nach der Vorbereitung wurde jede Biene in einem Vortest getestet. Anschließend wurden die Bienen der Gruppen III und IV mit Thiacloprid akut gefüttert. Dies geschieht wie in Kapitel 3.2 und in Abbildung 26 dargestellt. Danach wurden die Bienen 15 Minuten, 30 Minuten, 45 Minuten, 60 Minuten, 75 Minuten, 90 Minuten, und 120 Minuten nach der Fütterung getestet. Der Ablauf erfolgte wie in Abbildung 6 dargestellt.

#### 4.2.2 Thiacloprid

Die gleichen Versuche wie in Kapitel 4.2.1 für Clothianidin beschrieben wurden auch mit Thiacloprid durchgeführt. Dabei wurde für die chronische Fütterung der Versuchsvölker eine Konzentration von 5000 ppb (= 5 mg/kg) verwendet, für die Kontrollvölker Zuckersirup mit einer entsprechenden Menge (10 ml in 5 l Zuckersirup) Aceton (Carl Roth GmbH, Karlsruhe), und für die zusätzliche akute Fütterung mit Clothianidin wurde 1 ng in 10 µl Zuckerwasser verwendet. Für die Versuche ergaben sich dadurch folgende Gruppen:

- Gruppe I: chronisch mit Thiacloprid (5000 ppb) gefüttert, keine akute Fütterung (T/-)
- Gruppe II: chronisch mit Kontrollfutter gefüttert, keine akute Fütterung (K/-)
- Gruppe III: chronisch mit Thiacloprid (5000 ppb) gefüttert + akut mit Clothianidin gefüttert (T/C)
- Gruppe IV: chronisch mit Kontrollfutter gefüttert + akut mit Clothianidin gefüttert (K/C)

Alle anderen Angaben zu Material, Methoden und Ablauf sind Kapitel 4.2.1 zu entnehmen.

Um zu überprüfen, wie hoch die Konzentration der Substanzen sowohl nach der chronischen als auch nach der akuten Fütterung in den Bienen ist, wurden Bienenproben beider Versuchsdurchläufe (Clothianidin und Thiacloprid) auf Substanzrückstände analysiert (Bayer CropScience, Monheim). Die Bienen wurden nach Beendigung des Versuchs, das heißt 120 Minuten nach der akuten Fütterung, bei -20 °C eingefroren und in

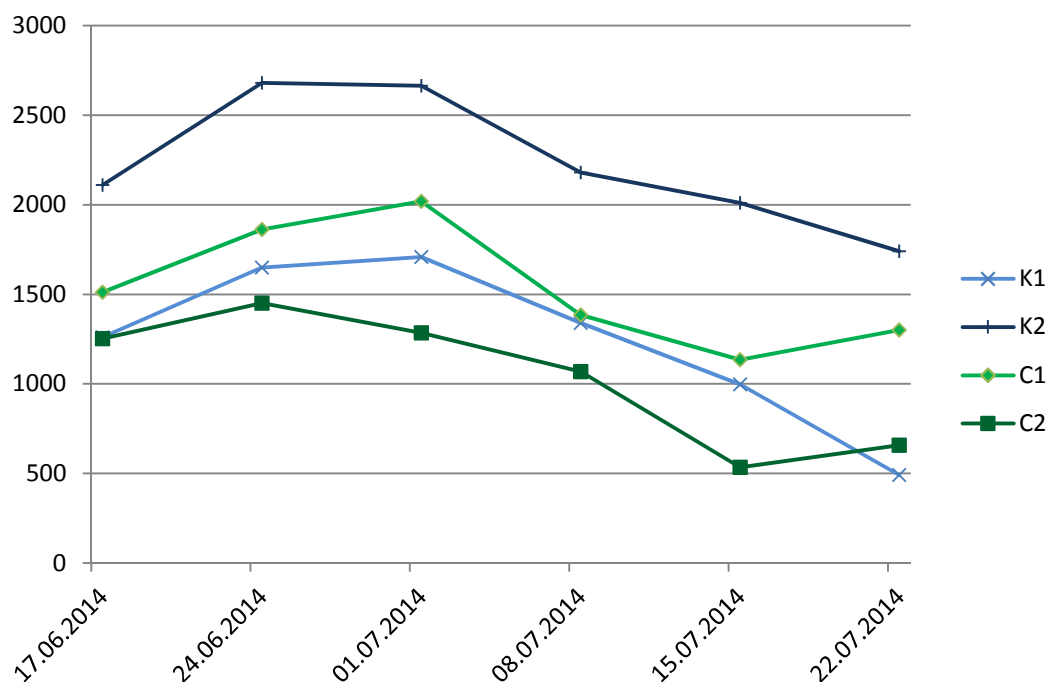
Trockeneis verschickt. Auch vom angerührten und eingelagerten Futter wurden jeweils Proben genommen, tiefgefroren und eingeschickt.

Die Auswertung der Daten erfolgte wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben.

### 4.3 Ergebnisse

#### 4.3.1 Clothianidin

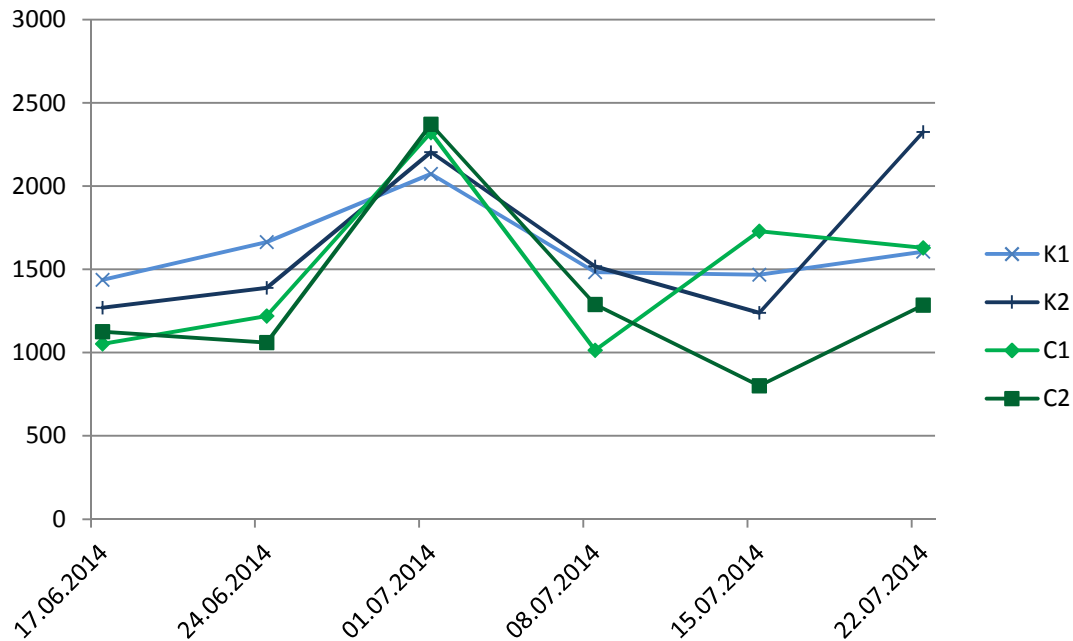
Zunächst sollen die Ergebnisse der Bonitur dargestellt werden. Dabei wurden die Anzahl an Bienen sowie die Anzahl der Brutzellen einmal wöchentlich geschätzt (siehe Abbildung 37 und Abbildung 38).



**Abbildung 37:** Anzahl der Bienen der verschiedenen Völker.

K1 und K2: Kontrollvölker, eingefüttert mit Zuckersirup; C1 und C2: Versuchsvölker, eingefüttert mit Zuckersirup mit 50 ppb Clothianidin; dargestellt sind die geschätzten Bienenanzahlen zu den verschiedenen Schätzterminen.

In Abbildung 37 ist zu sehen, dass sich die Anzahl an Bienen im Laufe der Zeit in allen vier Völkern ähnlich verhält, obwohl die Völker insgesamt verschiedene Anzahlen an Bienen aufweisen. Zunächst werden es mehr Bienen, ab dem ca. dritten Schätztermin nehmen die Bienenanzahlen alle langsam ab. Der Verlauf der Bienenanzahlen ist bei Kontroll- und Versuchsvölkern sehr ähnlich.



**Abbildung 38:** Anzahl der Brutzellen der verschiedenen Völker.

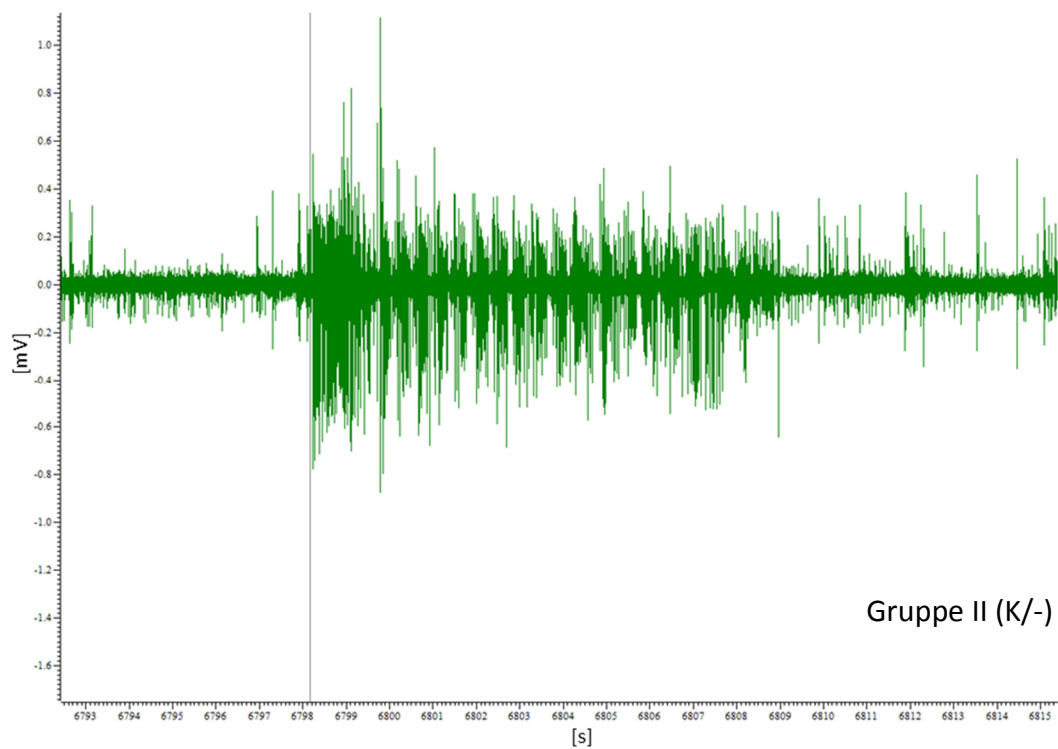
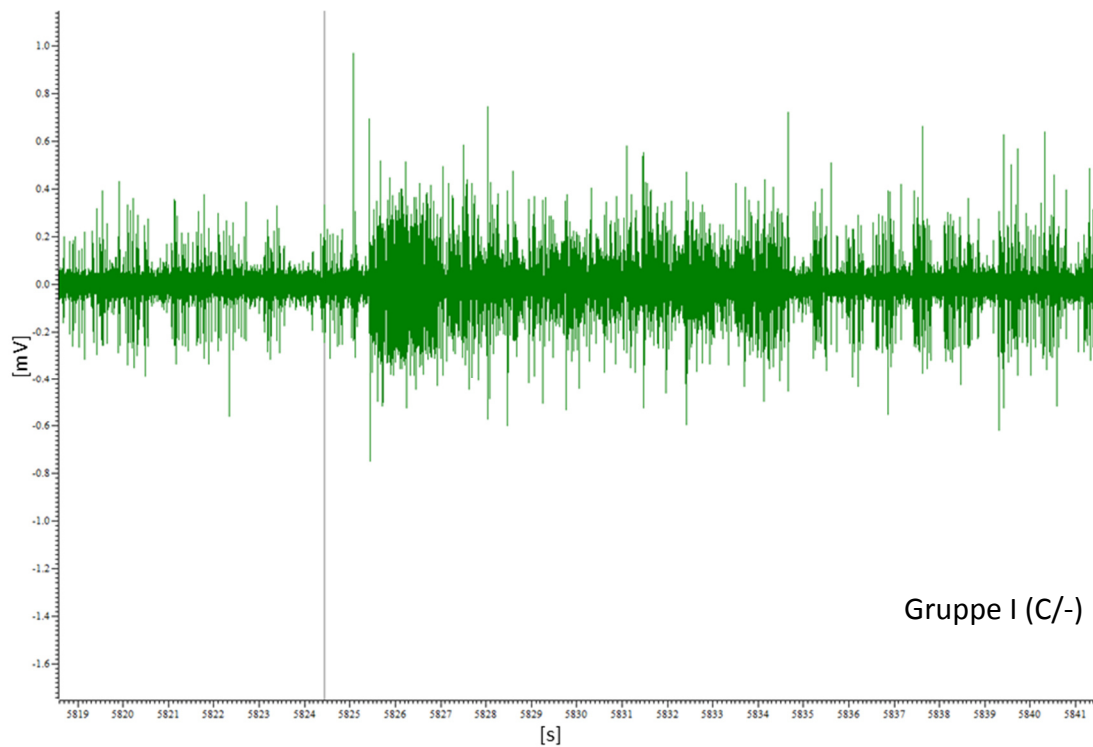
K1 und K2: Kontrollvölker, eingefüttert mit Zuckersirup; C1 und C2: Versuchsvölker, eingefüttert mit Zuckersirup mit 50 ppb Clothianidin; dargestellt sind die geschätzten Brutzellenanzahlen zu den verschiedenen Schätzterminen.

Auch die Anzahl der Brutzellen im Laufe des Versuchszeitraums verläuft bei allen vier Völkern parallel, sowohl bei den Kontroll- als auch bei den Versuchsvölkern (siehe Abbildung 38). Ein Maximum der Anzahl an Brutzellen wird beim dritten Schätztermin erreicht, danach nehmen die Anzahlen zunächst wieder ab, um dann erneut etwas anzusteigen.

Es wurden die Effekte einer chronischen Fütterung von Clothianidin (50 ppb) und einer zusätzlichen akuten Fütterung von Thiacloprid (250 ng in 10 µl Zuckerwasser) auf die Muskelspikerate des Muskels M17 zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Fütterung untersucht. Dabei wurden die Anzahlen an Spikes der folgenden Gruppen miteinander verglichen:

- Gruppe I (C/-) vs. Gruppe II (K/-)
- Gruppe I (C/-) vs. Gruppe III (C/T)
- Gruppe III (C/T) vs. Gruppe IV (K/T)
- Gruppe II (K/-) vs. Gruppe IV (K/T)

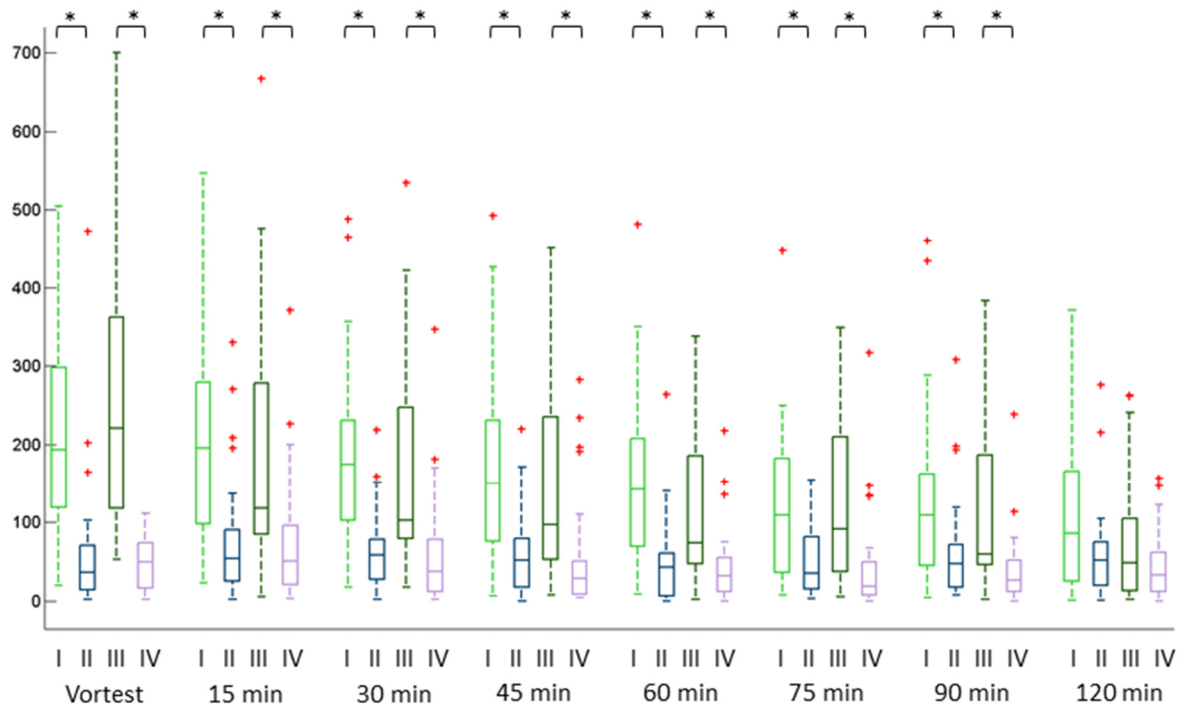
In den Ableitungen zeigt sich, dass Gruppe I (C/-) eine deutlich höhere Anzahl an Muskelaktionspotenzialen aufweist als Gruppe II (K/-) (siehe Abbildung 39).



**Abbildung 39:** Beispiele für Elektromyogramme des Muskels M17 während des PERs.

Oben: Gruppe I (C/-), unten: Gruppe II (K/-); x-Achse in Sekunden, y-Achse in mV (in Schritten von 0,2 mV); senkrechter Strich: Zuckerstimulus. Clothianidin, chronisch verfüttert, erhöht die Anzahl an Muskelaktionspotenzialen (vor allem im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Im Messbereich 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ergeben sich zu allen Messzeitpunkten, außer 120 Minuten nach der Fütterung, signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen I und II bzw. III und IV (siehe Abbildung 40).



**Abbildung 40:** Verteilung der Anzahl an Spikes 5 Sekunden vor dem Zuckerstimulus zu den verschiedenen Messzeitpunkten.

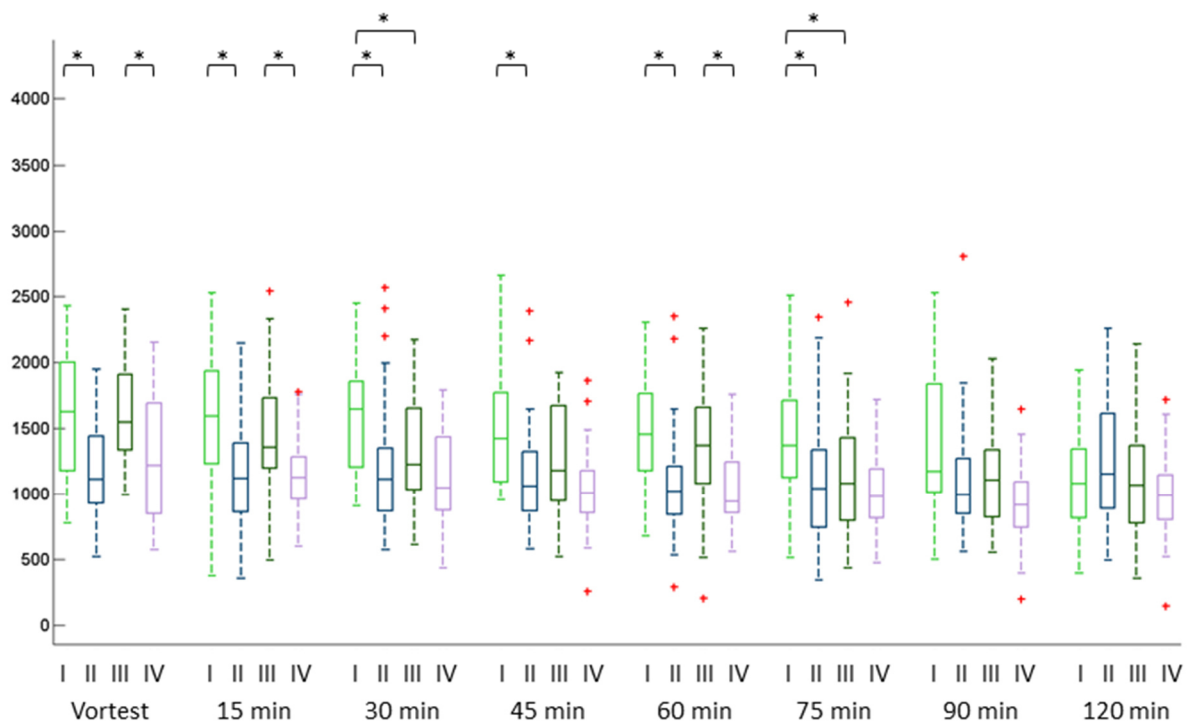
I = C/- (n = 30), II = K/- (n = 32), III = C/T (n = 30), IV = K/T (n = 29); signifikante Unterschiede zwischen Gruppe I und II bzw. zwischen Gruppe III und IV ergeben sich zu allen Zeitpunkten, außer 120 Minuten nach der Fütterung; die p-Werte sind Tabelle 5 zu entnehmen; \*p ≤ 0,05 Wilcoxon Ranksum Test.

**Tabelle 5:** p-Werte der chronischen Fütterung mit Clothianidin bzw. akuten Fütterung mit Thiacloprid 5 Sekunden vor dem Zuckerstimulus zu den verschiedenen Messzeitpunkten.

Gezeigt sind die p-Werte, die unter 0,05 liegen, wodurch ein signifikanter Unterschied zwischen den genannten Gruppen besteht; getestet mit Wilcoxon Ranksum Test.

Messzeitpunkt	I vs. II	III vs. IV
Vortest	0,000000154	0,0000000022
15 min	0,0000139	0,000850
30 min	0,00000272	0,000041
45 min	0,000101	0,000145
60 min	0,0000114	0,000803
75 min	0,000179	0,000366
90 min	0,0079	0,000593

In Abbildung 40 ist zu sehen, dass sich die Gruppen I und II bzw. III und IV zu fast allen Messzeitpunkten signifikant voneinander unterscheiden. Gruppe I hat chronisch Clothianidin aufgenommen und eine deutlich höhere mediane Anzahl an Spikes als Gruppe II, die mit Kontrollfutter gefüttert wurde. Gruppe III wurde chronisch mit Clothianidin gefüttert und zusätzlich akut mit Thiacloprid, was dazu führt, dass Gruppe III eine erhöhte mediane Anzahl an Spikes aufweist im Vergleich zu Gruppe IV, die chronisch mit Kontrollfutter und zusätzlich akut mit Thiacloprid gefüttert wurde.



**Abbildung 41:** Verteilung der Anzahl an Spikes für 20 Sekunden ab Stimulusbeginn zu den verschiedenen Messzeitpunkten.

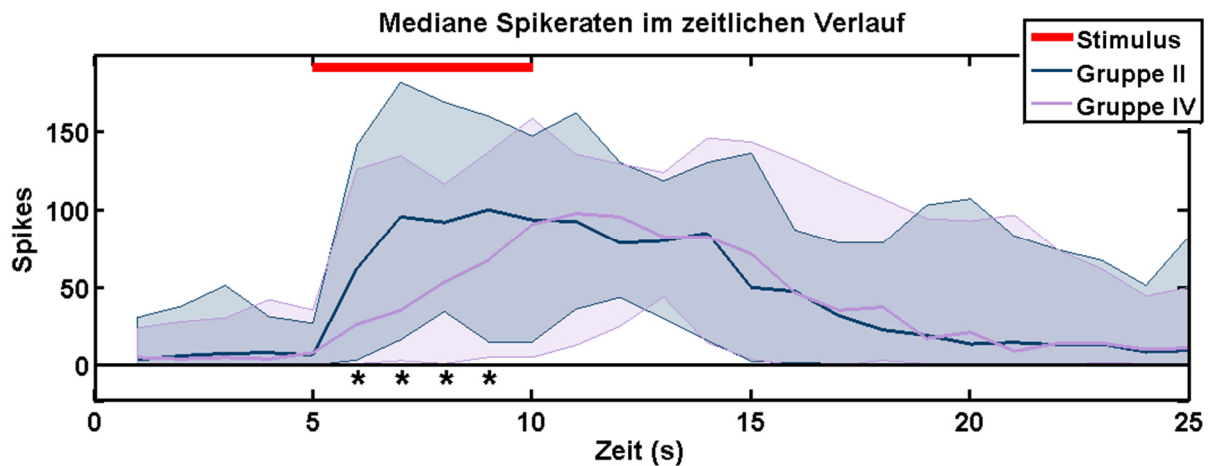
I = C/- (n = 30), II = K/- (n = 32), III = C/T (n = 30), IV = K/T (n = 29); signifikante Unterschiede ergeben sich zwischen Gruppe I und II zu den Messzeitpunkten Vortest sowie 15, 30, 45, 60 und 75 Minuten nach der Fütterung, zwischen Gruppe III und IV zu den Messzeitpunkten Vortest sowie 15 und 60 Minuten nach der Fütterung und zwischen Gruppe I und III zu den Messzeitpunkten 30 und 75 Minuten nach der Fütterung; die p-Werte sind Tabelle 6 zu entnehmen; \*p ≤ 0,05 Wilcoxon Ranksum Test.

**Tabelle 6:** p-Werte der chronischen Fütterung mit Clothianidin bzw. akuten Fütterung mit Thiacloprid für 20 Sekunden ab Stimulusbeginn zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Gezeigt sind die p-Werte, die unter 0,05 liegen, wodurch ein signifikanter Unterschied zwischen den genannten Gruppen besteht; n.s. = nicht signifikant; getestet mit Wilcoxon Ranksum Test.

Messzeitpunkt	I vs. II	I vs. III	III vs. IV
Vortest	0,000184	n.s.	0,0035
15 min	0,0016	n.s.	0,0030
30 min	0,0020	0,0144	n.s.
45 min	0,000687	n.s.	n.s.
60 min	0,000573	n.s.	0,0065
75 min	0,0076	0,0281	n.s.

Auch bei Betrachtung des Messzeitraums 20 Sekunden ab Stimulusbeginn (siehe Abbildung 41) zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen Gruppe I und II, und zwar zu den ersten sechs Messzeitpunkten. Gruppe I, die chronisch mit Clothianidin gefüttert wurde, hat eine höhere mediane Anzahl an Spikes als Gruppe II, die mit Kontrollfutter gefüttert wurde. Vergleicht man Gruppe I mit Gruppe III, zeigt sich auch hier, dass Gruppe I eine höhere Anzahl an Spikes aufweist, mit signifikanten Unterschieden zu den Messzeitpunkten 30 und 75 Minuten nach der Fütterung. Gruppe I wurde chronisch mit Clothianidin gefüttert, während Gruppe III zusätzlich zur chronischen Fütterung mit Clothianidin akut mit Thiacloprid gefüttert wurde. Im Vergleich von Gruppe III mit Gruppe IV hat wiederum Gruppe III die höhere Anzahl an Spikes, mit signifikanten Unterschieden zu den Messzeitpunkten Vortest, 15 und 60 Minuten nach der Fütterung. Beide Gruppen wurden akut mit Thiacloprid gefüttert, allerdings erhielt Gruppe III eine chronische Fütterung mit Clothianidin, während Gruppe IV mit Kontrollfutter gefüttert wurde.

Beim Vergleich der Gruppe II mit Gruppe IV zeigen sich signifikante Unterschiede nur im Messzeitraum während des Stimulus (5 s – 10 s) zu den Messzeitpunkten 45, 60, 75 und 90 Minuten nach der akuten Fütterung. Beispielhaft ist im Folgenden der Messzeitpunkt 60 Minuten nach Fütterung dargestellt (siehe Abbildung 42).



**Abbildung 42:** Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe II (K/-, n = 32) und der Gruppe IV (K/T, n = 29).

60 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es ergaben sich signifikante Unterschiede im Zeitraum während des Stimulus' (5 s – 10 s;  $p = 0,0038$ ; getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $*p \leq 0,05$ ).

In Abbildung 42 zeigt sich, dass Gruppe IV während des Stimulus eine deutlich geringere mediane Anzahl an Spikes aufweist als Gruppe II. Beide Gruppen wurden chronisch mit Kontrollfutter gefüttert, allerdings erhielt Gruppe IV eine zusätzliche akute Fütterung mit Thiacloprid. Vor und nach dem Stimulus unterscheiden sich die Spikeanzahlen der beiden Gruppen nicht signifikant, und es ist auch keine genaue Tendenz ersichtlich.

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der Probenanalyse der Futterproben dargestellt. Es wurden sowohl Proben des angerührten Futters entnommen als auch Proben des später durch die Bienen eingelagerten Futters.



**Tabelle 7:** Probenanalyse von eingelagertem und angerührtem Futter der Kontroll- und der Versuchsgruppe.

Die Angabe „< LOD“ bedeutet „< Limit of Detection“ und damit, dass keine der untersuchten Substanzen in der Probe nachgewiesen werden kann (< 0,0003 mg/kg). Die Angabe „< LOQ“ bedeutet „< Limit of Quantification“ und damit, dass die Konzentration der Substanzen in der Probe so gering ist, dass sie nicht mehr quantifiziert werden kann (< 0,001 mg/kg). Metabolite: TZNG = N-(2-chlorothiazol-5-ylmethyl)-N-nitroguanidine, TZMU = N-(2-chlorothiazol-5-ylmethyl)-N-methylurea, beides Metabolite von Clothianidin.

Probe	Clothianidin [ppb]	TZNG [ppb]	TZMU [ppb]
Eingelagertes Futter; Kontrollvolk 1	< LOD	< LOD	< LOD
Eingelagertes Futter; Kontrollvolk 2	< LOD	< LOD	< LOD
Eingelagertes Futter; Versuchsvolk 1	44	< LOD	< LOQ
Eingelagertes Futter; Versuchsvolk 2	44	< LOD	< LOQ
Angerührtes Futter; Kontrolle	< LOD	< LOD	< LOD
Angerührtes Futter; Clothianidin	44	< LOD	< LOD

Tabelle 7 zeigt, dass sowohl im angerührten als auch im eingelagerten Futter der Kontrollvölker kein Clothianidin oder dessen Metabolite nachzuweisen sind. Das angerührte und eingelagerte Futter der Versuchsvölker enthielt hingegen 44 ppb Clothianidin. Zusätzlich konnte im eingelagerten Futter der Versuchsvölker TZMU (ein Metabolit von Clothianidin) festgestellt werden, allerdings in einer nicht quantifizierbaren Menge.

Ebenfalls wurden Bienenproben nach den Versuchen analysiert. Die Bienen der Gruppe I wurden chronisch mit Clothianidin (50 ppb) gefüttert, die der Gruppe II chronisch mit Kontrollfutter. Die Bienen der Gruppe III wurden chronisch mit Clothianidin (50 ppb) und akut mit Thiacloprid (250 ng) gefüttert, die der Gruppe IV chronisch mit Kontrollfutter und akut mit Thiacloprid (250 ng). Die Ergebnisse sind Tabelle 8 zu entnehmen.

**Tabelle 8:** Probenanalyse von Bienen der verschiedenen Gruppen.

Eine Probe besteht aus fünf Bienen. Die Angabe „< LOD“ bedeutet „< Limit of Detection“ und damit, dass keine der untersuchten Substanzen in der Probe nachgewiesen werden kann (< 0,0003 mg/kg). Die Angabe „< LOQ“ bedeutet „< Limit of Quantification“ und damit, dass die Konzentration der Substanzen in der Probe so gering ist, dass sie nicht mehr quantifiziert werden kann (< 0,001 mg/kg). Metabolite: TZNG = N-(2-chlorothiazol-5-ylmethyl)-N-nitroguanidine, TZMU = N-(2-chlorothiazol-5-ylmethyl)-N-methylurea, beides Metabolite von Clothianidin; Thiacloprid-Amid: Metabolit von Thiacloprid.

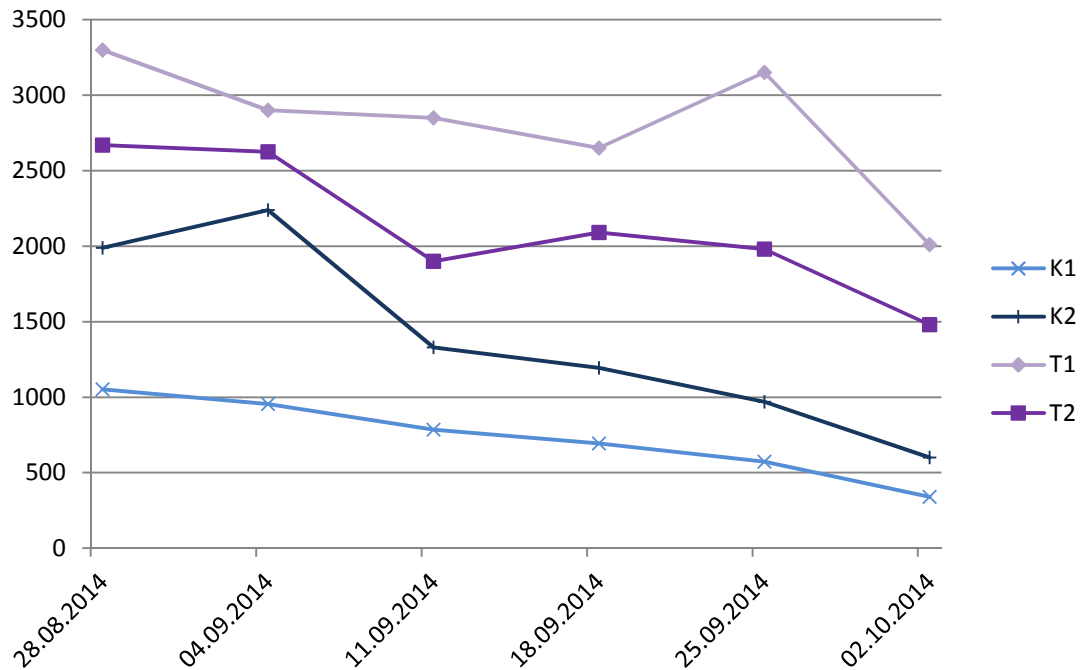
Probe	Clothianidin [ppb]	TZNG [ppb]	TZMU [ppb]	Thiacloprid [ng/Biene]	Thiacloprid-Amid [ng/Biene]
Gruppe I	4	2	< LOD	1,1	< LOD
Gruppe II	< LOD	< LOD	< LOD	1,4	< LOD
Gruppe III	7	1	< LOD	43	< LOQ
Gruppe IV	< LOD	< LOD	< LOD	29	< LOQ

In den Bienen der Gruppen I und III sind Clothianidin und der Metabolit TZNG nachweisbar (siehe Tabelle 8). In den Bienen der Gruppen II und IV ist dagegen kein Clothianidin enthalten. In den Bienen der Gruppen III und IV, die akut mit Thiacloprid gefüttert wurden, ist dies auch nachweisbar vorhanden (43 bzw. 29 ng pro Biene), sowie nicht quantifizierbare Mengen an Thiacloprid-Amid. Bei den Bienen der Gruppen I und II wurde ebenfalls eine geringe Menge an Thiacloprid festgestellt (1,1 bzw. 1,4 ng pro Biene).

Der in den Flugzelten verfütterte Pollen wurde ebenfalls analysiert, auf Clothianidin, Thiacloprid sowie Imidacloprid, und auch auf deren jeweilige Metabolite. Dabei konnten keine Substanzen oder Metabolite im Pollen festgestellt werden.

#### 4.3.2 Thiacloprid

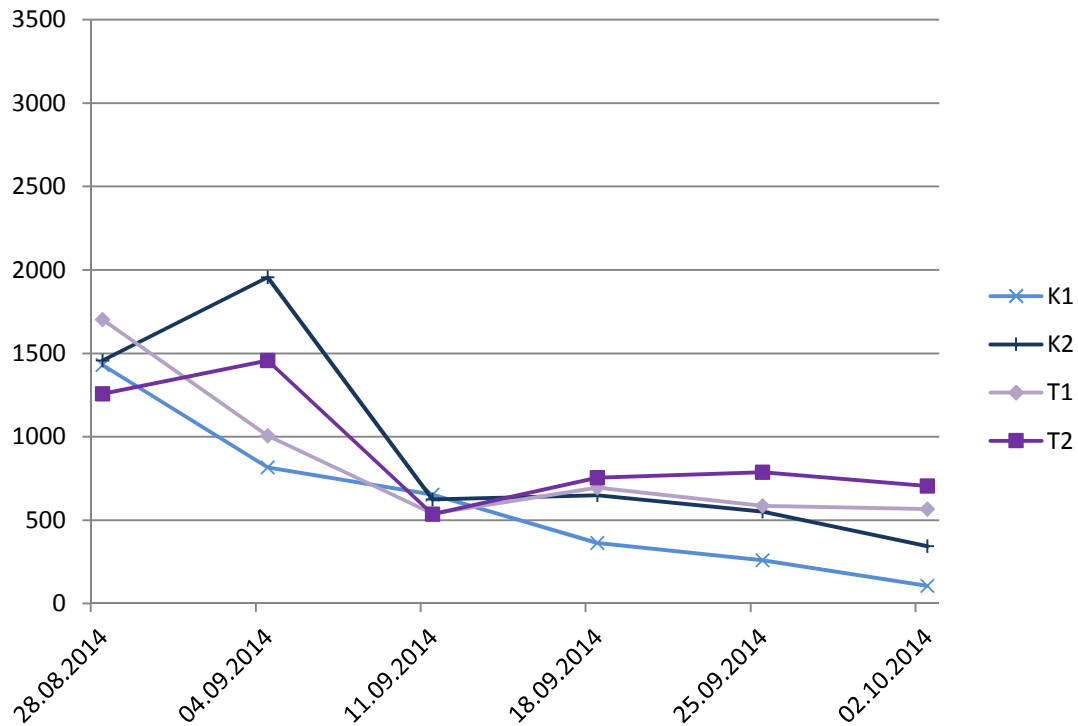
Auch hier sollen zunächst die Ergebnisse der Bonitur dargestellt werden. Dabei wurden die Anzahl an Bienen sowie die Anzahl der Brutzellen einmal wöchentlich geschätzt (siehe Abbildung 43 und Abbildung 44).



**Abbildung 43:** Anzahl der Bienen der verschiedenen Völker.

K1 und K2: Kontrollvölker, eingefüttert mit Zuckersirup; T1 und T2: Versuchsvölker, eingefüttert mit Zuckersirup mit 5000 ppb Thiacloprid; dargestellt sind die geschätzten Bienenanzahlen zu den verschiedenen Schätzterminen.

In Abbildung 43 ist der Verlauf der Bienenanzahl der vier Völker über den Versuchszeitraum zu sehen. Hier starten die Völker mit sehr verschiedenen Anzahlen an Bienen, verlaufen aber dennoch über die Zeit meist sehr ähnlich. Die Bienenanzahlen nehmen nahezu stetig ab, lediglich Volk T1 zeigt beim vorletzten Schätztermin eine deutliche Erhöhung der Anzahl. Der Verlauf der Bienenanzahlen ist bei Kontroll- und Versuchsvölkern sehr ähnlich bzw. parallel.



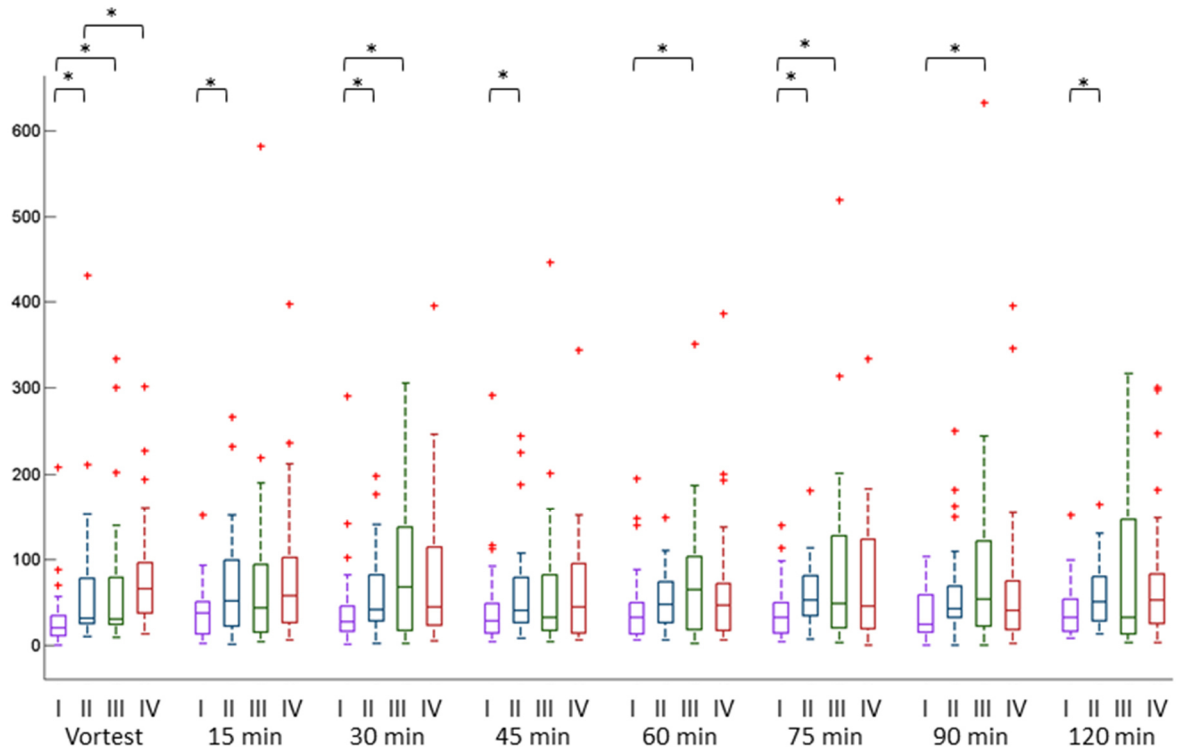
**Abbildung 44:** Anzahl der Brutzellen der verschiedenen Völker.

K1 und K2: Kontrollvölker, eingefüttert mit Zuckersirup; T1 und T2: Versuchsvölker, eingefüttert mit Zuckersirup mit 5000 ppb Thiacloprid; dargestellt sind die geschätzten Brutzellenanzahlen zu den verschiedenen Schätzterminen.

Bei der Anzahl der Brutzellen zeigt sich ein sehr ähnlicher Verlauf bei allen vier Völkern, sowohl Kontroll- als auch Versuchsvölkern (siehe Abbildung 44). Die Völker K2 und T2 haben einen Höhepunkt der Brutzellenanzahlen beim zweiten Schätztermin, danach nehmen die Anzahlen stark ab und steigen auch nur sehr gering wieder an. Im Volk K1 nimmt die Anzahl der Brutzellen über den gesamten Versuchszeitraum stetig ab.

Es wurden die Effekte einer chronischen Fütterung von Thiacloprid (5000 ppb) und einer zusätzlichen akuten Fütterung von Clothianidin (1 ng in 10 µl Zuckerwasser) auf die Muskelspikerate des Muskels M17 zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Fütterung untersucht. Dabei wurden die Anzahlen an Spikes der folgenden Gruppen miteinander verglichen:

- Gruppe I (T/-) vs. Gruppe II (K/-)
- Gruppe I (T/-) vs. Gruppe III (T/C)
- Gruppe III (T/C) vs. Gruppe IV (K/C)
- Gruppe II (K/-) vs. Gruppe IV (K/C)



**Abbildung 45:** Verteilung der Anzahl an Spikes 5 Sekunden vor dem Zuckerstimulus zu den verschiedenen Messzeitpunkten.

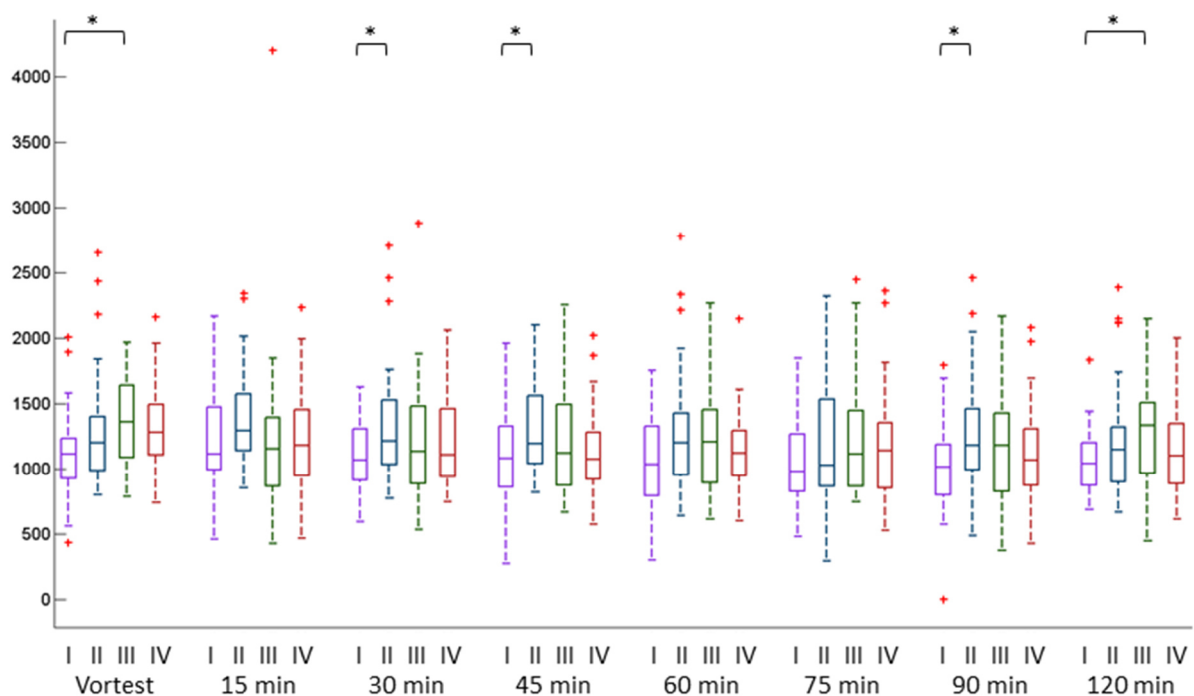
I = T/- (n = 31), II = K/- (n = 32), III = T/C (n = 29), IV = K/C (n = 31); signifikante Unterschiede ergeben sich zwischen Gruppe I und II zu den Messzeitpunkten Vortest, sowie 15, 30, 45, 75 und 120 Minuten nach der Fütterung, zwischen Gruppe I und III zu den Messzeitpunkten Vortest sowie 30, 60, 75 und 90 Minuten nach der Fütterung, und zwischen Gruppe II und IV zum Messzeitpunkt Vortest; die p-Werte sind Tabelle 9 zu entnehmen; \*p ≤ 0,05 Wilcoxon Ranksum Test.

**Tabelle 9:** p-Werte der chronischen Fütterung mit Thiachloprid bzw. akuten Fütterung mit Clothianidin 5 Sekunden vor dem Zuckerstimulus zu den verschiedenen Messzeitpunkten.

Gezeigt sind die p-Werte, die unter 0,05 liegen, wodurch ein signifikanter Unterschied zwischen den genannten Gruppen besteht; n.s. = nicht signifikant; getestet mit Wilcoxon Ranksum Test.

Messzeitpunkt	I vs. II	I vs. III	II vs. IV
Vortest	0,0014	0,0036	0,0331
15 min	0,0418	n.s.	n.s.
30 min	0,0303	0,0370	n.s.
45 min	0,0398	n.s.	n.s.
60 min	n.s.	0,0337	n.s.
75 min	0,0055	0,0285	n.s.
90 min	n.s.	0,0137	n.s.
120 min	0,0187	n.s.	n.s.

Gruppe I und II unterscheiden sich zu mehreren Messzeitpunkten signifikant voneinander (siehe Abbildung 45). Gruppe I wurde chronisch mit Thiacloprid, Gruppe II chronisch mit Kontrollfutter gefüttert. Die Bienen, die chronisch mit Thiacloprid gefüttert wurden, haben eine signifikant niedrigere Spikeanzahl als die Bienen, die mit Kontrollfutter gefüttert wurden. Auch Gruppe I und III unterscheiden sich zu mehreren Messzeitpunkten voneinander, und auch hier hat Gruppe I eine geringere Anzahl an Spikes. Gruppe I und III wurden beide chronisch mit Thiacloprid gefüttert, allerdings erhielt Gruppe III eine zusätzliche akute Fütterung mit Clothianidin. Gruppe II und Gruppe IV weisen einen signifikanten Unterschied im Vortest auf, wobei Gruppe IV eine höhere mediane Spikeanzahl hat als Gruppe II.



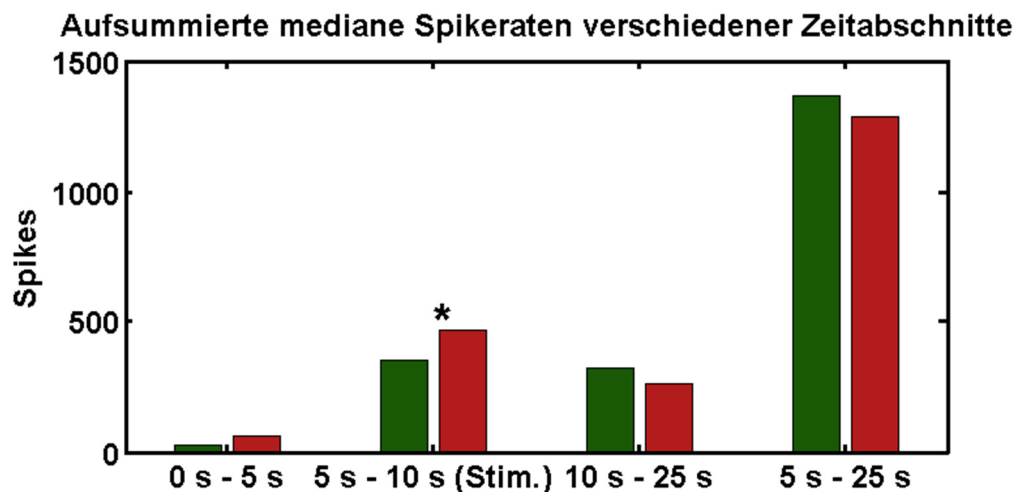
**Abbildung 46:** Verteilung der Anzahl an Spikes für 20 Sekunden ab Stimulusbeginn zu den verschiedenen Messzeitpunkten.

I = T/- (n = 31), II = K/- (n = 32), III = T/C (n = 29), IV = K/C (n = 31); signifikante Unterschiede ergeben sich zwischen Gruppe I und II zu den Messzeitpunkten 30 ( $p = 0,0278$ ), 45 ( $p = 0,0360$ ), und 90 Minuten ( $p = 0,0164$ ) nach der Fütterung und zwischen Gruppe I und III zu den Messzeitpunkten Vortest ( $p = 0,0124$ ) sowie 120 Minuten ( $p = 0,0124$ ) nach der Fütterung; \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

Abbildung 46 zeigt signifikante Unterschiede, die im Messzeitraum ab Stimulusbeginn bestehen. Gruppe I und II unterscheiden sich dabei zu den Messzeitpunkten 30, 45 und 90 Minuten nach der Fütterung signifikant voneinander. Gruppe I wurde chronisch mit Thiacloprid gefüttert und hat eine geringere Anzahl an Spikes als Gruppe II, die chronisch mit Kontrollfutter gefüttert wurde. Die Gruppen I und III unterscheiden sich im Vortest

und 120 Minuten nach der Fütterung signifikant voneinander. Beide Gruppen wurden chronisch mit Thiacloprid gefüttert, Gruppe III erhielt noch eine zusätzliche akute Fütterung mit Clothianidin und hat im Vergleich mit Gruppe I eine höhere mediane Anzahl an Spikes.

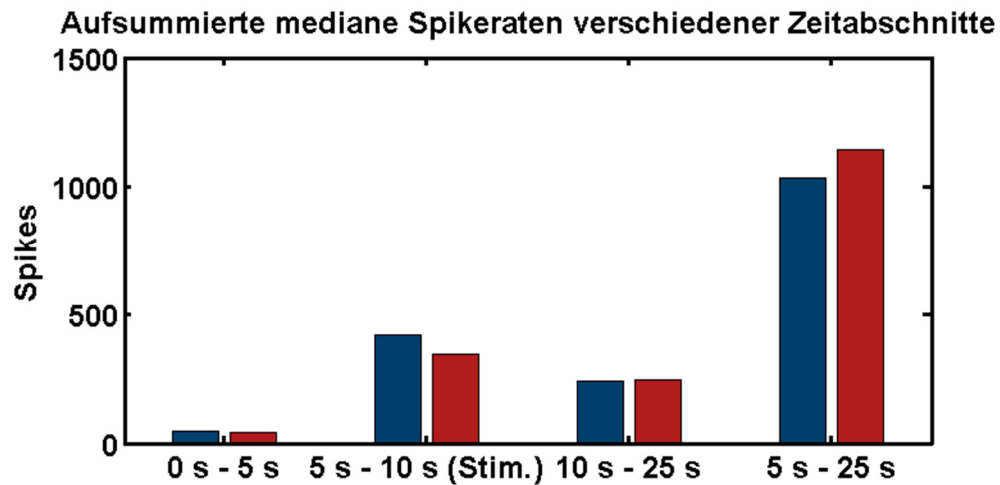
Beim Vergleich der Gruppen III und IV ergibt sich nur eine Signifikanz während des Stimulus im Vortest, also vor der Fütterung mit Clothianidin. Gruppe III hat dabei eine geringere Anzahl an Spikes als Gruppe IV (siehe Abbildung 47). Somit handelt es sich um einen Vergleich zwischen den chronischen Fütterungen (III: chronisch Thiacloprid, IV: chronisch Kontrollfutter) und entspricht damit den Ergebnissen des Vergleichs der Gruppen I und II (oben beschrieben). Über die akute Fütterung von Clothianidin lässt sich vor dessen Fütterung nichts aussagen. Eine allgemeine Tendenz beim Vergleich von Gruppe III mit Gruppe IV ist nicht festzustellen.



**Abbildung 47:** Vergleich der medianen Spikeraten von Gruppe III (T/C, n = 29, grün) und von Gruppe IV (K/C, n = 31, rot) in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

Vortest vor der akuten Fütterung; signifikante Unterschiede bestehen während des Stimulus ( $p = 0,0350$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

Die Gruppen II und IV weisen im Vergleich keine Signifikanzen und auch keine eindeutige Tendenz auf. Beispielhaft ist in Abbildung 48 der Zeitpunkt 75 Minuten nach der akuten Fütterung dargestellt.



**Abbildung 48:** Vergleich der medianen Spikeraten von Gruppe II (K/-, n = 32, blau) und von Gruppe IV (K/C, n = 31, rot) in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

75 Minuten nach der Fütterung; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ); Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der Probenanalyse der Futterproben dargestellt. Es wurden sowohl Proben des angerührten Futters entnommen als auch Proben des später durch die Bienen eingelagerten Futters.



**Tabelle 10:** Probenanalyse von eingelagertem und angerührtem Futter der Kontroll- und der Versuchsgruppe.

Die Angabe „< LOD“ bedeutet „< Limit of Detection“ und damit, dass keine der untersuchten Substanzen in der Probe nachgewiesen werden kann (< 0,0003 mg/kg). Die Angabe „< LOQ“ bedeutet „< Limit of Quantification“ und damit, dass die Konzentration der Substanzen in der Probe so gering ist, dass sie nicht mehr quantifiziert werden kann (< 0,001 mg/kg). Thiacloprid-Amid: Metabolit von Thiacloprid.

Probe	Thiacloprid [ppb]	Thiacloprid-Amid [ppb]
Eingelagertes Futter; Kontrollvolk 1	< LOD	< LOD
Eingelagertes Futter; Kontrollvolk 2	< LOQ	< LOD
Eingelagertes Futter; Versuchsvolk 1	4100	8
Eingelagertes Futter; Versuchsvolk 2	4100	7
Angerührtes Futter; Kontrolle	< LOD	< LOD
Angerührtes Futter; Thiacloprid	4900	< LOQ

Tabelle 10 zeigt, dass sowohl im angerührten als auch im eingelagerten Futter der Kontrollvölker kein Thiacloprid oder dessen Metabolit nachzuweisen ist, lediglich in einem der Kontrollvölker in einer nicht quantifizierbaren Menge. Im angerührten Futter der Versuchsvölker sind dagegen 4900 ppb Thiacloprid nachweisbar, im eingelagerten Futter der Versuchsvölker konnten jeweils 4100 ppb Thiacloprid sowie 8 bzw. 7 ppb Thiacloprid-Amid nachgewiesen werden. Im eingelagerten Futter sind also noch ca. 80 % der eingesetzten Konzentration enthalten.

Ebenfalls wurden Bienenproben nach den Versuchen analysiert. Die Bienen der Gruppe I wurden chronisch mit Thiacloprid (5000 ppb) gefüttert, die der Gruppe II chronisch mit Kontrollfutter. Die Bienen der Gruppe III wurden chronisch mit Thiacloprid (5000 ppb) und akut mit Clothianidin (1 ng) gefüttert, die der Gruppe IV chronisch mit Kontrollfutter und akut mit Clothianidin (1 ng). Die Ergebnisse sind Tabelle 11 zu entnehmen.

**Tabelle 11:** Probenanalyse von Bienen der verschiedenen Gruppen.

Eine Probe besteht aus fünf Bienen. Die Angabe „< LOD“ bedeutet „< Limit of Detection“ und damit, dass keine der untersuchten Substanzen in der Probe nachgewiesen werden kann (< 0,0003 mg/kg). Metabolite: Thiacloprid-Amid: Metabolit von Thiacloprid; TZNG = N-(2-chlorothiazol-5-ylmethyl)-N-nitroguanidine, TZMU = N-(2-chlorothiazol-5-ylmethyl)-N-methylurea, beides Metabolite von Clothianidin.

Probe	Thiacloprid [ppb]	Thiacloprid-Amid [ppb]	Clothianidin [ng/Biene]	TZNG [ng/Biene]	TZMU [ng/Biene]
Gruppe I	140	2	< LOD	< LOD	< LOD
Gruppe II	5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Gruppe III	96	2	0,5	< LOD	< LOD
Gruppe IV	5	< LOD	0,5	< LOD	< LOD

In den Bienen der Gruppen I und III konnten Thiacloprid und dessen Metabolit nachgewiesen werden (siehe Tabelle 11). In den Bienen der Gruppen II und IV ist ebenfalls Thiacloprid enthalten, allerdings in wesentlich geringerer Konzentration. Thiacloprid-Amid ist in Gruppe II und IV dagegen nicht nachweisbar. In den Bienen der Gruppen III und IV, die akut mit Clothianidin gefüttert wurden, ist dies auch nachweisbar vorhanden (jeweils 0,5 ng pro Biene), im Gegensatz zu den Bienen der Gruppen I und II.

Der in beiden Versuchsdurchläufen in den Flugzelten verfütterte Pollen wurde ebenfalls analysiert, auf Clothianidin, Thiacloprid, sowie Imidacloprid, und auch deren jeweilige Metabolite. Dabei konnten keine Substanzen oder Metabolite im Pollen festgestellt werden.

## 4.4 Diskussion

### 4.4.1 Clothianidin

In diesen Versuchen wurde die Auswirkung chronischer Fütterung mit Clothianidin untersucht. Betrachtet man zunächst die Ergebnisse der wöchentlichen Bonitur der Völker, zeigt sich, dass die vier Völker zwar alle eine unterschiedliche Anzahl an Bienen zu Beginn der Versuche aufweisen, dass sich diese aber im Verlauf der Versuche parallel entwickeln und keine Unterschiede in der Entwicklung zwischen Versuchs- und Kontrollvölkern aufweisen (siehe Abbildung 37). Auch die Brutentwicklung verläuft ähnlich, sodass auch hier keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsvölkern festgestellt werden können (siehe Abbildung 38). Alle vier Völker entwickeln sich normal

und waren auch gegen Ende der Versuche in ihrer Anzahl an adulten Bienen und ihrer Brutentwicklung noch stabil. Schmuck und Keppeler (2003) stellten keine Unterschiede in der Lebensdauer und Entwicklung von Bienen bei einer Fütterung mit 20 ppb Clothianidin fest, was den hier beschriebenen Ergebnissen entspricht. Auch in Versuchen, in denen Bienenvölker längere Zeit mit Clothianidin behandeltem Raps ausgesetzt waren, konnten keine Unterschiede in der Bienensterblichkeit, der Lebensdauer, der Volks- und Brutentwicklung und dem Honigertrag zwischen den Versuchsvölkern und den Kontrollvölkern festgestellt werden (Cutler & Scott-Dupree, 2007). In einem Feldversuch, in dem Bienenvölker mit 50 ppb Clothianidin gefüttert wurden, ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zu Kontrollvölkern in Bezug auf Volksstärke und der Anzahl an Brutzellen (R. Siede, persönliche Kommunikation, 30.06.2015). Dies entspricht exakt der Konzentration, die in den hier beschriebenen Versuchen verwendet wurde. Sowohl im Feldversuch als auch im hier beschriebenen Versuch konnten keine signifikanten Unterschiede in der Entwicklung der Völker festgestellt werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Untersuchungen von Cutler et al. (2014). Auch dort wurde gezeigt, dass Bienenvölker, die Clothianidin an Rapsfeldern ausgesetzt waren, keine Auswirkungen auf die Volksgesundheit, die Volksentwicklung oder die erfolgreiche Überwinterung zeigen. Ähnliche Versuche wurden auch mit Thiamethoxam durchgeführt, und auch hier zeigten sich keine Unterschiede in der Volksstärke, Brutentwicklung oder Sterberate im Vergleich von Versuchs- mit Kontrollvölkern (Pilling et al., 2013). In anderen Versuchen mit Bienenvölkern an mit Clothianidin behandelten Rapsfeldern wurde ebenfalls festgestellt, dass die Volksstärke nicht signifikant beeinflusst wurde (Rundlöf et al., 2015). Im gleichen Versuch wurde auch der Einfluss auf Hummelvölker (*Bombus terrestris*) und Wildbienen (*Osmia bicornis*) getestet, welche beide deutliche Einschränkungen im Volkswachstum bzw. im Nistverhalten aufwiesen. Cresswell et al. (2013) hatten bereits festgestellt, dass die Entgiftungsmechanismen bei Honigbienen für Neonikotinoide besser greifen als bei Hummeln, was sich in der Untersuchung von Rundlöf et al. (2015) und auch bei Whitehorn et al. (2012) sowie bei Goulson (2015) bestätigt. Insgesamt sind Hummeln und Wildbienen eventuell empfindlicher in ihrer Reaktion auf Neonikotinoide als Honigbienen (Pisa et al., 2015).

Vergleicht man nun in den hier beschriebenen Versuchen Gruppe I (C/-) mit Gruppe II (K/-), zeigt sich, dass die chronische Fütterung von Bienen mit Clothianidin für

eine höhere mediane Spikeanzahl des Muskels M17 sorgt. Bereits in der Zeit bevor die Biene mit Zuckerwasser stimuliert wird, ist die Anzahl an Spikes erhöht. Auch über den gesamten Messzeitraum 20 Sekunden ab Stimulusbeginn ist die Anzahl an Muskelaktionspotenzialen bei Gruppe I erhöht. Beispielsweise haben die Bienen aus Gruppe I zum Messzeitpunkt 30 Minuten eine mediane Spikeanzahl von 1643, während die Bienen aus Gruppe II eine mediane Spikeanzahl von 1112 aufweisen. Die Bienen, die chronisch mit Clothianidin gefüttert wurden und auch nur mit diesem Futter aufgewachsen sind, zeigen eine deutlich höhere mediane Spikerate im Vergleich zur Kontrollgruppe II. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den anderen Ergebnissen dieser Arbeit (siehe Kapitel 2 und Kapitel 3). Zwar ist die Verabreichung in diesem Versuch eine andere, da es sich um eine chronische Fütterung über mehrere Wochen handelte, das Ergebnis der erhöhten medianen Spikeanzahl zeigt sich aber erneut. Die Bienen aus Gruppe I haben also durchweg eine höhere Spikeanzahl, die sich über den gesamten Messzeitraum von zwei Stunden erstreckt, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Erhöhung der Spikerate auch so lange anhält, wie das Clothianidin chronisch verabreicht wird. Die Ergebnisse beim Vergleich dieser beiden Gruppen sind sehr deutlich ausgeprägt.

Beim Vergleich von Gruppe I (C/-) mit Gruppe III (C/T) zeigen sich im Vortest keine Unterschiede. Das entspricht den Erwartungen, da beide Gruppen bis dahin chronisch mit Clothianidin gefüttert wurden und davon ausgegangen wurde, dass sich die Spikeanzahlen dann auch nicht unterscheiden. In den 5 Sekunden vor Stimulusbeginn zeigen sich zu keinem Messzeitpunkt signifikante Unterschiede. Im Messzeitraum 20 Sekunden ab Stimulusbeginn konnten signifikante Unterschiede zu den Messzeitpunkten 30 und 75 Minuten nach der Fütterung festgestellt werden. Bei diesen Unterschieden weist Gruppe III stets eine niedrigere mediane Anzahl an Spikes auf als Gruppe I. Das bedeutet, dass das akut gefütterte Thiacloprid die Spikeanzahl der Bienen absenkt, obwohl beide Gruppen zuvor chronisch mit Clothianidin gefüttert wurden. Das Thiacloprid verliert also nicht seinen Effekt auf die Anzahl an Spikes und es tritt auch kein Gewöhnungseffekt oder ein synergistischer Effekt ein. Beide Substanzen wirken wie in einer einfachen Applikation bzw. Verfütterung, da die Spikeanzahl durch das Clothianidin erhöht wird (zu sehen durch den Vergleich von Gruppe I und Gruppe II), durch das Thiacloprid aber wieder abgesenkt wird, wie eben beschrieben. Eine Signifikanz ist zwar

lediglich zu zwei Messzeitpunkten nachzuweisen, aber auch zu den anderen Messzeitpunkten ist eine eindeutige Tendenz in diese Richtung zu erkennen (siehe Anhang, Abbildungen 146 bis 152).

Vergleicht man wiederum Gruppe III (C/T) mit Gruppe IV (K/T), zeigt sich erneut, dass Clothianidin die mediane Spikeanzahl der Bienen erhöht. Die Erhöhung der Anzahl an Muskelaktionspotenzialen vor Stimulusbeginn zeigt sich häufig nach Verabreichung von Clothianidin, sodass sich hier ein typisches Muster für diese Substanz wiederholt. Im Messzeitraum 20 Sekunden ab Stimulusbeginn zeigen sich beim Vortest sowie zu den Messzeitpunkten 15 und 60 Minuten signifikante Unterschiede. Auch hier hat Gruppe III eine erhöhte Anzahl an Spikes im Vergleich zu Gruppe IV. An diesem Vergleich zeigt sich, dass Clothianidin für eine höhere mediane Spikeanzahl sorgt als die Kontrolllösung, auch wenn akut zusätzlich Thiacloprid gefüttert wird. Die Wirkung von Clothianidin auf die Muskelspikes lässt sich somit durch Thiacloprid nicht aufheben, wird aber auch in keiner Weise verstärkt, was am vorigen Vergleich (Gruppe I und Gruppe III) zu sehen ist. Würde bei Gruppe III die Wirkung von Clothianidin durch Thiacloprid aufgehoben werden, könnte man damit rechnen, dass die Spikeanzahlen dann der Gruppe II (K/-) ähnelten. Dies ist aber nicht der Fall, Gruppe III hat tendenziell immer eine höhere Spikerate als Gruppe II (siehe Abbildung 41), wodurch auch hier eine dominante Rolle des Clothianidins zu erkennen ist (siehe auch Kapitel 2.4.2). Beide Substanzen wirken somit jeweils auf ihre Weise, auch wenn sie gemeinsam eingesetzt werden.

Gruppe II (K/-) und Gruppe IV (K/T) unterscheiden sich weder 5 Sekunden vor Stimulusbeginn signifikant voneinander noch über 20 Sekunden ab Stimulusbeginn. Jedoch ist eine Tendenz erkennbar, die zeigt, dass Gruppe IV eine niedrigere mediane Spikeanzahl aufweist als Gruppe II. Dies entspricht den Erwartungen, da Thiacloprid als Partial-Agonist die Spikeanzahl bereits in anderen Versuchen abgesenkt hat. Betrachtet man nun den gesamten Verlauf der einzelnen Messzeitpunkte, zeigt sich zu vier Messzeitpunkten (45, 60, 75 und 90 Minuten) eine signifikant niedrigere mediane Spikeanzahl im Zeitraum während des Stimulus (5 s – 10 s) bei Gruppe IV (siehe Abbildung 42). Bienen, die chronisch mit Kontrollfutter gefüttert wurden, weisen also nach akuter Fütterung mit Thiacloprid eine niedrigere Anzahl an Spikes auf als Bienen, die nicht akut gefüttert wurden.

Es lässt sich erneut feststellen, dass Thiacloprid die mediane Spikeanzahl im Zeitraum während des Stimulus' absenkt, während Clothianidin dies im Zeitraum nach dem Stimulus tut. Darauf soll später eingegangen werden (siehe Kapitel 4.4.3).

#### 4.4.2 Thiacloprid

In diesen Versuchen wurde die Auswirkung chronischer Fütterung mit Thiacloprid untersucht. Betrachtet man zunächst die Ergebnisse der wöchentlichen Bonitur der Völker, zeigt sich, dass die vier Völker bereits zu Beginn der Versuche alle eine sehr unterschiedliche Anzahl an Bienen aufweisen (siehe Abbildung 43). Trotzdem verlaufen die Kurven für alle vier Völker ähnlich, das heißt dass sie sich im Verlauf der Versuche parallel entwickeln, sowohl die Versuchs- als auch die Kontrollvölker. Gegen Ende der Versuche wurden die Kontrollvölker in ihrer Bienenanzahl sehr schwach, was aber vermutlich auf die bereits sehr niedrige Anzahl zu Beginn der Versuche zurückzuführen ist. Auch bei der Anzahl der Brutzellen zeigen sich keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsvölkern (siehe Abbildung 44). Zwar verlaufen die Anzahlen von K1 und T1 leicht anders als die von K2 und T2, was aber nicht auf die Gabe von Thiacloprid zurückzuführen ist und damit unabhängig vom jeweiligen Futter zu sein scheint. In Versuchen mit Völkern, die an mit Thiacloprid behandelten Feldern aufgestellt waren, zeigten sich keine Auswirkungen auf die Entwicklung und die Ertragsmenge der Bienenvölker (Pohorecka et al., 2012). Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der hier beschriebenen Versuche, da hier auch kein Unterschied in der Entwicklung zwischen Versuchs- und Kontrollvölkern festgestellt werden konnte.

Beim Vergleich von Gruppe I (T/-) mit Gruppe II (K/-) fällt auf, dass erstere eine deutlich niedrigere mediane Spikerate des Muskels M17 aufweist als die zweite Gruppe. Bereits vor einer Stimulation mit Zuckerwasser weisen die Bienen, die chronisch mit Thiacloprid gefüttert wurden, eine niedrigere Spikeanzahl auf. Im Messzeitraum 20 Sekunden ab Stimulusbeginn zeigen sich zu den Messzeitpunkten 30, 45 und 90 Minuten signifikante Unterschiede zwischen Gruppe I und Gruppe II. Auch hier hat Gruppe I eine niedrigere Spikeanzahl. Zum Zeitpunkt 30 Minuten beispielsweise hat Gruppe I eine mediane Spikeanzahl von 1067, während Gruppe II eine mediane Spikeanzahl von 1213 hat. Die Bienen, die über mehrere Wochen mit Thiacloprid gefüttert wurden und auch nur mit diesem Futter aufgewachsen sind, zeigen also eine niedrigere mediane Spikeanzahl als

Bienen, die mit Kontrollfutter aufgewachsen sind. Da sich dieser Unterschied bzw. diese Tendenz über den gesamten Messzeitraum von zwei Stunden erstreckt, wird davon ausgegangen, dass dieser Effekt bestehen bleibt, solange die chronische Fütterung fortgesetzt wird. Dieser Effekt bestätigt erneut die vorangegangenen Ergebnisse (siehe Kapitel 2 und 3) und bestärkt die Annahme, dass Thiacloprid ein Partial-Agonist des nAChRs der Biene ist.

Im Vergleich von Gruppe I (T/-) mit Gruppe III (T/C) zeigt sich insgesamt eine tendenzielle Erhöhung der medianen Spikerate nach der akuten Fütterung mit Clothianidin für Gruppe III. Im Zeitraum 5 Sekunden vor Stimulusbeginn weist Gruppe III zu den Messzeitpunkten Vortest, 30, 60, 75 und 90 Minuten eine signifikant erhöhte Spikerate auf, verglichen mit Gruppe I. Bei den Messzeitpunkten nach der Fütterung entspricht dies den Erwartungen, da beide Gruppen chronisch mit Thiacloprid gefüttert wurden, Gruppe III aber zusätzlich akut mit Clothianidin gefüttert wurde, sodass mit einer Erhöhung der medianen Spikeanzahl gerechnet wurde (siehe auch Kapitel 2 und 3). Im Vortest allerdings widerspricht dieses Ergebnis den Erwartungen. Zu diesem Zeitpunkt wurden beide Gruppen lediglich chronisch mit Thiacloprid gefüttert und sollten sich nicht unterscheiden. Dieses Ergebnis ist biologisch nicht erklärbar. Im Messzeitraum 20 Sekunden ab Stimulusbeginn zeigen sich zum Messzeitpunkt Vortest sowie 120 Minuten nach der Fütterung signifikante Unterschiede. Auch hier weist Gruppe III eine höhere mediane Spikeanzahl auf als Gruppe I. Die Tendenz für diese erhöhte Spikeanzahl besteht über den gesamten Messzeitraum. Es zeigt sich also ein ähnliches Ergebnis wie im Messzeitraum 5 Sekunden vor Stimulusbeginn: Im Prinzip wurde dieser Effekt erwartet, allerdings nicht im Vortest, wo Gruppe III noch nicht mit Clothianidin gefüttert wurde.

Gruppe III (T/C) und Gruppe IV (K/C) unterscheiden sich weder im Messzeitraum 5 Sekunden vor Stimulusbeginn signifikant voneinander, noch über 20 Sekunden ab Stimulusbeginn. Es zeigt sich lediglich ein einziger signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen: zum Messzeitpunkt Vortest, während des Stimulus (siehe Abbildung 47). Dies stimmt mit den Ergebnissen im Vergleich von Gruppe I (T/-) mit Gruppe II (K/-) überein, da sich die beiden Gruppen zum Messzeitpunkt Vortest ausschließlich durch ihre chronische Fütterung unterscheiden, die bei Gruppe III aus Thiacloprid bestand, bei

Gruppe IV aus Kontrollfutter, wodurch eine verminderte mediane Spikeanzahl bei Gruppe III erwartet wurde. Insgesamt zeigt sich bei diesem Gruppenvergleich keine eindeutige Tendenz, die Gruppen liegen oft auf gleichem Spikeanzahl-Niveau und unterscheiden sich kaum. Erwartet wurde eine niedrigere Spikeanzahl bei Gruppe III, da diese chronisch mit Thiacloprid gefüttert wurde, während Gruppe IV mit Kontrollfutter gefüttert wurde. Die Annahme war, dass das zusätzlich akut verfütterte Clothianidin für keinerlei Unterschiede sorgt, da es beiden Gruppen verabreicht wurde. Daher wurde das Thiacloprid als entscheidend betrachtet, was beim Vergleich der Gruppen I und II auch tatsächlich so auftrat (siehe oben). Diese Erwartung lässt sich beim Vergleich der Gruppen III und IV allerdings nicht nachweisen.

Auch beim Vergleich von Gruppe II (K/-) und Gruppe IV (K/C) zeigen sich keine eindeutigen Tendenzen. Es ergibt sich ein signifikanter Unterschied im Zeitraum 5 Sekunden vor Stimulusbeginn zum Messzeitpunkt Vortest. Dieser ist allerdings nicht erklärbar, da zu diesem Zeitpunkt beide Gruppen chronisch mit Kontrollfutter gefüttert wurden und sich kein Unterschied ergeben sollte. Weder gibt es Unterschiede während des Stimulus, noch im Messzeitraum 20 Sekunden ab Stimulusbeginn, und auch eine eindeutige Tendenz ist nicht zu erkennen. Erwartet wurde eine erhöhte mediane Spikeanzahl bei Gruppe IV, da diese akut mit Clothianidin gefüttert wurde, was in den bisherigen Versuchen die Spikeanzahl erhöht hatte. Dies lässt sich im hier beschriebenen Vergleich nicht nachweisen. Wie an den Analyseergebnissen zu sehen ist, befinden sich auch 120 Minuten nach der akuten Fütterung mit Clothianidin noch 0,5 ng der Substanz in den Bienen, wodurch eine Erhöhung der medianen Spikeanzahl erwartet wurde.

#### 4.4.3 Allgemeine Aspekte und Analyseergebnisse beider Substanzen

Betrachtet man die Zeiträume der Effekte von Clothianidin und Thiacloprid genauer, fällt (auch hier) ein gewisses Muster auf. Bei der chronischen Fütterung mit Clothianidin unterscheiden sich Gruppe I (C/-) und Gruppe II (K/-) häufiger im Zeitraum nach dem Stimulus als während des Stimulus. Gruppe I (T/-) und Gruppe II (K/-) bei der chronischen Fütterung mit Thiacloprid unterscheiden sich dagegen wesentlich häufiger im Zeitraum während des Stimulus als nach dem Stimulus. Der gleiche Effekt zeigt sich bei Gruppe I (C/-) und Gruppe III (C/T), wo es ausschließlich Unterschiede in der Spikeanzahl während des Stimulus gibt und keine im Zeitraum nach dem Stimulus. Ebenso verhält es



sich im Vergleich von Gruppe II (K/-) und Gruppe IV (K/T), die sich ausschließlich während des Stimulus unterscheiden. Gruppe I (T/-) und Gruppe III (T/C) weisen dagegen Unterschiede im Zeitraum nach dem Stimulus auf, keine jedoch während des Stimulus. Anhand dieser vielen Beispiele zeigt sich, dass Clothianidin die mediane Spikeanzahl meist im Zeitraum nach dem Stimulus signifikant erhöht, während Thiacloprid die mediane Spikeanzahl meist im Zeitraum während des Stimulus signifikant absenkt. Der Grund dafür liegt vermutlich darin, dass die Spikeanzahl während des Stimulus bereits maximal ist, sodass das Clothianidin diese nicht weiter erhöhen kann. Im Zeitraum nach dem Stimulus dagegen lassen die Spikes und damit die Spikeanzahl langsam nach, somit zeigt das Clothianidin hier seine Wirkung und bewirkt eine erhöhte mediane Spikeanzahl im Vergleich mit einer Kontrollgruppe. Thiacloprid dagegen senkt die mediane Spikeanzahl ab, was sich am deutlichsten im Zeitraum während des Stimulus zeigt, da hier die Spikeanzahl sehr hoch ist und Thiacloprid sie dort am meisten absenkt. Im Zeitraum nach dem Stimulus fällt die mediane Spikeanzahl sowieso ab, wodurch die Wirkung von Thiacloprid nicht mehr so deutlich ins Gewicht fällt.

Insgesamt lässt sich für beide Durchläufe (Clothianidin und Thiacloprid) sagen, dass es Auswirkungen auf die Muskelspikerate der einzelnen Versuchsbienen im Vergleich zu den Kontrollbienen gab und sich die jeweiligen Völker aber gleich entwickelten. Der Effekt der chronischen Fütterung mit Neonikotinoiden auf die Muskelspikerate scheint ein Effekt zu sein, der die einzelnen Bienen betrifft, sich aber in keiner Weise auf die Volksentwicklung und deren Aufgaben (Zellen ausbauen bzw. reparieren, Futter einlagern, Eier legen, Brutpflege etc.) auswirkt und die Völker folglich auch nicht zusammenbrechen. Die Bienen zeigten keine Einschränkungen in ihrem Leben im Volk auf, woraus der Schluss gezogen wird, dass das Volk insgesamt die Auswirkungen auf die Muskelspikeaktivität einzelner Bienen auffangen kann und keine Schäden davonträgt. Dazu muss allerdings gesagt werden, dass die Völker unter Flugzelten standen, was das Nektar und/oder Pollen sammeln enorm erleichterte, da das Futter direkt ins Volk gegeben wurde und damit nicht mit freifliegenden Völkern verglichen werden kann. Da der Vergleich aber zwischen Versuchs- und Kontrollvölkern gezogen werden soll, die beide unter dem Flugzelt standen, können hierzu keine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Behandlungen festgestellt werden. Im hier beschriebenen Versuch sind die Völker somit in der Lage, die Effekte, die sich an einzelnen Bienen zeigen, im Volk aufzufangen und

damit als Volk zu überleben, was wiederum dem entspricht, was Godfray et al. (2014) vermuten.

Anhand der Analyseergebnisse im Versuchsdurchlauf mit Clothianidin lässt sich erkennen, dass sowohl im angerührten als auch im eingelagerten Futter der Kontrollvölker erwartungsgemäß kein Clothianidin oder dessen Metabolite festgestellt werden konnten. Im Gegensatz dazu wurden im angerührten sowie im eingelagerten Futter der Versuchsvölker jeweils 44 ppb Clothianidin nachgewiesen. Dies entspricht nicht ganz den erwarteten 50 ppb. Eventuell lässt sich dies auf nicht ausreichendes Rühren und damit eine ungleiche Verteilung der Substanz in der großen Menge an Futter zurückführen. Allerdings weisen beide Versuchsvölker in ihrem eingelagerten Futter auch eine Konzentration von 44 ppb auf, was auf eine Ungenauigkeit der Feinwaage beim Einwiegen der Substanz schließen lässt. TZNG (Metabolit von Clothianidin) ließ sich in keiner der Proben nachweisen. Der andere untersuchte Metabolit (TZMU) konnte im eingelagerten Futter der Versuchsvölker nachgewiesen werden, allerdings in einer nicht quantifizierbaren Menge ( $< 1$  ppb) (siehe Tabelle 7). Das eingelagerte Futter haben die Bienen bereits aufgenommen (aus dem Fütterer) und anschließend in den Zellen der Waben als Vorrat eingelagert. Dadurch hat es sich bereits im Honigmagen der Bienen befunden und wurde eventuell zu einem Bruchteil schon metabolisiert. Somit würde sich der nachgewiesene, aber nicht quantifizierbare Anteil an TZMU im eingelagerten Futter erklären. Die Analyseergebnisse der Bienenproben (siehe Tabelle 8) zeigen, dass in den Bienen, die chronisch mit Clothianidin gefüttert wurden, dies auch nachweisbar ist: Bei den Bienen aus Gruppe I wurden 4 ppb Clothianidin, in den Bienen aus Gruppe III 7 ppb festgestellt. Dass dies nicht mit der festgestellten Konzentration im Futter (44 ppb) übereinstimmt, könnte zwei verschiedene Gründe haben. Zum einen befindet sich das aufgenommene Futter im Magen bzw. Darm der Biene. Analysiert wurde aber die ganze Biene, sodass sich die angegebene Konzentration von 4 bzw. 7 ppb auf den gesamten Bienenkörper bezieht und dadurch um ein Vielfaches niedriger ist als im eigentlichen Futter. Zum anderen befanden sich die Bienen, bevor sie eingefroren wurden, noch zwei Stunden im Versuch, wo sie kein Clothianidin mehr zu sich genommen haben und deshalb das vorher chronisch aufgenommene Clothianidin in diesem Zeitraum bereits zu Teilen metabolisieren konnten. Dies zeigt sich auch darin, dass in den Bienen der Gruppen I und III einer der Metabolite von Clothianidin (TZNG) nachgewiesen werden konnte: in

Gruppe I 2 ppb und in Gruppe III 1 ppb. Dies bedeutet aber auch, dass sich das Clothianidin nicht im Körper der Biene ansammelt und aufsummiert, sondern von der Biene abgebaut, metabolisiert und/oder ausgeschieden wird. In den Gruppen II und IV, die mit Kontrollfutter gefüttert wurden, wurde erwartungsgemäß kein Clothianidin oder dessen Metabolite festgestellt. In den Bienen der beiden Gruppen, die zusätzlich akut mit Thiacloprid gefüttert wurden (Gruppen III und IV), ließen sich 43 bzw. 29 ng Thiacloprid pro Biene nachweisen. Auch dies ist eine geringere Menge als die, die tatsächlich gefüttert wurde (250 ng). Aber auch hier liegt der Grund dafür wohl darin, dass die Bienen noch ca. zwei Stunden Zeit hatten, das Thiacloprid zu metabolisieren, bis sie eingefroren wurden. Der untersuchte Metabolit (Thiacloprid-Amid) konnte in den Bienen dieser Gruppen nur in so geringen Mengen nachgewiesen werden, dass er nicht mehr quantifizierbar ist. In den Bienen der Gruppen I und II wurden auch kleine Mengen an Thiacloprid nachgewiesen, nämlich 1,1 ng in Gruppe I und 1,4 ng in Gruppe II. Diese Bienen wurden weder chronisch noch akut mit Thiacloprid gefüttert, daher wurde dieses Ergebnis nicht erwartet. Ein möglicher Grund für dieses Ergebnis könnte bereits vorhandenes Thiacloprid im Wachs der ausgebauten Waben sein. Pestizide sammeln sich durchaus im wiederverwendeten Wachs der Waben an und können sich dort über Jahre hinweg halten (Chauzat & Faucon, 2007). Durch das Aceton im eingelagerten Futter wurde das Thiacloprid aus dem Wachs gelöst und dadurch von den Bienen aufgenommen. Eine andere Möglichkeit ist, dass sich minimale Reste von Thiacloprid bereits vor den Versuchen in den Fütterern befanden, sodass es sich durch das Aceton im neu eingefüllten Futter gelöst hat und mit dem Futter vermischt hat. Das eingelagerte Futter wurde nicht auf Thiacloprid analysiert, weshalb keine Aussage über eventuelle Mengen an Thiacloprid in diesem Futter getroffen werden kann. Da Thiacloprid aber in den Bienen der Gruppen I und II vorgefunden wurde, wird davon ausgegangen, dass es sich auch im eingelagerten Futter in entsprechend kleinen Mengen befand.

Die Analyseergebnisse des Versuchsdurchlaufs mit Thiacloprid zeigen, dass sich sowohl im angerührten als auch im eingelagerten Futter der Kontrollvölker keine messbaren Mengen an Thiacloprid oder dessen Metabolit befinden (siehe Tabelle 10). Lediglich in Kontrollvolk 2 konnte Thiacloprid im eingelagerten Futter nachgewiesen werden, allerdings in einer nicht quantifizierbaren Menge ( $< 1$  ppb). Auch in diesem Fall könnte ein möglicher Grund dafür sein, dass sich in den ausgebauten Waben bereits geringe Mengen

an Thiacloprid befunden haben, was sich dann durch das Aceton im Kontrollfutter gelöst hat und dadurch im eingelagerten Futter festgestellt wurde. Im angerührten Futter für die Versuchsvölker konnten dagegen 4900 ppb Thiacloprid nachgewiesen werden, was fast der gewünschten Konzentration von 5000 ppb entspricht. Kleine Schwankungen können durch nicht ausreichendes Rühren der großen Menge an Futter und damit einer ungleichen Verteilung des Thiacloprids entstanden sein. Im eingelagerten Futter beider Versuchsvölker wurden 4100 ppb Thiacloprid festgestellt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Bienen das eingelagerte Futter bereits aufgenommen haben, bevor sie es dann in den Zellen der Waben eingelagert haben, und damit könnten sie bereits einen kleinen Teil des Thiacloprids metabolisiert haben, wodurch die geringere Konzentration im Gegensatz zum angerührten Futter entstanden ist. Diese Annahme bestätigt sich durch das Vorhandensein von Thiacloprid-Amid im eingelagerten Futter von 8 bzw. 7 ppb. Die Analyseergebnisse der Bienenproben (siehe Tabelle 11) zeigen, dass in den Bienen der Gruppen I und III, die chronisch mit Thiacloprid gefüttert wurden, 140 bzw. 96 ppb Thiacloprid nachgewiesen werden konnten. Auch dies ist deutlich niedriger als die Konzentration im Futter und lässt sich vermutlich auf die Analyse der ganzen Biene und auf die verstrichene Zeit zwischen der letzten Fütterung mit Thiacloprid-Futter und dem Zeitpunkt des Einfrierens zurückführen (siehe oben). Dass bereits Teile des Thiacloprids metabolisiert wurden, zeigt sich auch am Vorhandensein von jeweils 2 ppb des Thiacloprid-Amids in Gruppe I und III. Auch hier wird davon ausgegangen, dass sich das Thiacloprid im Körper der Biene nicht ansammelt, sondern abgebaut und/oder ausgeschieden wird und immer nur so viel vorhanden ist, wie die Biene auch aufnimmt. In den Bienen der Gruppen II und IV, die chronisch mit Kontrollfutter gefüttert wurden, wurde ebenfalls Thiacloprid nachgewiesen, allerdings in einer sehr geringen Konzentration von jeweils 5 ppb. Es ist unklar, wo diese Konzentration an Thiacloprid ihren Ursprung nimmt, da weder im Kontrollfutter Thiacloprid in einer solchen Konzentration festgestellt wurde – lediglich bei einem der Kontrollvölker wurde eine nicht quantifizierbare Menge Thiacloprid im eingelagerten Futter festgestellt – , noch besteht eine Möglichkeit des Austauschs zwischen dem Futter der Kontrollvölker und der Versuchsvölker, da sie sich in getrennten Kompartimenten des Flugzeltes befunden haben. Thiacloprid-Amid konnte in den Bienen dieser beiden Gruppen jedoch nicht nachgewiesen werden. In den Bienen der Gruppen III und IV, die zusätzlich akut mit

Clothianidin gefüttert wurden, ließen sich jeweils 0,5 ng Clothianidin pro Biene nachweisen. Dies entspricht der Hälfte der ursprünglich verfütterten Menge an Clothianidin. Auch hier ist dies auf die verstrichene Zeit zwischen Fütterung und Einfrieren der Bienen zurückzuführen, in der die Bienen schon Anteile des Clothianidins metabolisieren konnten. Allerdings lassen sich in diesen Bienen die untersuchten Metabolite (TZNG und TZMU) nicht nachweisen. In den Bienen der Gruppen I und II, die keine zusätzliche akute Fütterung bekamen, wurde auch kein Clothianidin oder dessen Metabolite nachgewiesen, was wiederum den Erwartungen entspricht.

## 5 Duftlernen beim positiven Patterning unter Einfluss von Clothianidin

### 5.1 Einleitung

In diesem Kapitel geht es um eine komplexe Form des assoziativen Lernens, nämlich um das sogenannte positive Patterning, das zum nicht-elementaren Lernen zählt (siehe auch Kapitel 1.4). Beim positiven Patterning muss die Biene nicht einfach einen Duft erlernen oder ihn von einem anderen Duft unterscheiden können. Ihr werden Einzeldüfte präsentiert, die aber unbelohnt bleiben ( $A^-$ ,  $B^-$ ), und zusätzlich wird ihr ein Duftgemisch aus diesen beiden Einzeldüften präsentiert, das wiederum belohnt wird ( $AB^+$ ). Diese Unterscheidung stellt für die Biene zwar eine schwierige Aufgabe dar, ist aber durchaus lösbar für sie (Deisig et al., 2001). Dies ist allerdings nur dadurch zu erklären, dass das Duftgemisch AB nicht als die einfache Summe aus den Düften A und B betrachtet wird, da die gleichen Stimuli genauso oft belohnt und auch nicht belohnt werden (Devaud et al., 2015). Vielmehr wird die Verarbeitung eines Duftgemisches durch die sogenannte „unique-cue“-Theorie erklärt, welche besagt, dass das Duftgemisch einen für sich typischen Stimulus enthalten muss, der nur in der Kombination der Einzeldüfte (also im Duftgemisch) vorkommt und durch genau diesen dann von den Einzeldüften unterschieden werden kann (Rescorla, 1973). Für solch eine schwierige Unterscheidung sind die Pilzkörper im Gehirn der Biene die entscheidende Struktur. Wie oben bereits erwähnt stellen die Pilzkörper die höheren olfaktorischen Verarbeitungszentren dar. Während sie für das elementare Lernen, zum Beispiel die differenzielle Konditionierung, nicht nötig sind (Malun et al., 2002), sind sie für nicht-elementare Lernaufgaben, wie das positive Patterning, essenziell (Giurfa, 2003; Komischke et al., 2005; Devaud et al., 2015). In den Pilzkörpern findet die Übertragung der olfaktorischen Informationen über nAChRs statt. Clothianidin bindet als Agonist an die nAChRs und besetzt sie damit, wodurch das Acetylcholin nicht mehr daran binden kann. Da die nAChRs eine wichtige Rolle für das Lernen und die Konsolidierung spielen, soll in diesem Versuch nun herausgefunden werden, ob Clothianidin die Bienen in einer komplexen Lernaufgabe wie dem positiven Patterning so beeinflusst, dass sie nicht mehr oder nur noch teilweise in der Lage sind, diese schwierige Unterscheidung zu erlernen.

## 5.2 Material und Methoden

### 5.2.1 Vorbereitung der Bienen

Für diese Versuche standen Vollvölker aus institutseigener Zucht (*Apis mellifera carnica*) in Oberursel (Taunus) am Institut für Bienenkunde bereit. Alle Bienen wurden ausschließlich aus dem gleichen Volk entnommen. Die Bienen wurden am Vortag der Versuche am Stockeingang beim Ausfliegen abgefangen, wodurch man ausschließlich Sammlerinnen als Versuchstiere hat. Das Abfangen geschah mithilfe einer UV-durchlässigen Plexiglaspyramide, die auf beiden Seiten zu öffnen ist (siehe Abbildung 3, rechts), und verlief wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben. Die Gläschen mit den Bienen wurden im Labor auf Eis gelegt, ausschließlich so lange, bis die Bienen bewegungsunfähig waren, da eine zu lang andauernde Kühlung die Lernfähigkeit der Bienen einschränken könnte (Felsenberg et al., 2011). Daraufhin werden sie in kleine Plastikröhrchen überführt (Bitterman et al., 1983). Jede Biene kann ihren Rüssel sowie ihre Antennen frei bewegen, ist aber dennoch im Röhrchen fixiert und gut händelbar. Anschließend wurden die Bienen mithilfe einer Spritze mit einigen Tropfen einer 30 %igen Zuckerlösung [w/V] gefüttert, bis sie satt waren. Über Nacht wurden die Bienen in eine mit feuchten Tüchern ausgelegte abgedunkelte Plastikwanne mit ausreichender Luftversorgung gestellt. Die feuchten Tücher dienen dabei der Aufrechterhaltung der Luftfeuchtigkeit, während die Abdunkelung für die Biene eine natürliche Umgebung darstellt, da es im Volk auch stets dunkel ist. Am nächsten Tag wurden die Bienen vor den Versuchen nochmals mit einem Tropfen Zuckerwasser gefüttert, damit sie für die Dauer der Versuche gut versorgt, aber noch nicht zu satt sind, um das Zuckerwasser in den folgenden Versuchen nach wie vor als Belohnung zu betrachten, da sie so besser lernen als gesättigte Bienen (Friedrich et al., 2004).

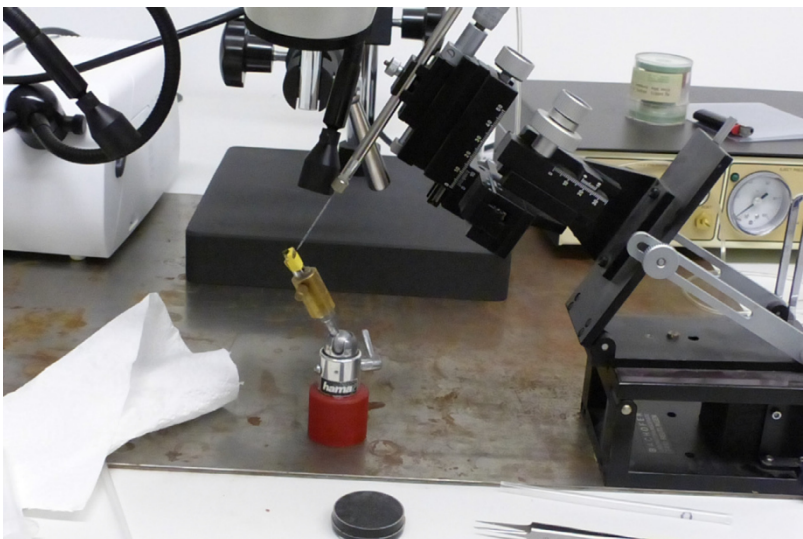
### 5.2.2 Konzentration der Substanzen

In diesem Versuch wurden zwei verschiedene Konzentrationen des Neonikotinoids Clothianidin (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze) verwendet: in der ersten Versuchsreihe 0,25 ng Clothianidin pro Biene, in der zweiten und dritten Versuchsreihe 1 ng Clothianidin pro Biene. Die niedrigere Konzentration entspricht dabei der Konzentration, die in den Versuchen der Muskelableitungen mit Applikation in die Kopfkapsel verwendet wurde (siehe Kapitel 2), während die höhere Konzentration den

Versuchen mit akuter Fütterung (Kapitel 3 und 4) entspricht. Das Clothianidin wird in Aceton (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) vorgelöst und anschließend mit PBS auf die entsprechende Konzentration verdünnt. Die Kontrolllösung besteht ebenfalls aus PBS, in das eine der Versuchslösung entsprechende Menge Aceton gegeben wurde, um Aceton als Auslöser für eventuelle Effekte auszuschließen.

### 5.2.3 Injektion

Die beiden verschiedenen Konzentrationen von Clothianidin wurden in den drei Versuchsreihen folgendermaßen eingesetzt: In der ersten Versuchsreihe wurde den Bienen jeweils 0,25 ng Clothianidin ca. 30 Minuten vor dem Akquisitionstest injiziert, in der zweiten Versuchsreihe wurde jeweils 1 ng Clothianidin ca. 30 Minuten vor dem Akquisitionstest injiziert, während in der dritten Versuchsreihe zwar ebenfalls 1 ng Clothianidin injiziert wurde; dies geschah aber ca. 30 Minuten vor dem 3-Stunden-Abrufftest. Jeder Biene wird für die Injektion mit einer Minutiennadel ein kleines Loch in den Thorax vorgestochen, in welches anschließend eine Injektionsnadel eingeführt wird. Die Injektionsnadel wurde zuvor aus einem Glasröhrchen ( $\varnothing$  0,58 mm) hergestellt. Mithilfe einer Mikroinjektionsapparatur (Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen) wurde nun 1  $\mu$ l der Clothianidin- bzw. Kontrolllösung in den Thorax injiziert (siehe Abbildung 49), dafür wird eine Druckluftpumpe (WPI, Inc., Florida, USA) verwendet. Die Bienen sind somit vorbereitet für die folgenden Konditionierungsversuche.



**Abbildung 49:** Injizieren von Clothianidin bzw. der Kontrolllösung (Foto: Annkathrin Hausmann). In den Thorax der Biene wird mit einer Minutiennadel ein Loch vorgestochen, in das anschließend die Injektionsnadel eingeführt wird. Darin befindet sich bereits die jeweilige Lösung. Diese wird mithilfe einer Druckluftpumpe in den Thorax der Biene injiziert.



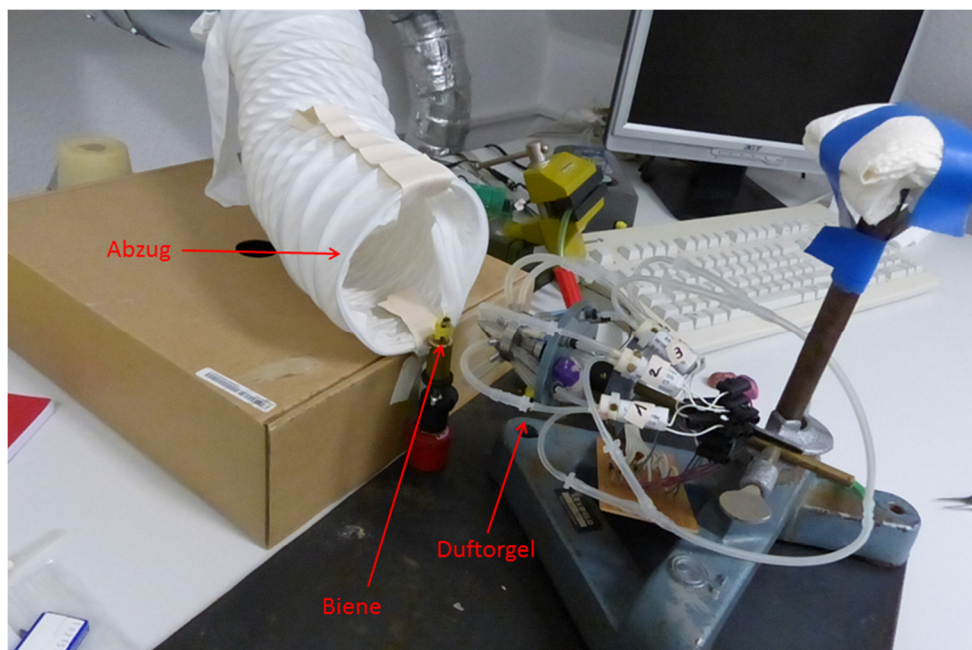
#### 5.2.4 Düfte

Bienen sind in der Lage eine Vielzahl von verschiedenen Düften zu diskriminieren (Laska et al., 1999). Düfte können in verschiedene funktionelle Gruppen eingeteilt werden, zum Beispiel Aldehyde, Alkohole, Terpene oder Ketone. Des Weiteren unterscheiden sie sich in ihrer Kohlenstoff-Kettenlänge. Genau diese beiden Eigenschaften sind wichtig, wenn es für die Biene darum geht, verschiedene Düfte zu unterscheiden. Guerrieri et al. (2005) fanden heraus, dass Bienen verschiedene Düfte am besten unterscheiden können, wenn diese sich sowohl in ihrer funktionellen Gruppe als auch in ihrer Kohlenstoff-Kettenlänge unterscheiden. Somit wurden in den Vorversuchen verschiedene Düfte getestet und letztlich D-Limonen und Hexanal (beide Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze) in den Hauptversuchen verwendet. D-Limonen ( $C_{10}H_{16}$ ) gehört der Gruppe der Terpene an, Hexanal ( $C_6H_{12}O$ ) dagegen ist ein Aldehyd (Laska et al., 1999). Wie an den Summenformeln der beiden Düfte zu sehen ist, unterscheiden sie sich auch in ihrer jeweiligen Kohlenstoff-Kettenlänge. D-Limonen wird von uns Menschen als zitroniger bzw. orangenartiger Duft wahrgenommen, Hexanal als ein Duft ähnlich dem Geruch von Holz.

#### 5.2.5 Versuchsaufbau und -ablauf

Die eigentliche Konditionierung findet in einem extra dafür konstruierten Versuchsaufbau statt. Die Biene, die in ihrem Plastikröhrchen wie oben beschrieben befestigt wurde, wird vor eine sogenannte Duftorgel gesetzt (siehe Abbildung 50). Diese hat sich bereits in früheren Konditionierungsversuchen bewährt und wurde in der Arbeitsgruppe selbst hergestellt. Die Duftorgel ermöglicht eine kontrollierte Konditionierung, in dem Sinne, dass ein ständiger Luftstrom fließt, in den sekundengenau ein Duft eingeschleust werden kann. Die Duftorgel besteht aus mehreren 1 ml-Spritzen, in die manuell jeweils ein Stück Filterpapier gelegt wird, welches mit 6  $\mu$ l eines Duftes getränkt ist. Außerdem befinden sich an der Duftorgel Schläuche, über die der ständige Luftstrom in Richtung der Biene fließt. Dieser Luftstrom wird durch eine handelsübliche Aquariumpumpe erzeugt und über einen Kunststoffschlauch zur Duftorgel transportiert. Der Kunststoffschlauch wird mit einer Klemme verengt, da der Luftstrom sonst zu stark für die Biene wäre. Der permanente Luftstrom sorgt dafür, dass die Bienen die Belohnung mit dem Duft und nicht allein mit dem Luftstrom assoziieren. Soll nun ein Duft in den Luftstrom gelangen, geschieht dies über eine R8 Platine (BMC Messsysteme GmbH), die über eine

USB-P10-Schnittstelle (BMS Messsysteme GmbH) mit einem Computer verbunden ist und mit der die Ventile der Anlage bedient werden können. Der Luftstrom läuft somit entweder über die Schläuche direkt zum Ausgang und liefert reine Luft zur Biene, oder er läuft (auf Befehl) über eine oder mehrere der Spritzen und transportiert damit einen Duft oder ein Duftgemisch zur Biene. Für diese Ventilsteuerung sind zwei Computerprogramme nötig: zum einen ST-MEMPIO Control Utility (BMC Messsysteme GmbH), zum anderen Odorstim 2.0 (Tilman Franke). Durch Letzteres lässt sich die genaue Dauer der Duftpräsentation einstellen. Damit die Biene nicht in einer „Duftwolke“ sitzt, befindet sich ca. 10 cm hinter ihr ein Abzug, der die Düfte nach der Präsentation direkt wieder absaugt (siehe Abbildung 50).



**Abbildung 50:** Versuchsaufbau für die Konditionierung (Foto: verändert nach Annkathrin Hausmann). Die Biene ist in ein Röhrchen eingespannt und sitzt vor der Duftorgel. Diese ist mit mehreren 1 ml-Spritzen ausgestattet, in denen sich jeweils die verschiedenen Düfte auf Filterpapier befinden. Die Spitze der Duftorgel ist auf den Kopf der Biene gerichtet. Hinter der Biene befindet sich ein Abzug, um die Düfte schnell wieder abzusaugen.

In Abbildung 51 und Abbildung 52 ist der Ablauf eines Konditionierungsvorgangs dargestellt. In Abbildung 51 handelt es sich um den Ablauf der ersten und zweiten Versuchsreihe, in Abbildung 52 dagegen um den Ablauf der dritten Versuchsreihe.



**Abbildung 51:** Ablauf der Konditionierung in der ersten und zweiten Versuchsreihe.

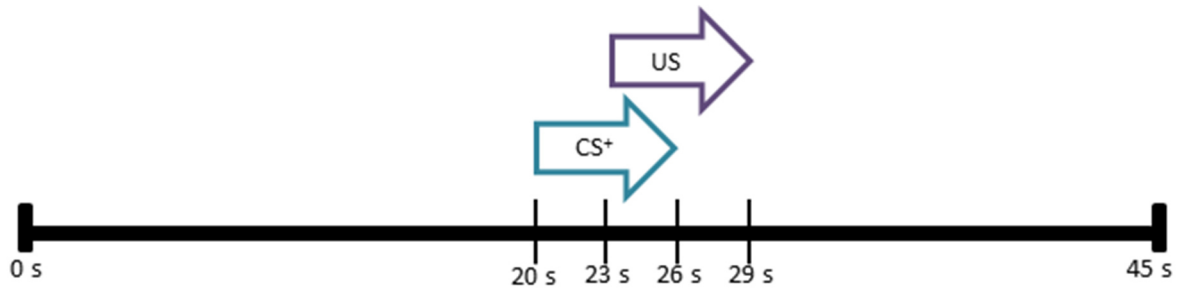
Zunächst erfolgt ein Vortest, in dem den Bienen die Einzeldüfte und das Duftgemisch präsentiert werden. Die Injektion (0,25 ng Clothianidin Versuchsreihe 1; 1 ng Clothianidin in Versuchsreihe 2) findet anschließend und damit direkt vor dem darauffolgenden Akquisitionstest statt. Die Abbruchtests erfolgen nach 3 bzw. 19 Stunden.



**Abbildung 52:** Ablauf der Konditionierung in der dritten Versuchsreihe.

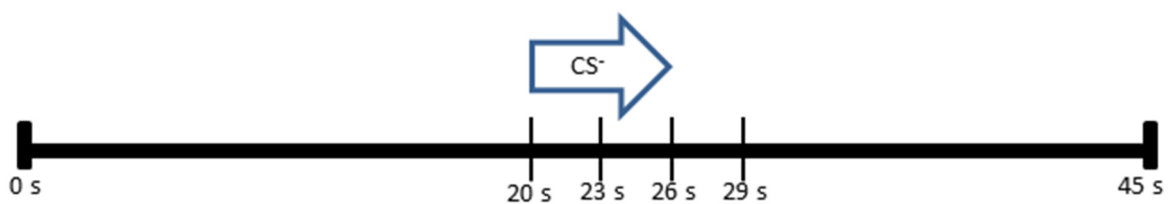
Ablauf wie oben mit einer Ausnahme: Die Injektion (1 ng Clothianidin) findet erst nach dem Akquisitionstest, sprich direkt vor dem 3-Stunden-Abbruchtest statt.

Jeder dieser Abläufe beginnt damit, dass die Biene mit einem mit Zuckerwasser benetzten Zahnstocher getestet wird, das heißt es wird überprüft, ob die Biene überhaupt einen PER zeigt, wenn das Zuckerwasser an ihre Antennen bzw. Rüssel gehalten wird. Ist dies nicht der Fall, wird die Biene aussortiert, weil dann keine Konditionierung an ihr durchgeführt werden kann, für die der PER notwendig ist. Als Nächstes folgt ein Vortest: Die beiden Einzeldüfte A<sup>-</sup> und B<sup>-</sup> (D-Limonen und Hexanal) bzw. das Duftgemisch AB<sup>+</sup> (D-Limonen + Hexanal) werden der Biene präsentiert und es wird notiert, ob die Biene darauf mit einem PER reagiert. Damit wird überprüft, ob sie eine Spontanreaktion auf die Düfte zeigt. Bei Versuchsreihe 1 und 2 folgt daraufhin die Injektion, in Versuchsreihe 3 findet diese zu einem späteren Zeitpunkt statt (siehe Abbildung 52). Die Injektion dauert für alle Tiere insgesamt ca. 30 Minuten. Anschließend finden die Akquisitionstests statt: Jeder Biene werden sechsmal die unbelohnten Einzeldüfte (A<sup>-</sup>, B<sup>-</sup>) und sechsmal das belohnte Duftgemisch (AB<sup>+</sup>) alternierend präsentiert. Die Zeitabstände zwischen den Lernakten (ITI) hängt von der Anzahl der zu konditionierenden Bienen ab und betrug in den Versuchsreihen 1 und 2 ca. 15 bis 18 Minuten, bei Versuchsreihe 3 ca. 22 Minuten, und damit deutlich über den erforderlichen 10 Minuten (siehe Kapitel 1.4). Der Ablauf eines einzelnen Lernaktes ist in Abbildung 53 und Abbildung 54 dargestellt.



**Abbildung 53:** Ablauf eines belohnten Lernaktes ( $AB^+$ ).

Die Biene befindet sich für 45 Sekunden vor der Duftorgel. Ab Sekunde 20 wird ihr das Duftgemisch präsentiert (bis Sekunde 26). Ab Sekunde 23 kommt die Belohnung (Zuckerwasser) hinzu (bis Sekunde 29), sodass sich die beiden Stimuli für 3 Sekunden überlappen.



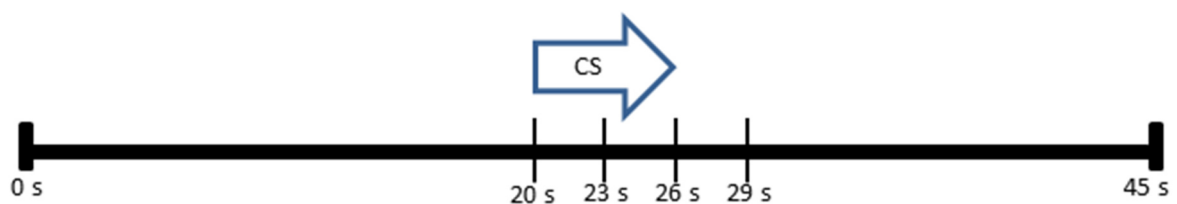
**Abbildung 54:** Ablauf eines unbelohnten Lernaktes ( $A^-$  bzw.  $B^-$ ).

Die Biene befindet sich für 45 Sekunden vor der Duftorgel. Ab Sekunde 20 wird ihr einer der Einzeldüfte präsentiert (bis Sekunde 26). Es erfolgt keine Belohnung.

Jeder einzelne Lernakt dauert 45 Sekunden pro Biene. Bei Sekunde 0 wird die Biene vor die Duftorgel gesetzt und hat 20 Sekunden Zeit, sich an diese Situation und den Luftstrom zu gewöhnen, um ein Kontextlernen zu vermeiden. Ab Sekunde 20 wird der  $CS^+$  (Duftgemisch) oder einer der  $CS^-$  (Einzelduft) für die Dauer von sechs Sekunden präsentiert. Drei Sekunden nach Einsetzen des Duftes wird, im Falle eines belohnten Lernaktes, der US (Zuckerwasser) an die Antennen und den Rüssel gehalten. Auch dies geschieht für die Dauer von sechs Sekunden. Der  $CS^+$  und der US überlappen sich dadurch um drei Sekunden (ISI) (siehe dazu auch Kapitel 1.4). Im Falle eines unbelohnten Lernaktes wird kein US präsentiert (Abbildung 54). Die Biene verbleibt bis Sekunde 45 vor der Duftorgel (ohne weitere Behandlung) und wird dann zurückgesetzt. Im Anschluss an die Akquisitionsphase werden die Bienen jeweils mit einem Tropfen Zuckerwasser gefüttert.

Der erste Abrufttest erfolgt nach drei Stunden. In Versuchsreihe 3 wird direkt vor diesem Abrufttest die Injektion vorgenommen, die in Versuchsreihen 1 und 2 bereits vor dem Akquisitionstest durchgeführt wurde (siehe Abbildung 51 und Abbildung 52). Auch hier verbleibt die Biene (wie im Akquisitionstest) pro Trial für insgesamt 45 Sekunden vor der

Duftorgel. Nach 20 Sekunden wird der Duft bzw. das Duftgemisch sechs Sekunden lang präsentiert, anschließend verbleibt die Biene bis Sekunde 45 vor der Duftorgel (siehe Abbildung 55). Während des Abrufttests werden der Biene sowohl die Einzeldüfte als auch das Duftgemisch präsentiert, das heißt, dass immer ein Duft bzw. das Duftgemisch allen Bienen der Reihe nach präsentiert wurde, anschließend der nächste Duft usw., also ein Duft/Duftgemisch pro Trial. Die Reaktion der Biene, das heißt, ob sie einen PER zeigt oder nicht, wird dabei notiert. Der zweite Abrufttest erfolgt nach 18 Stunden (Versuchsreihe 3) bzw. nach 19 Stunden (Versuchsreihen 1 und 2), um den Transfer in das LTM zu überprüfen.



**Abbildung 55:** Ablauf eines Abrufttests.

Die Biene befindet sich für 45 Sekunden vor der Duftorgel. Ab Sekunde 20 wird ihr einer der Einzeldüfte bzw. das Duftgemisch präsentiert (bis Sekunde 26). Die PER-Reaktion jeder einzelnen Biene wird notiert.

Das zuvor erwähnte ITI beträgt auch hier ca. 15 bis 18 Minuten bei den Versuchsreihen 1 und 2 bzw. ca. 22 Minuten bei Versuchsreihe 3. Nach Abschluss des letzten Abrufttests wird allen Bienen noch einmal der Zuckerstimulus präsentiert und überprüft, ob jede Biene noch einen PER zeigt. Damit wird kontrolliert, ob eine Biene nicht mehr auf einen Duft reagiert hat, obwohl sie ihn richtig gelernt hat, und dies nur aus anderen Gründen nicht tut, weil sie beispielsweise keinen Hunger mehr hatte oder ihr Rüssel eingeklemmt war etc. Bienen, die bei diesem Test am Ende keinen PER zeigen, werden aus der Wertung genommen, da nicht klar ist, ob sie nicht gelernt oder aus sonstigen Gründen nicht reagiert haben.

### 5.2.6 Auswertung

Ausgewertet wurden ausschließlich Bienen, die in der letzten PER-Kontrolle (nach allen Tests) diesen auch gezeigt haben. Des Weiteren wurden Bienen aussortiert, die während des Akquisitionstests bzw. des Abrufttests nach 3 Stunden gestorben sind. Bienen, die bis zum Abrufttest nach 18 bzw. 19 Stunden gestorben waren, wurden nur in der Auswertung dieses Abrufttests nicht berücksichtigt. Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Excel 2010 (Microsoft Office Standard, Microsoft Corporation). Für die statistische

Auswertung wurde der Fisher's Exact Test herangezogen (<http://www.langsrud.com/-stat/Fishertest.htm>).

### 5.3 Ergebnisse

#### 5.3.1 Sterberaten

Da in der Versuchsgruppe der Versuchsreihe 2 auffällig viele Bienen über Nacht, also noch vor dem 19-Stunden-Abrufstest, starben, wurden die Sterberaten der einzelnen Gruppen der drei Versuchsreihen errechnet (siehe Tabelle 12).

**Tabelle 12:** Sterberaten der verschiedenen Versuchsreihen.

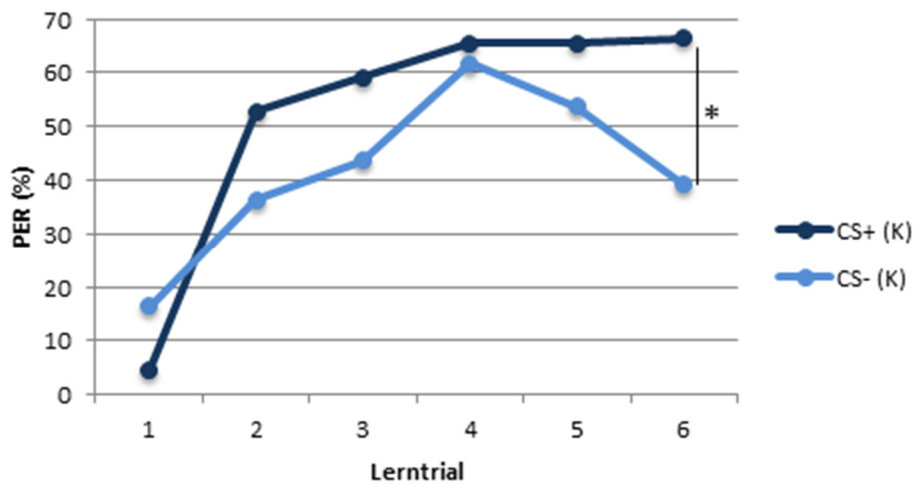
Gezeigt sind die tatsächlichen Anzahlen der Bienen (sortiert nach Versuchsreihe und Gruppe), die in den jeweiligen Tests eingesetzt wurden, und die daraus resultierende Sterberate.

Versuchsreihe	Behandlung	Anzahl der Tiere: Akquisitions- bzw. 3h-Abrufstest	Anzahl der Tiere: 18 bzw. 19h-Abrufstest	Sterberate [%]
1	0,25 ng Clothianidin	116	93	19,8
	Kontrolle	110	95	13,6
2	1 ng Clothianidin	106	61	42,5
	Kontrolle	107	86	19,6
3	1 ng Clothianidin (vor Abrufstest)	71	69	2,8
	Kontrolle (vor Abrufstest)	74	73	1,4

Tatsächlich lässt sich in Tabelle 12 erkennen, dass in der Versuchsgruppe der Versuchsreihe 2 deutlich mehr Bienen über Nacht starben als in allen anderen Gruppen. Mit 42,5 % liegt die Sterberate mehr als doppelt so hoch wie bei allen anderen Gruppen. Innerhalb der Versuchsreihen 1 und 3 zeigen sich keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der Versuchs- und der Kontrollgruppen (getestet mit Fisher's Exact Test). In Versuchsreihe 2 dagegen ist der Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe signifikant, mit einem p-Wert von 0,00036 (Fisher's Exact Test;  $p \leq 0,05$ ).

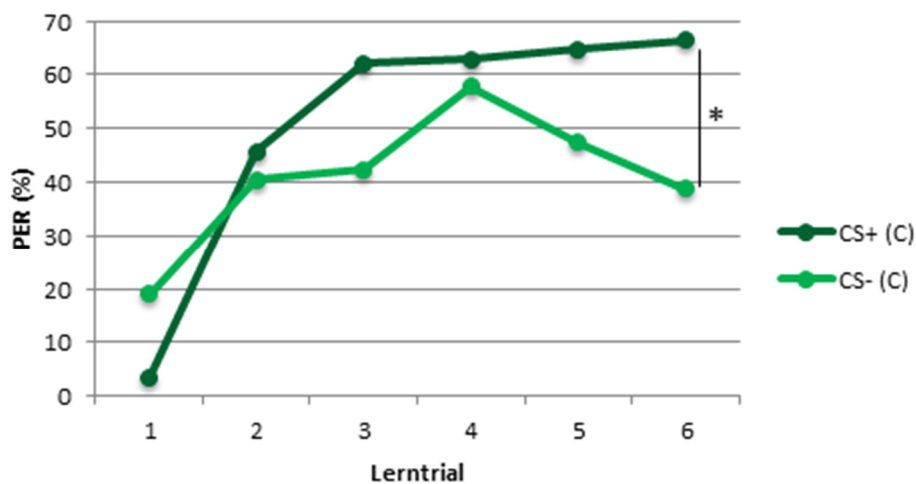
### 5.3.2 Versuchsreihe 1: 0,25 ng Clothianidin vor Akquisitionstest injiziert

In dieser Versuchsreihe wurden 0,25 ng Clothianidin bzw. die Kontrolllösung ca. 30 Minuten vor dem Akquisitionstest in den Thorax injiziert. Der Verlauf der Akquisitionskurven ist in Abbildung 56 für die Kontrollgruppe und in Abbildung 57 für die Versuchsgruppe dargestellt.



**Abbildung 56:** Akquisitionstest der Kontrollgruppe (n = 110).

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Bienen, die im jeweiligen Lerntrial auf den CS<sup>+</sup> bzw. auf den CS<sup>-</sup> mit einem PER geantwortet haben. Es ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem CS<sup>+</sup> und dem CS<sup>-</sup> ( $p = 0,0000821$ );  $*p \leq 0,05$  Fisher's Exact Test.

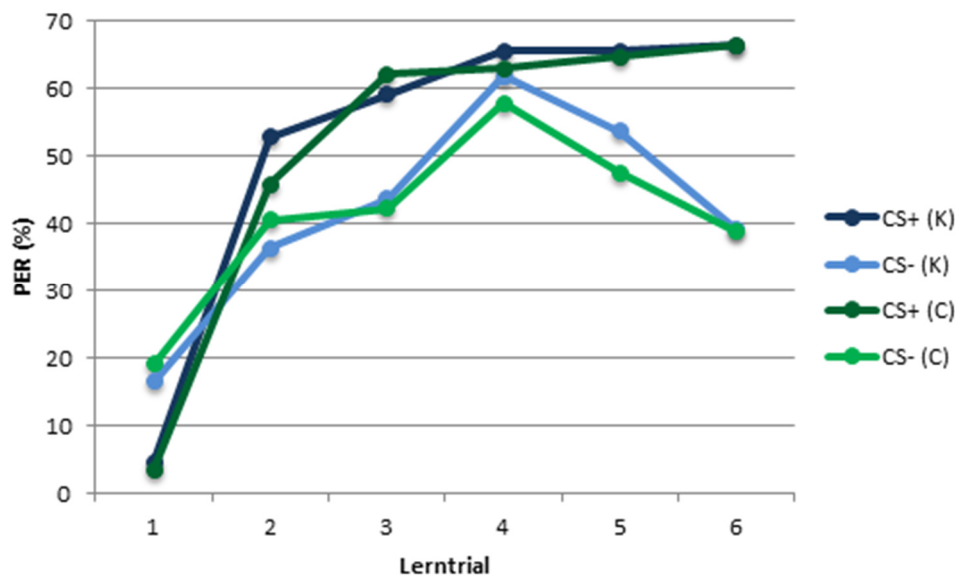


**Abbildung 57:** Akquisitionstest der Versuchsgruppe (n = 116).

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Bienen, die im jeweiligen Lerntrial auf den CS<sup>+</sup> bzw. auf den CS<sup>-</sup> mit einem PER geantwortet haben. Es ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem CS<sup>+</sup> und dem CS<sup>-</sup> ( $p = 0,0000414$ );  $*p \leq 0,05$  Fisher's Exact Test.

Wie in den Abbildungen oben zu erkennen ist, verlaufen die Akquisitionskurven der Kontroll- und der Versuchsgruppe recht ähnlich. Die Kurve für den CS<sup>+</sup> beginnt jeweils niedriger als die Kurve des CS<sup>-</sup>, steigt dann aber steiler an. Die Kurve des CS<sup>-</sup> fällt nach

Lerntrial 4 wieder ab – ab diesem Trial haben die Bienen gelernt, den CS<sup>+</sup> und den CS<sup>-</sup> zu unterscheiden. Letztlich unterscheiden sich die PER-Reaktionsraten für den CS<sup>+</sup> und den CS<sup>-</sup> beim 6. Lerntrial signifikant voneinander (Kontrolle:  $p = 0,0000821$ ; Clothianidin:  $p = 0,0000414$ ). Vergleicht man die Kurven für die Kontroll- und die Versuchsgruppe in einer Abbildung, ergibt sich folgendes Bild (Abbildung 58).

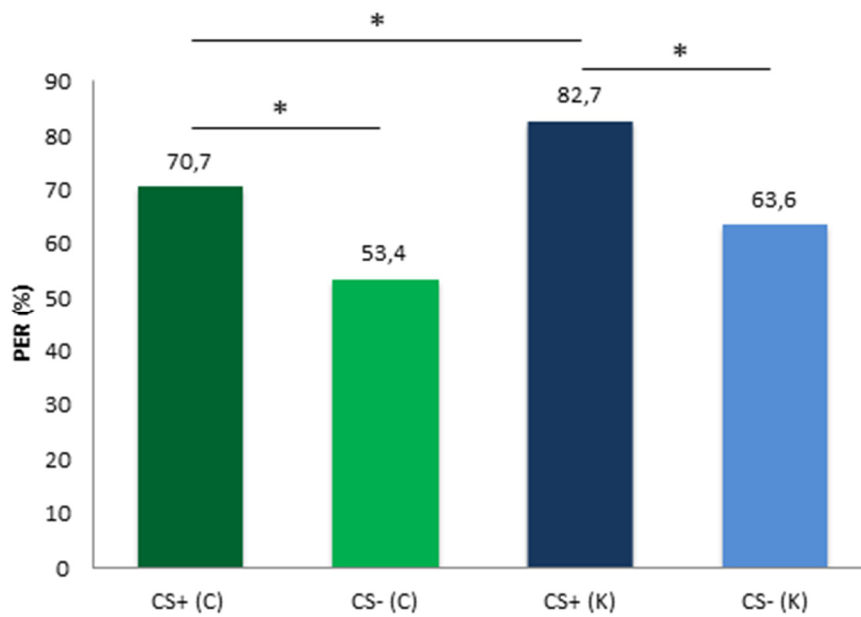


**Abbildung 58:** Akquisitionstest der Kontroll- (K:  $n = 110$ ) und der Versuchsgruppe (C:  $n = 116$ ) im Vergleich. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede für den CS<sup>+</sup> und den CS<sup>-</sup> zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe;  $p \leq 0,05$  Fisher's Exact Test.

Die Akquisitionskurven für CS<sup>+</sup> und CS<sup>-</sup> verlaufen für die Kontroll- und die Versuchsgruppe nahezu identisch und weisen keine signifikanten Unterschiede auf.

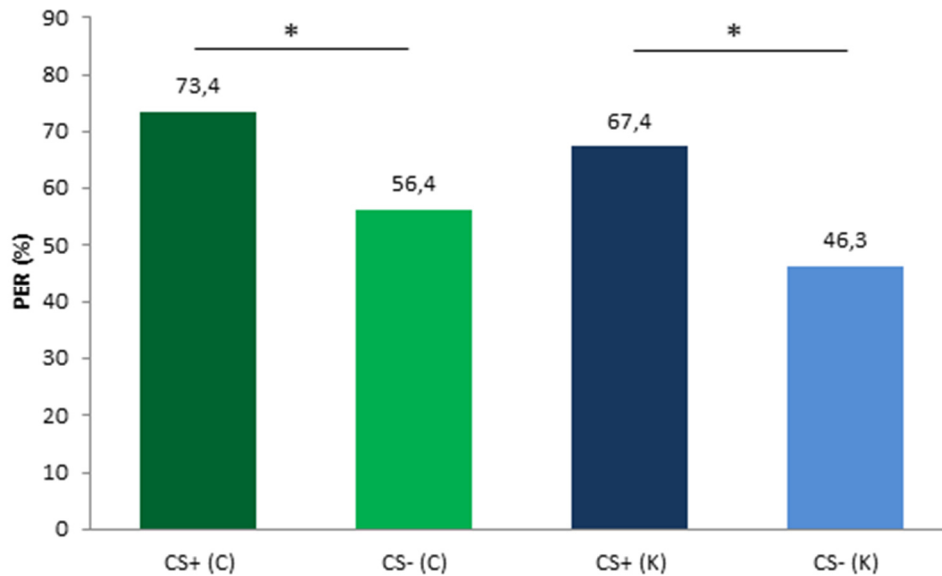
Die Abrufttests fanden in dieser Versuchsreihe 3 Stunden und 19 Stunden nach Beendigung des Akquisitionstests statt. Die Abrufttests dienen der Überprüfung, ob die Bienen gelernt haben, zwischen dem Duftgemisch (CS<sup>+</sup>) und den Einzeldüften (CS<sup>-</sup>) zu unterscheiden, und ob das Gelernte damit ins Langzeitgedächtnis übergegangen ist. Die Ergebnisse des Abrufttests nach 3 Stunden sind in Abbildung 59 dargestellt.





**Abbildung 59:** Abrufttest der Versuchs- (n = 116) und der Kontrollgruppe (n = 110) nach 3 Stunden. Es ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen dem CS<sup>+</sup> und dem CS<sup>-</sup> der Versuchsgruppe (p = 0,00996) und der Kontrollgruppe (p = 0,00218) sowie beim CS<sup>+</sup> zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe (p = 0,041); \*p ≤ 0,05 Fisher's Exact Test.

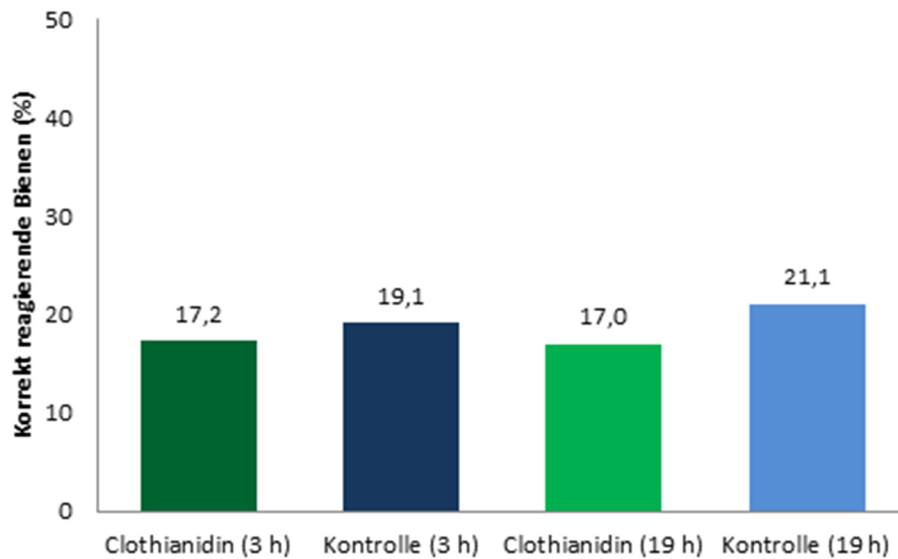
Beim Abrufttest nach 3 Stunden ergeben sich signifikante Unterschiede innerhalb der Kontroll- bzw. der Versuchsgruppe zwischen dem belohnten (CS<sup>+</sup>) und dem unbelohnten Stimulus (CS<sup>-</sup>). Die PER-Reaktionsrate liegt beim CS<sup>+</sup> signifikant höher als beim CS<sup>-</sup>. In beiden Gruppen reagieren mehr Bienen auf das belohnte Duftgemisch als auf die unbelohnten Einzeldüfte. Außerdem ergibt sich ein signifikanter Unterschied für den CS<sup>+</sup> zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe. Die PER-Reaktionsrate auf den CS<sup>+</sup> liegt bei der Kontrollgruppe signifikant höher als bei der Versuchsgruppe.



**Abbildung 60:** Abruftest der Versuchs- (n = 93) und der Kontrollgruppe (n = 95) nach 19 Stunden. Es ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen dem CS<sup>+</sup> und dem CS<sup>-</sup> der Versuchsgruppe (p = 0,0216) und der Kontrollgruppe (p = 0,0052); \*p ≤ 0,05 Fisher's Exact Test.

Auch beim Abruftest nach 19 Stunden (siehe Abbildung 60) ergeben sich innerhalb der Kontroll- bzw. der Versuchsgruppe signifikante Unterschiede zwischen dem belohnten Duftgemisch und den unbelohnten Einzeldüften. Die PER-Reaktionsrate liegt beim CS<sup>+</sup> signifikant höher als beim CS<sup>-</sup>. In beiden Gruppen reagieren mehr Bienen auf den belohnten Stimulus (CS<sup>+</sup>) als auf den unbelohnten Stimulus (CS<sup>-</sup>).

Betrachtet man die eigentliche Lernrate der Bienen, also wie viele Bienen tatsächlich korrekt mit einem PER auf das Duftgemisch (CS<sup>+</sup>) und gleichzeitig nicht auf die Einzeldüfte (CS<sup>-</sup>) reagieren, ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 61).

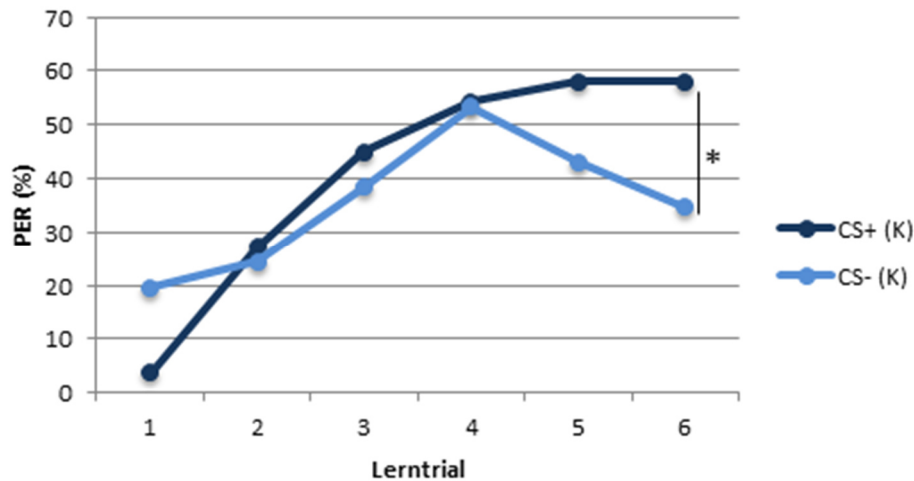


**Abbildung 61:** Lernraten der Versuchs- und der Kontrollgruppe zu den beiden Abrufttests (3 h und 19 h). Kontrolle (3 h): n = 110, Clothianidin (3 h): n = 116, Kontrolle (19 h): n = 95, Clothianidin (19 h): n = 93; Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede;  $p \leq 0,05$  Fisher's Exact Test.

Die Lernrate der Versuchsgruppe, der 0,25 ng Clothianidin injiziert wurde, liegt bei ca. 17 %, während die der Kontrollgruppe bei ca. 20 % liegt. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

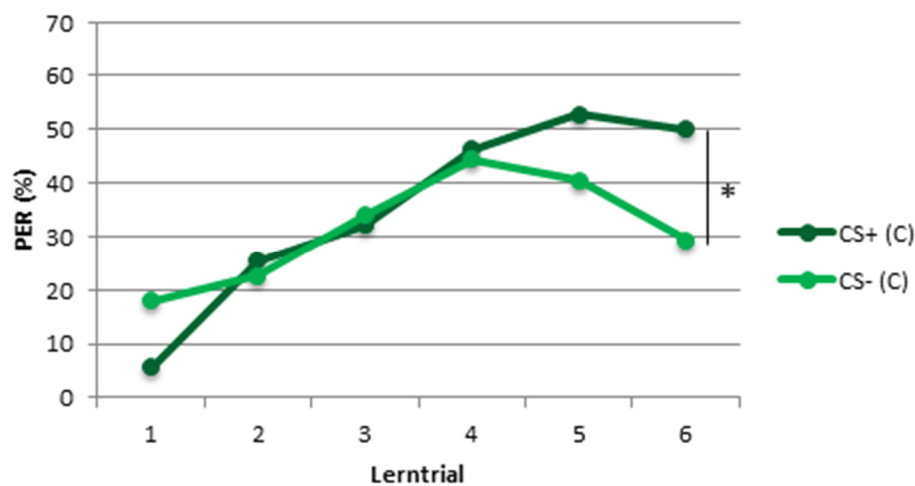
### 5.3.3 Versuchsreihe 2: 1 ng Clothianidin vor Akquisitionstest injiziert

In der zweiten Versuchsreihe wurde 1 ng Clothianidin bzw. die Kontrolllösung ca. 30 Minuten vor dem Akquisitionstest in den Thorax der Bienen injiziert. Der Verlauf der Akquisitionskurven ist in Abbildung 62 für die Kontrollgruppe und in Abbildung 63 für die Versuchsgruppe dargestellt.



**Abbildung 62:** Akquisitionstest der Kontrollgruppe (n = 107).

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Bienen, die im jeweiligen Lerntrial auf den CS<sup>+</sup> bzw. auf den CS<sup>-</sup> mit einem PER geantwortet haben. Es ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem CS<sup>+</sup> und dem CS<sup>-</sup> ( $p = 0,00095$ ); \* $p \leq 0,05$  Fisher's Exact Test.

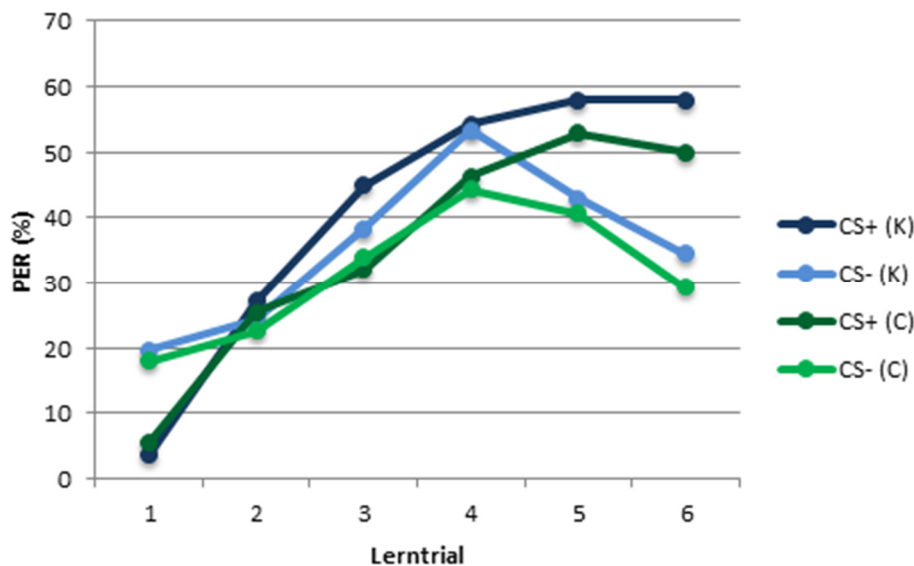


**Abbildung 63:** Akquisitionstest der Versuchsgruppe (n = 106).

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Bienen, die im jeweiligen Lerntrial auf den CS<sup>+</sup> bzw. auf den CS<sup>-</sup> mit einem PER geantwortet haben. Es ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem CS<sup>+</sup> und dem CS<sup>-</sup> ( $p = 0,0031$ ); \* $p \leq 0,05$  Fisher's Exact Test.

Auch in dieser Versuchsreihe verlaufen die Akquisitionskurven der beiden Gruppen für den CS<sup>+</sup> und den CS<sup>-</sup> recht ähnlich. Es zeigt sich der normale Verlauf, bei dem zu Anfang wenige Bienen mit einem PER auf den belohnten und den unbelohnten Duft reagieren, anschließend die Reaktionsrate ansteigt, um dann ab dem 4. Lerntrial auseinanderzudriften, indem die Kurve für den unbelohnten Duft absinkt und die für den belohnten Duft weiter steigt. Beim 6. Lerntrial unterscheiden sich die beiden Kurven signifikant voneinander (Kontrolle:  $p = 0,00095$ ; Clothianidin:  $p = 0,0031$ ). Auch hier

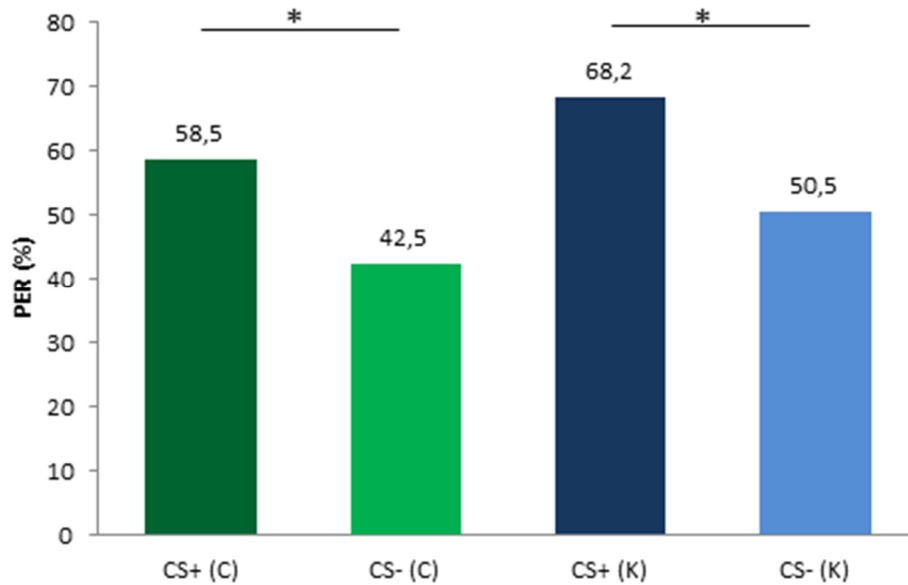
werden die Kurven zum besseren Vergleich nochmals in einer Grafik dargestellt (Abbildung 64).



**Abbildung 64:** Akquisitionstest der Kontroll- (K: n = 107) und der Versuchsgruppe (C: n = 106) im Vergleich. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede für den CS<sup>+</sup> und den CS<sup>-</sup> zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe;  $p \leq 0,05$  Fisher's Exact Test.

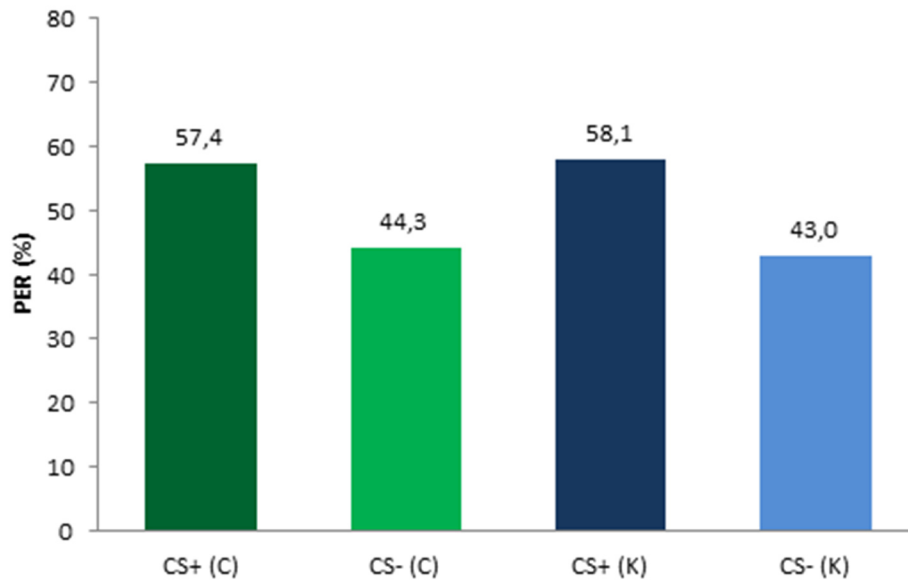
Die Reaktionsraten auf den CS<sup>+</sup> bzw. den CS<sup>-</sup> der beiden Gruppen verlaufen nicht ganz so ähnlich wie in Versuchsreihe 1, aber auch hier ist deutlich zu erkennen, dass es keine großen bzw. vor allem auch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe gibt.

Die Abrufttests fanden in dieser Versuchsreihe nach 3 Stunden und nach 19 Stunden statt. Die Reaktionsraten des Abrufttests nach 3 Stunden sind in Abbildung 65 abgebildet.



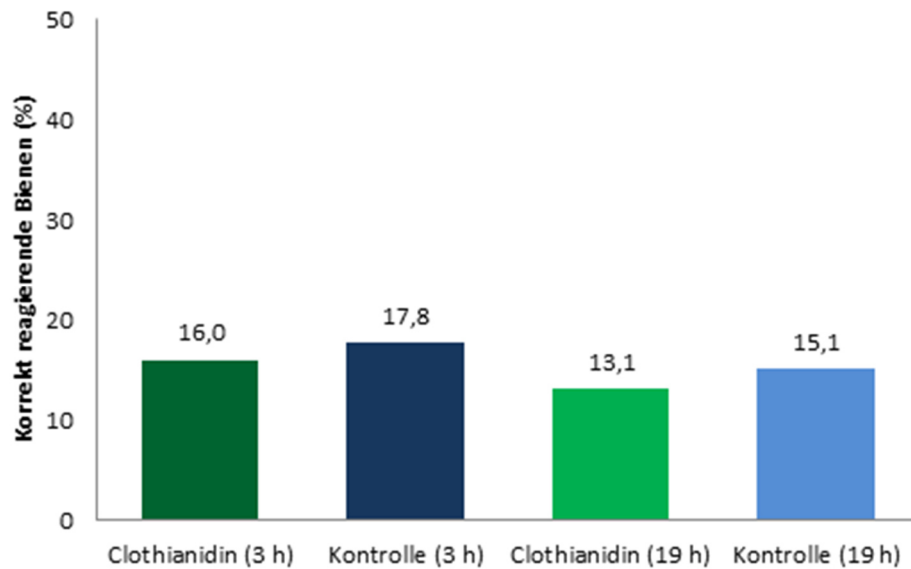
**Abbildung 65:** Abrufttest der Versuchs- (n = 106) und der Kontrollgruppe (n = 107) nach 3 Stunden. Es ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen dem CS<sup>+</sup> und dem CS<sup>-</sup> der Versuchsgruppe (p = 0,028) und der Kontrollgruppe (p = 0,012); \*p ≤ 0,05 Fisher's Exact Test.

Der Abrufttest nach 3 Stunden zeigt auch hier signifikante Unterschiede innerhalb der Kontroll- bzw. der Versuchsgruppe zwischen dem belohnten Duftgemisch (CS<sup>+</sup>) und dem unbelohnten Einzelduft (CS<sup>-</sup>). Zwischen der mit Clothianidin behandelten und der Kontrollgruppe ergeben sich hier ebenfalls keine signifikanten Unterschiede, wobei die Reaktionsraten der Versuchsgruppe jeweils unterhalb der Reaktionsraten der Kontrollgruppe liegen.



**Abbildung 66:** Abrufttest der Versuchs- (n = 61) und der Kontrollgruppe (n = 86) nach 19 Stunden. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede;  $p \leq 0,05$  Fisher's Exact Test.

Beim Abrufttest nach 19 Stunden (siehe Abbildung 66) ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Versuchs- und die Kontrollgruppe unterscheiden sich auch hier in keiner Weise, im Gegenteil sind die Werte der Reaktionsrate auf den CS<sup>+</sup> und den CS<sup>-</sup> jeweils nahezu identisch in den beiden Gruppen. Die Reaktionsraten auf den CS<sup>+</sup> und den CS<sup>-</sup> unterscheiden sich in diesem Fall auch nicht signifikant, jedoch ist eine deutliche Tendenz zu sehen, dass jeweils mehr Bienen auf das belohnte Duftgemisch (CS<sup>+</sup>) als auf die unbelohnten Einzeldüfte (CS<sup>-</sup>) reagieren.



**Abbildung 67:** Lernraten der Versuchs- und der Kontrollgruppe zu den beiden Abrufttests (3 h und 19 h). Kontrolle (3 h): n = 107, Clothianidin (3 h): n = 106, Kontrolle (19 h): n = 86, Clothianidin (19 h): n = 61; Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede;  $p \leq 0,05$  Fisher's Exact Test.

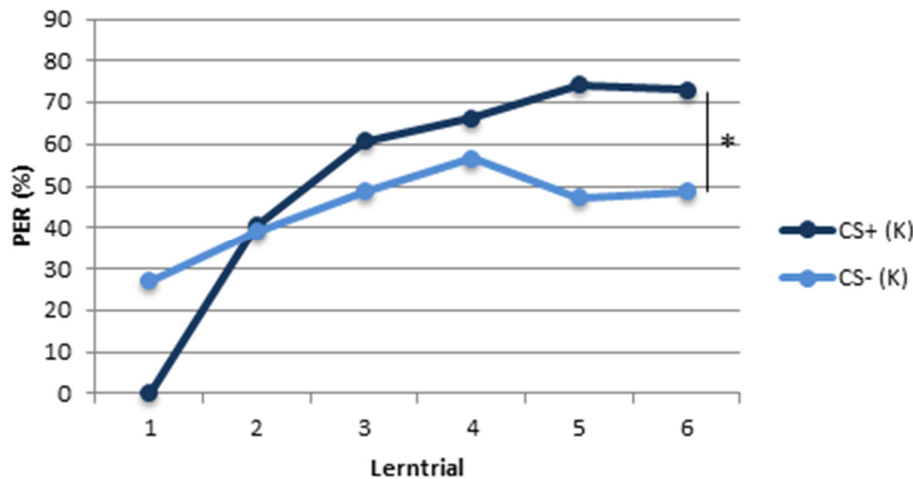
Bei den Lernraten ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe (siehe Abbildung 67). Die Lernraten beim Abrufttest nach 19 Stunden liegen niedriger als beim Abrufttest nach 3 Stunden. Auch liegt die Lernrate in dieser Versuchsreihe insgesamt niedriger als in Versuchsreihe 1.

Da in dieser Versuchsreihe in der Versuchsgruppe deutlich mehr Bienen über Nacht starben als in allen anderen Gruppen, wurde untersucht, ob die Ergebnisse des Akquisitionstests bzw. der Abrufttests davon beeinflusst wurden. Dies war aber nicht der Fall. Bienen, die über Nacht, also bis zum 19-Stunden-Abrufttest, starben, lernten deswegen nicht schlechter oder weniger als Bienen, die den gesamten Versuch überlebten, weder in der Versuchs- noch in der Kontrollgruppe (Ergebnisse nicht dargestellt).

#### 5.3.4 Versuchsreihe 3: 1 ng Clothianidin vor Abrufttest 3 h injiziert

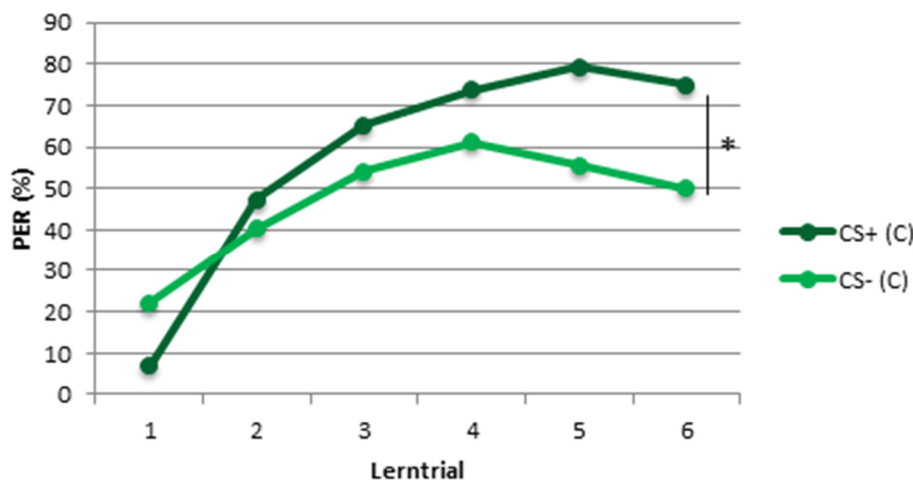
In Versuchsreihe 3 wurde 1 ng Clothianidin bzw. die Kontrolllösung ca. 30 Minuten vor dem ersten Abrufttest (3 Stunden) in den Thorax der Bienen injiziert. Der Verlauf der Akquisitionskurven ist in Abbildung 68 für die Kontrollgruppe und in Abbildung 69 für die Versuchsgruppe dargestellt.





**Abbildung 68:** Akquisitionstest der Kontrollgruppe (n = 74).

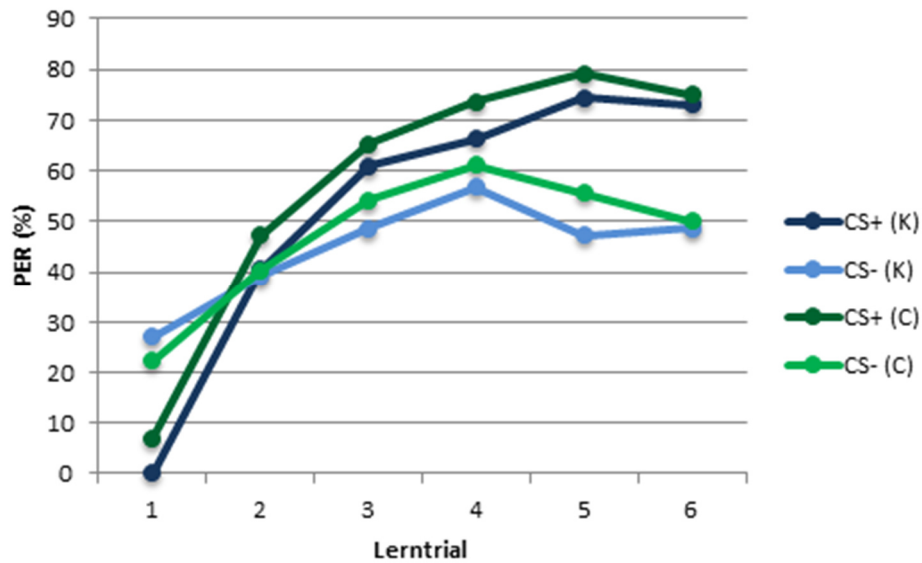
Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Bienen, die im jeweiligen Lertrial auf den CS<sup>+</sup> bzw. auf den CS<sup>-</sup> mit einem PER geantwortet haben. Es ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem CS<sup>+</sup> und dem CS<sup>-</sup> (p = 0,004); \*p ≤ 0,05 Fisher's Exact Test.



**Abbildung 69:** Akquisitionstest der Versuchsgruppe (n = 71).

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Bienen, die im jeweiligen Lertrial auf den CS<sup>+</sup> bzw. auf den CS<sup>-</sup> mit einem PER geantwortet haben. Es ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem CS<sup>+</sup> und dem CS<sup>-</sup> (p = 0,003); \*p ≤ 0,05 Fisher's Exact Test

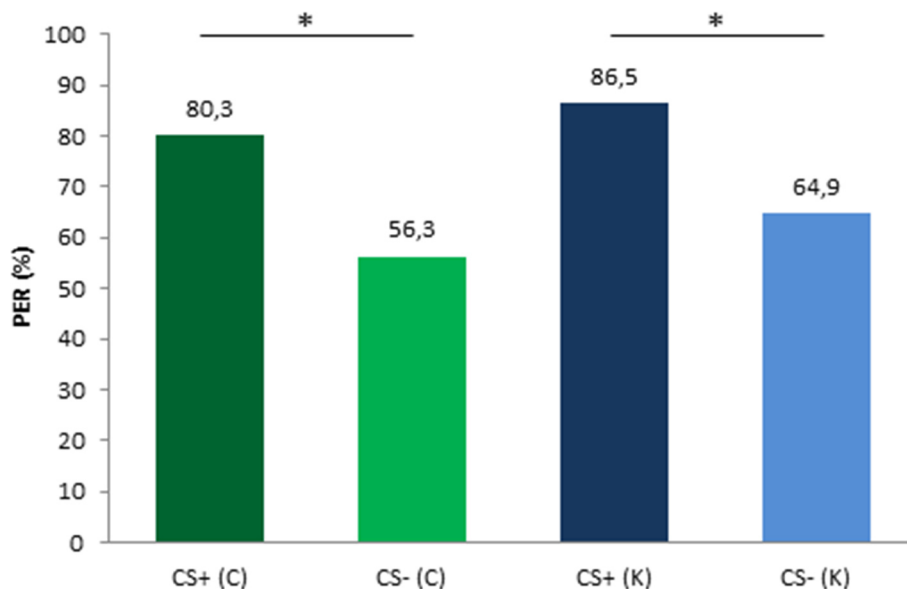
Auch in Versuchsreihe 3 verlaufen die Akquisitionskurven für die Kontrollgruppe und die Versuchsgruppe wie zu erwarten. Ab dem fünften Lertrial können die Bienen beider Gruppen relativ sicher zwischen dem belohnten Duftgemisch und den unbelohnten Einzeldüften unterscheiden, sodass die Reaktionsrate auf den CS<sup>+</sup> deutlich höher liegt als auf den CS<sup>-</sup>. Da die Injektion erst nach der Akquisitionsphase stattfand, ergeben sich natürlicherweise keine Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe, wie in Abbildung 70 zu sehen ist.



**Abbildung 70:** Akquisitionstest der Kontroll- (K: n = 74) und der Versuchsgruppe (C: n = 71) im Vergleich. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede für den CS<sup>+</sup> und den CS<sup>-</sup> zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe; Fisher's Exact Test.

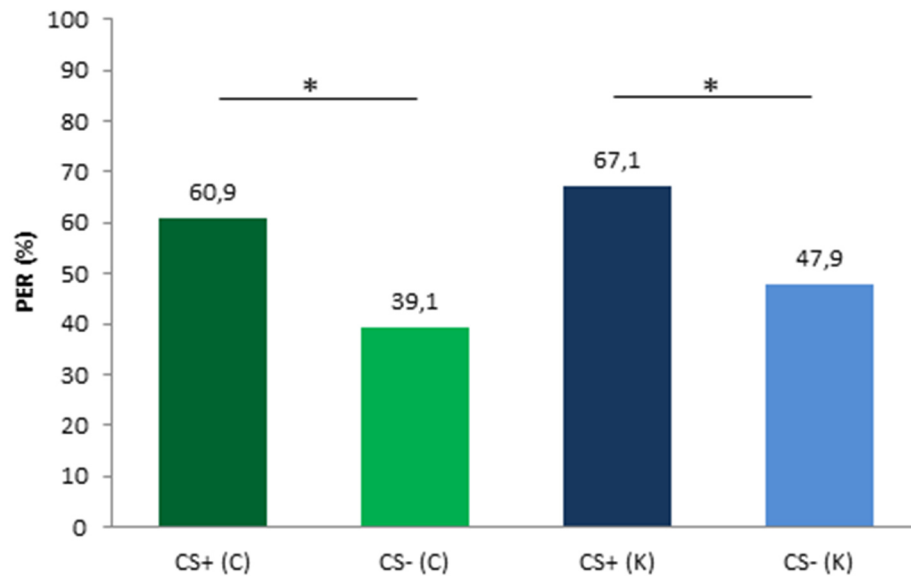
Die Kurven für den CS<sup>+</sup> und für den CS<sup>-</sup> verlaufen für beide Gruppen nahezu identisch und weisen keine signifikanten Unterschiede auf.

Die Abrufttests fanden in dieser Versuchsreihe nach 3 und nach 18 Stunden statt. Die Reaktionsraten des Abrufttests nach 3 Stunden sind in Abbildung 71 dargestellt.



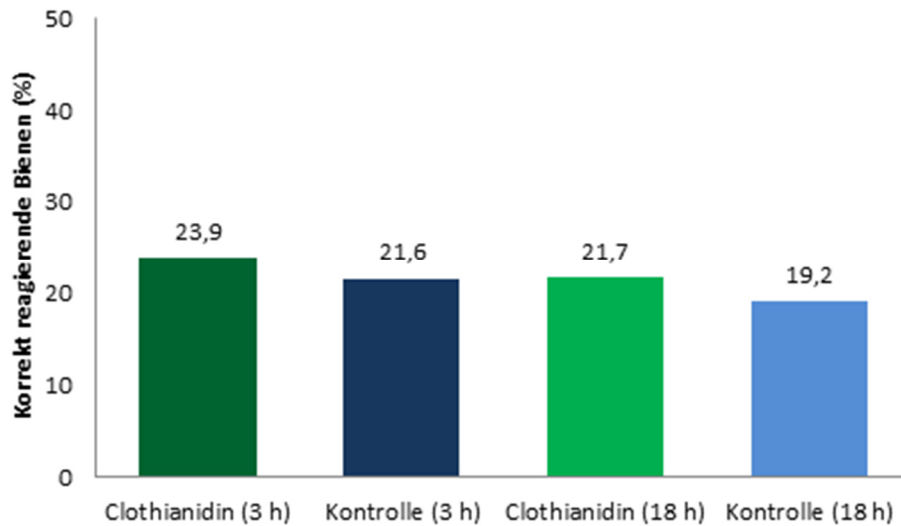
**Abbildung 71:** Abrufttest der Versuchs- (n = 71) und der Kontrollgruppe (n = 74) nach 3 Stunden. Es ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen dem CS<sup>+</sup> und dem CS<sup>-</sup> der Versuchsgruppe ( $p = 0,0037$ ) und der Kontrollgruppe ( $p = 0,0037$ );  $*p \leq 0,05$  Fisher's Exact Test.

Der Abrufttest nach 3 Stunden zeigt hier ebenfalls signifikante Unterschiede innerhalb der Kontroll- bzw. der Versuchsgruppe zwischen dem belohnten Duftgemisch (CS<sup>+</sup>) und dem unbelohnten Einzelduft (CS<sup>-</sup>). Zwischen der mit Clothianidin behandelten und der Kontrollgruppe ergeben sich auch hier keine signifikanten Unterschiede, obwohl die Injektion der Substanzen direkt vor diesem Abrufttest stattfand. Die Reaktionsraten der Versuchsgruppe liegen jeweils unterhalb der Reaktionsraten der Kontrollgruppe.



**Abbildung 72:** Abrufttest der Versuchs- (n = 69) und der Kontrollgruppe (n = 73) nach 18 Stunden. Es ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen dem CS<sup>+</sup> und dem CS<sup>-</sup> der Versuchsgruppe (p = 0,017) und der Kontrollgruppe (p = 0,029); \*p ≤ 0,05 Fisher's Exact Test.

Die Reaktionsraten der Kontroll- und der Versuchsgruppe beim Abrufttest nach 18 Stunden unterscheiden sich auch in dieser Versuchsreihe nicht voneinander (siehe Abbildung 72). Innerhalb der beiden Gruppen zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den Reaktionsraten des belohnten Stimulus (CS<sup>+</sup>) und denen des unbelohnten Stimulus (CS<sup>-</sup>): Deutlich mehr Bienen reagieren auf den CS<sup>+</sup> als auf den CS<sup>-</sup>, sowohl in der Kontrollgruppe (p = 0,029) als auch in der Versuchsgruppe (p = 0,017).



**Abbildung 73:** Lernraten der Versuchs- und der Kontrollgruppe zu den beiden Abrufttests (3 h und 18 h). Kontrolle (3 h): n = 74, Clothianidin (3 h): n = 71, Kontrolle (19 h): n = 73, Clothianidin (19 h): n = 69; Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede;  $p \leq 0,05$  Fisher's Exact Test.

Bei den Lernraten ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe (siehe Abbildung 73). Die Lernraten beim Abrufttest nach 18 Stunden liegen innerhalb der Gruppen niedriger als beim Abrufttest nach 3 Stunden, insgesamt aber um die 20 %.

## 5.4 Diskussion

### 5.4.1 Sterberaten

Die Sterberaten der mit Clothianidin behandelten Bienen in Versuchsreihe 2 liegen deutlich über der Sterberate aller anderen Gruppen (siehe Tabelle 12). Dies ist nicht direkt einleuchtend, da den Bienen der Versuchsreihe 2 die gleiche Menge an Clothianidin injiziert wurde wie den Bienen der Versuchsreihe 3. In letzterer Versuchsreihe starben sehr wenige Bienen. Abgesehen von der Konzentration unterscheidet sich Versuchsreihe 2 insofern von Versuchsreihe 3, als dort das Clothianidin bereits vor dem Akquisitionstest injiziert wurde, während es bei Versuchsreihe 3 erst vor dem ersten Abrufttest injiziert wurde. Darin könnte eventuell auch die Erklärung für die hohe Sterberate bei Versuchsreihe 2 liegen. Den Bienen wurde das Clothianidin zwar zum gleichen Zeitpunkt wie den Bienen aus Versuchsreihe 1 injiziert, aber die Konzentration war bei Versuchsreihe 2 höher (1 ng vs. 0,25 ng). Von Versuchsreihe 3 unterscheidet sich die zweite Versuchsreihe im Zeitpunkt der Injektion. Das bedeutet, dass eine bereits früh injizierte hohe Konzentration zu einer hohen Sterberate bei den Bienen führte. Dies ist

insofern zu erklären, als die Bienen nach der Injektion noch über ca. 24 Stunden beobachtet wurden und in dieser Zeit auch verstarben, während sie nach der Injektion der hohen Konzentration in Versuchsreihe 3 deutlich kürzere Zeit unter Beobachtung standen. Es ist nicht auszuschließen, dass die Bienen in der dritten Versuchsreihe ebenfalls nach längerer Zeit gestorben wären.

Ein Grund dafür könnte der negative Einfluss von Clothianidin auf das Immunsystem der Bienen sein, indem es auf verschiedene Signalwege und Regelkreise der Immunabwehr einwirkt (Di Prisco et al., 2013). Versuche mit Bienen, die einer subletalen Dosis eines Neonikotinoids ausgesetzt waren und zusätzlich mit Pathogenen infiziert waren, zeigten eine deutlich erhöhte Mortalität der Bienen, die ohne die Gabe des Neonikotinoids nicht auftrat (Doublet et al., 2015). Die Bienen im hier beschriebenen Versuch hatten durch die Injektion alle ein kleines Loch im Thorax, durch das Erreger in den Körper eingedrungen sein könnten, da nicht unter sterilen Bedingungen gearbeitet wurde. Diese Erreger werden im Körper der Biene durch eine normale Immunabwehr unschädlich gemacht. Ist diese Immunabwehr nun durch Clothianidin beeinträchtigt, könnte es passieren, dass die Bienen dadurch nach einiger Zeit sterben, da sie sich nicht gegen die Erreger zur Wehr setzen konnten. Bei den anderen Versuchsgruppen war entweder die Konzentration an Clothianidin zu niedrig, als dass das Immunsystem geschwächt wurde, oder die Beobachtungszeit nach der Injektion zu kurz, als dass die Erreger hätten Schaden anrichten können. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die erhöhte Sterberate der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe bei Versuchsreihe 2. Diese erhöhte Sterberate hat wiederum keinen Einfluss auf das Lernverhalten der Bienen (siehe unten).

Eine andere Erklärung wäre, dass das Clothianidin in der Biene in seine Metabolite (zum Beispiel TZNG und TZMU) abgebaut wird, welche möglicherweise toxischer für die Biene sind als das Clothianidin selbst. Durch die hohe Konzentration der Substanz und die längere Zeit, die das Clothianidin in Versuchsreihe 2 in der Biene verbleibt, hat der Körper der Biene auch länger Zeit, es in seine Metabolite abzubauen, und diese können dann länger in der Biene wirken und möglicherweise den Tod der Bienen verursachen. Für Imidacloprid wurde genau dies festgestellt: Die direkten Vergiftungserscheinungen der Bienen wurden von Imidacloprid herbeigeführt, während die tödlichen Effekte durch

dessen Metabolite 5-hydroxyimidacloprid und Olefin verursacht wurden (Suchail et al., 2004).

#### 5.4.2 Lernversuche

In Vorversuchen wurde die Frage geklärt, ob sich bei Injektion von 1 ng Clothianidin in den Thorax der Bienen Auswirkungen im Verhalten der Bienen zeigen. Es ging dabei auch darum zu überprüfen, ob bei der Injektion die gewünschte Menge an Clothianidin in den Körper der Biene gelangt, da durch unterschiedlichen Hämolympdruck bei manchen Bienen geringfügige Mengen nach der Injektion wieder aus dem Injektionsloch austreten. Dafür wurde den Bienen 1 ng Clothianidin in 1 µl Lösung bzw. 1 µl Kontrolllösung in den Thorax injiziert (nach dem gleichen Prinzip wie oben beschrieben) und anschließend wurden die Bienen in einen Becherkäfig gesetzt und konnten sich dort frei bewegen. Sehr schnell waren deutliche Unterschiede erkennbar. Während sich die Kontrollbienen nach einer Weile ruhig verhielten und nur gelegentlich herumliefen, bewegten sich die Versuchsbienen sehr schnell im Käfig hin und her oder lagen gekrümmt auf dem Rücken und zeigten somit ein für Clothianidin typisches Verhalten (Schneider et al., 2012). Dieses Verhalten zeigt sich umso deutlicher, wenn das Clothianidin in die Hämolymphe injiziert wird, wie es in den vorliegenden Versuchen geschehen ist (Benzidane et al., 2010). Somit kann davon ausgegangen werden, dass sich auch in den späteren Hauptversuchen nach der Injektion eine ausreichende Menge an Clothianidin im Körper der Bienen befand, um eventuelle Auswirkungen zu zeigen.

In den Hauptversuchen wurde die Auswirkung von Clothianidin auf das Lernvermögen der Bienen in einer komplexen Lernaufgabe, dem positiven Patterning, untersucht. Dabei ergaben sich weitestgehend keine signifikanten Unterschiede zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe. In Versuchsreihe 1 ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe beim Abrufttest nach 3 Stunden. Dieser Unterschied konnte aber weder im später folgenden Abrufttest nach 19 Stunden noch in den anderen Versuchsreihen (mit einer höheren Konzentration von Clothianidin) bestätigt werden. In Versuchsreihe 1 wurde eine Konzentration von 0,25 ng Clothianidin verwendet, während in den Versuchsreihen 2 und 3 eine Konzentration von 1 ng Clothianidin verwendet wurde. In diesen beiden Versuchsreihen ergeben sich keinerlei signifikante Unterschiede

zwischen den Versuchs- und den Kontrollgruppen, sodass davon ausgegangen wird, dass die Signifikanz in Versuchsreihe 1 keine weitere Bedeutung hat.

In Versuchsreihe 1 wurde die gleiche Konzentration von Clothianidin verwendet wie in den Versuchen der Einzel-Applikation in Kapitel 2, nämlich 0,25 ng. In den Versuchen in Kapitel 2 konnten durchaus signifikante Unterschiede in der Spikeanzahl verglichen mit einer Kontrollgruppe festgestellt werden. Trotz dieser erhöhten Spikeanzahl in den Applikationsversuchen wurde in den Versuchen zum positiven Patterning mit der gleichen Konzentration von Clothianidin kein Unterschied im Lernerfolg ermittelt. Clothianidin scheint sich in dieser Konzentration auf die Biene auszuwirken, was an der erhöhten Spikeanzahl zu erkennen ist, auf den Lernerfolg in einer komplexen Lernaufgabe wirkt es sich jedoch nicht aus.

Ähnlich sieht es bei Versuchsreihe 2 aus. Es ergibt sich kein Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe, weder in der Akquisition noch in den beiden Abrufttests. In dieser Versuchsreihe wurde 1 ng Clothianidin injiziert, was sich wiederum mit den Versuchen zur akuten Fütterung aus Kapitel 3 in Relation setzen lässt. Auch hier wurde 1 ng Clothianidin verabreicht, allerdings als Fütterung und nicht als Injektion. Dennoch zeigen sich in den Versuchen aus Kapitel 3 signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe, das heißt, auch hier wird die Anzahl an Muskelaktionspotenzialen durch Clothianidin erhöht. Wie schon bei Versuchsreihe 1 beschrieben scheint sich aber trotz einer Spikeanzahl-Erhöhung nach akuter Fütterung keine Auswirkung auf den Lernerfolg der Bienen durch 1 ng Clothianidin zu ergeben. Zu bedenken sind die Unterschiede in der Gabe des Neonikotinoïds, und zwar zum einen die akute Fütterung, zum anderen die Injektion in den Thorax. Es ist davon auszugehen, dass sich durch die Gabe als Injektion das Clothianidin im gesamten Körper der Biene verteilt und dies auch ungehindert von der Verdauung tut – im Gegensatz zur akuten Fütterung. Wie in Kapitel 3 dargestellt sind zwei Stunden nach der Fütterung noch 0,3 ng Clothianidin in den Bienen vorzufinden, wodurch anzunehmen ist, dass durch die Metabolisierung bereits ein Großteil des Neonikotinoïds abgebaut wurde. Dennoch zeigen sich nach akuter Fütterung auch zum letzten Messzeitpunkt noch Auswirkungen auf die Spikeanzahl. In den Versuchen dieses Kapitels wurde die Substanz injiziert, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die

Menge an Clothianidin auch im Nervensystem vorzufinden ist. Trotzdem ergeben sich keine Unterschiede im Lernerfolg der Bienen, verglichen mit der Kontrollgruppe.

Aufgrund der erhöhten Sterberate in Versuchsreihe 2 wurde hier zusätzlich getestet, ob es einen Unterschied im Lernerfolg zwischen den Bienen gibt, die bis zum letzten Abrufttest überlebten, und denen, die über Nacht starben. Dabei zeigte sich, dass die hohe Sterberate keinen Einfluss auf die Lernfähigkeit der Bienen hat. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen, weder im Akquisitionstest noch im Abrufttest nach 3 Stunden (Ergebnisse nicht dargestellt).

In Versuchsreihe 3 wurde ebenfalls 1 ng Clothianidin injiziert, allerdings erst vor dem ersten Abrufttest, der drei Stunden nach der Akquisition stattfand. Der Akquisitionstest verläuft demnach in Versuchs- und Kontrollgruppe erwartungsgemäß gleich und ohne signifikante Unterschiede. Aber auch im Abrufttest nach drei Stunden, also direkt nach der Injektion der Substanz, können keine Unterschiede zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Das Gleiche gilt für den Abrufttest nach 18 Stunden. Die Überlegung zur Injektion vor dem ersten Abrufttest war, dass das Clothianidin das erste Lernen im Akquisitionstest möglicherweise nicht beeinflusst, eventuell aber den Abruf und/oder die Konsolidierung behindert, sodass die Biene das gelernte Wissen nach mehreren Stunden nicht mehr abrufen bzw. nicht in das LTM überführen kann. Dies ist allerdings in diesen Versuchen nicht der Fall. Die Bienen der Versuchsgruppe reagieren nicht signifikant anders als die Bienen der Kontrollgruppe. Clothianidin scheint weder das Lernen noch das Abrufen von Gelerntem oder das STM und LTM zu beeinflussen.

Die Lernraten der drei Versuchsreihen liegen alle ca. zwischen 13 und 23 %. Es gibt jeweils keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Versuchsreihen zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe, wodurch auch hier festgestellt werden kann, dass Clothianidin in den hier beschriebenen Versuchen keine Auswirkungen auf den Lernerfolg hat.

Bisher ist nur wenig über die Auswirkung von Clothianidin auf das Lernen und noch weniger über das komplexe Lernen der Honigbiene bekannt. In seiner Bachelorarbeit zeigte Steinbeisser (2010), dass Clothianidin keinerlei Effekte auf die Habituation (nicht-assoziatives Lernen) aufwies. Ebenfalls wurden in der Bachelorarbeit von Degenhardt (2011) keine signifikanten Auswirkungen von Clothianidin auf das Lernen in einer differenziellen Konditionierung festgestellt. Lediglich minimale Tendenzen, dass zwischen



dem belohnten und dem unbelohnten Duft weniger gut unterschieden werden kann, zeigten sich für die mit Clothianidin behandelten Bienen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das nicht-assoziative Lernen wie die Habituation und die einfachen Formen des assoziativen Lernens, zum Beispiel die differenzielle Konditionierung, von Clothianidin weitestgehend unberührt bleiben. Aber auch in den hier erstmals durchgeführten Versuchen mit einer komplexen Lernaufgabe, welche die Funktionsfähigkeit der Pilzkörper voraussetzen, scheint sich das Clothianidin nicht auf den Lernerfolg auszuwirken.

Im Gegensatz zum Clothianidin wurden bereits verschiedene Experimente zum Lernen mit anderen Neonikotinoiden, zum Beispiel Imidacloprid (Decourtye et al., 2004a; Decourtye et al., 2004b; Williamson & Wright, 2013; Williamson et al., 2013) oder Thiamethoxam (El Hassani et al., 2008; Aliouane et al., 2009), durchgeführt. Dabei zeigen sich verschiedene Ergebnisse. Imidacloprid zeigt sowohl bei Decourtye et al. (2004a), bei Decourtye et al. (2004b) als auch bei Williamson & Wright (2013) deutliche Auswirkungen auf die Akquisition, während es bei Williamson et al. (2013) kaum Auswirkungen auf den Lernerfolg zeigt. Dies liegt vermutlich an der deutlich niedrigeren Konzentration, die in letzteren Versuchen verwendet wurde (1,28 ng). Bei Decourtye et al. (2004b) wurden beispielsweise bei einer Menge von 12 ng Imidacloprid Auswirkungen auf die Akquisition beobachtet. Ebenso verursachte die gleiche Menge Imidacloprid deutliche Effekte auf das MTM, was auf eine Beeinträchtigung der Gedächtnisbildung rückschließen lässt (Decourtye et al., 2004b). Im Gegensatz zu den Auswirkungen auf das Lernen, die durch Imidacloprid verursacht werden, zeigte Thiamethoxam bis zu einer Menge von 1 ng keine Effekte auf das Lernen, weder auf die Akquisition noch auf den Abruf des Gelernten (Aliouane et al., 2009; El Hassani et al., 2008). Damit zeigt Thiamethoxam ähnliche Ergebnisse wie das Clothianidin in den hier beschriebenen Versuchen: Beide weisen in einer Menge von 1 ng keine Effekte auf den gesamten Lernvorgang auf. Eventuell liegt dies in der Ähnlichkeit der Substanzen, da Clothianidin ein Metabolit von Thiamethoxam ist (Nauen et al., 2003). Dadurch wird davon ausgegangen, dass auch beide Substanzen an die gleichen nAChRs im Körper der Biene binden. Diese nAChRs scheinen von einem Subtyp zu sein, der keinerlei Beteiligung am Lernvorgang aufweist, wodurch die beiden Substanzen in den eben beschriebenen Versuchen auch keine Auswirkungen auf das Lernen zeigen (siehe auch Kapitel 6).

## 6 Allgemeine Diskussion

In den Versuchen dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, welche Auswirkungen Neonikotinoide in verschiedenen Applikationsformen auf die Muskelspikeaktivität der Biene hat sowie ob bzw. welche Effekte durch Clothianidin auf den Lernvorgang in einer komplexen Lernaufgabe entstehen.

Die Effekte von Neonikotinoiden auf die Anzahl der Muskelaktionspotenziale wurden an der Honigbiene bisher nicht untersucht. Sie sind aber von großer Wichtigkeit, da von diesen Effekten auch eine Auswirkung auf die gesamte Motorik der Biene abgeleitet werden kann, welche wiederum einen Einfluss auf das allgemeine Verhalten der Bienen haben kann. Die Auswirkungen auf die Spikeaktivität des Muskels M17 ist in dieser Arbeit über alle Versuche hinweg (Einzel- und Doppelapplikation in die Kopfkapsel, akute Fütterung, chronische Fütterung) für die jeweiligen Neonikotinoide gleich: Thiacloprid senkt die mediane Spikeanzahl ab, während Clothianidin sie erhöht. Dabei ist der Effekt von Clothianidin deutlicher als der von Thiacloprid. Es gibt lediglich eine einzelne Ausnahme (siehe Kapitel 4.3.2, Abbildung 46), in der Clothianidin in der akuten Fütterung keine Steigerung der medianen Anzahl an Spikes bewirkte. Für diese Ausnahme fehlt jedoch jegliche biologische Begründung.

Über die Wirkung von Neonikotinoiden am Muskel bei Insekten ist bisher wenig bekannt, bzw. wurde die Verbreitung von neonikotinoidsensitiven Rezeptoren an der neuromuskulären Synapse in der Honigbiene bisher noch kaum untersucht (Williamson et al., 2014). Acetylcholin, der natürliche Transmitter des nAChRs, zeigte in Versuchen an neuromuskulären Präparaten von Schaben bzw. Heuschrecken keine der für Vertebraten typischen Effekte, während Nikotin nur dann einen Effekt zeigte, wenn die Nerven am Muskel intakt blieben. Gleiches gilt für Eserin, einen Acetylcholinesterase-Hemmer. Aus diesem Versuch wurde die Folgerung gezogen, dass es am adulten neuromuskulären Präparat keinen Beweis für eine cholinerge Signalübertragung gibt (Faeder et al., 1970). Effekte traten immer dann auf, wenn die Verbindung zum zentralen Nervensystem intakt blieb, womit eine Wirkung am Muskel schwer zu beurteilen ist (McCann & Reece, 1967). Ebenfalls an einem isolierten Beinmuskel der Heuschrecke durchgeführte Versuche mit ca. 30 verschiedenen Substanzen (cholinerge und anticholinerge) zeigten keine Effekte für Acetylcholin, weshalb man auch hieraus schließen kann, dass eine cholinerge

Übertragung am Muskel bei Insekten sehr unwahrscheinlich ist (McDonald et al., 1972; McDonald, 1975). Anhand dieser Ergebnisse zeigt sich, dass die Übertragung vom Nerv auf den Muskel bei Insekten wohl nicht über Acetylcholin geschieht, sondern vermutlich über den Neurotransmitter Glutamat (McDonald et al., 1972). Da die Neonikotinoide am nAChR bei Insekten binden, scheint es unwahrscheinlich, dass diese Substanzen eine direkte Auswirkung auf den Muskel M17 bewirken, sondern dass die Effekte in den Versuchen dieser Arbeit vermutlich über eine Auswirkung im Nervensystem zustande kommen, wodurch die Muskeln ebenfalls betroffen sind, da auch die Motorik indirekt von der Aktivierung cholinergischer Signalwege abhängt (Gauthier, 2010). Martin et al. (1998) stellten für *Drosophila melanogaster* fest, dass die Pilzkörper einen entscheidenden, wenn auch nicht alleinigen Einfluss auf die Motorik, genauer gesagt auf die Laufaktivität, der Tiere haben. War die Funktionsfähigkeit der Pilzkörper eingeschränkt, erhöhte sich die gesamte Bewegungsaktivität. Somit dienen die Pilzkörper bei *Drosophila melanogaster* unter anderem als Inhibitoren der Laufaktivität. Gleiches hatten Roeder (1937) für die Gottesanbeterin (*Mantis religiosa*) und Huber (1960) für Grillen (Gryllidae) festgestellt. Da Clothianidin in der vorliegenden Arbeit die Anzahl der Muskelaktionspotenziale deutlich erhöhte, könnte es auch hier der Fall sein, dass bestimmte Funktionen zur Dämpfung der Bewegungsaktivität in den Pilzkörpern der Biene durch Clothianidin abgeschwächt werden und sich damit die Anzahl der Spikes erhöht.

Die Wirkung von Neonikotinoiden auf den Muskel wurde beispielsweise an Muskelzellen von Frosch-Embryonen (*Xenopus laevis*) getestet (Seifert & Stollberg, 2005). Wie für Vertebraten erwartet zeigten sowohl Acetylcholin als auch Nikotin in diesen Versuchen einen deutlichen Effekt auf die Muskelzellen, und zwar in Form von Kontraktionen, während Imidacloprid keine Auswirkungen dieser Art zeigte. Vielmehr schwächte Imidacloprid die Kontraktionen ab, die durch Acetylcholin bzw. Nikotin verursacht wurden – die von Nikotin deutlich mehr als die von Acetylcholin. Es wird daher vermutet, dass Imidacloprid leichter an die Nikotin-Bindungsstelle am nAChR bindet, als an die Acetylcholin-Bindungsstelle. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit zeigt Imidacloprid ebenfalls keine Auswirkungen auf den Muskel. Allerdings wurden erstere Versuche am Frosch durchgeführt, der als Vertebrat erwartungsgemäß schwächer auf ein Neonikotinoid reagiert als ein Invertebrat wie die Biene. Jedoch sind die Versuche von

Seifert und Stollberg (2005) durchaus interessant, weil sie einen der wenigen Versuche durchgeführt haben, der die Auswirkungen eines Neonikotinoids am Muskel untersucht und darin auch die beschriebenen Eigenschaften der Substanzen im Vertebraten bestätigt.

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit fällt auf, dass sich durch die Neonikotinoide Clothianidin und Thiacloprid deutliche Auswirkungen auf die Muskelpikerate des Muskels M17 zeigen, die Lernfähigkeit aber durch das Clothianidin zu keinem Zeitpunkt eingeschränkt wird. Für diese Effekte gibt es mindestens zwei mögliche Erklärungen.

Eine Möglichkeit besteht darin, dass die Konzentrationen des Clothianidins in den Versuchen zum positiven Patterning insofern nicht hoch genug waren, als sie die Lernfähigkeit beeinflussen könnten. Möglicherweise entsteht ein Effekt auf die Muskelaktivität bereits ab einer niedrigeren Konzentration, wie sie in den hier beschriebenen Versuchen verwendet wurde (0,25 bzw. 1 ng). Da die Muskelaktivität des Muskels M17 im Elektromyogramm ein sehr starkes Signal darstellt, können auch kleinste Änderungen deutlich wahrgenommen werden. Das bedeutet, dass bereits sehr kleine Auswirkungen der Substanzen als deutliche Effekte erfasst werden. Für die Beeinflussung der Lernfähigkeit der Biene könnten deutlich höhere Konzentrationen an Clothianidin nötig sein, um dort einen eindeutigen Effekt bzw. eine Verminderung der Lernfähigkeit festzustellen. Wie oben beschrieben zeigt sich auch bei Imidacloprid erst bei höheren Konzentrationen eine Auswirkung auf das Lernen, im Gegensatz zu niedrigeren Konzentrationen (Williamson et al., 2013). Würden allerdings höhere Konzentrationen von Clothianidin verwendet, wären diese vermutlich zu hoch für die Bienen, sodass die Tiere noch während der Versuche sterben würden. In den hier beschriebenen Versuchen starben die Bienen bereits nach einer Injektion von 1 ng Clothianidin nach längerer Einwirkung vermehrt (siehe Kapitel 5.3.1), sodass es wohl nicht möglich ist, eine noch höhere Konzentration zu verwenden, um Auswirkungen auf die Lernfähigkeit festzustellen.

Eine andere Möglichkeit stellen die verschiedenen Rezeptorsubtypen dar. Wie bereits oben erwähnt, wurden für die Biene 9  $\alpha$ - und 2  $\beta$ -Untereinheiten für den nAChR festgestellt (Jones et al., 2006). Diese Untereinheiten können sich in verschiedenen Kombinationen zusammensetzen und somit verschiedene Subtypen des nAChRs mit

individuellen pharmakologischen Eigenschaften bilden (Gauthier, 2010). Versuche mit verschiedenen nikotinischen Antagonisten des nAChRs (Mecamylamin,  $\alpha$ -Bungarotoxin, Methyllycaconitin) zeigten unterschiedliche Auswirkungen auf die Lernfähigkeit von Bienen (Gauthier et al., 2006). Methyllycaconitin und  $\alpha$ -Bungarotoxin zeigten Effekte auf das LTM, daher wird davon ausgegangen, dass die beiden Substanzen auf die zellulären Mechanismen zur Bildung des LTM einwirken. Mecamylamin dagegen beeinflusste das MTM und Abrufprozesse. Aus diesen Ergebnissen wird die Schlussfolgerung gezogen, dass in der Biene mindestens zwei verschiedene nAChR-Subtypen existieren:  $\alpha$ -Bungarotoxin-sensitive nAChRs, die unter anderem für die Bildung des LTM verantwortlich sind und bei wiederholten Lerntrials aktiviert werden, und  $\alpha$ -Bungarotoxin-insensitive nAChRs, die wiederum für das MTM und das Abrufgedächtnis wichtig sind. Zu diesem Schluss kommen auch Thany et al. (2006). Diese beiden Rezeptorsubtypen könnten in Insekten vorkommen und unterschiedliche Affinitäten für Neonikotinoide aufweisen, die eine niedrige Affinität, die anderen eine hohe Affinität (Gauthier et al., 2006; Thany, 2009). Auch wurde festgestellt, dass zwei sehr ähnliche Neonikotinoide wie Clothianidin und Thiamethoxam offensichtlich nicht an den gleichen nAChR-Subtypen binden (Thany, 2011). Die genaue Zuordnung der pharmakologischen Eigenschaften zu den verschiedenen nAChR-Subtypen ist nach wie vor nicht endgültig geklärt, jedoch scheint klar zu sein, dass die Zusammensetzung für die Eigenschaften entscheidend ist. Es wurde bereits gezeigt, dass in verschiedene Abläufe des Lernens durch ein „Ausschalten“ einzelner Untereinheiten eingegriffen werden kann (Gauthier & Grünewald, 2012). Da beide Rezeptorsubtypen ( $\alpha$ -Bungarotoxin-sensitive und  $\alpha$ -Bungarotoxin-insensitive) zur Lernfähigkeit der Biene benötigt werden, wird davon ausgegangen, dass das Acetylcholin während des Lernvorgangs auch an beide nAChR-Subtypen bindet (Dupuis et al., 2012). Wenn man aber davon ausgeht, dass die Affinität der verschiedenen Subtypen für Neonikotinoide unterschiedlich hoch ist, kann es sein, dass die hier verwendeten Substanzen auch an verschiedene Rezeptoren binden bzw. an manche Rezeptorsubtypen mit größerer Wahrscheinlichkeit als an andere. Imidacloprid bindet beispielsweise in der Schabe an drei verschiedene nAChR-Subtypen (Buckingham et al., 1997). Da in den Versuchen der vorliegenden Arbeit die Muskelspikeaktivität in fast jedem der Versuche durch Clothianidin beeinflusst wurde, die Lernfähigkeit der Bienen aber in keiner ihrer Phasen durch Clothianidin gestört wurde, wird davon ausgegangen, dass es noch weitere

nAChR-Subtypen geben muss, die sich auf die Muskeln auswirken und an die Clothianidin mit hoher Affinität bindet, und dass es andererseits weitere nAChR-Subtypen gibt, die für die verschiedenen Lernvorgänge verantwortlich sind, an die allerdings das Clothianidin gar nicht oder kaum bindet und damit auch keine Auswirkungen zeigt. Das würde auch bedeuten, dass Clothianidin nicht alle Rezeptorsubtypen in gleicher Weise beeinflusst und dadurch unterschiedliche Auswirkungen auf das Lernen der Biene und deren Muskelspikeaktivität zeigt. Dies sind bisher nur Spekulationen, die aber auch durch andere Experimente, zum Beispiel durch Versuche zum Heimfindevermögen der Bienen, glaubhaft erscheinen. In ihrer Bachelorarbeit stellte Weßel (2014) fest, dass die akute Fütterung mit Clothianidin (1 ng) die Heimkehrtrate der Bienen nicht negativ beeinflusst. Und auch bei Fischer et al. (2014) zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl heimkehrender Bienen zwischen Bienen, die mit 2,5 ng Clothianidin gefüttert wurden, und Kontrollbienen. Auch in diesen Versuchen könnte es der Fall sein, dass Clothianidin an nAChRs bindet, die sich nicht auf das Gedächtnis auswirken, wodurch die Bienen auch nach einer Fütterung mit Clothianidin noch zu ihrem Stock zurückfinden.

Die ausbleibenden Effekte auf den Muskel M17 für Imidacloprid sind nicht vollständig geklärt. Möglich ist, dass die verwendete Konzentration von 0,25 ng zu gering war, um einen Effekt auf die Muskelspikerate hervorzurufen. Allerdings liegt die LD<sub>50</sub> von Imidacloprid bei 4,5 ng pro Biene (Cresswell, 2011) bzw. 5,4 ng pro Biene (Suchail et al., 2000), was deutlich niedriger ist als die LD<sub>50</sub> von Thiacloprid (17,32 µg a.s. pro Biene (European Commission, 2004)) und nur etwas höher als die von Clothianidin (0,00379 µg a.s. pro Biene (European Commission, 2005)). Clothianidin und Thiacloprid allerdings zeigten in der niedrigen Konzentration von 0,25 ng einen deutlichen Effekt auf die Muskelspikerate (siehe Kapitel 2). Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass diese Konzentration ausreichen sollte, allerdings sollten weitere Versuche mit Imidacloprid in einer höheren Konzentration durchgeführt werden, um die Auswirkungen weiter zu klären. Lambin et al. (2001) konnten Effekte auf die Motoraktivität der Biene ab einer Konzentration von 1,25 ng Imidacloprid nachweisen. Diese Menge an Substanz entspricht dem Fünffachen der in dem hier beschriebenen Versuch eingesetzten Konzentration. In weiteren Versuchen zur Muskelspikerate des Muskels M17 könnte diese Konzentration verwendet werden, um eventuelle Effekte festzustellen. Ein weiterer Grund für das Ausbleiben der Effekte könnte die Metabolisierung der Substanzen sein.

Allgemein ist zum Entgiftungsmechanismus für Neonikotinoide in der Honigbiene nicht viel bekannt. Die Biene besitzt insgesamt weniger Proteine, die für die Entgiftung zuständig sind, als beispielsweise *Drosophila melanogaster* (Claudianos et al., 2006). Man kann aber davon ausgehen, dass Multiple-Drug-Resistance-Transporter (MDR-Transporter) bei der Entgiftung eine große Rolle spielen. Diese sind vermutlich daran beteiligt, die Neonikotinoide zu metabolisieren bzw. sie der Exkretion zugänglich zu machen. Sind diese Transporter blockiert, haben die Neonikotinoide eine deutlich stärkere Auswirkung auf die Biene (Hawthorne & Dively, 2011). Auch die Cytochrome P450 werden für die Metabolisierung (mindestens von Thiacloprid) verantwortlich gemacht (Iwasa et al., 2004; Claudianos et al., 2006). Wie schnell der Abbau der Neonikotinoide in der Honigbiene abläuft, ist weitgehend unklar. Lediglich bei Imidacloprid liegen Daten vor, die eine Halbwertszeit von 4,5 bis 5 Stunden und die Tatsache nachweisen, dass bereits nach 20 Minuten ca. 30 % des Imidacloprids abgebaut sind. Orientiert man sich an diesen Daten, müssten in allen hier beschriebenen Versuchen noch eventuelle Auswirkungen zu erkennen sein, da die Beobachtung der Bienen immer auch in den ersten Minuten und Stunden nach der Gabe der Substanzen stattfand. Dass eine der Substanzen bereits nach wenigen Minuten vollständig abgebaut ist und damit keine Effekte mehr zu sehen sind, ist sehr unwahrscheinlich und wird für die hier beschriebenen Versuche ausgeschlossen. Insofern sollten in der vorliegenden Arbeit Effekte der Substanzen, soweit sie vorhanden sind, auch beobachtet worden sein.

Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit subletale Dosen der Neonikotinoide verwendet, die damit deutlich unter der jeweiligen LD<sub>50</sub> liegen. Zusätzlich muss erwähnt werden, dass die verwendeten Konzentrationen deutlich höher sind als die, die tatsächlich auf dem Feld an den Nutzpflanzen ausgebracht werden bzw. von der Biene aufgenommen werden können. Beispielsweise wurde in den Versuchen zur chronischen Fütterung in Kapitel 4 der vorliegenden Arbeit ca. das 25-fache der jeweiligen feldrelevanten Dosis von Clothianidin bzw. Thiacloprid verwendet. Die Rückstände in Futter- und Bienenproben waren wiederum deutlich niedriger als die eingesetzten Konzentrationen, was auf eine Metabolisierung der Substanzen durch die Biene hinweist und auf keinerlei Akkumulation schließen lässt. Auf ihren Sammelflügen in der Natur begegnen die Bienen also weit niedrigeren Konzentrationen an Neonikotinoiden, als dies in den hier beschriebenen Versuchen der Fall war. Dadurch ist es möglich, dass die

Bienen, die in der Natur sammeln, keine, weniger oder auch andere Auswirkungen aufweisen als die Bienen der Versuche dieser Arbeit. Dennoch konnte mit der vorliegenden Arbeit mehr Licht auf die Risiken der Neonikotinoide geworfen und damit zur Klärung der Gefahr für die Honigbiene beigetragen werden. Es zeigen sich in den oben beschriebenen Versuchen zum Teil sehr deutliche Effekte der Substanzen auf die Muskelspikeaktivität, diese scheinen aber für das gesamte Volk von geringer Relevanz zu sein. Auch das Lernvermögen bleibt in den Versuchen dieser Arbeit gänzlich unbeeinflusst. Das Lernvermögen ist für die Honigbiene von essenzieller Bedeutung, da sie nur dadurch lernt, welche Nahrungsquellen für sie effizient sind und wie sie diese (wieder)finden kann. Eine Gefahr für die Honigbiene könnte die Schwächung des Immunsystems sein, welche mindestens durch das Neonikotinoid Clothianidin vermutet wird: Bis ca. 20 Stunden nach der Injektion starben deutlich mehr Bienen als in der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 12). Aber auch hier sei auf die deutlich höhere verwendete Konzentration verwiesen, als sie in der Natur vorkommen sollte.

## **7 Fazit und Ausblick**

Es zeigen sich deutliche Auswirkungen auf die Muskelspikeaktivität durch die Substanzen Clothianidin und Thiacloprid, die allerdings keine letalen Konsequenzen aufweisen, und auch die Völker, die chronisch mit Clothianidin oder Thiacloprid behandelt wurden, zeigten keine Einschränkungen in ihrer Entwicklung. Das Lernvermögen in einer komplexen Lernaufgabe wurde ebenfalls nicht von Clothianidin beeinflusst. Somit lässt sich sagen, dass es zwar gewisse Effekte der getesteten Neonikotinoide gibt, diese aber in den hier beschriebenen Versuchen keine letale Gefahr für die Bienenvölker darstellten. Interessant wären weitere Versuche mit Neonikotinoiden, die den direkten Effekt der Substanzen auf neuronales Gewebe bzw. weitere Auswirkungen auf den bloßen Muskel untersuchen. Damit könnten die Risiken von Neonikotinoiden auf die Honigbiene weiter aufgeklärt werden.



**I Literaturverzeichnis**

Aliouane, Y., El Hassani, A.K., Gary, V., Armengaud, C., Lambin, M., Gauthier, M. (2009): Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environ Toxicol Chem*, Vol. 28, No. 1, 113 – 122

Barbara, G.S., Grünewald, B., Paute, S., Gauthier, M., Raymond-Delpech, V. (2008): Study of nicotinic acetylcholine receptors on cultured antennal lobe neurones from adult honeybee brains. *Invert Neurosci*, 8, 19 – 29

Belzunces, L.P., Tchamitchian, S., Brunet, J.-L. (2012): Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie*, 43, 348 – 370

Benzidane, Y., Touinsi, S., Motte, E., Jadas-Hécart, A., Communal, P.-Y., Leduc, L., Thany, S.H. (2010): Effect of thiamethoxam on cockroach locomotor activity is associated with its metabolite clothianidin. *Pest Manag Sci*, 66, 1351 – 1359

Bicker, G., Schäfer, S., Rehder, V. (1987): Chemical neuroanatomy of the honeybee brain. In: Menzel, R., Mercer, A. (eds.): *Neurobiology and Behavior of Honeybees*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg

Bicker, G. (1999): Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee. *Microsc res techniq*, 45, 174 – 183

Bitterman, M.E., Menzel, R., Fietz, A., Schäfer, S. (1983): Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *J Comp Psychol*, Vol. 97, No. 2, 107 – 119

Braun, G., Bicker, G. (1992): Habituation of an appetitive reflex in the honeybee. *J Neurophysiol*, 67, 588 – 598

Brown, L.A., Ihara, M., Buckingham, S.D., Matsuda, K., Sattelle, D.B. (2006): Neonicotinoid insecticides display partial and super agonist actions on native insect nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem*, 99, 608 – 615

Brunet, J.-L., Badiou, A., Belzunces, L.P. (2005): *In vivo* metabolic fate of [<sup>14</sup>C]-acetamiprid in six biological compartments of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Pest Manag Sci*, 61, 742 – 748

Buckingham, S.D., Lapied, B., Le Corrond, H., Grolleau, F., Sattelle, D.B. (1997): Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *J Exp Biol*, 200, 2685 – 2692

Chauzat, M.-P., Faucon, J.-P. (2007): Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in France. *Pest Manag Sci*, 63, 1100 – 1106

Claudianos, C., Ranson, H., Johnson, R.M., Biswas, S., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., Feyereisen, R., Oakeshott, J.G. (2006): A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol Biol*, 15(5), 615 – 636

- Cresswell, J.E. (2011): A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology*, 20, 149 – 157
- Cresswell, J.E., Robert, F.-X.L., Florance, H., Smirnoff, N. (2013): Clearance of ingested neonicotinoid pesticide (imidacloprid) in honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus terrestris*). *Pest Manag Sci*, DOI 10.1002/ps.3569
- Cutler, G.C., Scott-Dupree, C.D. (2007): Exposure to clothianidin seed-treated canola has no long-term impact on honey bees. *J Econ Entomol*, 100(3), 765 – 772
- Cutler, G.C., Scott-Dupree, C.D., Sultan, M., McFarlane, A.D., Brewer, L. (2014): 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; DOI 10.7717/peerj.652
- Decourtye, A., Devillers, J., Cluzeau, S., Charreton, M., Pham-Delègue, M.-H. (2004a): Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotox Environ Safe*, 57, 410 – 419
- Decourtye, A., Armengaud, C., Renou, M., Devillers, J., Cluzeau, S., Gauthier, M., Pham-Delègue, M.-H. (2004b): Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pestic Biochem Phys*, 78, 83 – 92
- Decourtye, A., Devillers, J. (2010): Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. In: Thany, S.H. (ed.): *Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors*. Landes Bioscience, Springer Science+Business Media, LLC, New York
- Degenhardt, P. (2011): Auswirkungen von subletalen Dosen von neonicotinoiden Insektiziden auf das Duftlernen von Honigbienen (*Apis mellifera*). Bachelorarbeit am Institut für Bienenkunde, Oberursel, Fachbereich Biowissenschaften, Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- Déglise, P., Grünewald, B., Gauthier, M. (2002): The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. *Neurosci Lett*, 321, 13 – 16
- Deisig, N., Lachnit, H., Giurfa, M., Hellstern, F. (2001): Configural olfactory learning in honeybees: negative and positive patterning discrimination. *Learn Memory*, 8, 70 – 78
- Devaud, J.-M., Papouin, T., Carcaud, J., Sandoz, J.C., Grünewald, B., Giurfa, M. (2015): Neural substrate for higher-order learning in an insect: mushroom bodies are necessary for configural discriminations. *PNAS*, Vol. 112, No. 43
- Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E., Nazzi, F., Gargiulo, G., Pennacchio, F. (2013): Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *P Natl Acad Sci USA*, Vol. 110, No. 46, 18466 – 18471
- Doublet, V., Labarussias, M., de Miranda, J.R., Moritz, R.F.A., Paxton, R.J. (2015): Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environ Microbiol*, 17(4), 969 – 983

- Dupuis, J., Louis, T., Gauthier, M., Raymond, V. (2012): Insights from honeybee (*Apis mellifera*) and fly (*Drosophila melanogaster*) nicotinic acetylcholine receptors: from genes to behavioral functions. *Neurosci Biobehav R*, 36, 1553 – 1564
- Durchführungsverordnung (EU) Nr. 485/2013 der Kommission vom 24. Mai 2013, Amtsblatt der Europäischen Union, 25.05.2013, L 139/12-26
- El Hassani, A.K., Dacher, M., Gary, V., Lambin, M., Gauthier, M., Armengaud, C. (2008): Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Arch Environ Contam Toxicol*, 54, 653 – 661
- European Commission (2004): Review report for the active substance thiacloprid. Health & Consumer protection directorate-general, Directorate E – Food Safety: plant health, animal health and welfare, international questions, E1 – Plant health, SANCO/4347/2000 - Final
- European Commission (2005): Review report for the active substance clothianidin. Health & Consumer protection directorate-general, Directorate D – Food Safety: Production and distribution chain, Unit D.3 – Chemicals, contaminants and pesticides, SANCO/10533/05 - Final
- Faeder, I.R., O'Brien, R.D., Salpeter, M.M. (1970): A re-investigation of evidence for cholinergic neuromuscular transmission in insects. *J Exp Zool*, 173, 187 – 202
- Felsenberg, J., Gehring, K.B., Antemann, V., Eisenhardt, D. (2011): Behavioural pharmacology in classical conditioning of the proboscis extension response in honeybees (*Apis mellifera*). *JoVE*. 47. doi: 10.3791/2282
- Fischer, J., Müller, T., Spatz, A.-K., Greggers, U., Grünewald, B., Menzel, R. (2014): Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. *PLoS ONE* 9(3): e91364. doi:10.1371/journal.pone.0091364
- Friedrich, A., Thomas, U., Müller, U. (2004): Learning at different satiation levels reveals parallel functions for the cAMP-protein kinase A cascade in formation of long-term memory. *J Neurosci*, 24(18), 4460 – 4468
- Frings, H. (1944): The loci of olfactory end-organs in the honey-bee, *Apis mellifera* Linn. *J Exp Zool*, 97, 123 – 134
- Frisch, K. v. (1914): Der Farbensinn und Formensinn der Biene. Sonderabdruck aus „Zoologische Jahrbücher“. Abteilung für allgemeine Zoologie und Physiologie. Herausgegeben von Prof. J.W. Spengel in Gießen. Band 35. Verlag von Gustav Fischer, Jena
- Gauthier, M., Dacher, M., Thany, S.H., Niggebrügge, C., Déglise, P., Kljucovic, P., Armengaud, C., Grünewald, B. (2006): Involvement of  $\alpha$ -bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in long-term memory formation in the honeybee (*Apis mellifera*). *Neurobiol Learn Mem*, 86, 164 – 174

- Gauthier, M. (2010): State of the art on insect nicotinic acetylcholine receptor function in learning and memory. In: Thany, S.H. (ed.): *Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors*. Landes Bioscience, Springer Science+Business Media, LLC, New York
- Gauthier, M., Grünewald, B. (2012): Neurotransmitter systems in the honey bee brain: functions in learning and memory. In: Galizia, C.G., Eisenhardt, D., Giurfa, M. (eds.): *Honeybee Neurobiology and Behavior. A Tribute to Randolph Menzel*. Springer Science+Business Media B.V., Heidelberg London New York
- Genersch, E., Von der Ohe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Büchler, R., Berg, S., Ritter, W., Mühlen, W., Gisder, S., Meixner, M., Liebig, G., Rosenkranz, P. (2010): Das Deutsche Bienen-Monitoring-Projekt: eine Langzeitstudie zur Untersuchung periodisch auftretender hoher Winterverluste bei Honigbienenstöcken. *Apidologie*, DOI: 10.1051/apido/2010014
- Gil, M. (2010): Reward expectations in honeybees. *Communicative & Integrative Biology*, 3:2, 95 – 100
- Gill, R.J., Ramos-Rodriguez, O., Raine, N.E. (2012): Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature*, 491, 105 – 108
- Giurfa, M. (2007): Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well. *J Comp Physiol A*, 193, 801 – 824
- Giurfa, M., Sandoz, J.-C. (2012): Invertebrate learning and memory: fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees. *Learn Memory*, 19, 54 – 66
- Godfray, H.C.J., Blacquière, T., Field, L.M., Hails, R.S., Petrokofsky, G., Potts, S.G., Raine, N.E., Vanbergen, A.J., McLean, A.R. (2014): A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proc R Soc B* 281: 20140558
- Goldberg, F., Grünewald, B., Rosenboom, H., Menzel, R. (1999): Nicotinic acetylcholine currents of cultured Kenyon cells from the mushroom bodies of the honey bee *Apis mellifera*. *J Physiol*, 514.3, 759 – 768
- Goodman, L. (2003): *Form and Function in the Honey Bee*. (eds. R.J. Cooter and P.A. Munn). International Bee Research Association, Cardiff, UK
- Goulson, D. (2015): Neonicotinoids impact bumblebee colony fitness in the field; a reanalysis of the UK's Food & Environment Research Agency 2012 experiment. *PeerJ* 3:e854; DOI 10.7717/peerj.854
- Guerrieri, F., Schubert, M., Sandoz, J.-C., Giurfa, M. (2005): Perceptual and neural olfactory similarity in honeybees. *PLoS Biol* 3(4): e60
- Hammer, M. (1993): An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature*, Vol. 366, 59 – 63

- Hammer, M., Braun, G., Mauelshagen, J. (1994): Food-induced arousal and nonassociative learning in honeybees: dependence of sensitization on the application site and duration of food stimulation. *Behav neural biol*, 62, 210 – 223
- Hawthorne, D.J., Dively, G.P. (2011): Killing them with kindness? In-hive medications may inhibit xenobiotic efflux transporters and endanger honey bees. *PLoS ONE* 6(11): e26796. doi:10.1371/journal.pone.0026796
- Heisenberg, M. (1998): What do the mushroom bodies do for the insect brain? An introduction. *Learn Memory*, 5, 1 – 10
- Huber, F. (1960): Untersuchungen über die Funktion des Zentralnervensystems und insbesondere des Gehirnes bei der Fortbewegung und der Lauterzeugung der Grillen. *Z vergl Physiol*, 44, 60 – 132
- Imdorf, A., Buehlmann, G., Gerig, L., Kilchenmann, V., Wille, H. (1987): Überprüfung der Schätzmethode zur Ermittlung der Brutfläche und der Anzahl Arbeiterinnen in freifliegenden Bienenvölkern. *Apidologie*, 18 (2), 137 – 146
- Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J.T., Roe, R.M. (2004): Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Prot*, 23, 371 – 378
- Jay, S.C. (1963): The development of honeybees in their cells. *J Apicult Res*, 2, 117 – 134
- Jeschke, P., Nauen, R. (2008): Neonicotinoids – from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Manag Sci*, 64, 1084 – 1098
- Joerges, J., Küttner, A., Galizia, C.G., Menzel, R. (1997): Representations of odours and odour mixtures visualized in the honeybee brain. *Nature*, 387, 285 – 288
- Jones, A.K., Raymond-Delpech, V., Thany, S.H., Gauthier, M., Sattelle, D.B. (2006): The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Res*, 16, 1422 – 1430
- Kabat vel Job, K. (2012): Auswirkungen von Thiacloprid und Clothianidin auf die Mortalität und das Bewegungsverhalten der Honigbiene, *Apis mellifera*. Bachelorarbeit am Institut für Bienenkunde, Oberursel, Fachbereich Biowissenschaften, Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- Köhler, H.-R., Triebkorn, R. (2013): Wildlife ecotoxicology of pesticides: Can we track effects to the population level and beyond? *Science*, 341, 759 – 765
- Komischke, B., Sandoz, J.-C., Malun, D., Giurfa, M. (2005): Partial unilateral lesions of the mushroom bodies affect olfactory learning in honeybees *Apis mellifera* L. *Eur J Neurosci*, 21, 477 – 485
- Kreissl, S., Bicker, G. (1989): Histochemistry of acetylcholinesterase and immunocytochemistry of an acetylcholine receptor-like antigen in the brain of the honeybee. *J Comp Neurol*, 286, 71 – 84

- Kuwabara, M. (1957): Bildung des bedingten Reflexes von Pavlovs Typus bei der Honigbiene, *Apis mellifera*. Jour Fac Sci Hokkaido Univ Ser VI, Zool. 13(1-4), 458 – 464
- Lambin, M., Armengaud, C., Raymond, S., Gauthier, M. (2001): Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. Arch Insect Biochem, 48, 129 – 134
- Laska, M., Galizia, C.G., Giurfa, M., Menzel, R. (1999): Olfactory discrimination ability and odor structure-activity relationships in honeybees. Chem Senses, 24, 429 – 438
- Le Conte, Y., Ellis, M., Ritter, W. (2010): *Varroa* mites and honey bee health: can *Varroa* explain part of the colony losses? Apidologie, 41, 353 – 363
- Lindauer, M. (1970): Lernen und Gedächtnis – Versuche an der Honigbiene. Die Naturwissenschaften, 10, 463 – 467
- Malun, D., Giurfa, M., Galizia, C.G., Plath, N., Brandt, R., Gerber, B., Eisermann, B. (2002): Hydroxyurea-induced partial mushroom body ablation does not affect acquisition and retention of olfactory differential conditioning in honeybees. J Neurobiol, 53, 343 – 360
- Martin, J.-R., Ernst, R., Heisenberg, M. (1998): Mushroom bodies suppress locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. Learn Memory, 5, 179 – 191
- Matsuda, K., Buckingham, S.D., Kleier, D., Rauh, J.J., Grauso, M., Sattelle, D.B. (2001): Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. TRENDS Pharmacol Sci, Vol. 22, No. 11, 573 – 580
- Mauelshagen, J. (1993): Neural correlates of olfactory learning paradigms in an identified neuron in the honeybee brain. J Neurophysiol, Vol. 69, No. 2, 609 – 625
- McCann, F.V., Reece, R.W. (1967): Neuromuscular transmission in insects: effect of injected chemical agents. Comp Biochem Physiol, 21, 115 – 124
- McDonald, T.J., Farley, R.D., March, R.B. (1972): Pharmacological profile of the excitatory neuromuscular synapses of the insect retractor unguis muscle. Comp gen Pharmac, 3, 327 – 338
- McDonald, T.J. (1975): Neuromuscular pharmacology of insects. Annu Rev Entomol, 20, 151 – 166
- Medrzycki, P., Montanari, R., Bortolotti, L., Sabatini, A.G., Maini, S., Porrini, C. (2003): Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bee behaviour. Laboratory tests. Bull Insectology, 56 (1), 59 – 62
- Menzel, R., Bitterman, M.E. (1983): Learning by honeybees in an unnatural situation. In: Huber, F., Markl, H. (Hrsg.): Neuroethology and Behavioral Physiology. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg

- Menzel, R., Greggers, U., Hammer, M. (1993): Functional organization of appetitive learning and memory in a generalist pollinator, the honey bee. In: Papaj, D.R., Lewis, A.C. (eds.): *Insect Learning: Ecological and Evolutionary Perspectives*. Chapman & Hall, New York
- Menzel, R., Müller, U. (1996): Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. *Annu Rev Neurosci*, 19, 379 – 404
- Menzel, R. (1999): Memory dynamics in the honeybee. *J Comp Physiol A*, 185, 323 – 340
- Menzel, R., Giurfa, M. (2001): Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. *TRENDS Cogn Sci*, Vol. 5, No. 2, 62 – 71
- Menzel, R., Manz, G., Menzel, R., Greggers, U. (2001): Massed and spaced learning in honeybees: the role of CS, US, the intertrial interval, and the test interval. *Learn Memory*, 8, 198 – 208
- Menzel, R. (2012): The honeybee as a model for understanding the basis of cognition. *Nature*, Vol. 13, 758 – 768
- Mobbs, P.G. (1982): The brain of the honeybee *Apis mellifera*. I. The connections and spatial organization of the mushroom bodies. *Phil Trans R Soc Lond B*, 298, 309 – 354
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Schmuck, R. (2001): Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Manag Sci*, 57, 577 – 586
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Salgado, V.L., Kausmann, M. (2003): Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pestic Biochem Phys*, 76, 55 – 69
- Page Jr, R.E., Peng, C.Y.-S. (2001): Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Exp Gerontol*, 36, 695 – 711
- Palmer, M.J., Moffat, C., Saranzewa, N., Harvey, J., Wright, G.A., Connolly, C.N. (2013): Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees. *Nat Commun* 4:1634 doi: 10.1038/ncomms2648
- Pankiw, T., Page Jr, R.E. (2000): Response thresholds to sucrose predict foraging division of labor in honeybees. *Behav Ecol Sociobiol*, 47, 265 – 267
- Pavlov, I.P. (1927): *Conditioned reflexes. An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex.* (ed. Anrep, G.V.), Oxford University Press: Humphrey Milford
- Pilling, E., Campbell, P., Coulson, M., Ruddle, N., Tornier, I. (2013): A four-year field program investigating long-term effects of repeated exposure of honey bee colonies to flowering crops treated with thiamethoxam. *PLoS ONE* 8(10): e77193. doi:10.1371/journal.pone.0077193

- Pisa, L.W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Downs, C.A., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., McField, M., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J.D., Van der Sluijs, J.P., Van Dyck, H., Wiemers, M. (2015): Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ Sci Pollut Res*, 22, 68 – 102
- Pohorecka, K., Skubida, P., Miszczak, A., Semkiw, P., Sikorski, P., Zagibajlo, K., Teper, D., Koltowski, Z., Skubida, M., Zdanska, D., Bober, A. (2012): Residues of neonicotinoid insecticides in bee collected plant materials from oilseed rape crops and their effect on bee colonies. *J Apic Sci*, Vol. 56, No. 2, 115 – 134
- Posokhov, Y.O., Kyrychenko, A. (2013): Effect of acetone accumulation on structure and dynamics of lipid membranes studied by molecular dynamics simulations. *Comput Biol Chem*, 46, 23 – 31
- Ramirez-Romero, R., Desneux, N., Decourtye, A., Chaffiol, A., Pham-Delègue, M.H. (2008): Does Cry 1 Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)? *Ecotox Environ Safe*, 70, 327 – 333
- Rehder, V. (1987): Quantification of the honeybee's proboscis reflex by electromyographic recordings. *J Ins Physiol*, Vol. 33, No. 7, 501 – 507
- Rehder, V. (1989): Sensory pathways and motoneurons of the proboscis reflex in the suboesophageal ganglion of the honey bee. *J Comp Neurol*, 279, 499 – 513
- Rescorla, R.A. (1973): Evidence for "unique stimulus" account of configural conditioning. *J Comp Physiol Psych*, Vol. 85, No. 2, 331 – 338
- Roeder, K.D. (1937): The control of tonus and locomotor activity in the praying mantis (*Mantis religiosa* L.). *J Exp Zool*, Vol. 76, No. 3, 353 – 374
- Rundlöf, M., Andersson, G.K.S., Bommarco, R., Fries, I., Hederström, V., Herbertsson, L., Jonsson, O., Klatt, B.K., Pedersen, T.R., Yourstone, J., Smith, H.G. (2015): Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature*, Vol 521, doi:10.1038/nature14420
- Sandoz, J.-C. (2012): Olfaction in honey bees: from molecules to behavior. In: Galizia, C.G., Eisenhardt, D., Giurfa, M. (eds.): *Honeybee Neurobiology and Behavior. A Tribute to Randolph Menzel*. Springer Science+Business Media B.V., Heidelberg London New York
- Schmuck, R., Keppler, J. (2003): Clothianidin – ecotoxicological profile and risk assessment. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 56, 1, 26 – 58
- Schmuck, R., Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U. (2003): Effects of imidacloprid and common plant metabolites of imidacloprid in the honeybee: toxicological and biochemical considerations. *Bull Insectology* 56 (1), 27 – 34
- Schneider, C.W., Tautz, J., Grünewald, B., Fuchs, S. (2012): RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PLoS ONE* 7(1): e30023. doi:10.1371/journal.pone.0030023



- Seifert, J., Stollberg, J. (2005): Antagonism of a neonicotinoid insecticide imidacloprid at neuromuscular receptors. *Environ Toxicol Phar*, 20, 18 – 21
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C.H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E.A.D., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Pisa, L., Settele, J., Stark, J.D., Tapparo, A., Van Dyck, H., Van Praagh, J., Van der Sluijs, J.P., Whitehorn, P.R., Wiemers, M. (2015): Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ Sci Pollut Res*, 22, 5 – 34
- Smith, B.H., Menzel, R. (1989): The use of electromyogram recordings to quantify odourant discrimination in the honey bee, *Apis mellifera*. *J Insect Physiol*, Vol. 35, No. 5, 369 - 375
- Snodgrass, R.E. (1956): *Anatomy of the honey bee*. Comstock Publishing Associates (a division of Cornell University Press), Ithaca, New York
- Stadler, T., Martínez Ginés, D., Buteler, M. (2003): Long-term toxicity assessment of imidacloprid to evaluate side effects on honey bees exposed to treated sunflower in Argentina. *Bull Insectology*, 56 (1), 77 – 81
- Steinbeisser, G.M. (2010): *Effects of acute oral application of the insecticide clothianidine on the habituation in the honeybee*. Bachelorarbeit am Institut für Bienenkunde, Oberursel, Fachbereich Biowissenschaften, Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- Stenersen, J. (2004): *Chemical pesticides: mode of action and toxicology*. CRC Press, Boca Raton, Florida
- Strausfeld, N.J. (2002): Organization of the honey bee mushroom body: representation of the calyx within the vertical and gamma lobes. *J Comp Neurol*, 450, 4 – 33
- Suchail, S., Guez, D., Belzunces, L.P. (2000): Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environ Toxicol Chem*, Vol. 19, No. 7, 1901 – 1905
- Suchail, S., Debrauwer, L., Belzunces, L.P. (2003): Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest Manag Sci*, 60, 291 – 296
- Suchail, S., De Sousa, G., Rahmani, R., Belzunces, L.P. (2004): *In vivo* distribution and metabolisation of <sup>14</sup>C-imidacloprid in different compartments of *Apis mellifera* L. *Pest Manag Sci*, 60, 1056 – 1062
- Szyszkka, P., Demmler, C., Oemisch, M., Sommer, L., Biergans, S., Birnbach, B., Silbering, A.F., Galizia, C.G. (2011): Mind the gap: olfactory trace conditioning in honeybees. *J Neurosci*, 31(20), 7229 – 7239
- Takeda, K. (1961): Classical conditioned response in the honey bee. *J Ins Physiol*, Vol. 6, 168 – 179
- Tan, J., Galligan, J.J., Hollingworth, R.M. (2007): Agonist actions of neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors expressed by cockroach neurons. *NeuroToxicology*, 28, 829 – 842

- Thany, S.H., Lenaers, G., Raymond-Delpech, V., Sattelle, D.B., Lapied, B. (2006): Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors. *TRENDS Pharmacol Sci*, Vol. 28, No. 1, 14 – 22
- Thany, S.H. (2009): Agonist actions of clothianidin on synaptic and extrasynaptic nicotinic acetylcholine receptors expressed on cockroach sixth abdominal ganglion. *NeuroToxicology*, 30, 1045 – 1052
- Thany, S.H. (2011): Thiamethoxam, a poor agonist of nicotinic acetylcholine receptors expressed on isolated cell bodies, acts as a full agonist at cockroach cercal afferent/giant interneuron synapses. *Neuropharmacology*, 60, 587 – 592
- Tomizawa, M., Lee, D.L., Casida, J.E. (2000): Neonicotinoid insecticides: molecular features conferring selectivity for insect versus mammalian nicotinic receptors. *J Agric Food Chem*, 48, 6016 – 6024
- Tomizawa, M., Casida, J.E. (2003): Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu Rev Entomol*, 48, 339 – 364
- Tomizawa, M., Casida, J.E. (2005): Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45, 247 – 268
- Vareschi, E. (1971): Duftunterscheidung bei der Honigbiene – Einzelzell-Ableitungen und Verhaltensreaktionen. *Z vergl Physiol*, 75, 143 – 173
- Wendler, G. (1999): Fortbewegung und sensomotorische Integration. In: Dettner, K., Peters, W. (Hrsg.): *Lehrbuch der Entomologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm
- Weßel, F.K. (2014): Wirkung von Clothianidin auf die Flugaktivität und das Heimfindevermögen von Honigbienen (*Apis mellifera carnica*). Bachelorarbeit am Institut für Bienenkunde, Oberursel, Fachbereich Biowissenschaften, Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- Whitehorn, P.R., O'Connor, S., Wackers, F.L., Goulson, D. (2012): Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*, 336, 351 – 352
- Williamson, S.M., Wright, G.A. (2013): Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. *J Exp Biol*, 216, 1799 – 1807
- Williamson, S.M., Baker, D.D., Wright, G.A. (2013): Acute exposure to a sublethal dose of imidacloprid and coumaphos enhances olfactory learning and memory in the honeybee *Apis mellifera*. *Invert Neurosci*, 13, 63 – 70
- Williamson, S.M., Willis, S.J., Wright, G.A. (2014): Exposure to neonicotinoids influences the motor function of adult worker honeybees. *Ecotoxicology*, 23, 1409 – 1418
- Witthöft, W. (1967): Absolute Anzahl und Verteilung der Zellen im Hirn der Honigbiene. *Z Morph Tiere*, 61, 160 – 184
- Wüstenberg, D.G., Grünewald, B. (2004): Pharmacology of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor of cultured Kenyon cells of the honeybee, *Apis mellifera*. *J Comp Physiol A*, 190, 807 – 821

## Internet

<http://www.holtermann-shop.de/> (11.03.2015)

<http://www.langsrud.com/stat/Fishertest.htm> (10.12.2014)

## II Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Verlauf des Muskels M17 (Abbildung: Goodman, 2003; reproduced by permission of the International Bee Research Association). .....	5
<b>Abbildung 2:</b> Elektromyogramm des Muskels M17 während des PERs. ....	7
<b>Abbildung 3:</b> Abfangen der Bienen. ....	19
<b>Abbildung 4:</b> Biene mit eingeschnittener Öffnung in der Kopfkapsel. ....	20
<b>Abbildung 5:</b> Bienen – vorbereitet für die folgenden Versuche. ....	20
<b>Abbildung 6:</b> Schematische Darstellung des Ablaufs der Experimente. ....	22
<b>Abbildung 7:</b> Beispiele für Elektromyogramme des Muskels M17 während des PERs. ....	26
<b>Abbildung 8:</b> Verteilung der Anzahl an Spikes 5 Sekunden vor dem Zuckerstimulus zu den verschiedenen Messzeitpunkten. ....	27
<b>Abbildung 9:</b> Verteilung der Anzahl an Spikes für 20 Sekunden ab Stimulusbeginn zu den verschiedenen Messzeitpunkten. ....	28
<b>Abbildung 10:</b> Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Clothianidin (1 $\mu$ M), n = 30) und der Kontrollgruppe (PBS, n = 30). ....	29
<b>Abbildung 11:</b> Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Clothianidin (1 $\mu$ M), n = 30, grün) und der Kontrollgruppe (PBS, n = 30, blau) in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. ....	29
<b>Abbildung 12:</b> Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Thiacloprid (1 $\mu$ M), n = 30, lila) und der Kontrollgruppe (PBS, n = 30, blau) in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. ....	30
<b>Abbildung 13:</b> Verteilung der Anzahl an Spikes 5 Sekunden vor dem Zuckerstimulus zu den verschiedenen Messzeitpunkten. ....	31
<b>Abbildung 14:</b> Verteilung der Anzahl an Spikes für 20 Sekunden ab Stimulusbeginn zu den verschiedenen Messzeitpunkten. ....	32
<b>Abbildung 15:</b> Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe 1 (Clothianidin (1 $\mu$ M) + Thiacloprid (10 $\mu$ M), n = 18) und der Versuchsgruppe 2 (Thiacloprid (10 $\mu$ M) + Clothianidin (1 $\mu$ M), n = 17). ....	33
<b>Abbildung 16:</b> Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Versuchsgruppe 1 (Clothianidin (1 $\mu$ M) + Thiacloprid (10 $\mu$ M), n = 18). ....	34
<b>Abbildung 17:</b> Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Versuchsgruppe 2 (Thiacloprid (10 $\mu$ M) + Clothianidin (1 $\mu$ M), n = 17). ....	35
<b>Abbildung 18:</b> Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 6 (Thiacloprid (10 $\mu$ M) + PBS, n = 15) und der Versuchsgruppe 2 (Thiacloprid (10 $\mu$ M) + Clothianidin (1 $\mu$ M), n = 17). ....	36
<b>Abbildung 19:</b> Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 6 (Thiacloprid (10 $\mu$ M) + PBS, n = 15, lila) und der Versuchsgruppe 2 (Thiacloprid (10 $\mu$ M) + Clothianidin (1 $\mu$ M), n = 17, dunkelgrün) in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. ....	36
<b>Abbildung 20:</b> Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Kontrollgruppe 4 (Clothianidin (1 $\mu$ M) + PBS, n = 17). ....	37
<b>Abbildung 21:</b> Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Kontrollgruppe 5 (PBS + Clothianidin (1 $\mu$ M), n = 18). ....	38
<b>Abbildung 22:</b> Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Kontrollgruppe 6 (Thiacloprid (10 $\mu$ M) + PBS, n = 15). ....	39
<b>Abbildung 23:</b> Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Kontrollgruppe 7 (PBS + Thiacloprid (10 $\mu$ M), n = 18). ....	39

<b>Abbildung 24:</b> Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 9 (PBS + PBS, n = 22) und der Kontrollgruppe 8 (PBS & Aceton + PBS & Aceton, n = 20).....	40
<b>Abbildung 25:</b> Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 9 (PBS + PBS, n = 22, dunkelblau) und der Kontrollgruppe 8 (PBS & Aceton + PBS & Aceton, n = 20, königsblau) in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.....	41
<b>Abbildung 26:</b> Biene, die akut gefüttert wird. ....	52
<b>Abbildung 27:</b> Verteilung der Anzahl an Spikes 5 Sekunden vor dem Zuckerstimulus zu den verschiedenen Messzeitpunkten. ....	53
<b>Abbildung 28:</b> Verteilung der Anzahl an Spikes für 20 Sekunden ab Stimulusbeginn zu den verschiedenen Messzeitpunkten.....	54
<b>Abbildung 29:</b> Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Clothianidin (1 ng), n = 30) und der Kontrollgruppe (Zuckerwasser, n = 30). ....	55
<b>Abbildung 30:</b> Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Clothianidin (1 ng), n = 30, grün) und der Kontrollgruppe (Zuckerwasser, n = 30, blau) in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. ....	56
<b>Abbildung 31:</b> Verteilung der Anzahl an Spikes 5 Sekunden vor dem Zuckerstimulus zu den verschiedenen Messzeitpunkten. ....	57
<b>Abbildung 32:</b> Verteilung der Anzahl an Spikes für 20 Sekunden ab Stimulusbeginn zu den verschiedenen Messzeitpunkten.....	58
<b>Abbildung 33:</b> Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Thiacloprid (250 ng), n = 28) und der Kontrollgruppe (Zuckerwasser, n = 29). ....	59
<b>Abbildung 34:</b> Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Thiacloprid (250 ng), n = 28, lila) und der Kontrollgruppe (Zuckerwasser, n = 29, blau) in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.....	59
<b>Abbildung 35:</b> Unterbringung und Versorgung der Bienen im Flugzelt. ....	66
<b>Abbildung 36:</b> Markierung der Bienen auf dem Thorax. ....	67
<b>Abbildung 37:</b> Anzahl der Bienen der verschiedenen Völker. ....	69
<b>Abbildung 38:</b> Anzahl der Brutzellen der verschiedenen Völker. ....	70
<b>Abbildung 39:</b> Beispiele für Elektromyogramme des Muskels M17 während des PERs....	71
<b>Abbildung 40:</b> Verteilung der Anzahl an Spikes 5 Sekunden vor dem Zuckerstimulus zu den verschiedenen Messzeitpunkten. ....	72
<b>Abbildung 41:</b> Verteilung der Anzahl an Spikes für 20 Sekunden ab Stimulusbeginn zu den verschiedenen Messzeitpunkten.....	73
<b>Abbildung 42:</b> Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe II (K/-, n = 32) und der Gruppe IV (K/T, n = 29). ....	75
<b>Abbildung 43:</b> Anzahl der Bienen der verschiedenen Völker. ....	78
<b>Abbildung 44:</b> Anzahl der Brutzellen der verschiedenen Völker. ....	79
<b>Abbildung 45:</b> Verteilung der Anzahl an Spikes 5 Sekunden vor dem Zuckerstimulus zu den verschiedenen Messzeitpunkten. ....	80
<b>Abbildung 46:</b> Verteilung der Anzahl an Spikes für 20 Sekunden ab Stimulusbeginn zu den verschiedenen Messzeitpunkten.....	81
<b>Abbildung 47:</b> Vergleich der medianen Spikeraten von Gruppe III (T/C, n = 29, grün) und von Gruppe IV (K/C, n = 31, rot) in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. ....	82
<b>Abbildung 48:</b> Vergleich der medianen Spikeraten von Gruppe II (K/-, n = 32, blau) und von Gruppe IV (K/C, n = 31, rot) in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. ....	83

<b>Abbildung 49:</b> Injizieren von Clothianidin bzw. der Kontrolllösung (Foto: Annkathrin Hausmann).....	99
<b>Abbildung 50:</b> Versuchsaufbau für die Konditionierung (Foto: verändert nach Annkathrin Hausmann).....	101
<b>Abbildung 51:</b> Ablauf der Konditionierung in der ersten und zweiten Versuchsreihe.....	102
<b>Abbildung 52:</b> Ablauf der Konditionierung in der dritten Versuchsreihe.....	102
<b>Abbildung 53:</b> Ablauf eines belohnten Lernaktes (AB <sup>+</sup> ).....	103
<b>Abbildung 54:</b> Ablauf eines unbelohnten Lernaktes (A <sup>-</sup> bzw. B <sup>-</sup> ).....	103
<b>Abbildung 55:</b> Ablauf eines Abrufttests. ....	104
<b>Abbildung 56:</b> Akquisitionstest der Kontrollgruppe (n = 110).....	106
<b>Abbildung 57:</b> Akquisitionstest der Versuchsgruppe (n = 116). ....	106
<b>Abbildung 58:</b> Akquisitionstest der Kontroll- (K: n = 110) und der Versuchsgruppe (C: n = 116) im Vergleich.....	107
<b>Abbildung 59:</b> Abrufttest der Versuchs- (n = 116) und der Kontrollgruppe (n = 110) nach 3 Stunden.....	108
<b>Abbildung 60:</b> Abrufttest der Versuchs- (n = 93) und der Kontrollgruppe (n = 95) nach 19 Stunden.....	109
<b>Abbildung 61:</b> Lernraten der Versuchs- und der Kontrollgruppe zu den beiden Abrufttests (3 h und 19 h).....	110
<b>Abbildung 62:</b> Akquisitionstest der Kontrollgruppe (n = 107).....	111
<b>Abbildung 63:</b> Akquisitionstest der Versuchsgruppe (n = 106). ....	111
<b>Abbildung 64:</b> Akquisitionstest der Kontroll- (K: n = 107) und der Versuchsgruppe (C: n = 106) im Vergleich.....	112
<b>Abbildung 65:</b> Abrufttest der Versuchs- (n = 106) und der Kontrollgruppe (n = 107) nach 3 Stunden.....	113
<b>Abbildung 66:</b> Abrufttest der Versuchs- (n = 61) und der Kontrollgruppe (n = 86) nach 19 Stunden.....	114
<b>Abbildung 67:</b> Lernraten der Versuchs- und der Kontrollgruppe zu den beiden Abrufttests (3 h und 19 h).....	115
<b>Abbildung 68:</b> Akquisitionstest der Kontrollgruppe (n = 74).....	116
<b>Abbildung 69:</b> Akquisitionstest der Versuchsgruppe (n = 71). ....	116
<b>Abbildung 70:</b> Akquisitionstest der Kontroll- (K: n = 74) und der Versuchsgruppe (C: n = 71) im Vergleich.....	117
<b>Abbildung 71:</b> Abrufttest der Versuchs- (n = 71) und der Kontrollgruppe (n = 74) nach 3 Stunden.....	117
<b>Abbildung 72:</b> Abrufttest der Versuchs- (n = 69) und der Kontrollgruppe (n = 73) nach 18 Stunden.....	118
<b>Abbildung 73:</b> Lernraten der Versuchs- und der Kontrollgruppe zu den beiden Abrufttests (3 h und 18 h).....	119

Wenn nicht anders gekennzeichnet, sind die Bilder von der Autorin selbst angefertigt.

### III Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Versuchs- und Kontrollgruppen, die für die Doppelapplikation getestet wurden, und jeweilige Anzahl an getesteten Bienen (n).....	24
<b>Tabelle 2:</b> Zusammenfassung der Ergebnisse der zeitversetzten Doppelapplikation, 4. Messzeitpunkt. ....	42
<b>Tabelle 3:</b> Probenanalyse von Bienen der Kontroll- und der Versuchsgruppe.....	56
<b>Tabelle 4:</b> Probenanalyse von Bienen der Kontroll- und der Versuchsgruppe.....	60
<b>Tabelle 5:</b> p-Werte der chronischen Fütterung mit Clothianidin bzw. akuten Fütterung mit Thiachloprid 5 Sekunden vor dem Zuckerstimulus zu den verschiedenen Messzeitpunkten. ....	72
<b>Tabelle 6:</b> p-Werte der chronischen Fütterung mit Clothianidin bzw. akuten Fütterung mit Thiachloprid für 20 Sekunden ab Stimulusbeginn zu den verschiedenen Messzeitpunkten. ....	74
<b>Tabelle 7:</b> Probenanalyse von eingelagertem und angerührtem Futter der Kontroll- und der Versuchsgruppe.....	76
<b>Tabelle 8:</b> Probenanalyse von Bienen der verschiedenen Gruppen.....	77
<b>Tabelle 9:</b> p-Werte der chronischen Fütterung mit Thiachloprid bzw. akuten Fütterung mit Clothianidin 5 Sekunden vor dem Zuckerstimulus zu den verschiedenen Messzeitpunkten. ....	80
<b>Tabelle 10:</b> Probenanalyse von eingelagertem und angerührtem Futter der Kontroll- und der Versuchsgruppe.....	84
<b>Tabelle 11:</b> Probenanalyse von Bienen der verschiedenen Gruppen.....	85
<b>Tabelle 12:</b> Sterberaten der verschiedenen Versuchsreihen.....	105

#### **IV Danksagung**



**V Anhang**

Der Anhang befindet sich in digitaler Form auf der CD ganz hinten in der Arbeit.

## **VI Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Effekte von Neonikotinoiden auf die Aktivität des Muskels M17 und das Lernverhalten der Honigbiene“

selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Frankfurt, den 19.08.2015

---

Martina Kabrede

**VII Lebenslauf**

## Anhang zur Dissertation „Effekte von Neonikotinoiden auf die Aktivität des Muskels M17 und das Lernverhalten der Honigbiene“ von Martina Kabrede.

### Zu Kapitel 2: Applikation von Neonikotinoiden in die Kopfkapsel

#### Einzelapplikationen

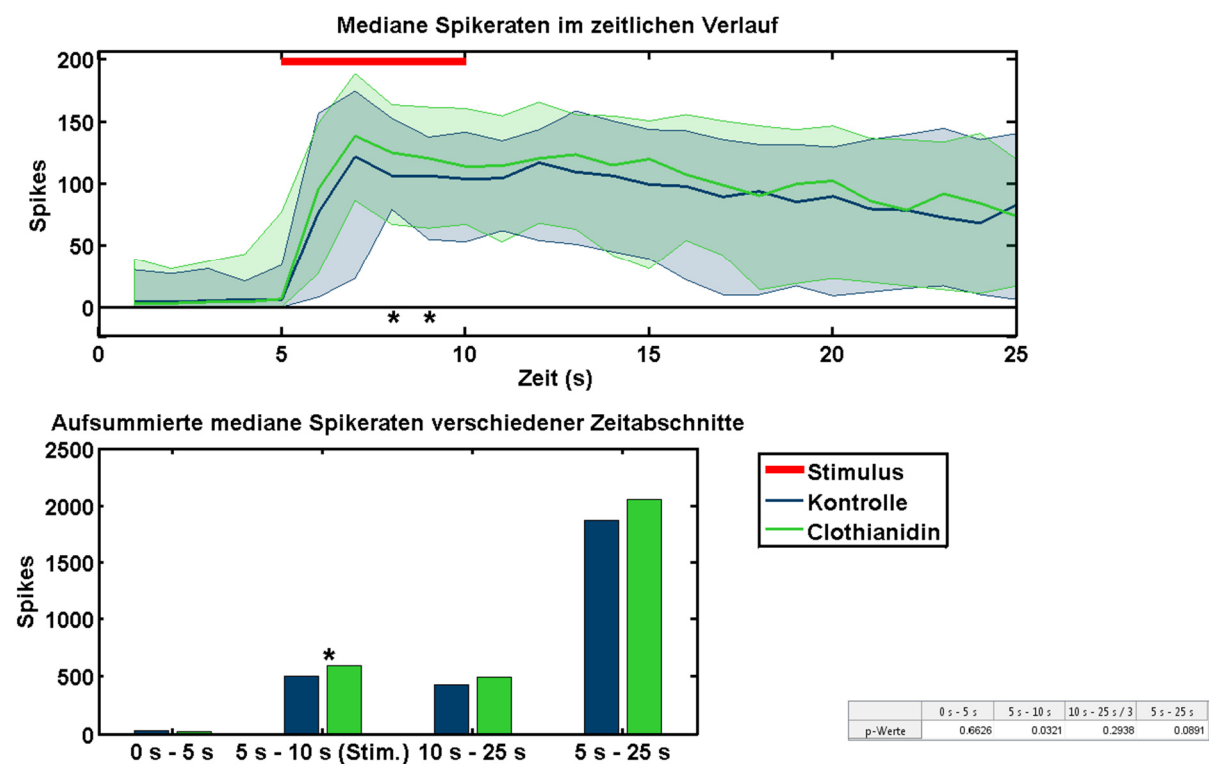


Abbildung 74: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Clothianidin (1  $\mu$ M), n = 30) und der Kontrollgruppe (PBS, n = 30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. Vortest; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt während des Stimulus' (5 s – 10 s, p = 0,0321). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \*p  $\leq$  0,05 Wilcoxon Ranksum Test.

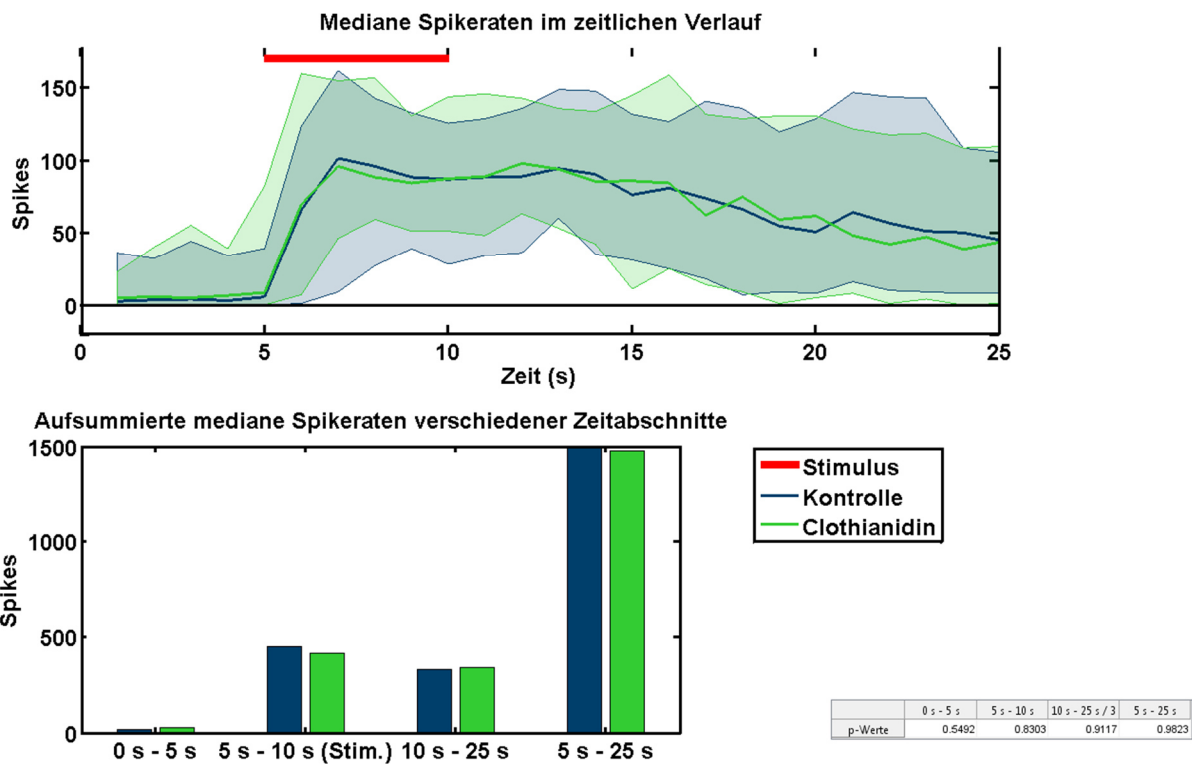


Abbildung 75: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Clothianidin (1  $\mu$ M), n = 30) und der Kontrollgruppe (PBS, n = 30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 20 Sekunden nach Applikation; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

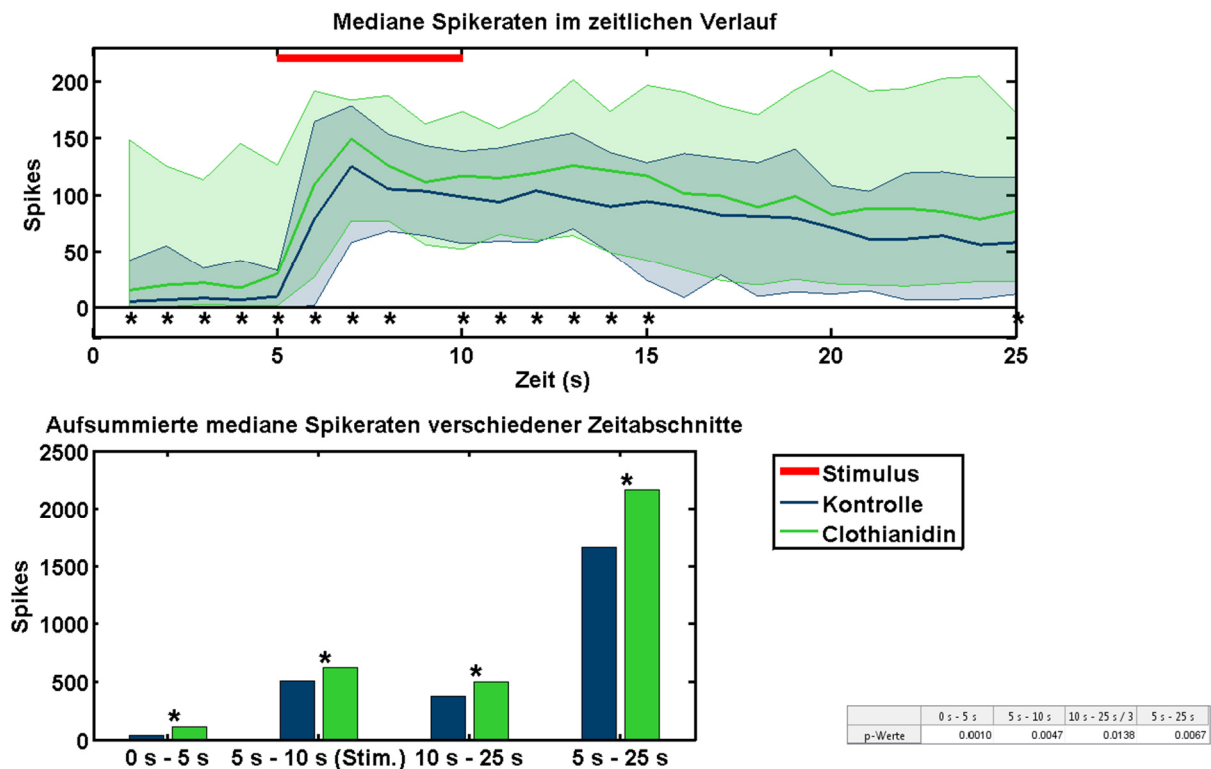


Abbildung 76: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Clothianidin (1  $\mu$ M), n = 30) und der Kontrollgruppe (PBS, n = 30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 10 Minuten nach Applikation; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen über den gesamten Messzeitraum signifikante Unterschiede (0 s – 5 s: p = 0,0010, 5 s – 10 s: p = 0,0047, 10 s – 25 s: p = 0,0138, 5 s – 25 s: p = 0,0067. Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \*p  $\leq$  0,05 Wilcoxon Ranksum Test.

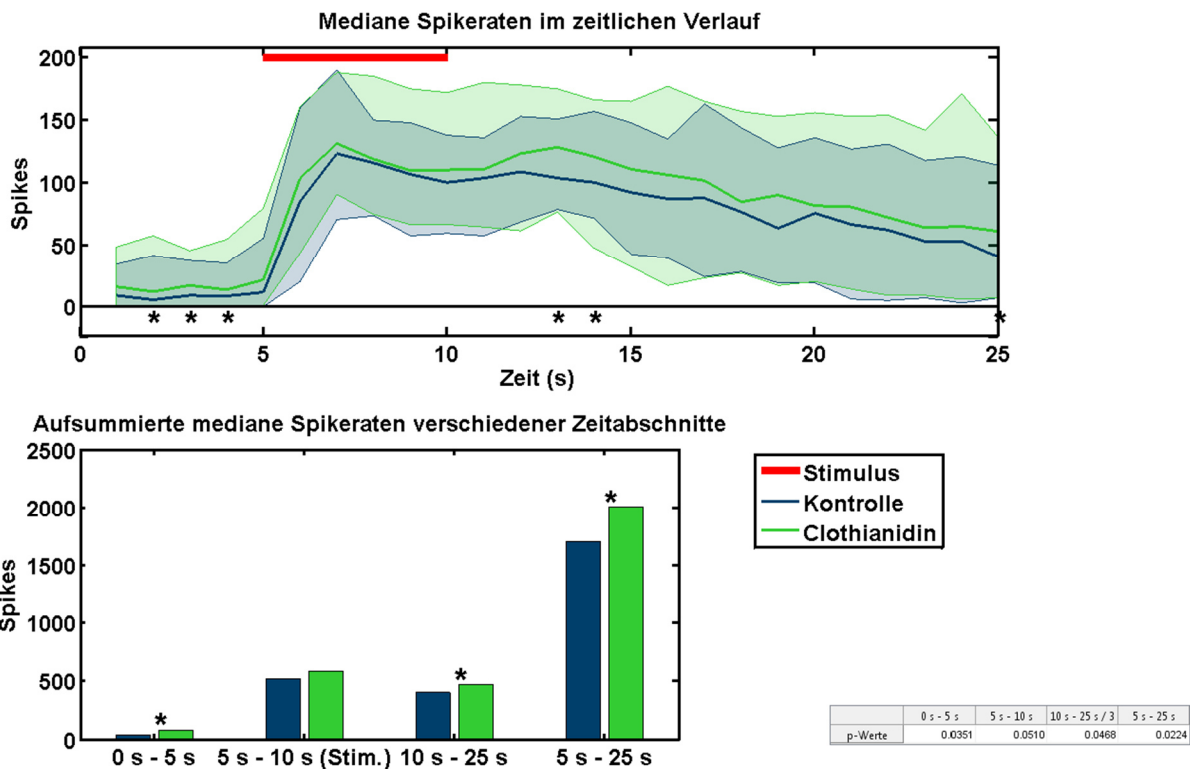


Abbildung 77: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Clothianidin (1  $\mu$ M), n = 30) und der Kontrollgruppe (PBS, n = 30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 20 Minuten nach Applikation; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0351$ ), im Zeitabschnitt nach dem Stimulus ( $p = 0,0468$ ), und über 20 Sekunden ab Stimulusbeginn ( $p = 0,0224$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

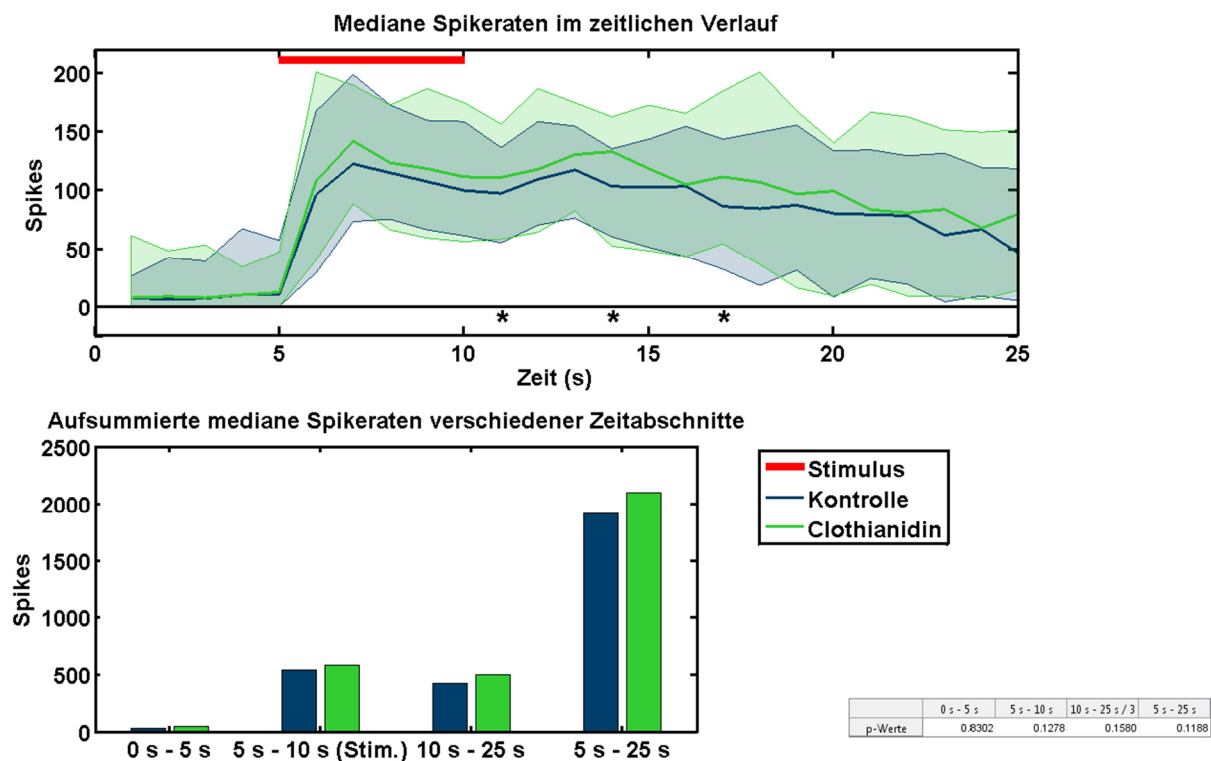


Abbildung 78: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Clothianidin (1  $\mu$ M), n = 30) und der Kontrollgruppe (PBS, n = 30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 60 Minuten nach Applikation; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.



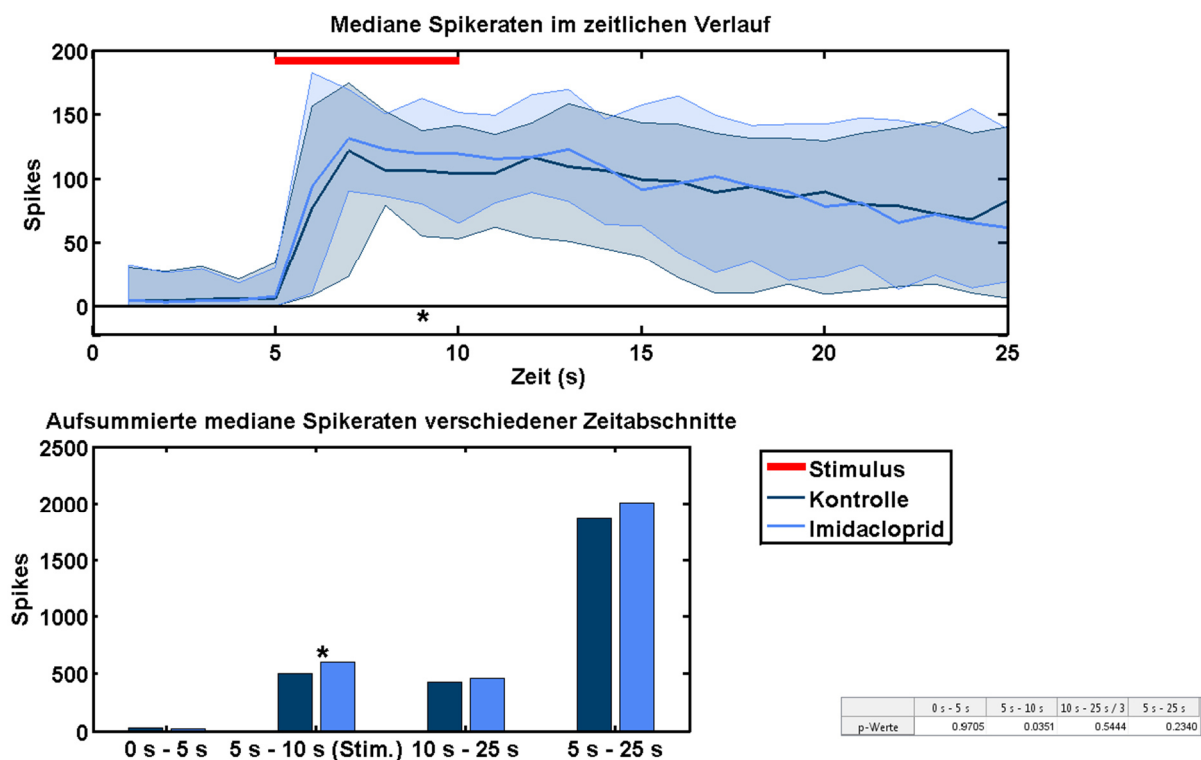


Abbildung 79: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Imidacloprid (1  $\mu$ M), n = 30) und der Kontrollgruppe (PBS, n = 30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. Vortest; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt während des Stimulus (5 s – 10 s, p = 0,0351). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \*p  $\leq$  0,05 Wilcoxon Ranksum Test.

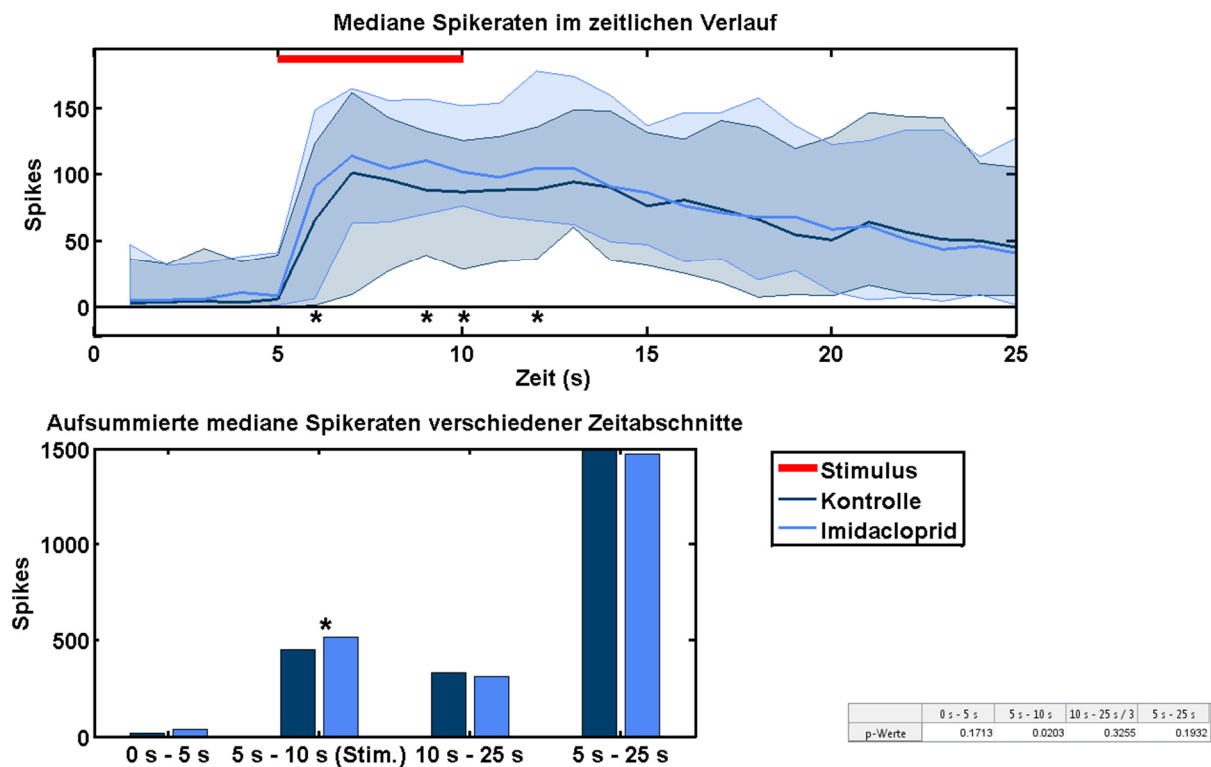


Abbildung 80: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Imidacloprid (1  $\mu$ M), n = 30) und der Kontrollgruppe (PBS, n = 30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 20 Sekunden nach Applikation; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt während des Stimulus (5 s – 10 s, p = 0,0203). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \*p  $\leq$  0,05 Wilcoxon Ranksum Test.

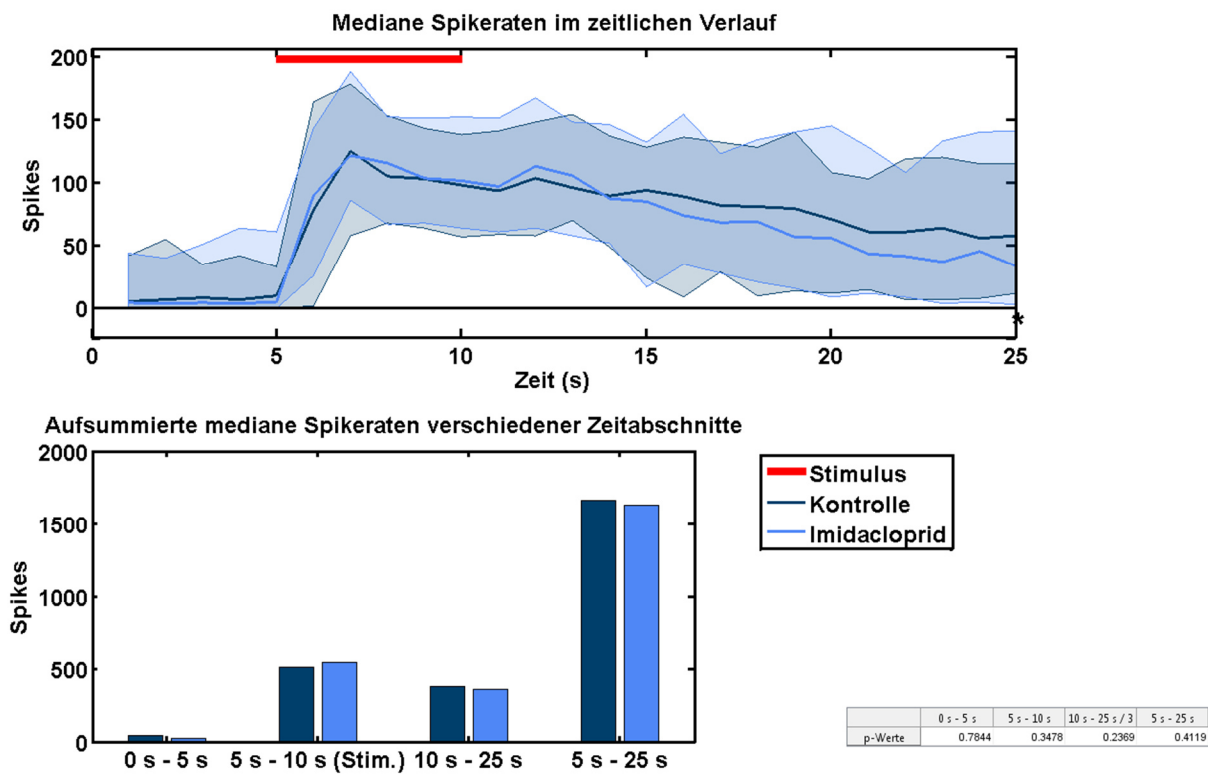


Abbildung 81: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Imidacloprid (1  $\mu$ M), n = 30) und der Kontrollgruppe (PBS, n = 30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 10 Minuten nach Applikation; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

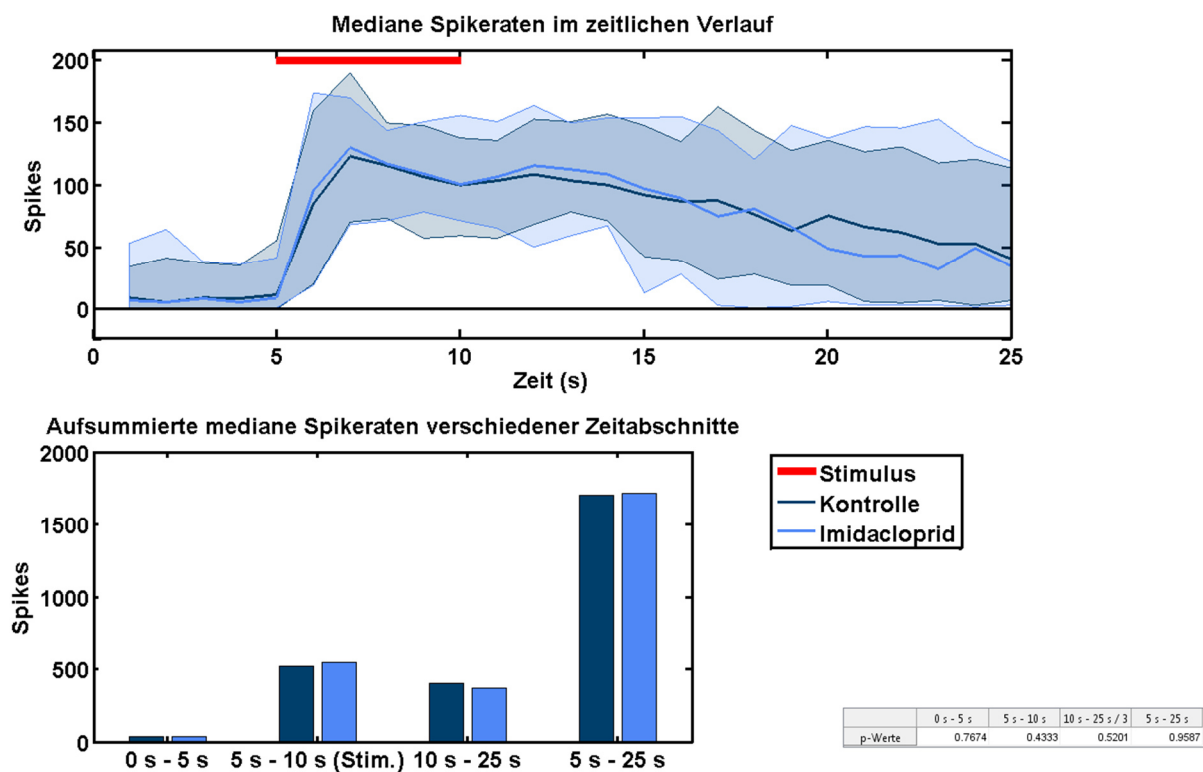


Abbildung 82: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Imidacloprid (1  $\mu$ M), n = 30) und der Kontrollgruppe (PBS, n = 30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 20 Minuten nach Applikation; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

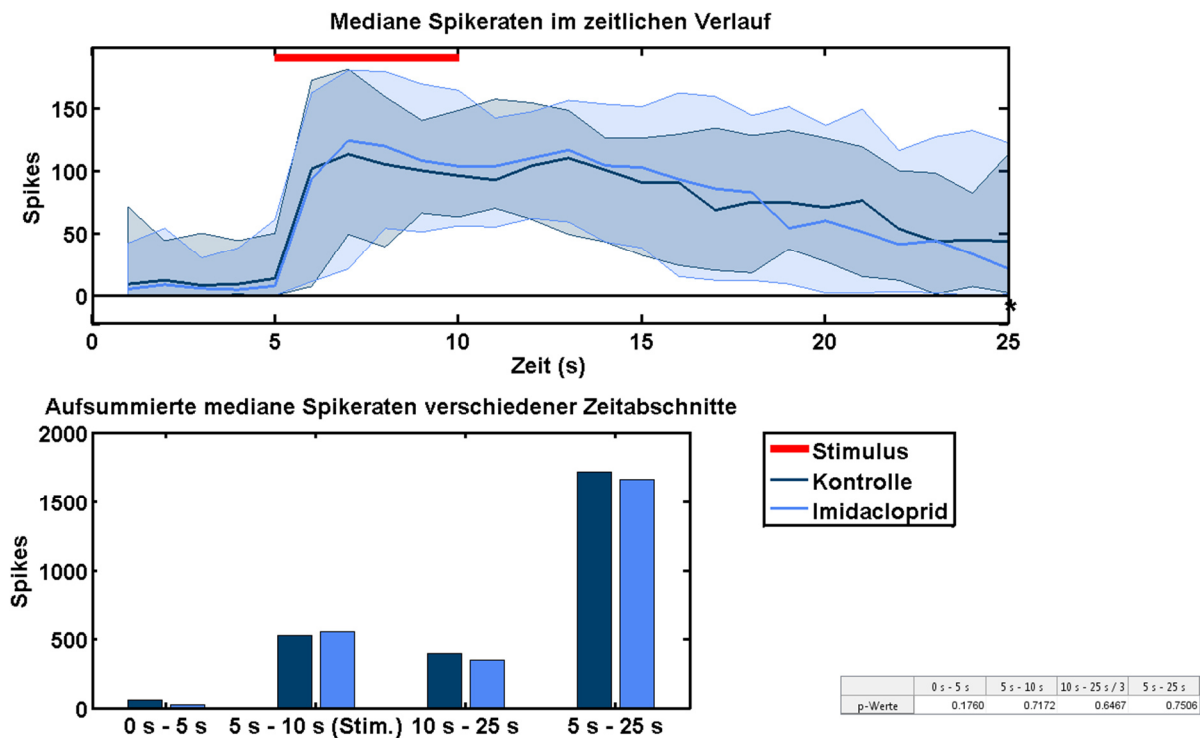


Abbildung 83: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Imidacloprid (1  $\mu$ M), n = 30) und der Kontrollgruppe (PBS, n = 30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 30 Minuten nach Applikation; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

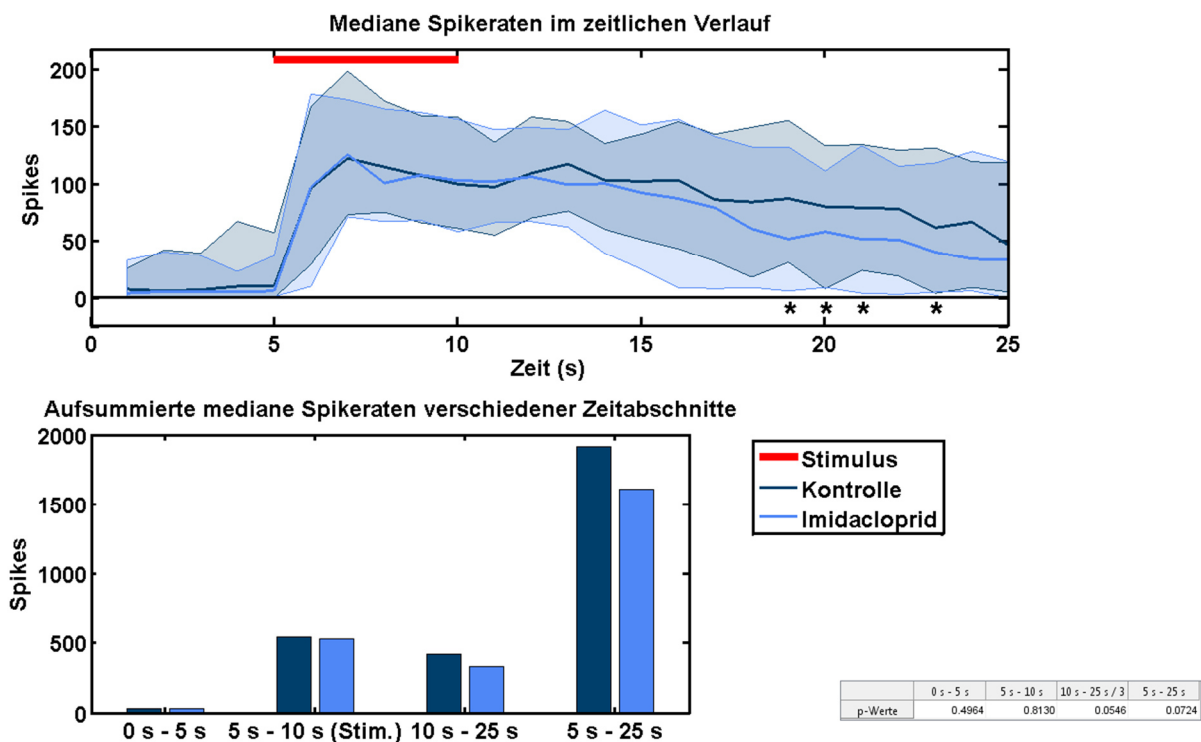


Abbildung 84: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Imidacloprid (1  $\mu$ M), n = 30) und der Kontrollgruppe (PBS, n = 30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 60 Minuten nach Applikation; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

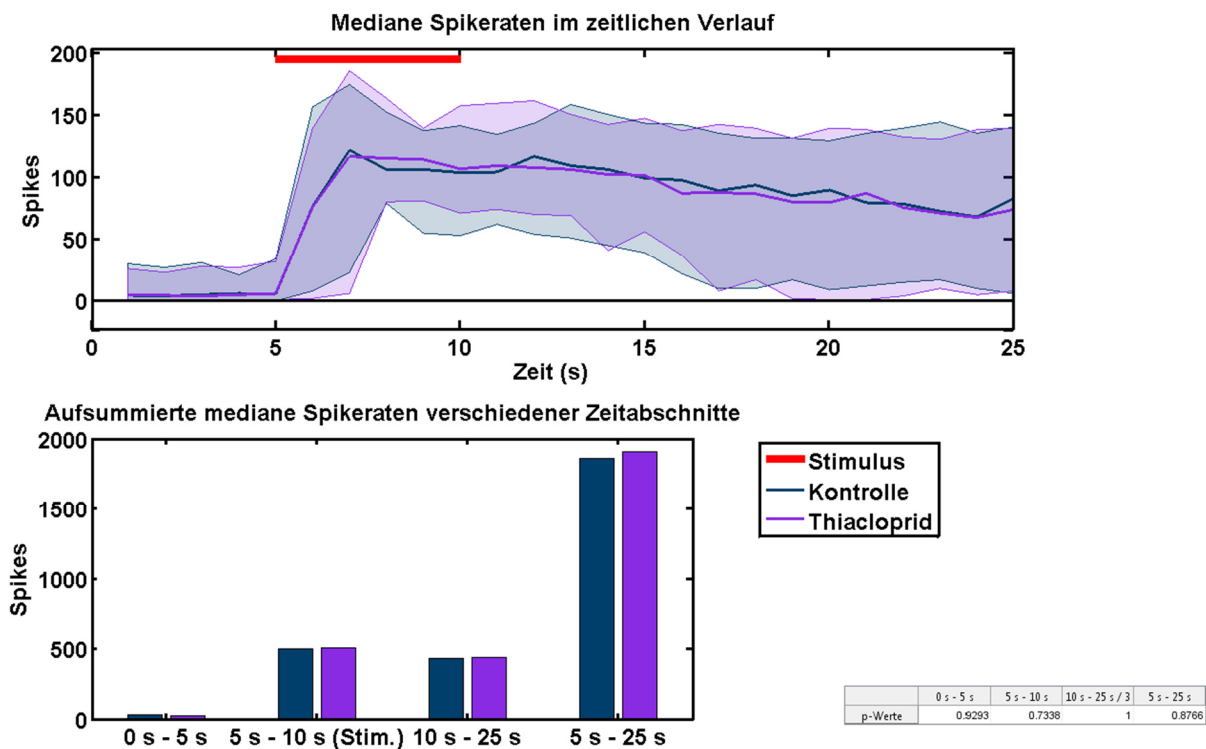


Abbildung 85: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Thiacloprid (1  $\mu$ M), n = 30) und der Kontrollgruppe (PBS, n = 30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. Vortest; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

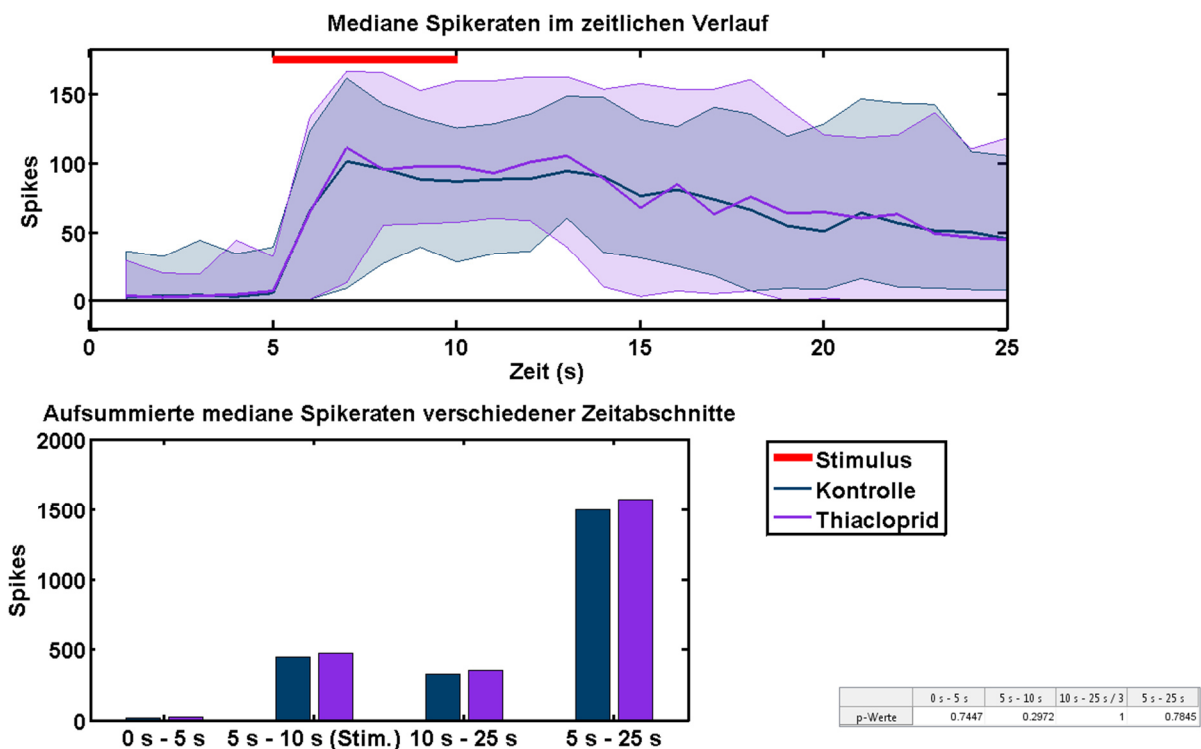


Abbildung 86: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Thiaclopid (1  $\mu$ M), n = 30) und der Kontrollgruppe (PBS, n = 30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 20 Sekunden nach Applikation; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.



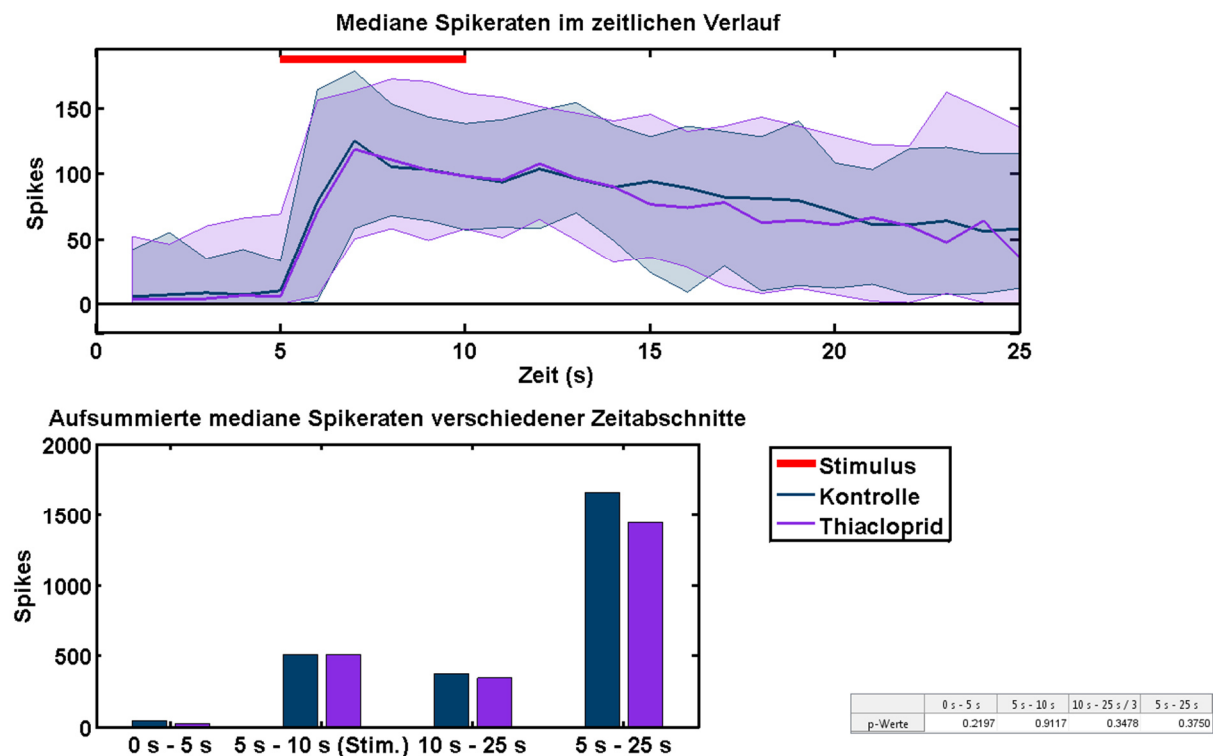


Abbildung 87: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Thiaclopid (1  $\mu$ M), n = 30) und der Kontrollgruppe (PBS, n = 30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 10 Minuten nach Applikation; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

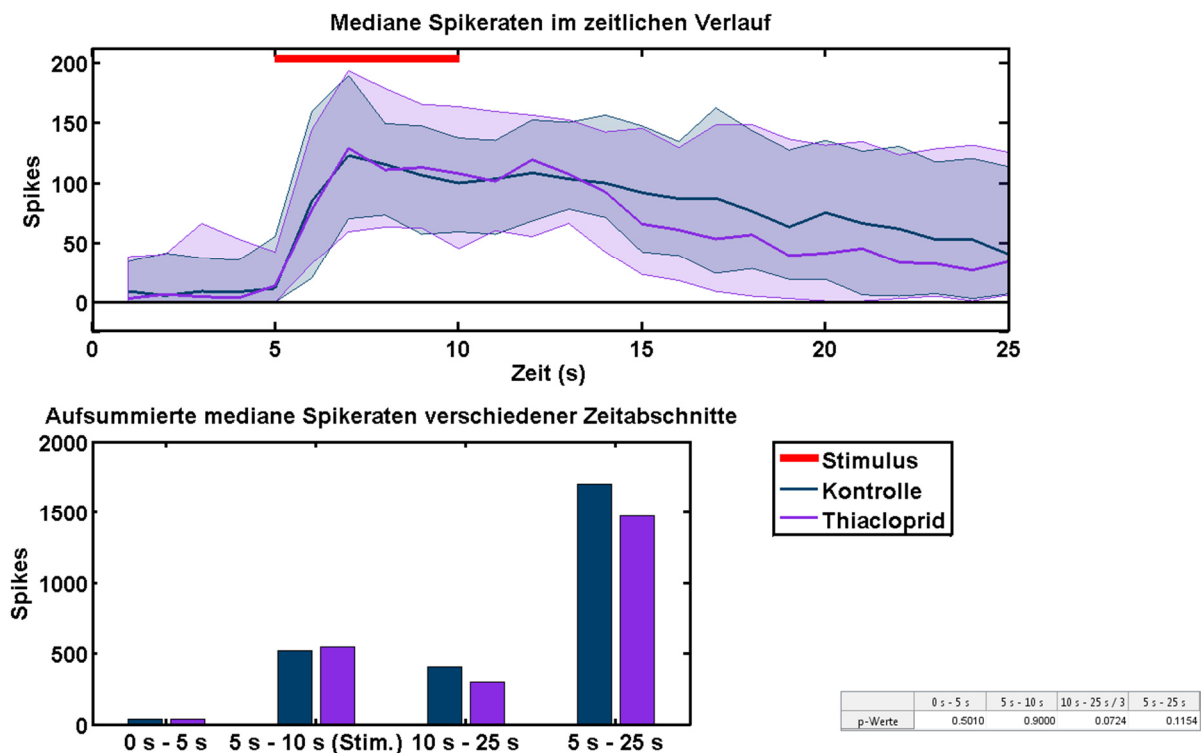


Abbildung 88: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Thiacloprid (1  $\mu$ M), n = 30) und der Kontrollgruppe (PBS, n = 30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 20 Minuten nach Applikation; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

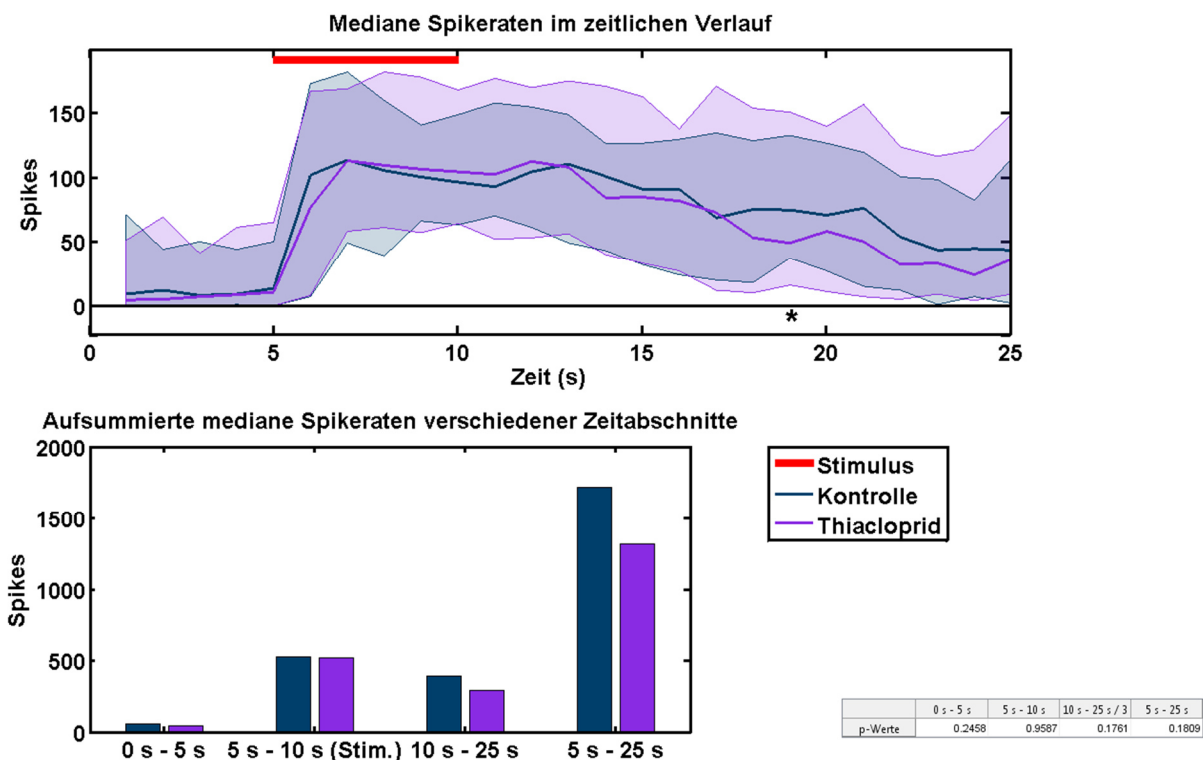


Abbildung 89: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Thiaclopid (1  $\mu$ M), n = 30) und der Kontrollgruppe (PBS, n = 30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 30 Minuten nach Applikation; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

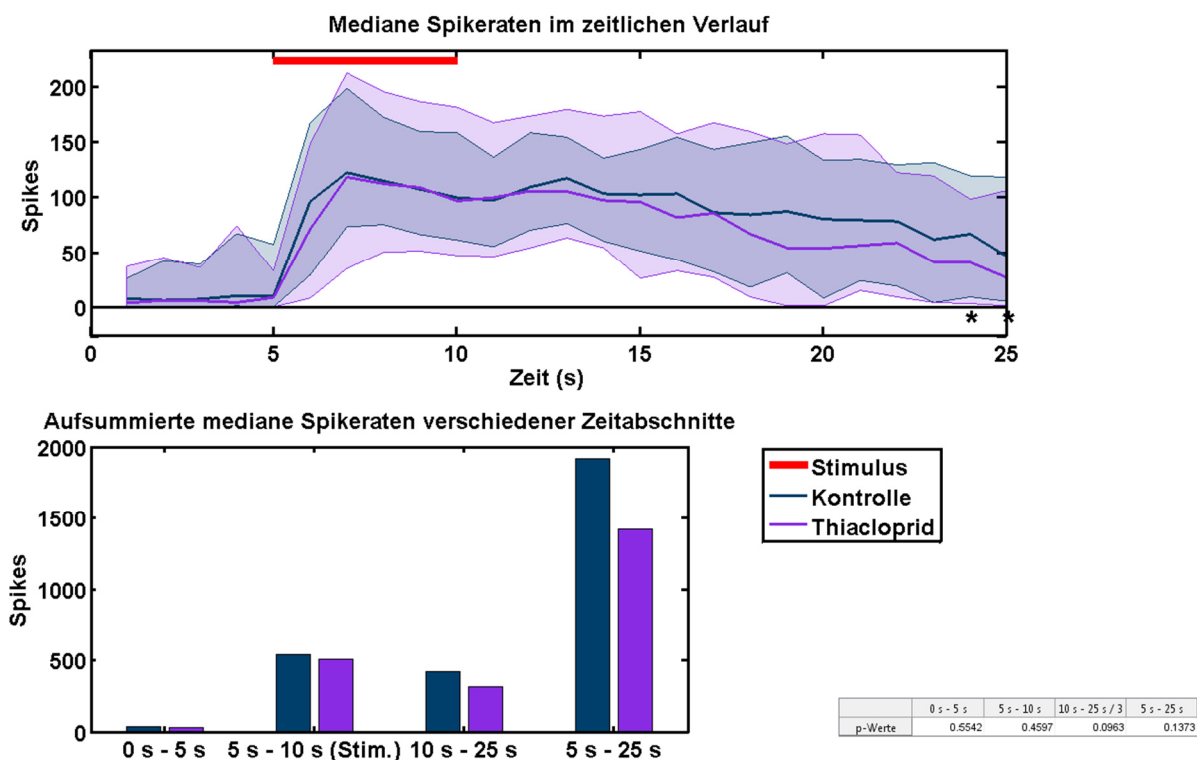


Abbildung 90: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Thiaclopid (1  $\mu$ M), n = 30) und der Kontrollgruppe (PBS, n = 30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 60 Minuten nach Applikation; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

## Doppelapplikationen

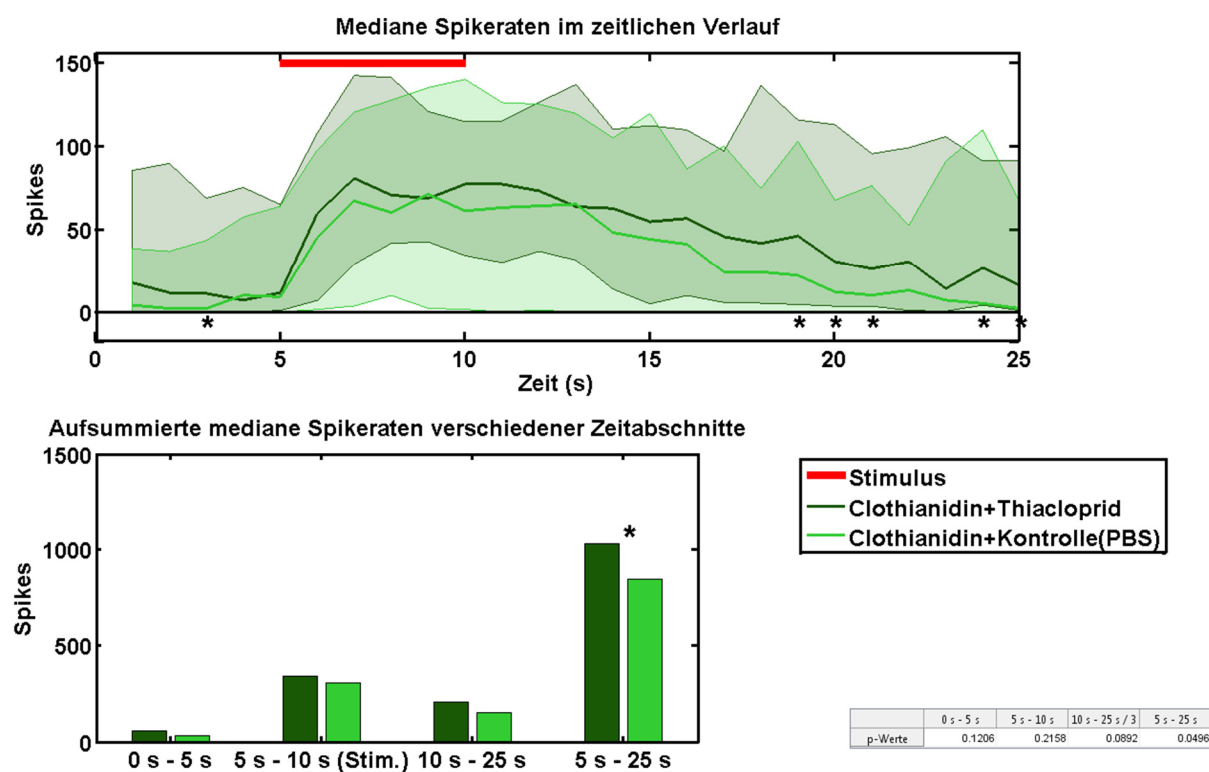


Abbildung 91: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe 1 (Clothianidin (1  $\mu$ M) + Thiacloprid (10  $\mu$ M), n = 18) und der Kontrollgruppe 4 (Clothianidin (1  $\mu$ M) + PBS, n = 17) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

3. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt über 20 Sekunden ab Stimulusbeginn ( $p = 0,0496$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

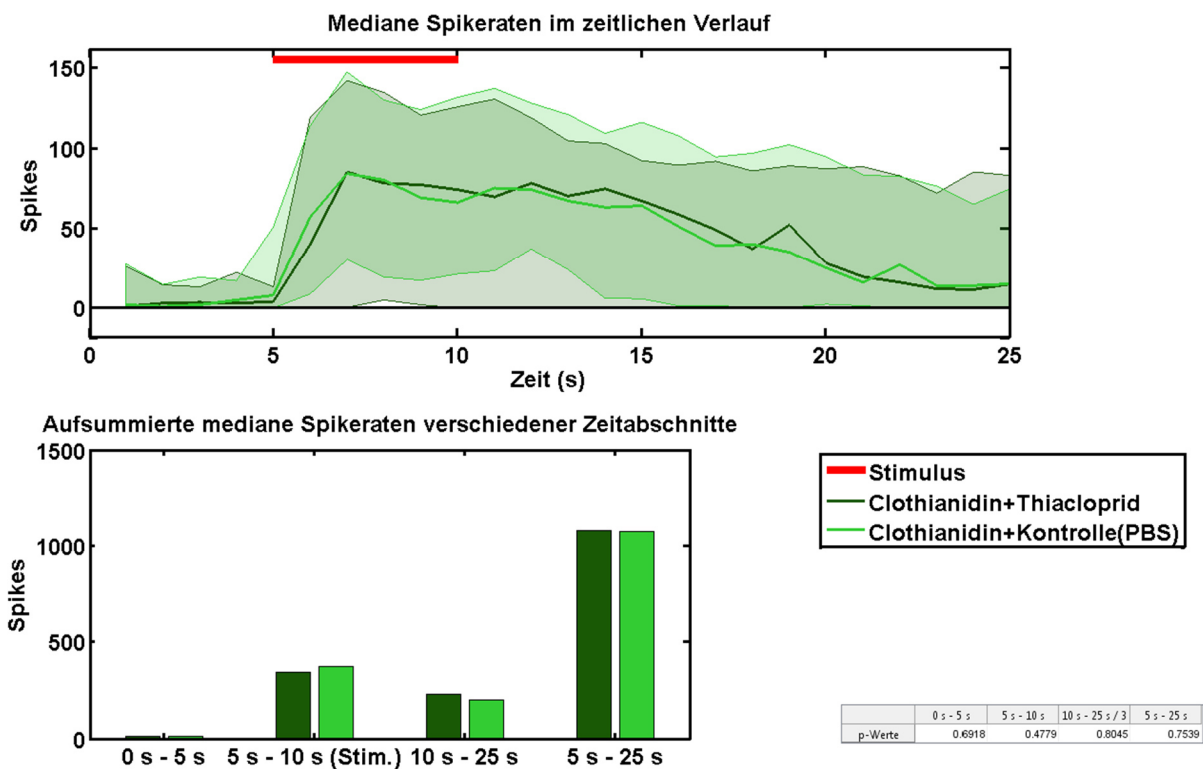


Abbildung 92: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe 1 (Clothianidin (1 µM) + Thiachloprid (10 µM), n = 18) und der Kontrollgruppe 4 (Clothianidin (1 µM) + PBS, n = 17) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

4. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

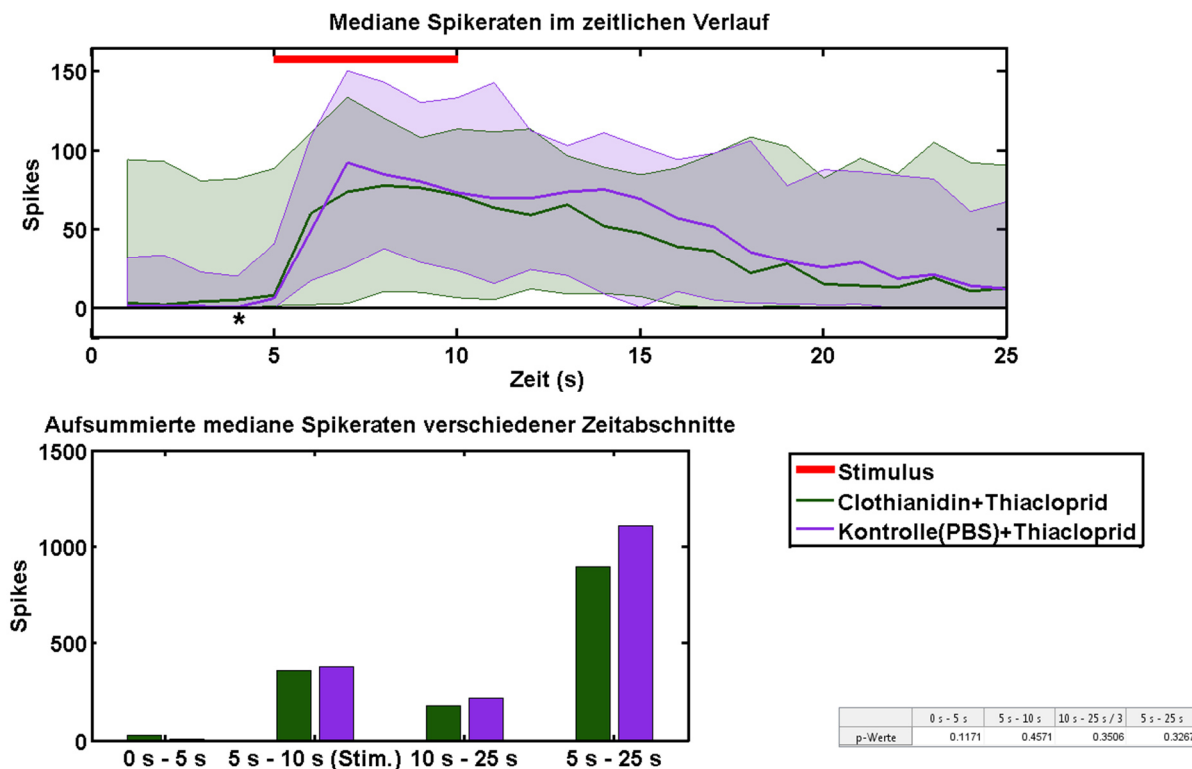


Abbildung 93: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe 1 (Clothianidin (1 µM) + Thiacloprid (10 µM), n = 18) und der Kontrollgruppe 7 (PBS + Thiacloprid (10 µM), n = 18) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

2. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

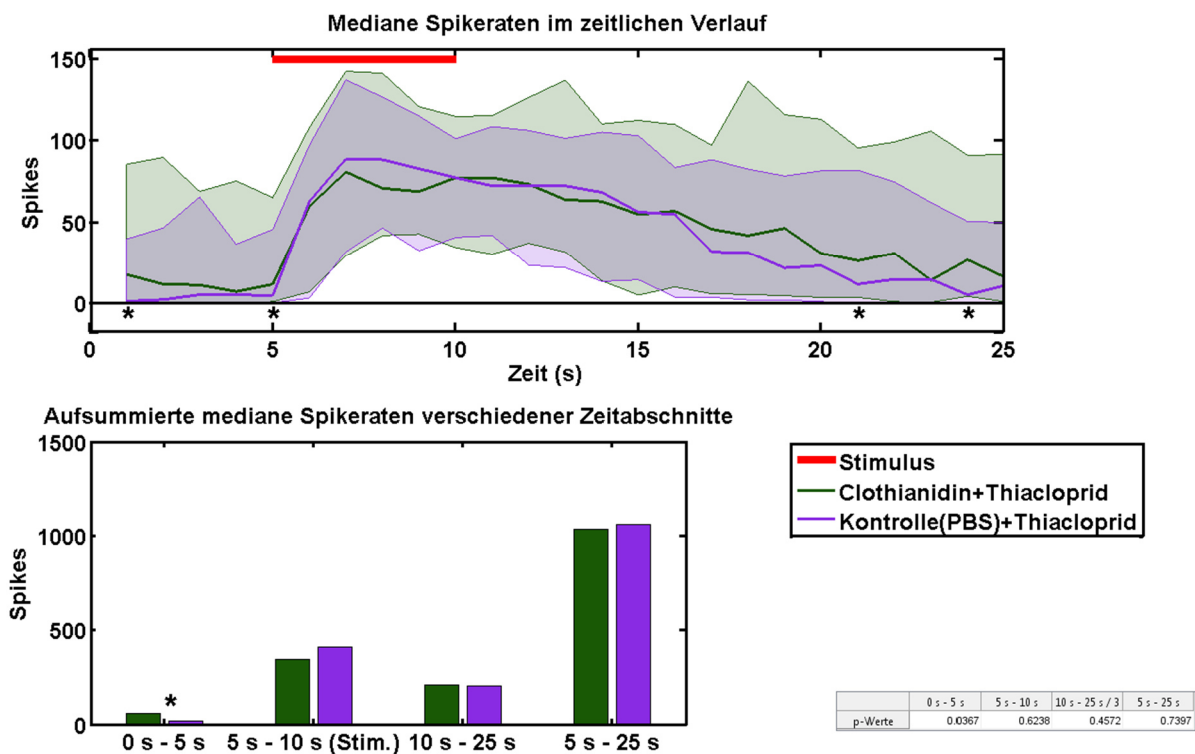


Abbildung 94: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe 1 (Clothianidin (1 µM) + Thiaclopid (10 µM), n = 18) und der Kontrollgruppe 7 (PBS + Thiaclopid (10 µM), n = 18) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

3. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn (p = 0,0367). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \*p ≤ 0,05 Wilcoxon Ranksom Test.



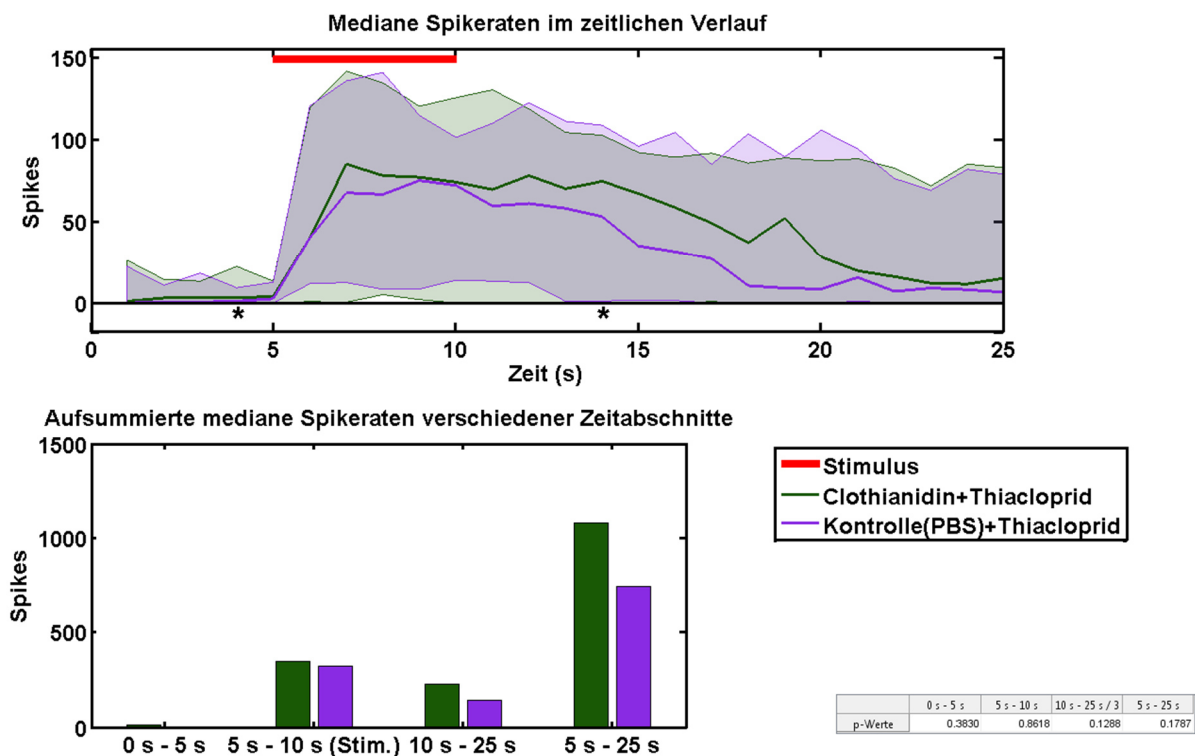


Abbildung 95: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe 1 (Clothianidin (1 µM) + Thiacloprid (10 µM), n = 18) und der Kontrollgruppe 7 (PBS + Thiacloprid (10 µM), n = 18) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

4. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

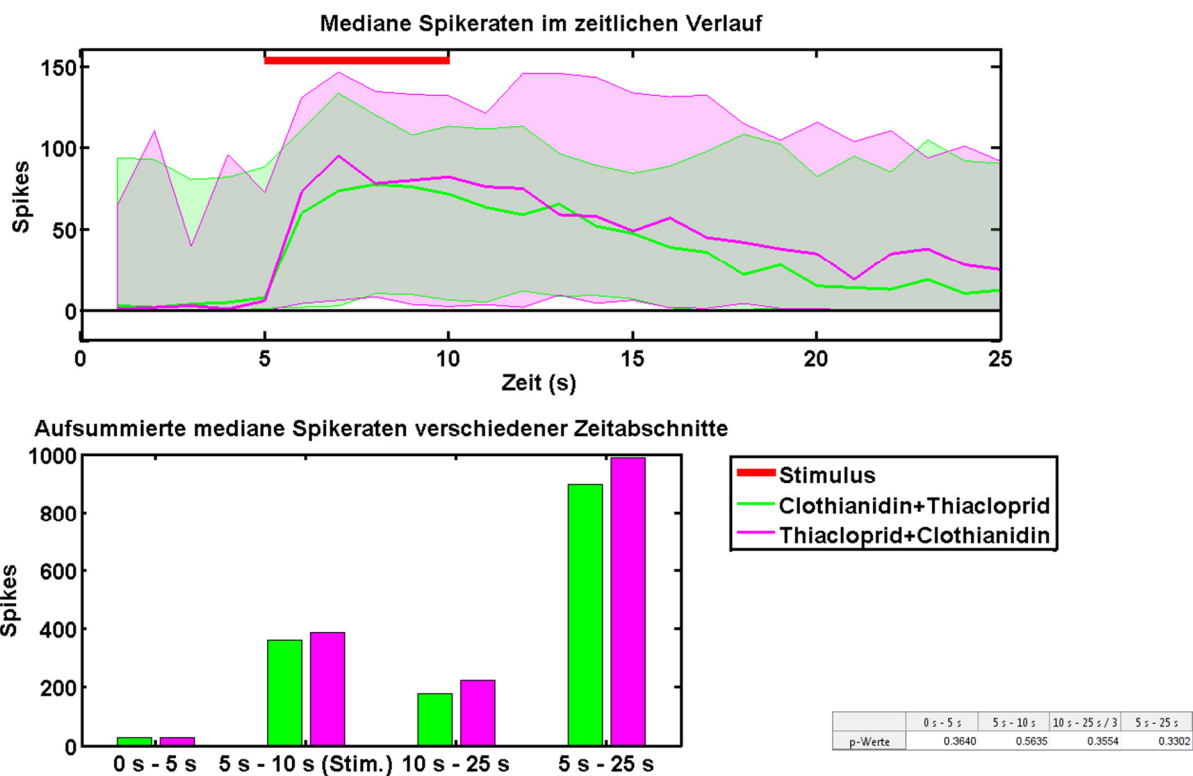


Abbildung 96: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe 1 (Clothianidin (1 µM) + Thiacloprid (10 µM), n = 18) und der Versuchsgruppe 2 (Thiacloprid (10 µM) + Clothianidin (1 µM), n = 17) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

2. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

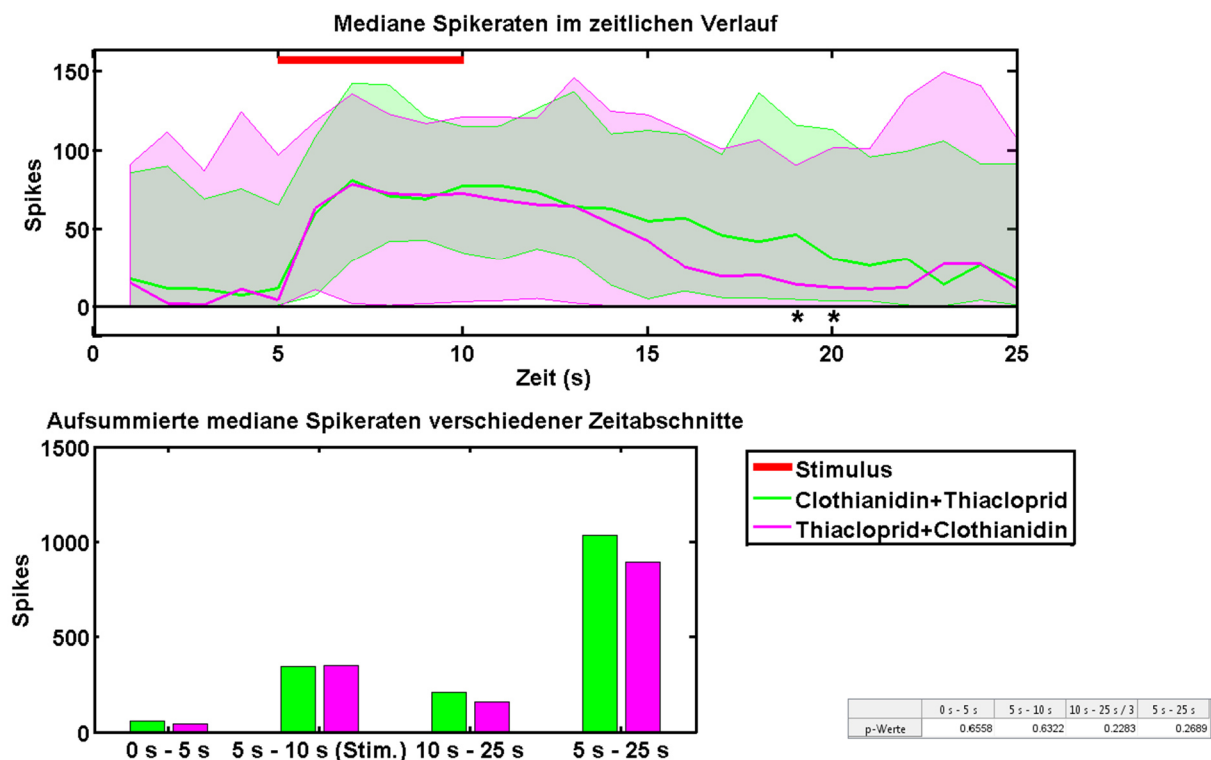


Abbildung 97: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe 1 (Clothianidin (1 µM) + Thiacloprid (10 µM), n = 18) und der Versuchsgruppe 2 (Thiacloprid (10 µM) + Clothianidin (1 µM), n = 17) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

3. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

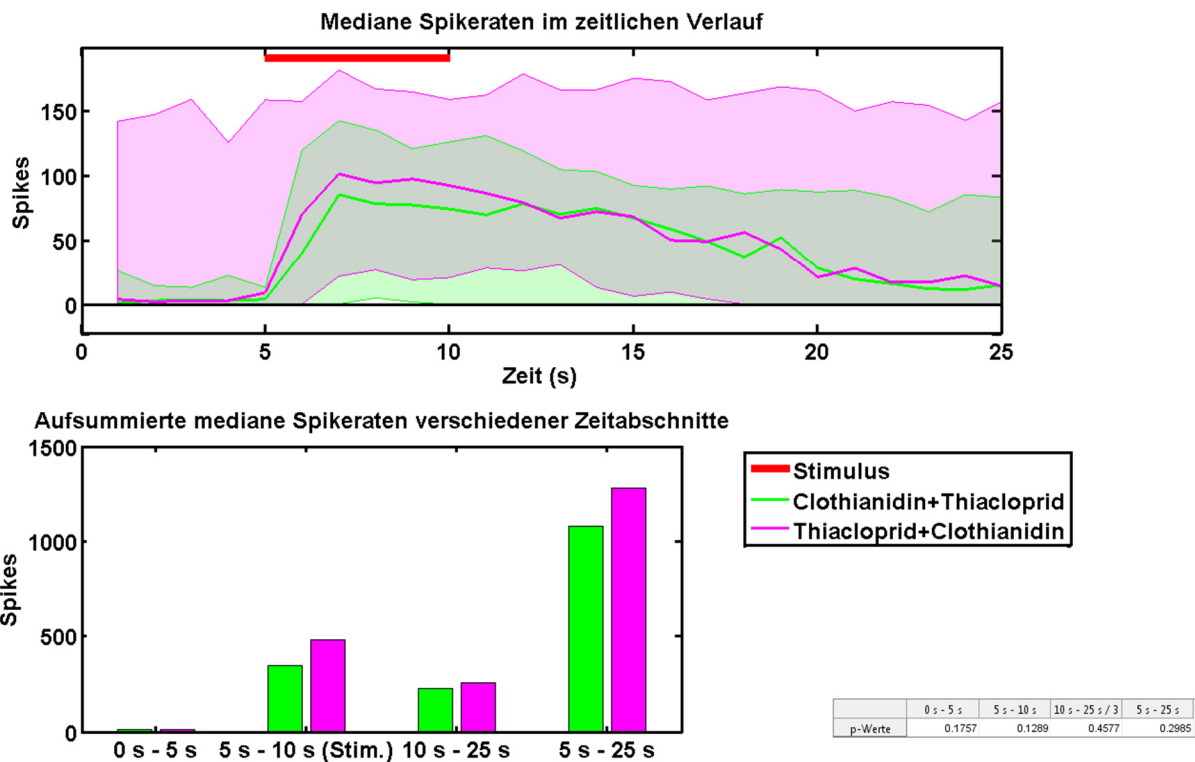


Abbildung 98: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe 1 (Clothianidin (1 µM) + Thiacloprid (10 µM), n = 18) und der Versuchsgruppe 2 (Thiacloprid (10 µM) + Clothianidin (1 µM), n = 17) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

4. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

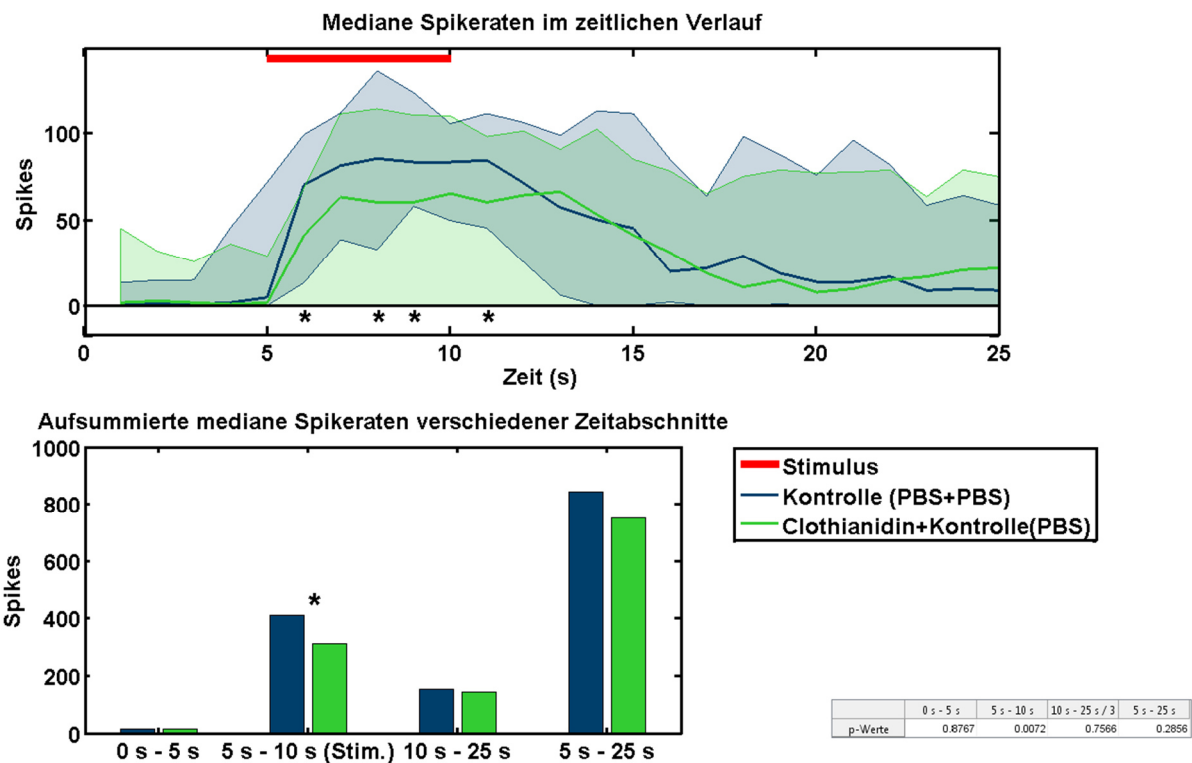


Abbildung 99: Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Kontrollgruppe 4 (Clothianidin (1 µM) + PBS, n = 17) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

2. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt während des Stimulus ( $p = 0,0072$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

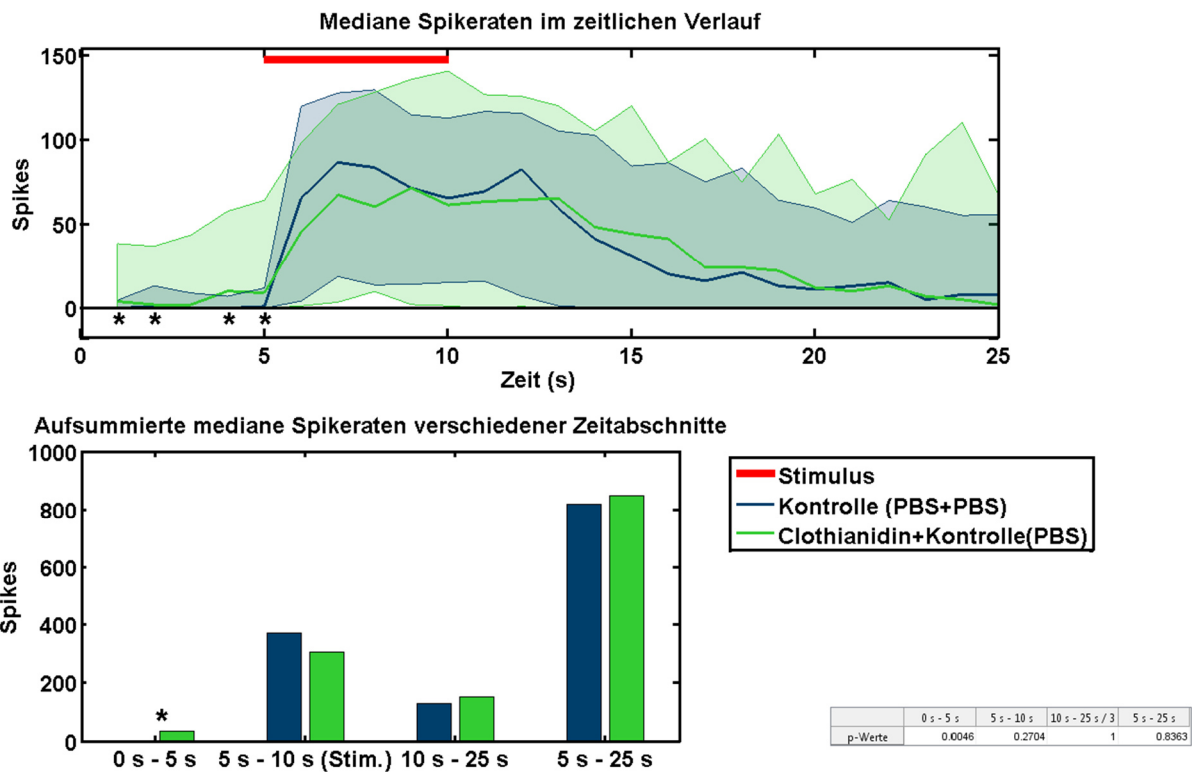


Abbildung 100: Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Kontrollgruppe 4 (Clothianidin (1 µM) + PBS, n = 17) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

3. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0046$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

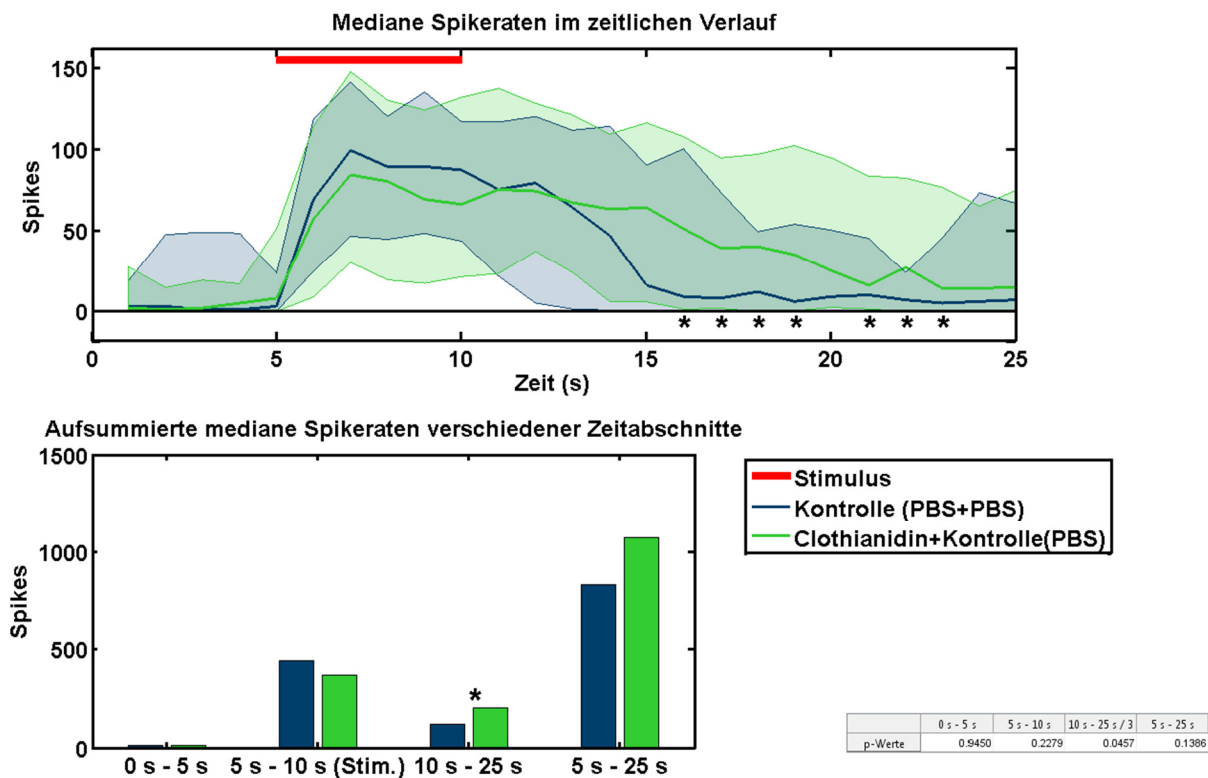


Abbildung 101: Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Kontrollgruppe 4 (Clothianidin (1 µM) + PBS, n = 17) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

4. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt nach dem Stimulus ( $p = 0,0457$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

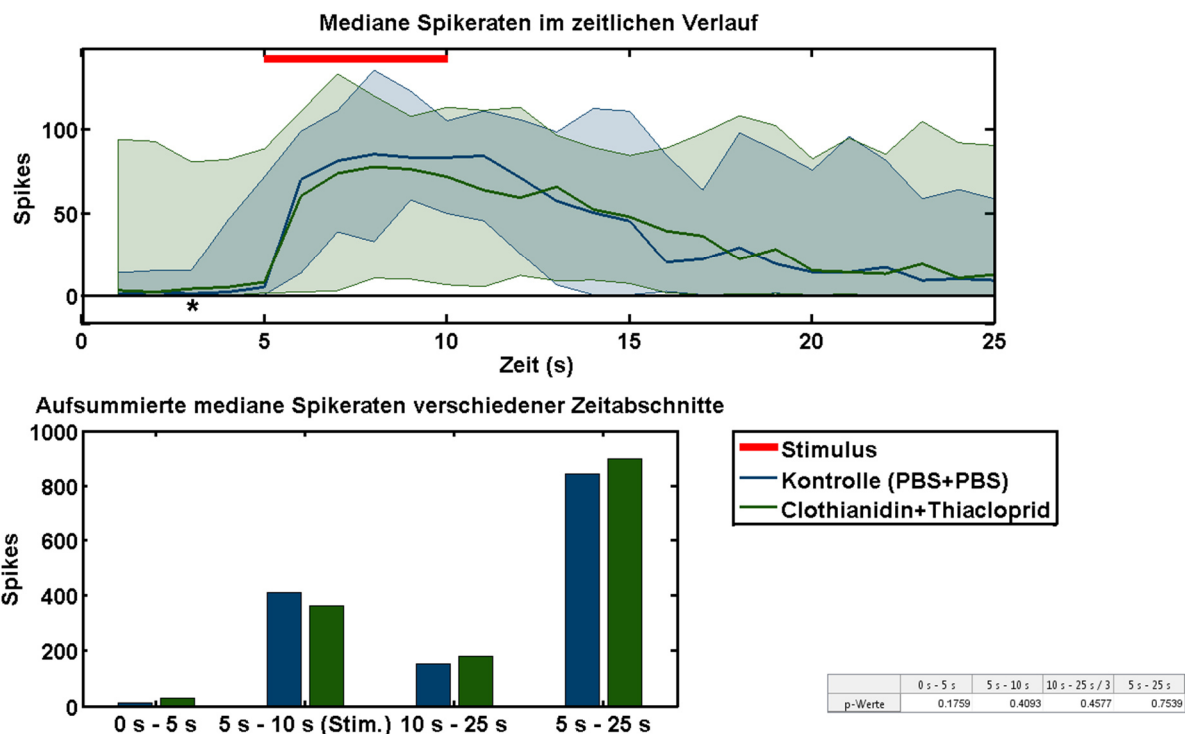


Abbildung 102: Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Versuchsgruppe 1 (Clothianidin (1 µM) + Thiacloprid (10 µM), n = 18) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

2. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.



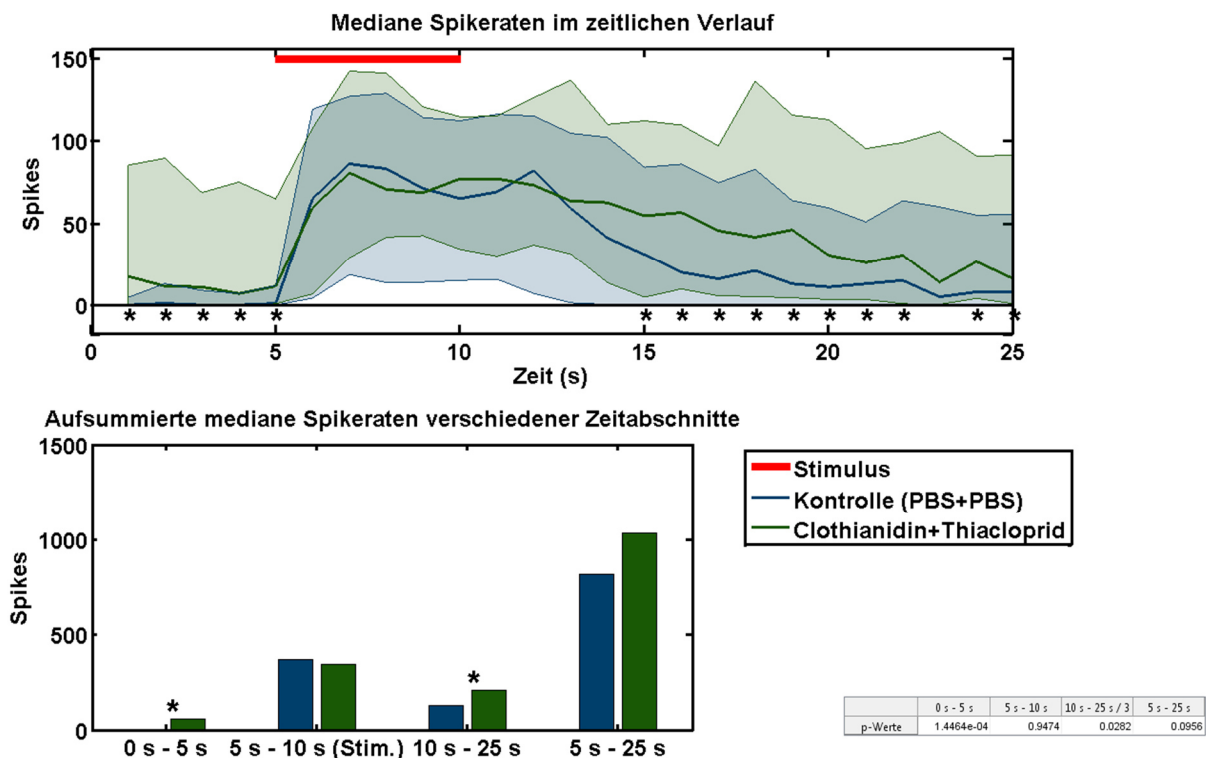


Abbildung 103: Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Versuchsgruppe 1 (Clothianidin (1 µM) + Thiacloprid (10 µM), n = 18) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

3. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,00014464$ ) und im Zeitabschnitt nach dem Stimulus ( $p = 0,0282$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksom Test.

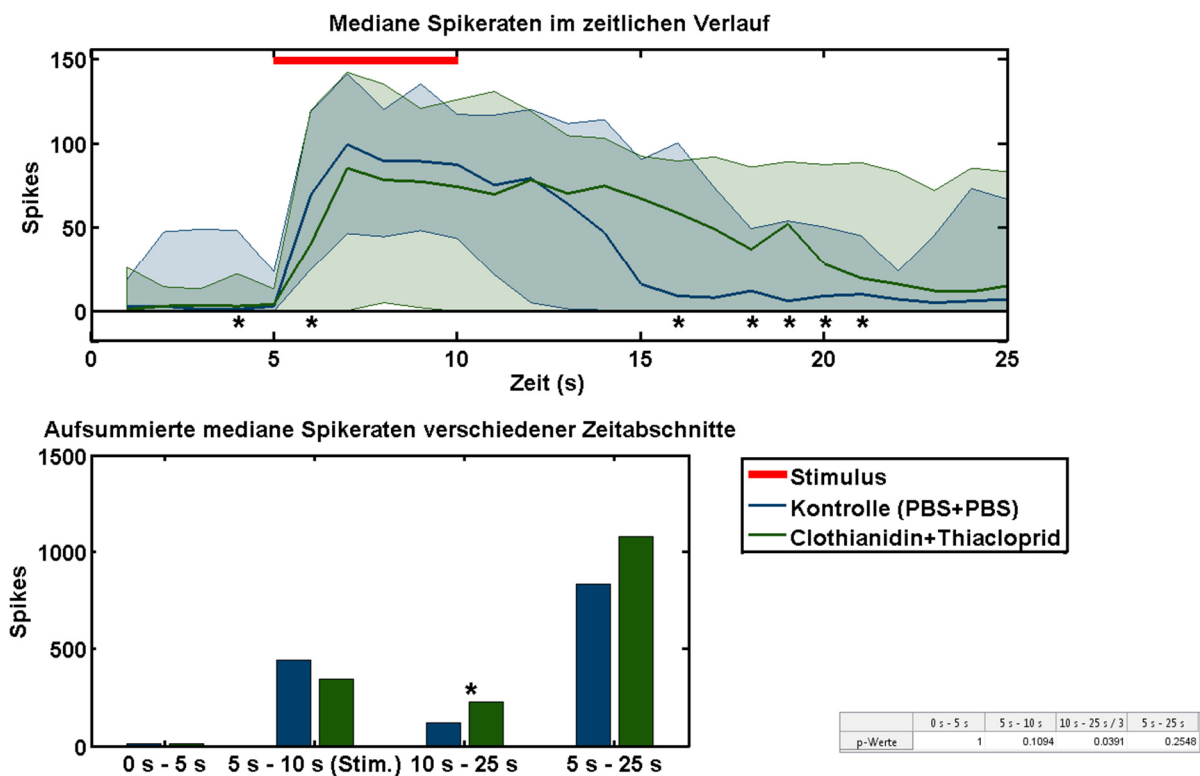


Abbildung 104: Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Versuchsgruppe 1 (Clothianidin (1  $\mu$ M) + Thiacloprid (10  $\mu$ M), n = 18) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

3. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt nach dem Stimulus ( $p = 0,0391$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

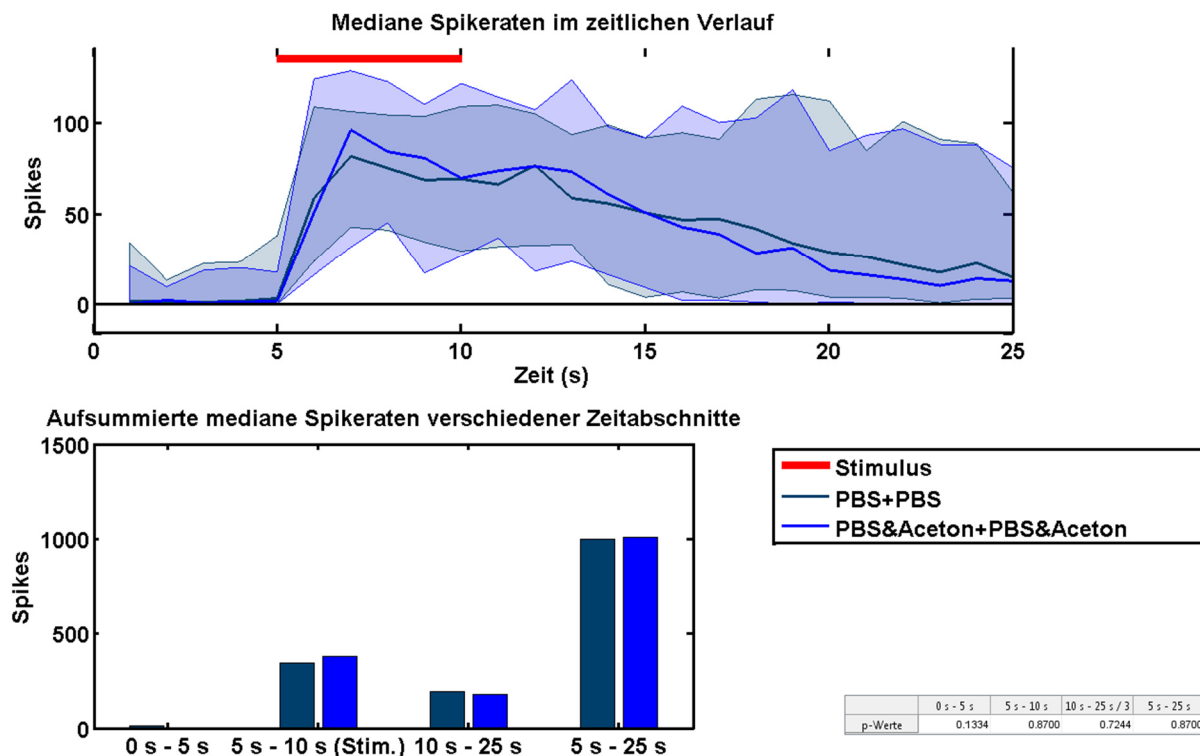


Abbildung 105: Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 9 (PBS + PBS, n = 22) und der Kontrollgruppe 8 (PBS & Aceton + PBS & Aceton, n = 20) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

2. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

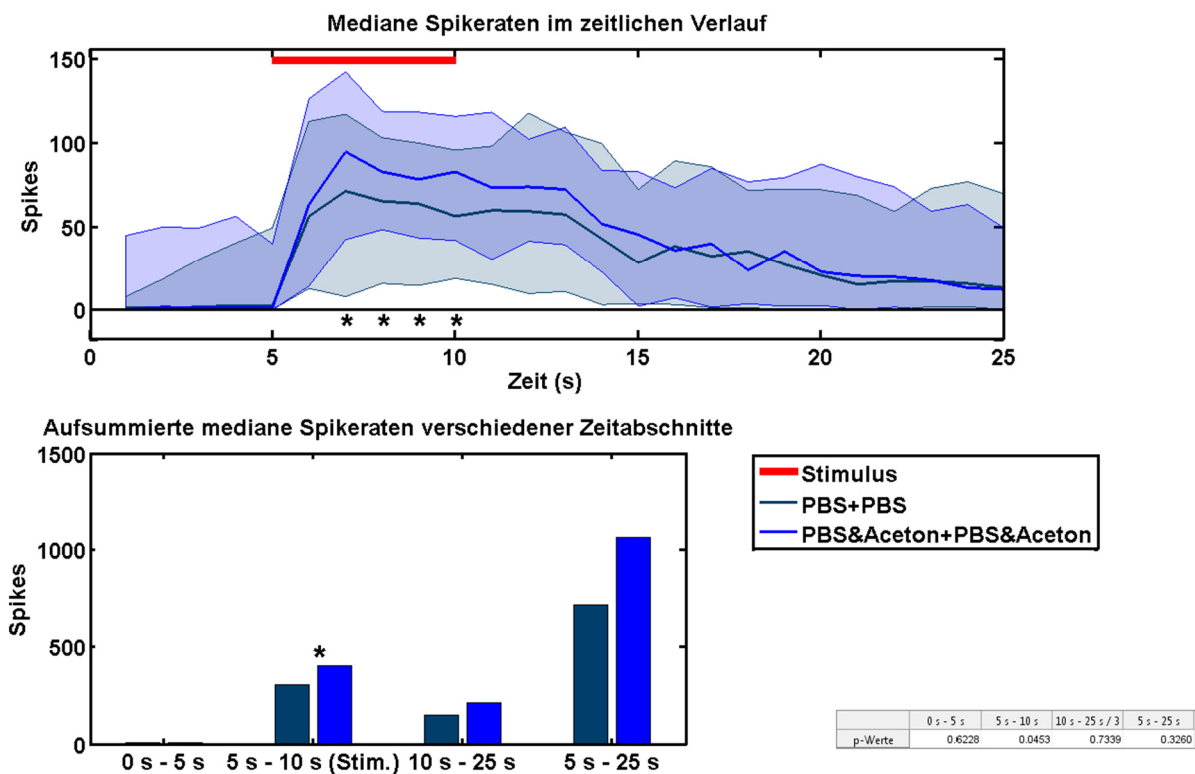


Abbildung 106: Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 9 (PBS + PBS, n = 22) und der Kontrollgruppe 8 (PBS & Aceton + PBS & Aceton, n = 20) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

3. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt während des Stimulus ( $p = 0,0453$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

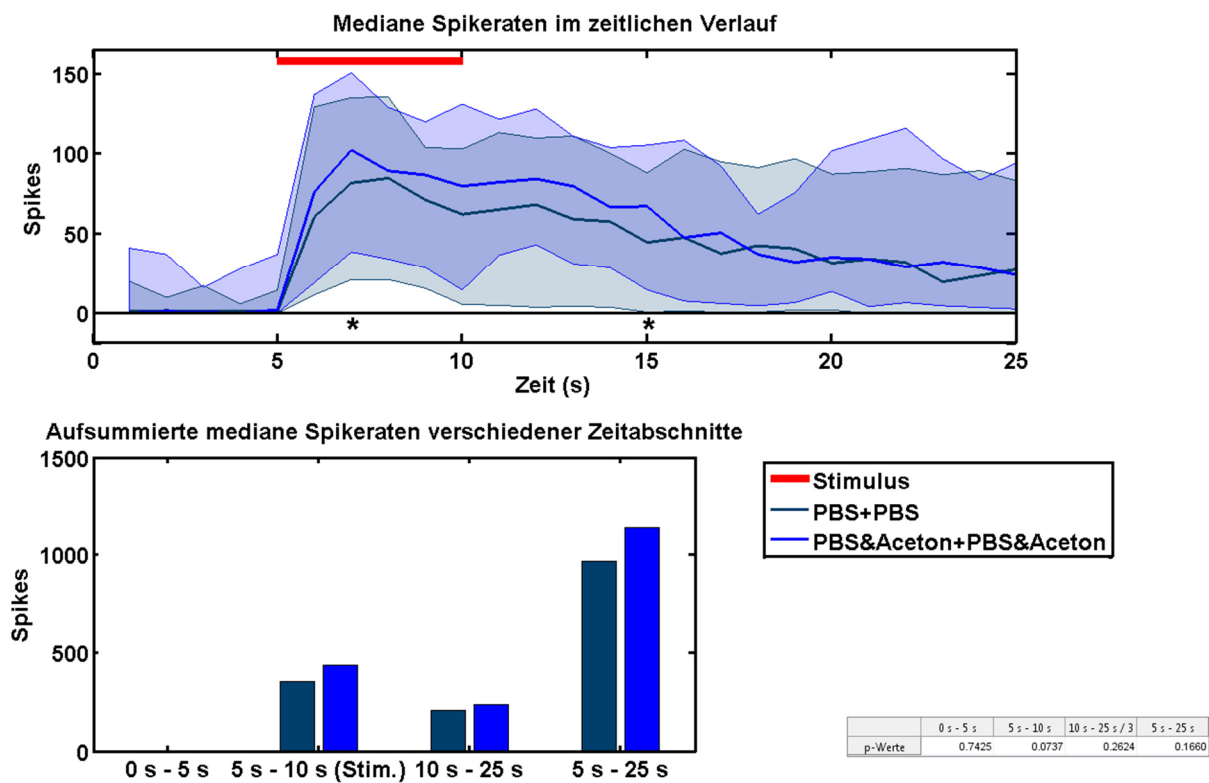


Abbildung 107: Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 9 (PBS + PBS, n = 22) und der Kontrollgruppe 8 (PBS & Aceton + PBS & Aceton, n = 20) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

4. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

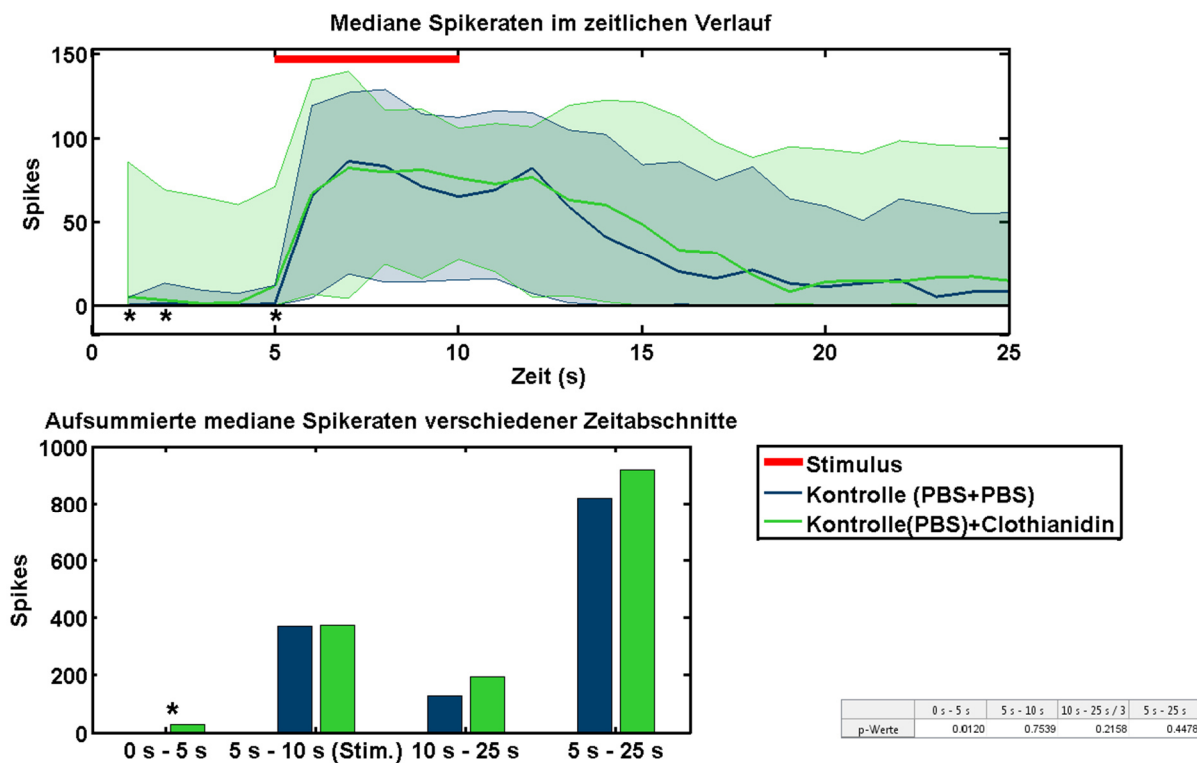


Abbildung 108: Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Kontrollgruppe 5 (PBS + Clothianidin (1 μM), n = 18) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

3. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0120$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

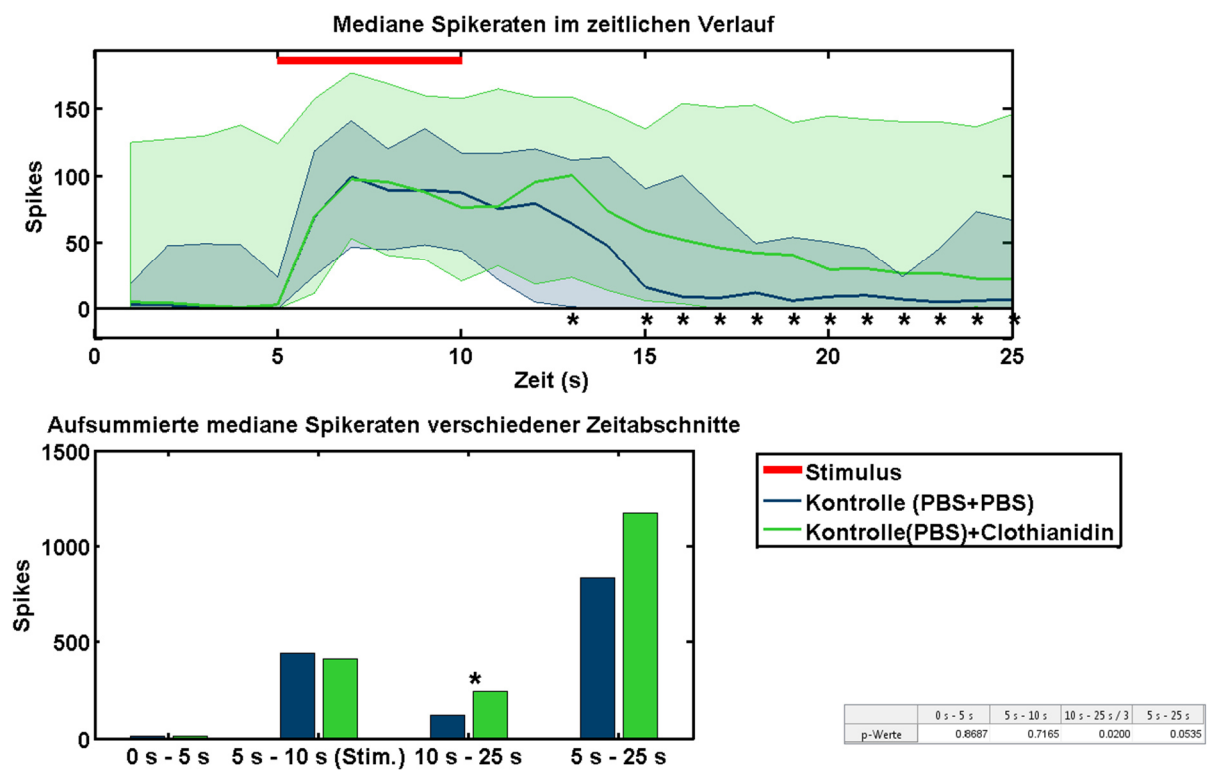


Abbildung 109: Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Kontrollgruppe 5 (PBS + Clothianidin (1 µM), n = 18) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

4. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt nach dem Stimulus ( $p = 0,0200$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

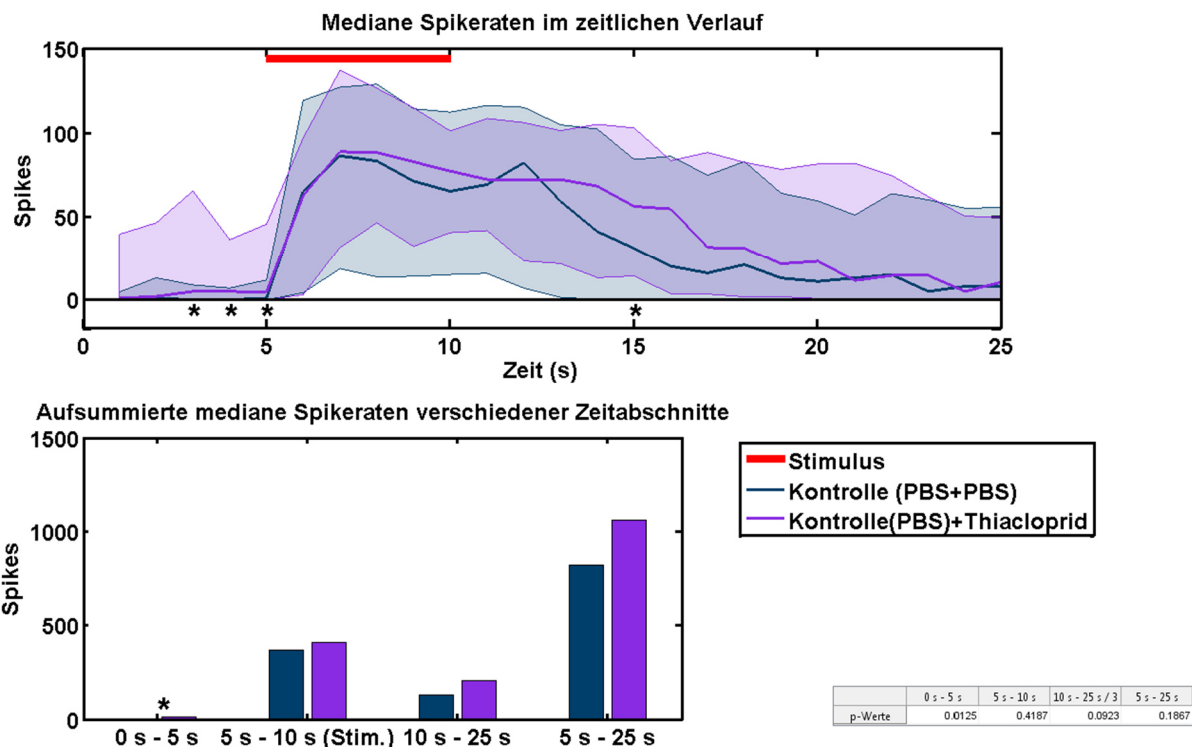


Abbildung 110: Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Kontrollgruppe 7 (PBS + Thiaclopid (10 µM), n = 18) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

3. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0125$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.



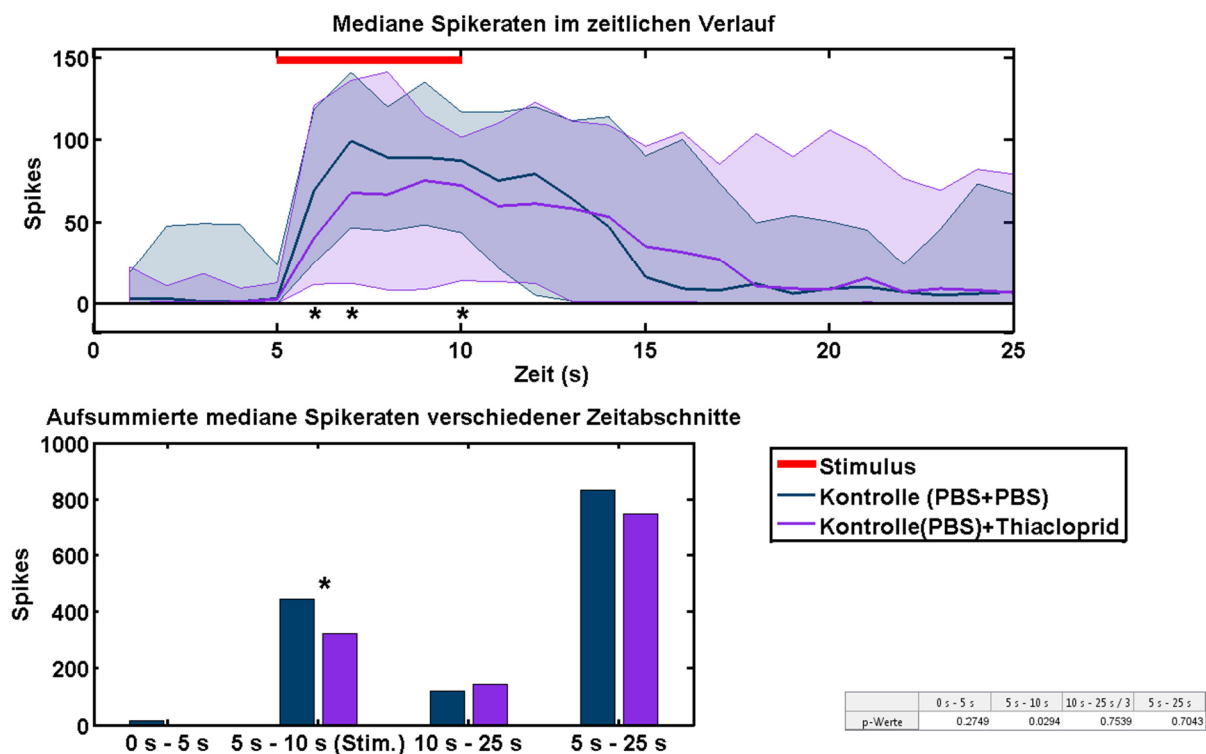


Abbildung 111: Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Kontrollgruppe 7 (PBS + Thiaclopid (10  $\mu$ M), n = 18) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

4. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt während des Stimulus ( $p = 0,0294$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

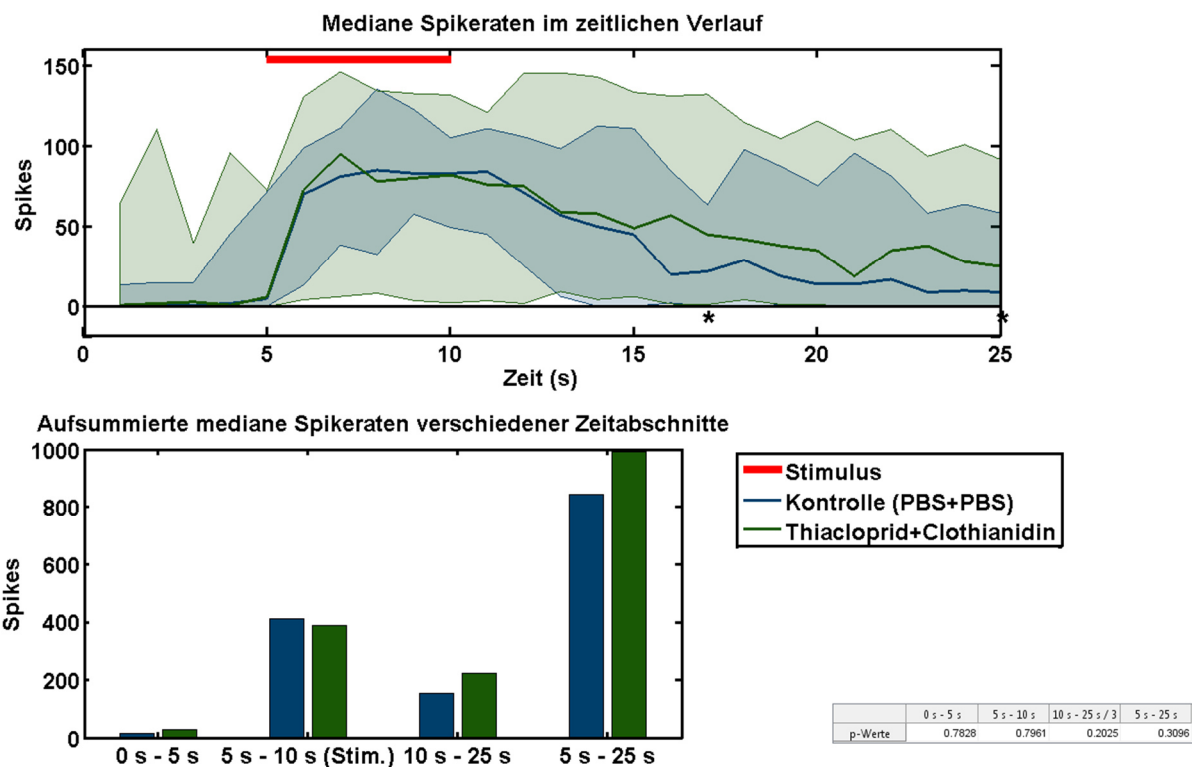


Abbildung 112: Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Versuchsgruppe 2 (Thiacloprid (10 µM) + Clothianidin (1 µM), n = 17) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

2. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

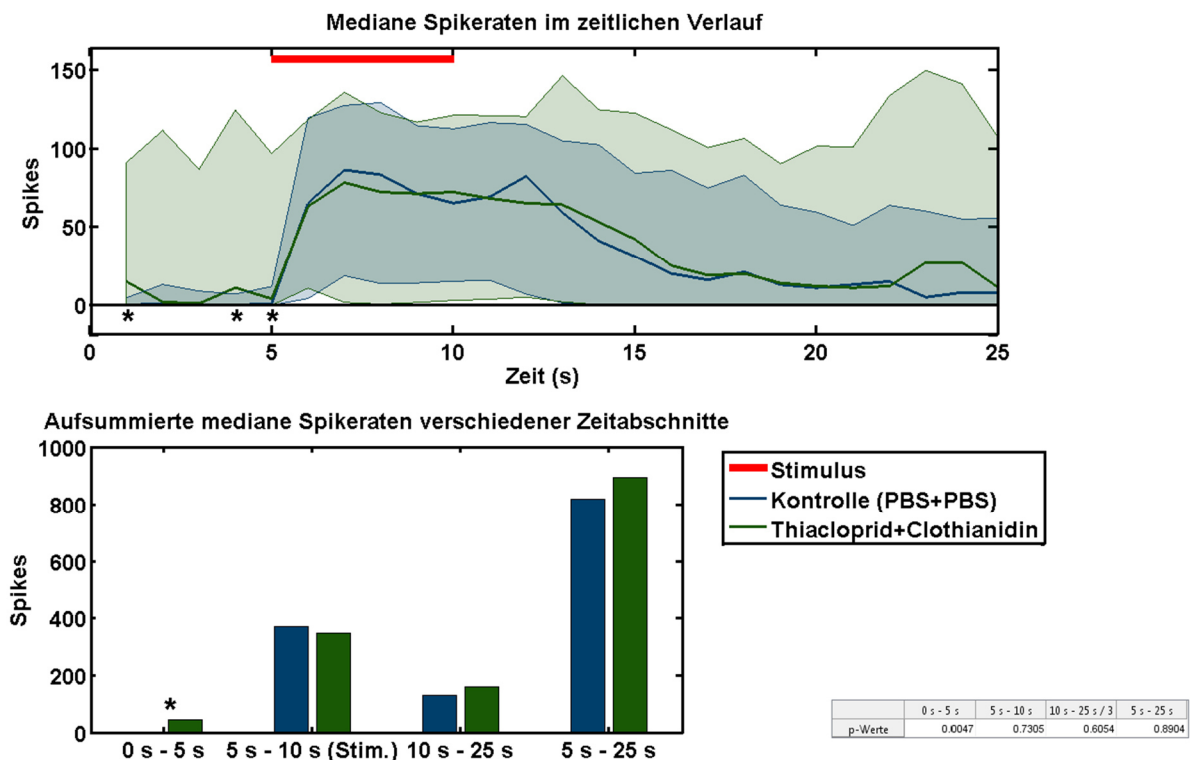


Abbildung 113: Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Versuchsgruppe 2 (Thiacloprid (10 µM) + Clothianidin (1 µM), n = 17) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

3. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0047$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

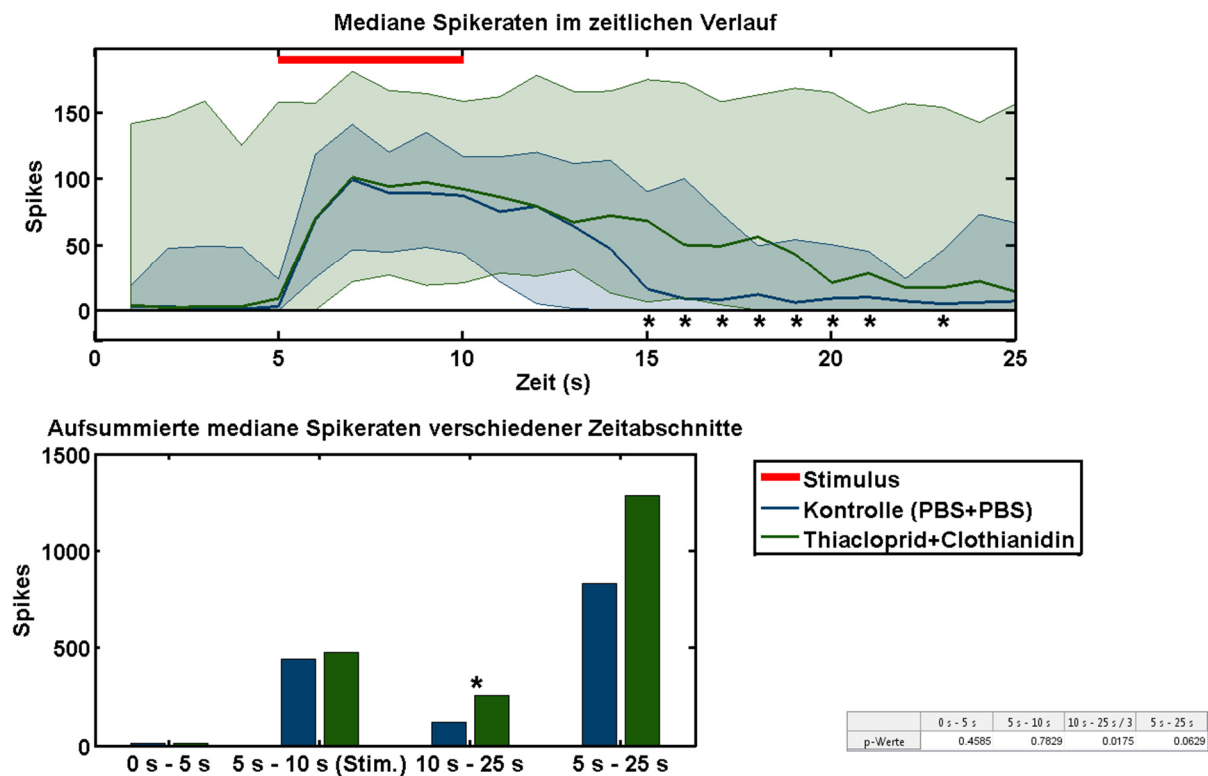


Abbildung 114: Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Versuchsgruppe 2 (Thiacloprid (10 µM) + Clothianidin (1 µM), n = 17) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

4. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt nach dem Stimulus ( $p = 0,0175$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

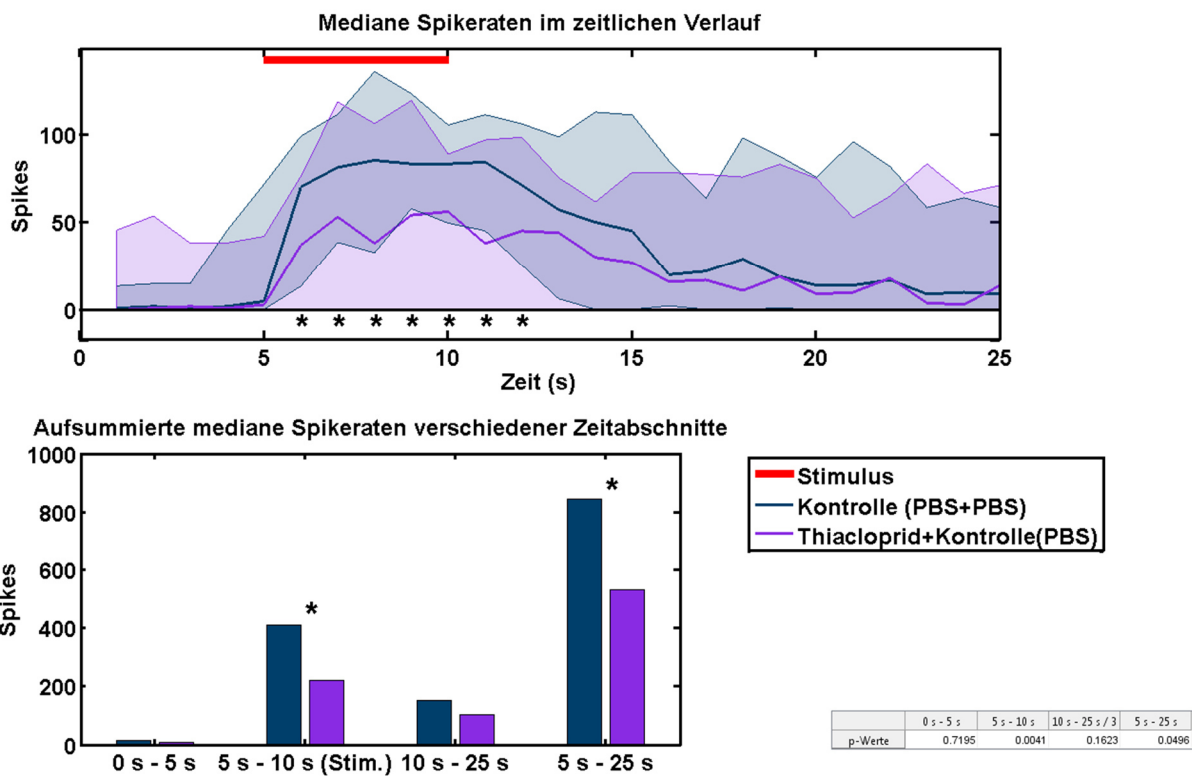


Abbildung 115: Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Kontrollgruppe 6 (Thiacloprid (10 µM) + PBS, n = 15) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

2. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt während des Stimulus ( $p = 0,0041$ ) und im Zeitabschnitt über 20 Sekunden ab Stimulusbeginn ( $p = 0,0496$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

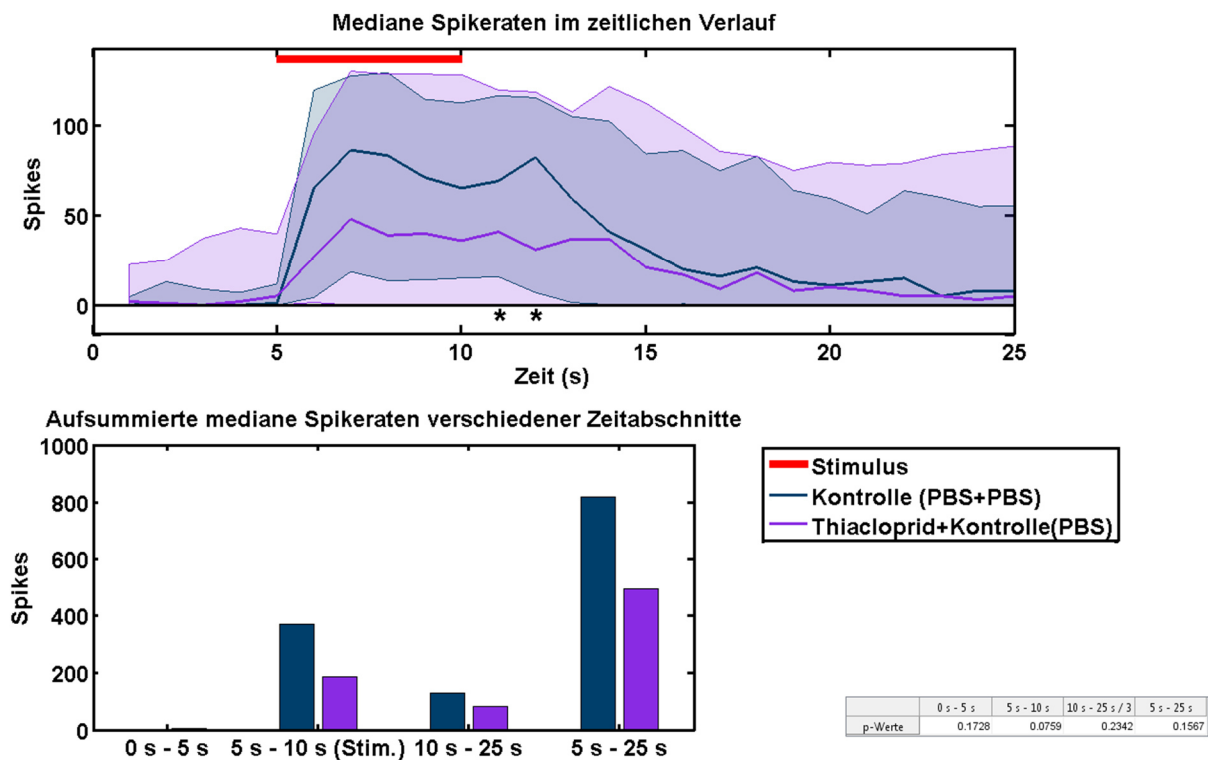


Abbildung 116: Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Kontrollgruppe 6 (Thiacloprid (10 µM) + PBS, n = 15) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

3. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

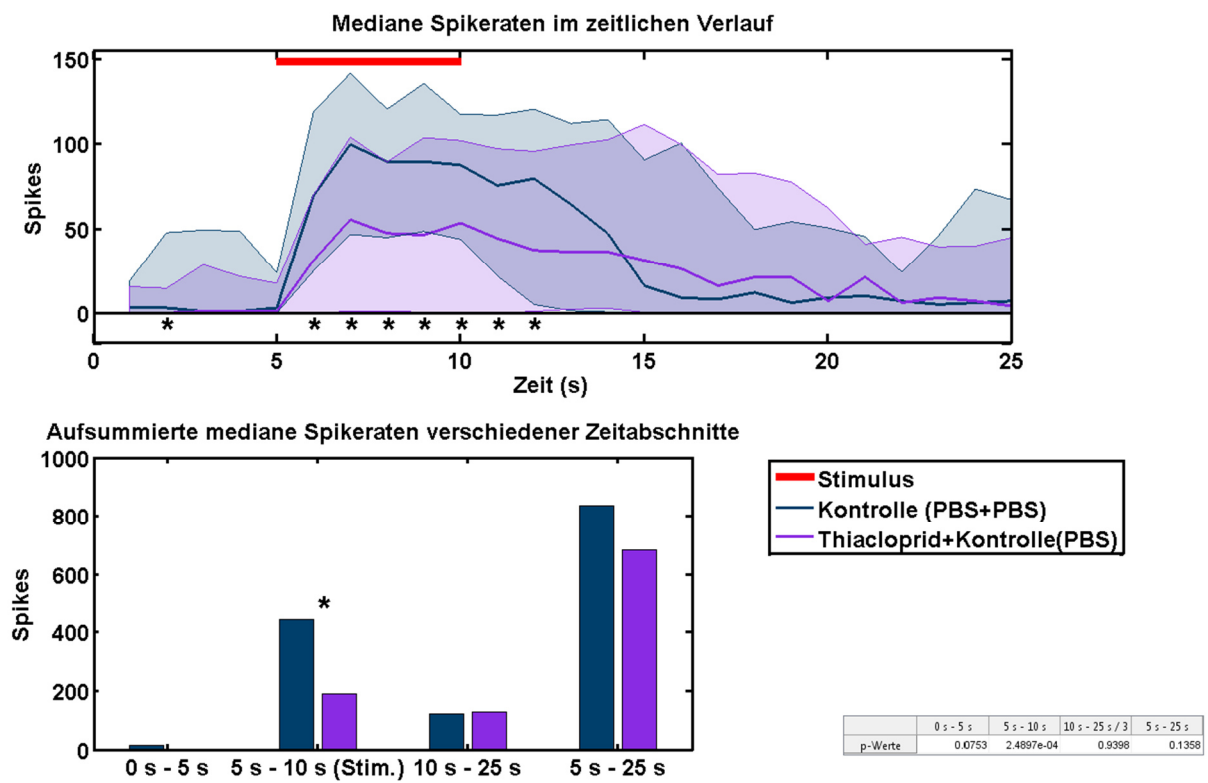


Abbildung 117: Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 3 (PBS + PBS, n = 17) und der Kontrollgruppe 6 (Thiaclopid (10 µM) + PBS, n = 15) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

4. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt während des Stimulus ( $p = 0,00024897$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksom Test.

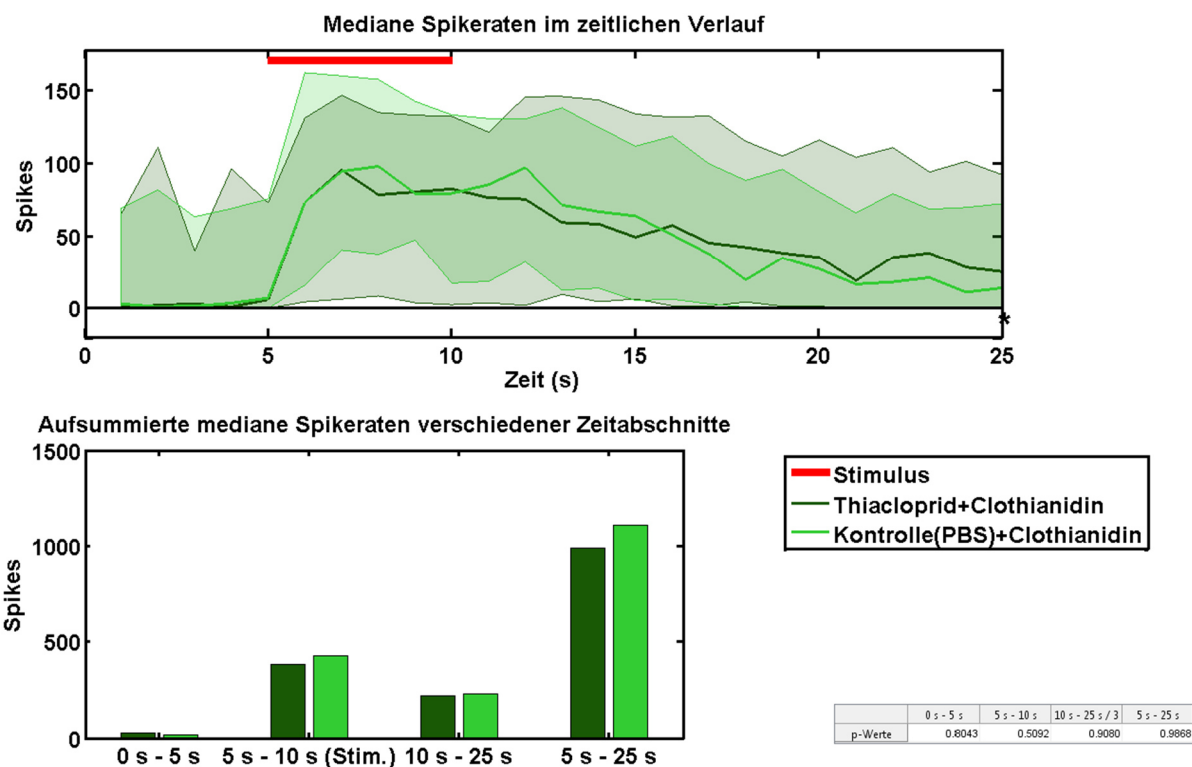


Abbildung 118: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe 2 (Thiacloprid (10 µM) + Clothianidin (1 µM), n = 17) und der Kontrollgruppe 5 (PBS + Clothianidin (1 µM), n = 18) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

2. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.



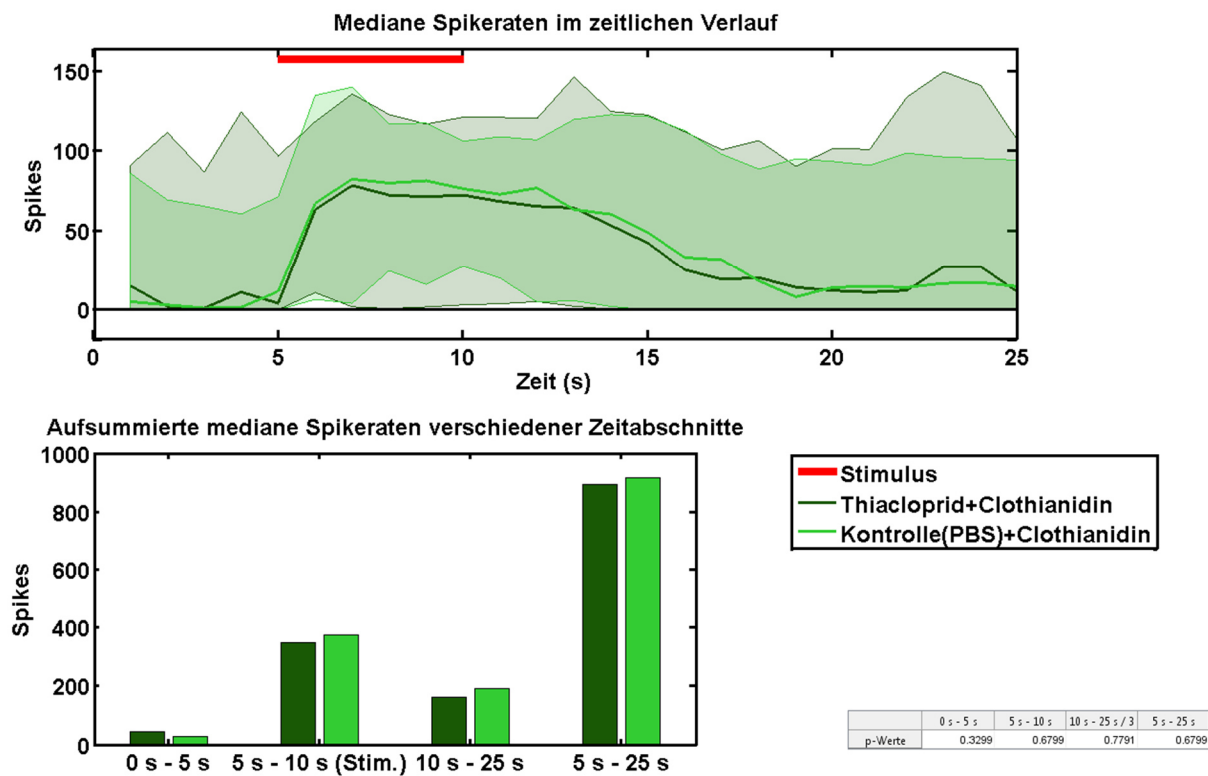


Abbildung 119: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe 2 (Thiaclopid (10 µM) + Clothianidin (1 µM), n = 17) und der Kontrollgruppe 5 (PBS + Clothianidin (1 µM), n = 18) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

3. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

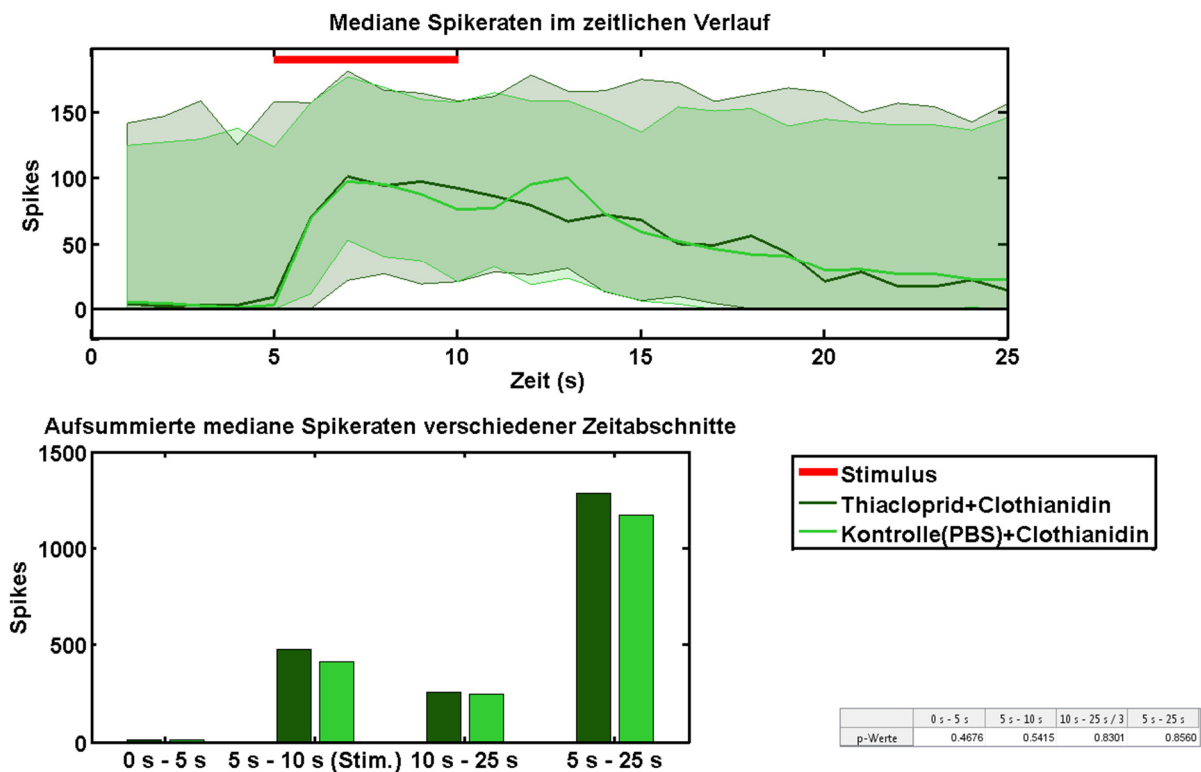


Abbildung 120: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe 2 (Thiachloprid (10 µM) + Clothianidin (1 µM), n = 17) und der Kontrollgruppe 5 (PBS + Clothianidin (1 µM), n = 18) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

4. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

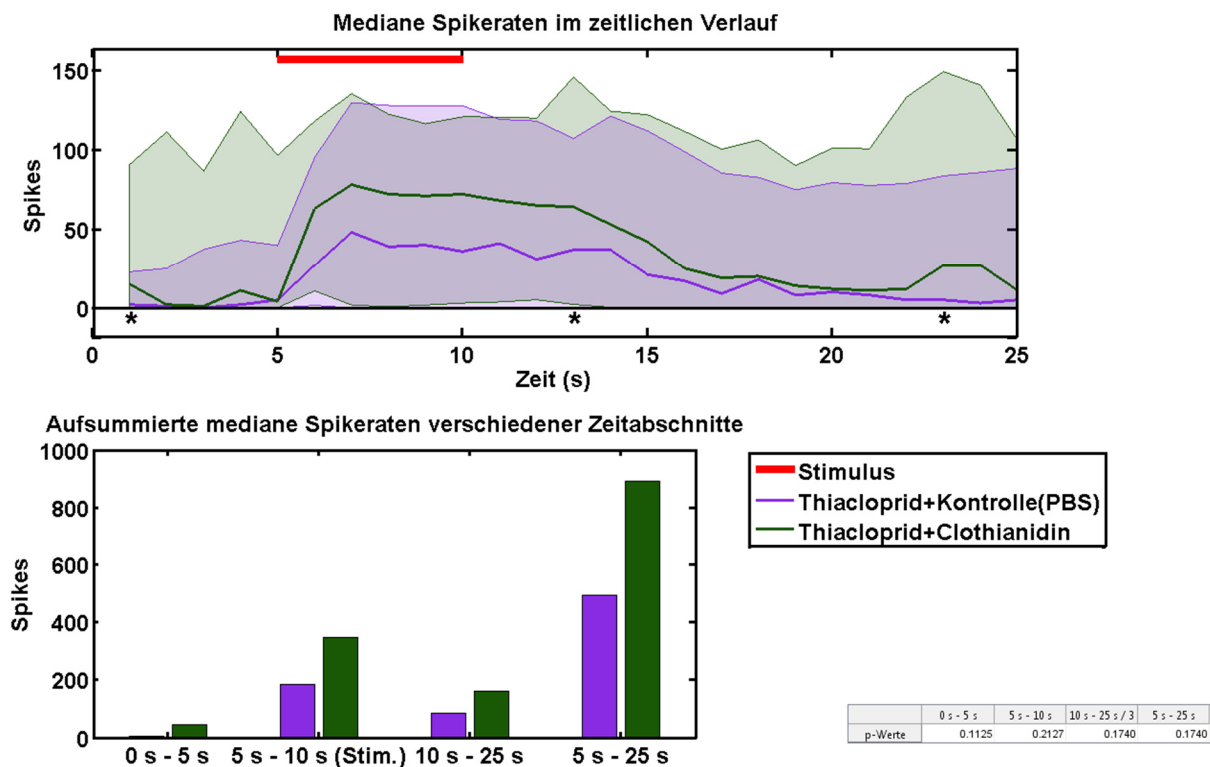


Abbildung 121: Vergleich der medianen Spikeraten der Kontrollgruppe 6 (Thiacloprid (10 µM) + PBS, n = 15) und der Versuchsgruppe 2 (Thiacloprid (10 µM) + Clothianidin (1 µM), n = 17) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

3. Messung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

**Zu Kapitel 3: Akute Fütterung mit Clothianidin bzw. Thiacloprid**

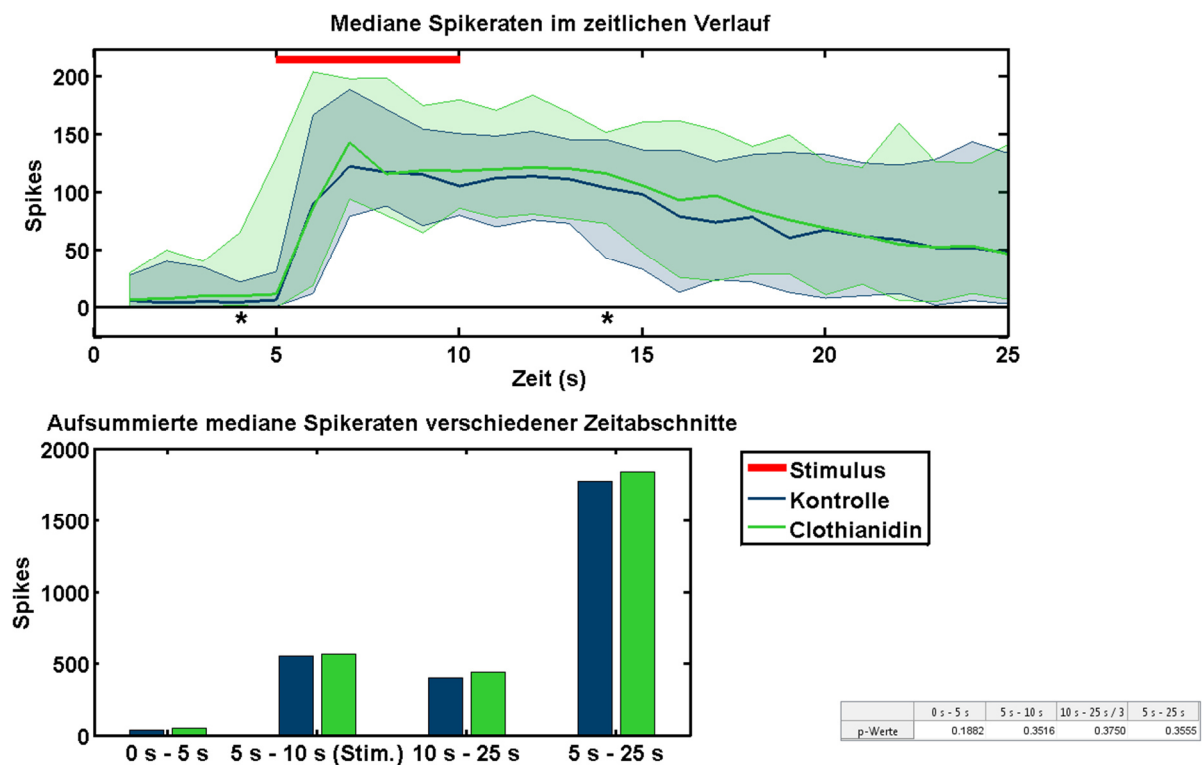


Abbildung 122: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Clothianidin (1 ng), n=30) und der Kontrollgruppe (Zuckerwasser, n=30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

Vortest; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

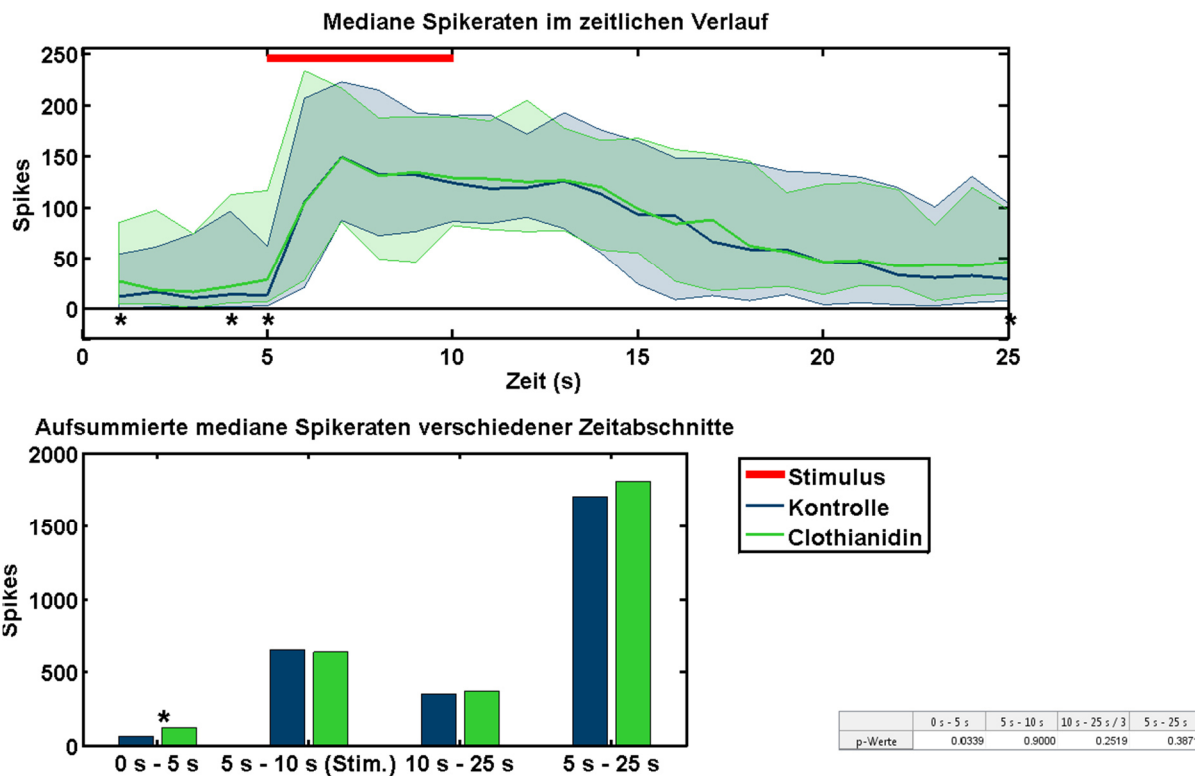


Abbildung 123: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Clothianidin (1 ng), n=30) und der Kontrollgruppe (Zuckerwasser, n=30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

15 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0339$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

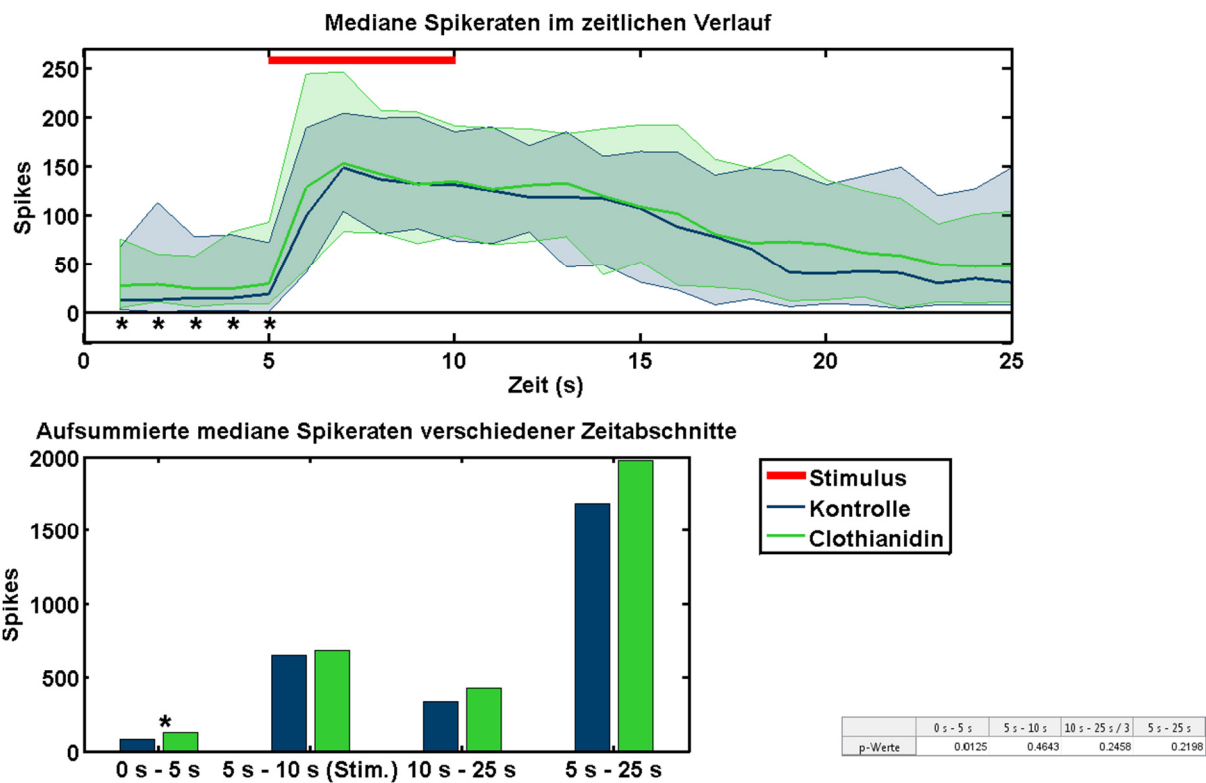


Abbildung 124: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Clothianidin (1 ng), n=30) und der Kontrollgruppe (Zuckerwasser, n=30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

30 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0125$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

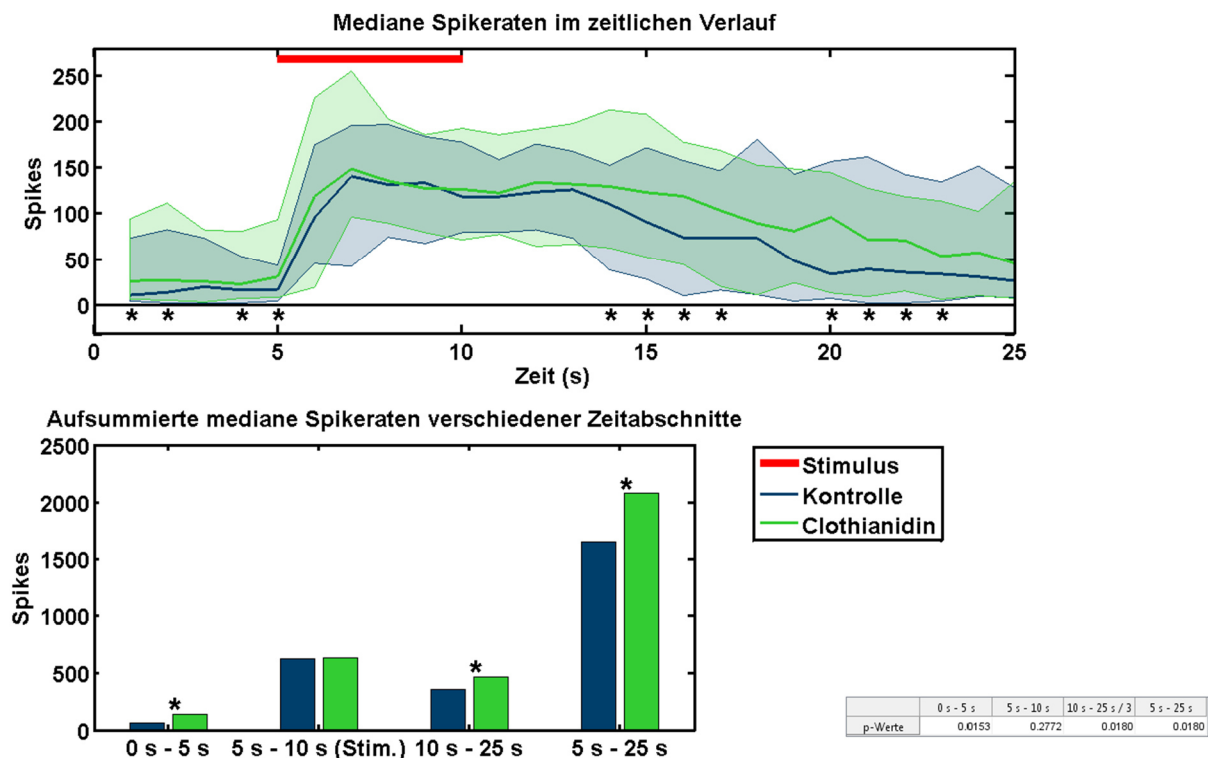


Abbildung 125: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Clothianidin (1 ng), n=30) und der Kontrollgruppe (Zuckerwasser, n=30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

45 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0153$ ), im Zeitabschnitt nach dem Stimulus ( $p = 0,0180$ ), und über 20 Sekunden ab Stimulusbeginn ( $p = 0,0180$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

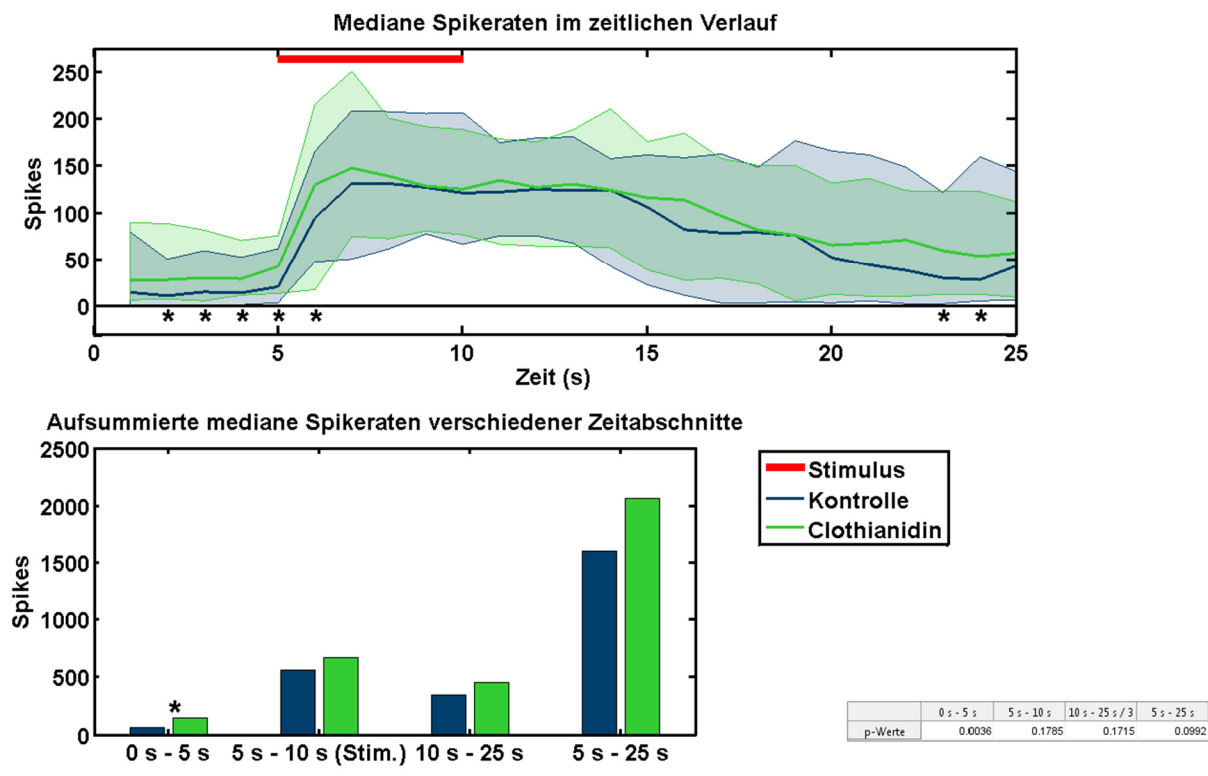


Abbildung 126: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Clothianidin (1 ng), n=30) und der Kontrollgruppe (Zuckerwasser, n=30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

60 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0036$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.



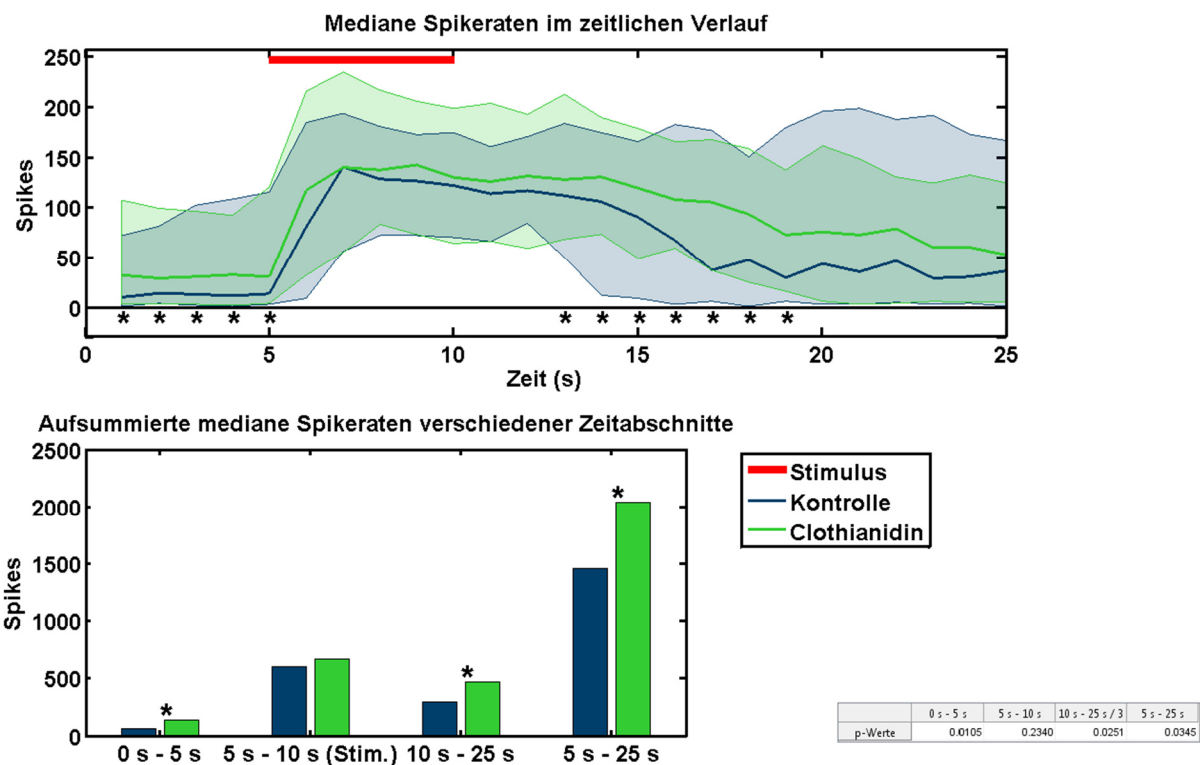


Abbildung 127: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Clothianidin (1 ng), n=30) und der Kontrollgruppe (Zuckerwasser, n=30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

75 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0105$ ), im Zeitabschnitt nach dem Stimulus ( $p = 0,0251$ ), und über 20 Sekunden ab Stimulusbeginn ( $p = 0,0345$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

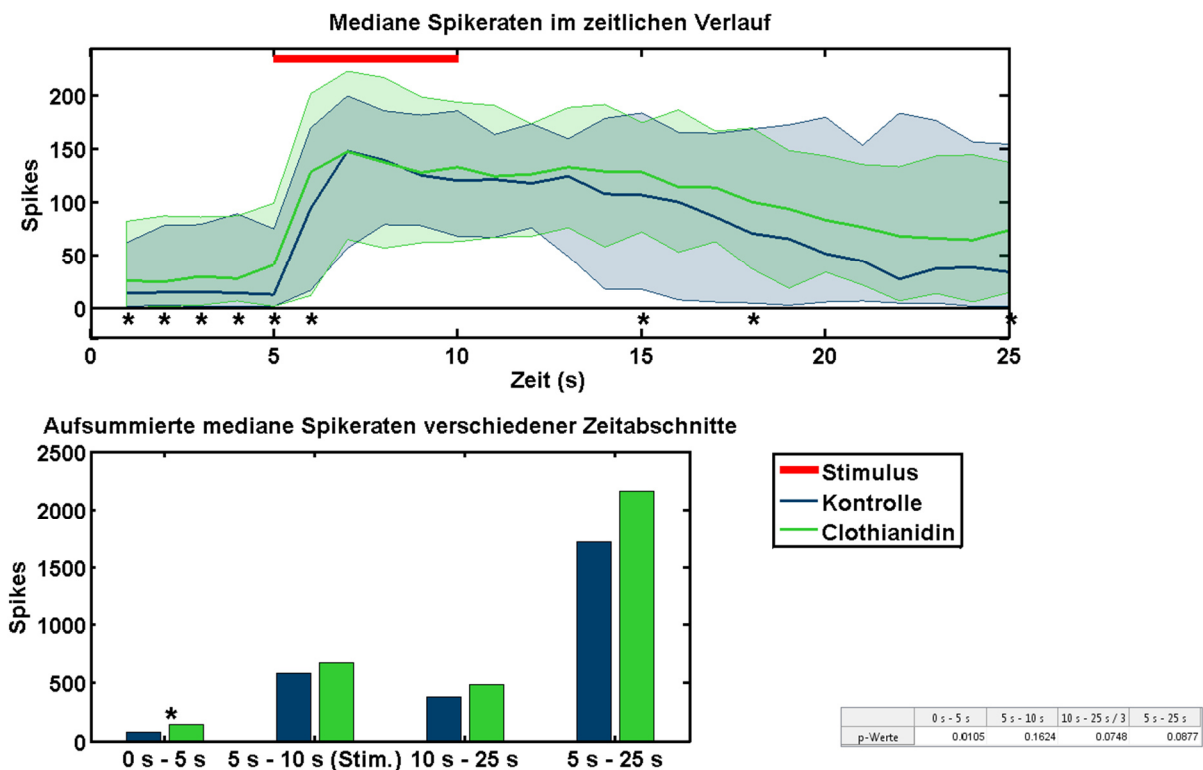


Abbildung 128: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Clothianidin (1 ng), n=30) und der Kontrollgruppe (Zuckerwasser, n=30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

120 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0105$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

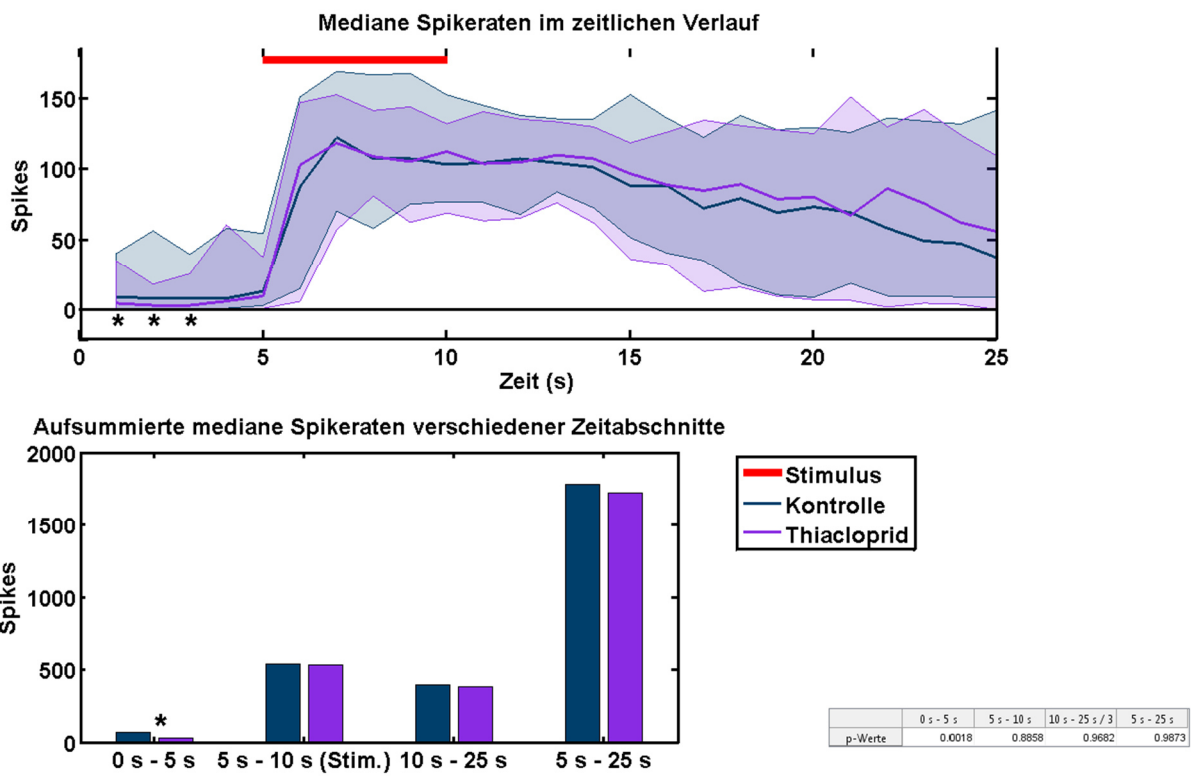


Abbildung 129: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Thiacloprid (250 ng), n=28) und der Kontrollgruppe (Zuckerwasser, n=29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

Vortest; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0018$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

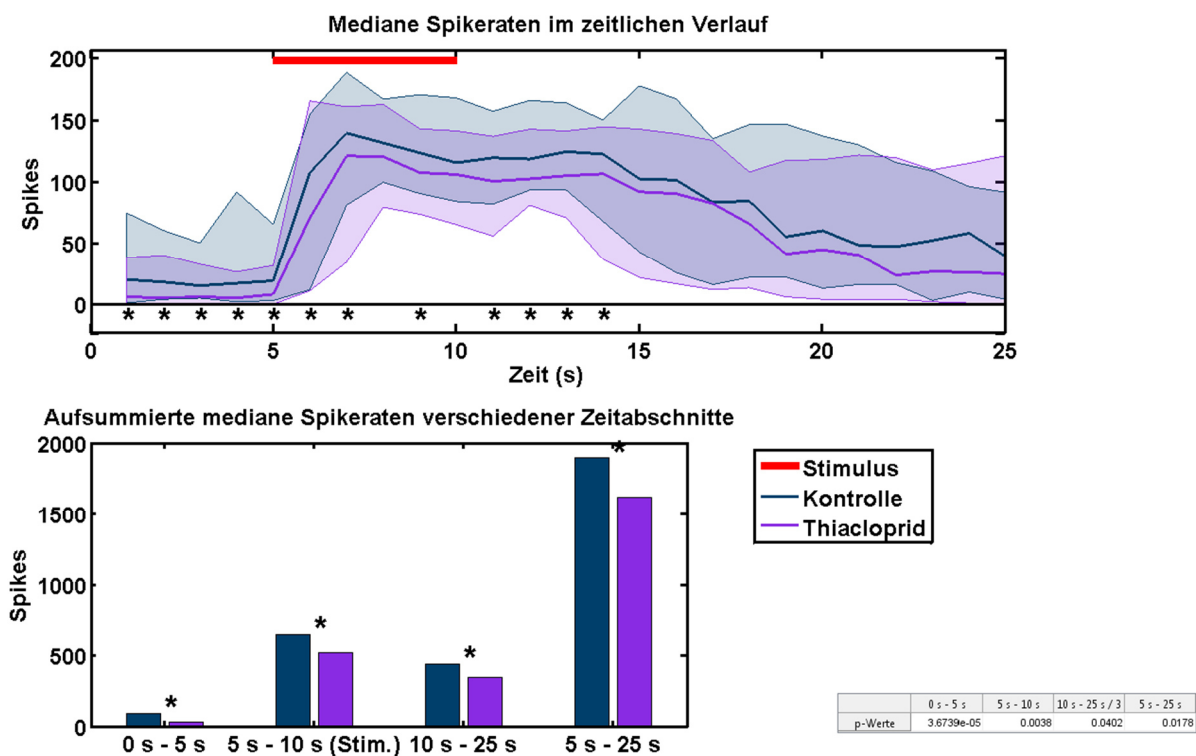


Abbildung 130: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Thiaclopid (250 ng), n=28) und der Kontrollgruppe (Zuckerwasser, n=29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

15 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen über den gesamten Messzeitraum signifikante Unterschiede (0 s – 5 s:  $p = 0,0000367$ , 5 s – 10 s:  $p = 0,0038$ , 10 s – 25 s:  $p = 0,0402$ , 5 s – 25 s:  $p = 0,0178$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

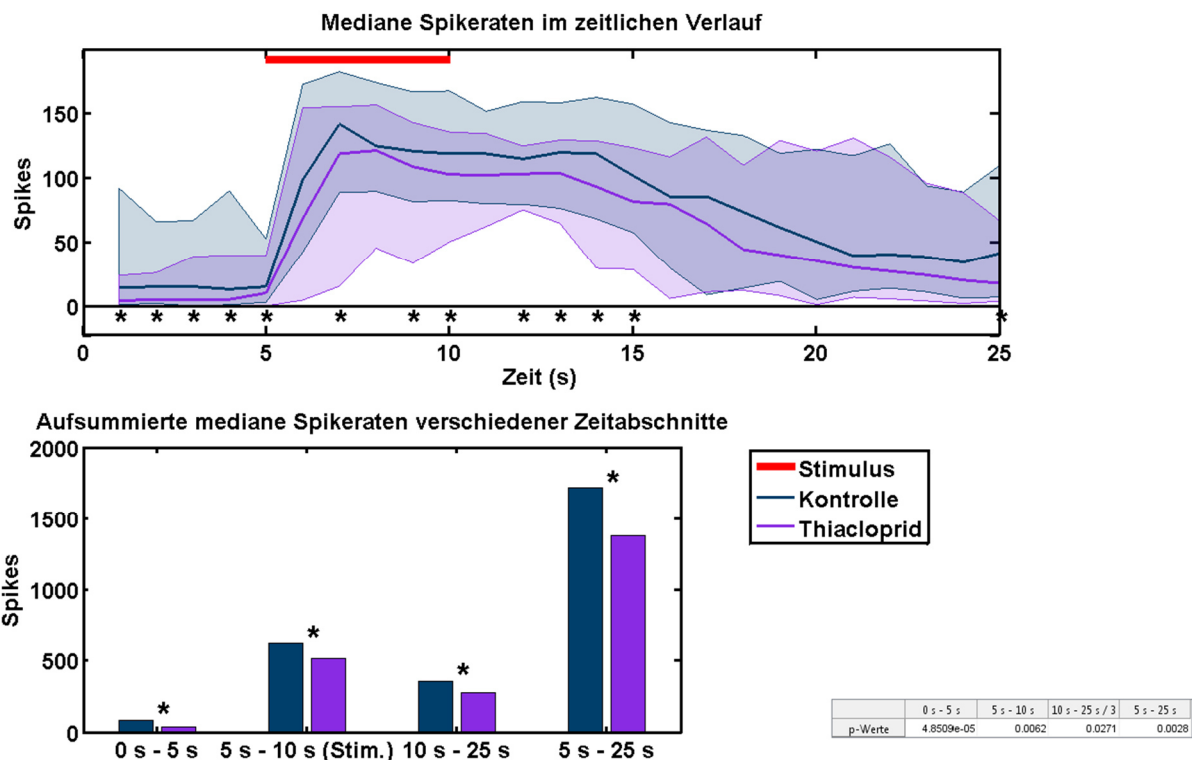


Abbildung 131: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Thiacloprid (250 ng), n=28) und der Kontrollgruppe (Zuckerwasser, n=29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

30 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen über den gesamten Messzeitraum signifikante Unterschiede (0 s – 5 s: p = 0,0000485, 5 s – 10 s: p = 0,0062, 10 s – 25 s: p = 0,0271, 5 s – 25 s: p = 0,0028). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \*p ≤ 0,05 Wilcoxon Ranksum Test.

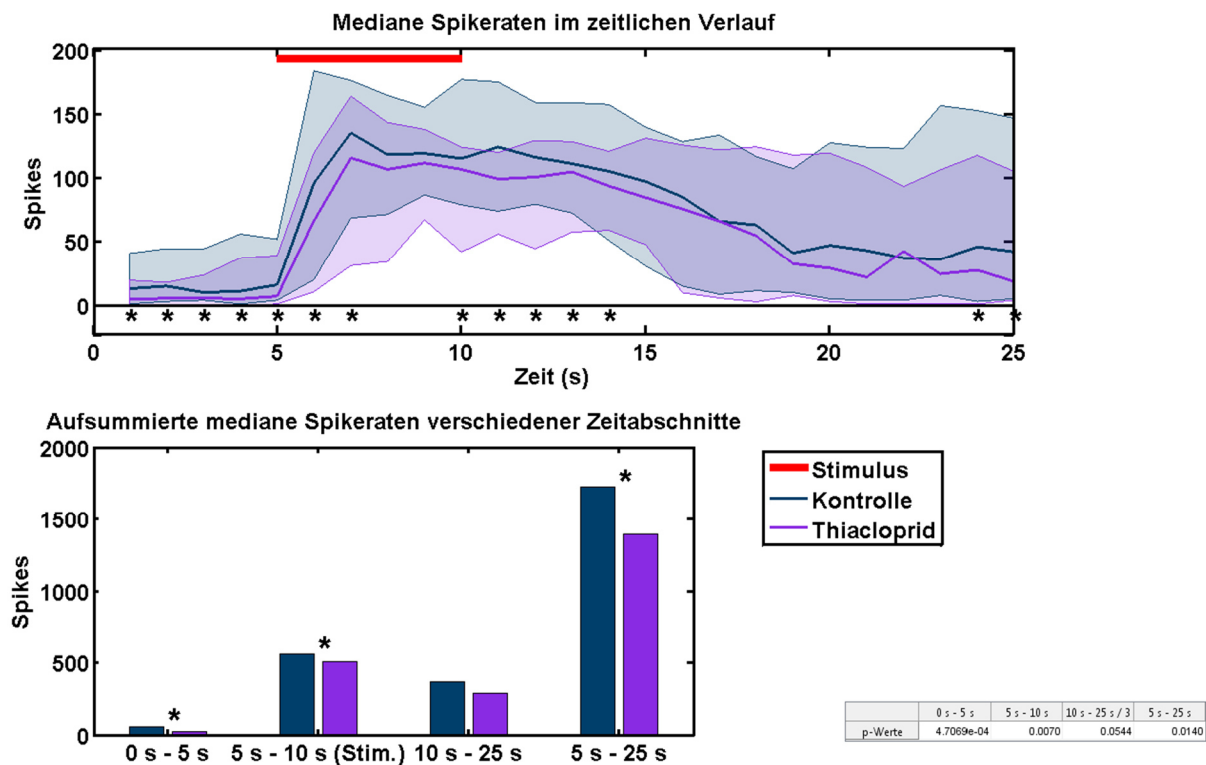


Abbildung 132: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Thiacloprid (250 ng), n=28) und der Kontrollgruppe (Zuckerwasser, n=29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

45 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0004707$ ), im Zeitabschnitt während des Stimulus ( $p = 0,0070$ ), und über 20 Sekunden ab Stimulusbeginn ( $p = 0,0140$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

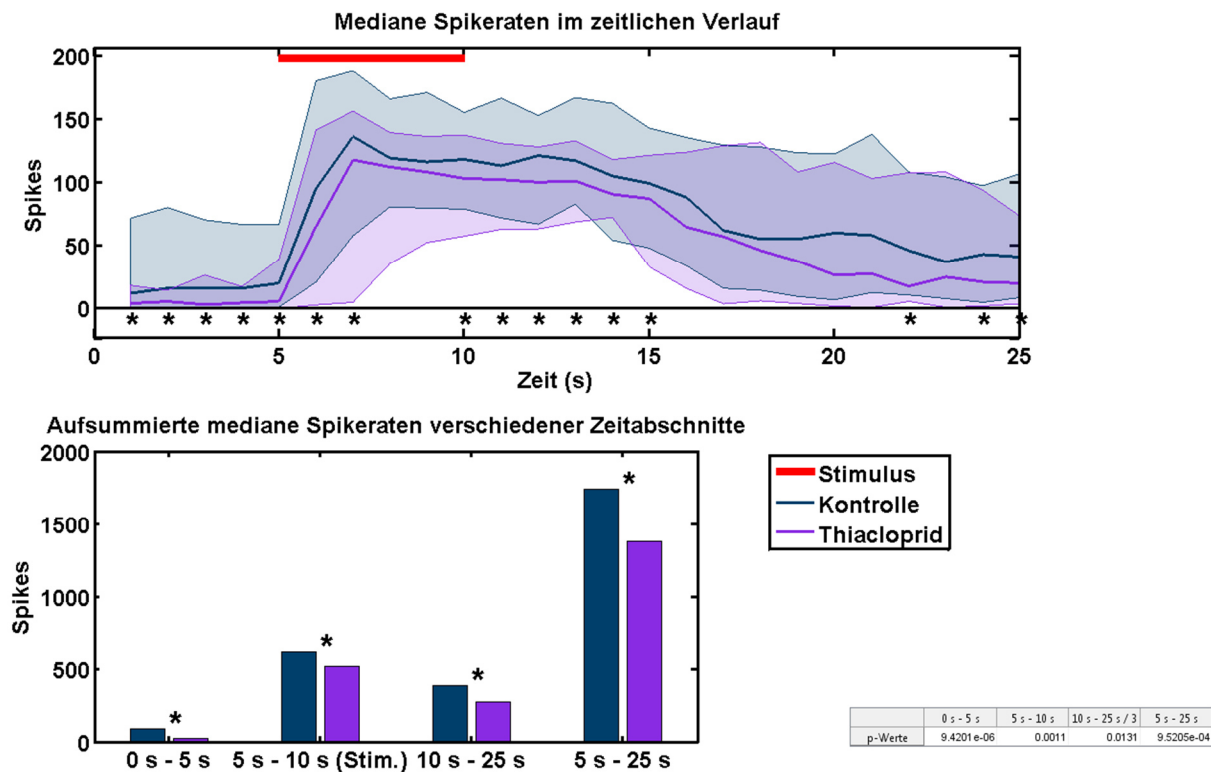


Abbildung 133: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Thiaclopid (250 ng), n=28) und der Kontrollgruppe (Zuckerwasser, n=29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

60 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen über den gesamten Messzeitraum signifikante Unterschiede (0 s – 5 s: p = 0,0000094, 5 s – 10 s: p = 0,0011, 10 s – 25 s: p = 0,0131, 5 s – 25 s: p = 0,00095). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \*p ≤ 0,05 Wilcoxon Ranksum Test.

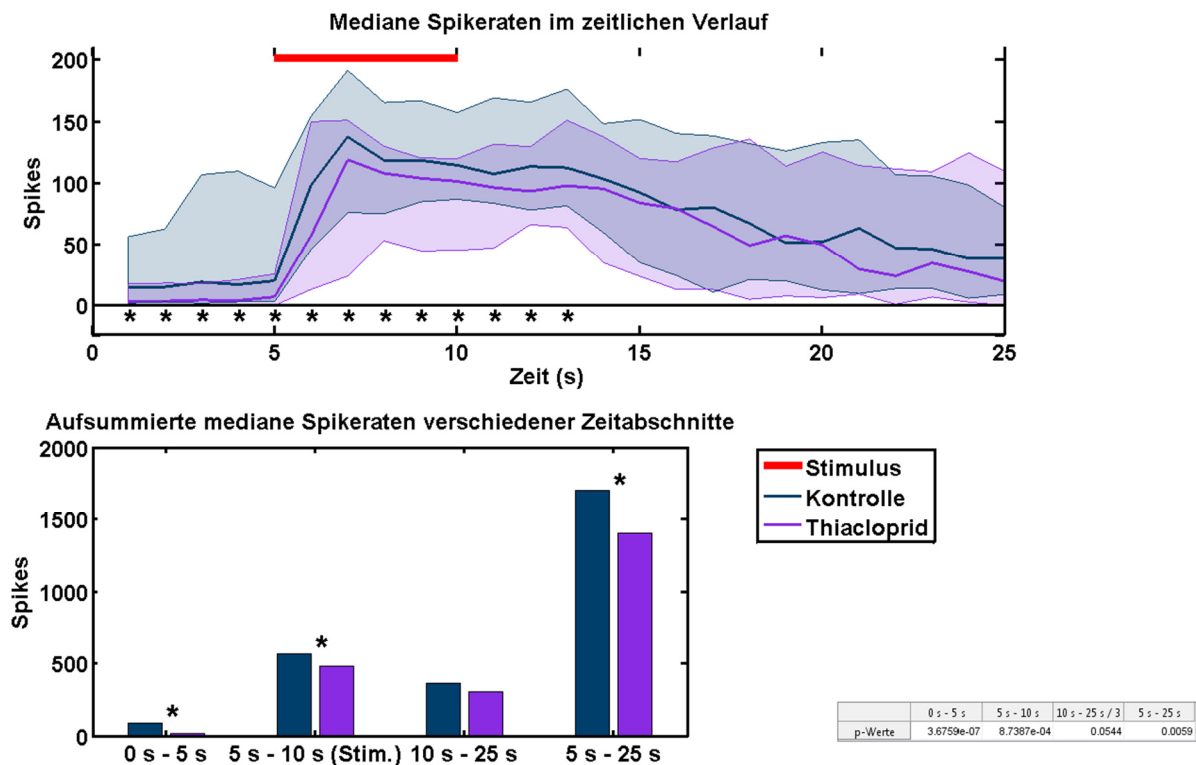


Abbildung 134: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Thiocloprid (250 ng), n=28) und der Kontrollgruppe (Zuckerwasser, n=29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

75 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,00000037$ ), im Zeitabschnitt während des Stimulus ( $p = 0,000874$ ), und über 20 Sekunden ab Stimulusbeginn ( $p = 0,0059$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.



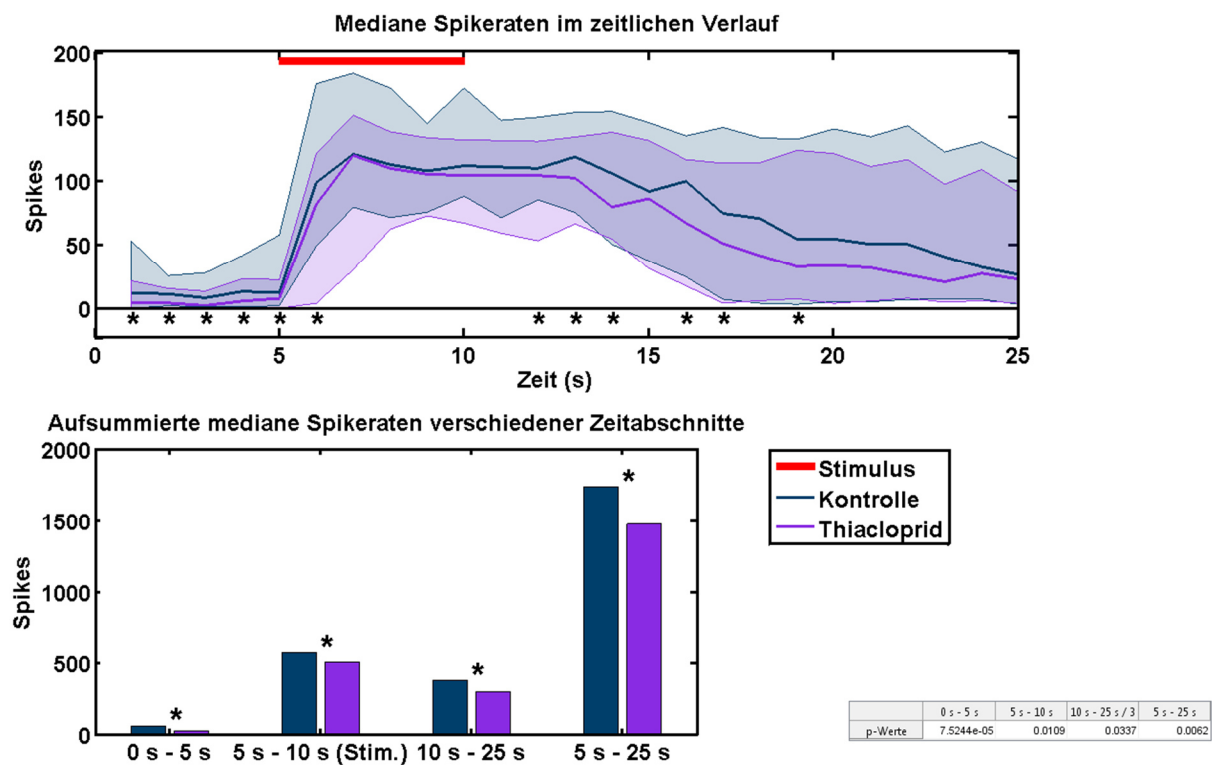


Abbildung 135: Vergleich der medianen Spikeraten der Versuchsgruppe (Thiocloprid (250 ng), n=28) und der Kontrollgruppe (Zuckerwasser, n=29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

120 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen über den gesamten Messzeitraum signifikante Unterschiede (0 s – 5 s:  $p = 0,000075$ , 5 s – 10 s:  $p = 0,0109$ , 10 s – 25 s:  $p = 0,0337$ , 5 s – 25 s:  $p = 0,0062$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

**Zu Kapitel 4: Chronische und zusätzliche akute Fütterung mit Clothianidin bzw. Thiacloprid**

## Clothianidin

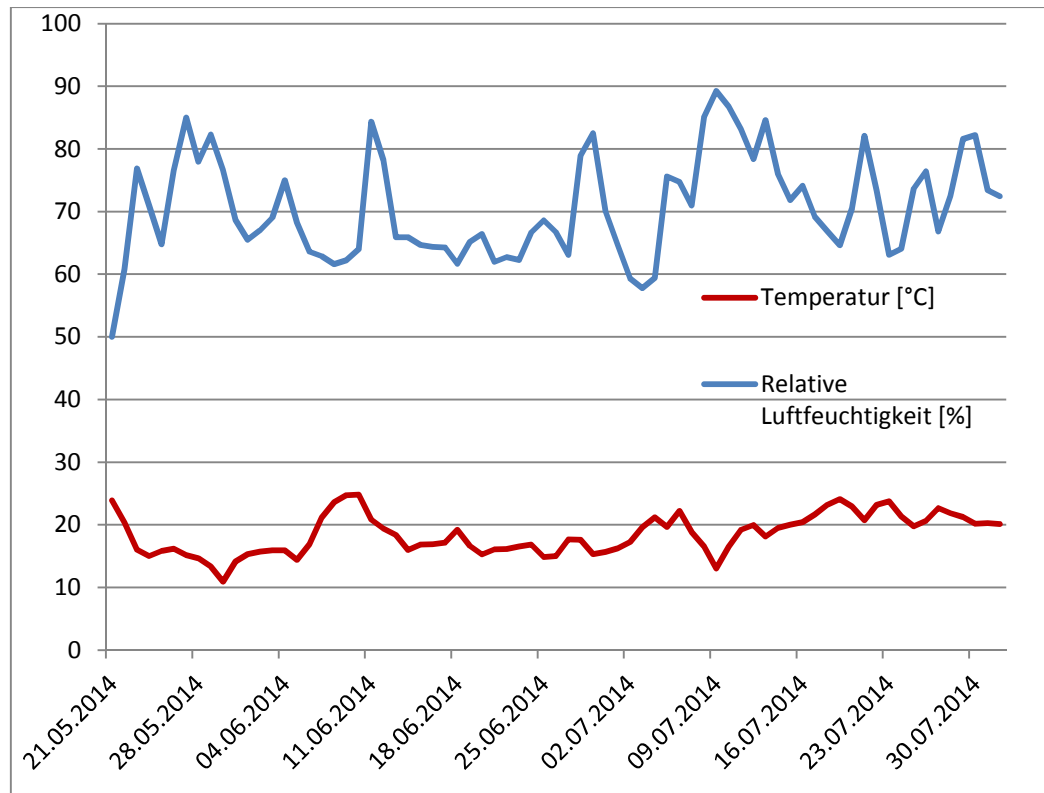


Abbildung 136: Wetterdaten über den gesamten Versuchszeitraum.  
Temperatur in °C und Relative Luftfeuchtigkeit in % über den Zeitraum des Versuchs (gemessen mit EL-USB-2-LCD, Data Logger, Lascar Electronics Ltd., Salisbury, United Kingdom).

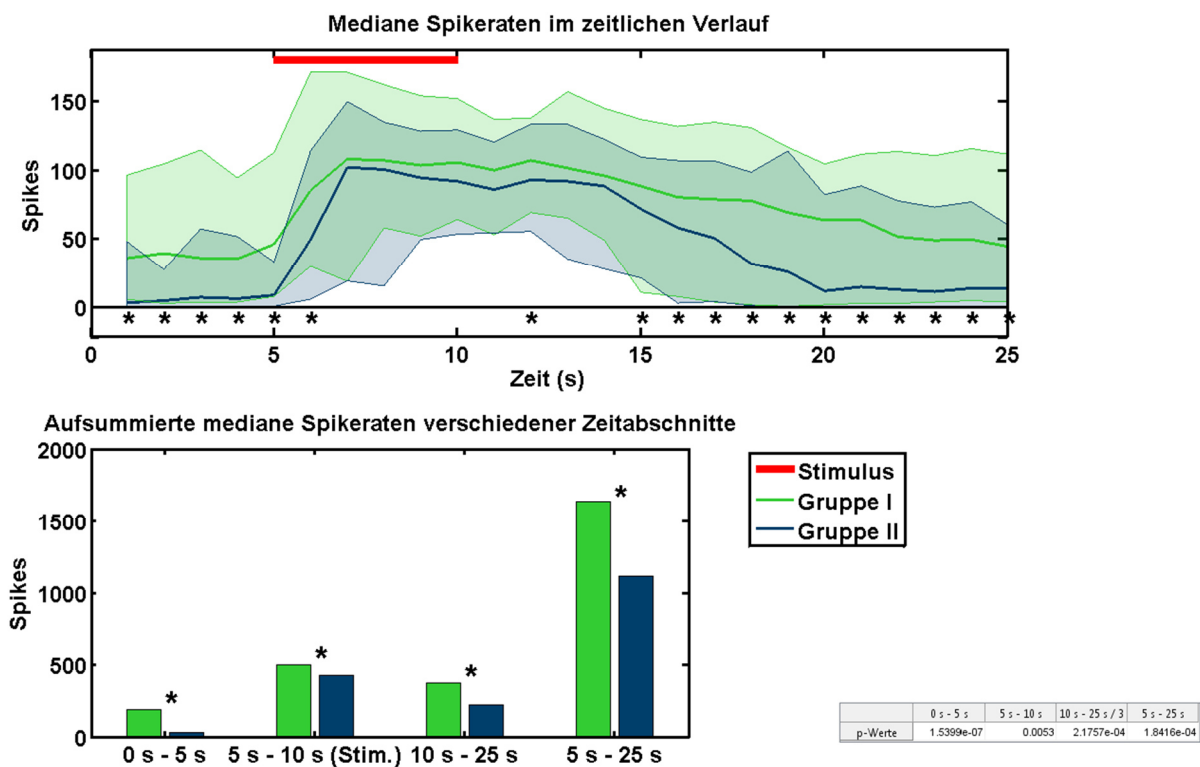


Abbildung 137: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (C/-, n = 30) und der Gruppe II (K/-, n = 32) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

Vortest; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen über den gesamten Messzeitraum signifikante Unterschiede (0 s – 5 s:  $p = 0,00000015$ , 5 s – 10 s:  $p = 0,0053$ , 10 s – 25 s:  $p = 0,00022$ , 5 s – 25 s:  $p = 0,000184$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

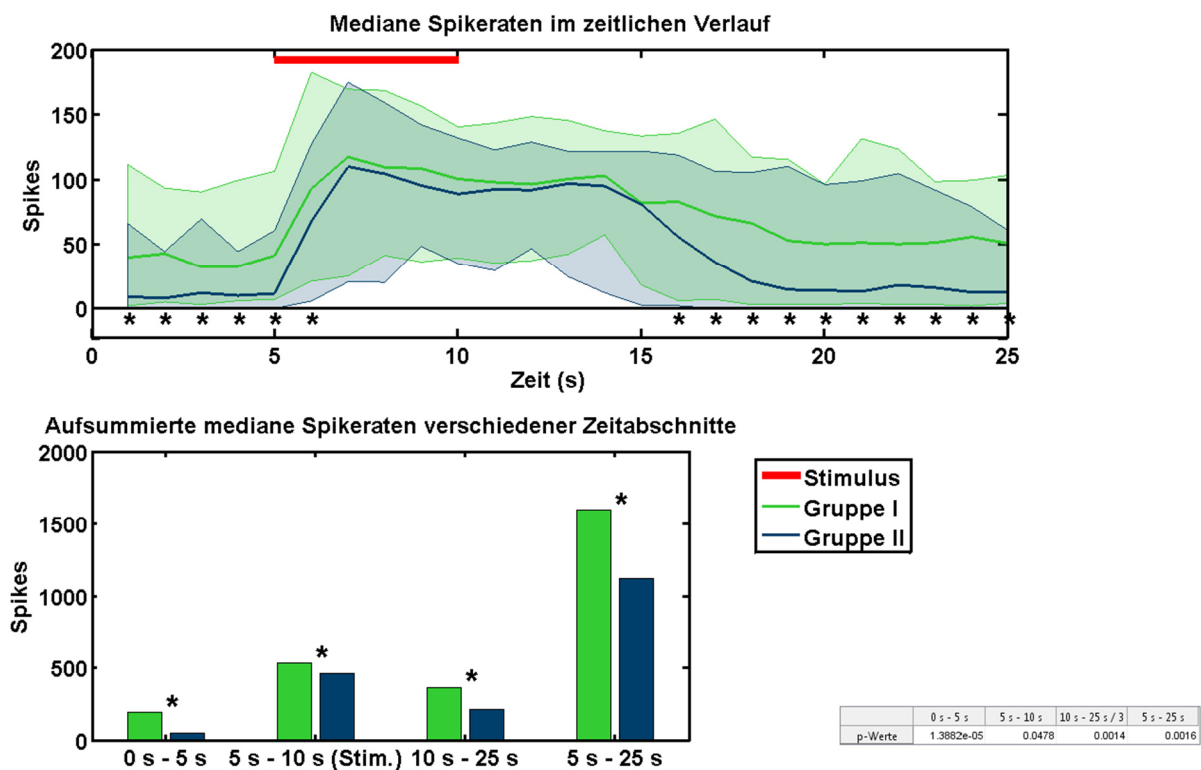


Abbildung 138: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (C/-, n = 30) und der Gruppe II (K/-, n = 32) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

15 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen über den gesamten Messzeitraum signifikante Unterschiede (0 s – 5 s:  $p = 0,0000139$ , 5 s – 10 s:  $p = 0,0478$ , 10 s – 25 s:  $p = 0,0014$ , 5 s – 25 s:  $p = 0,0016$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

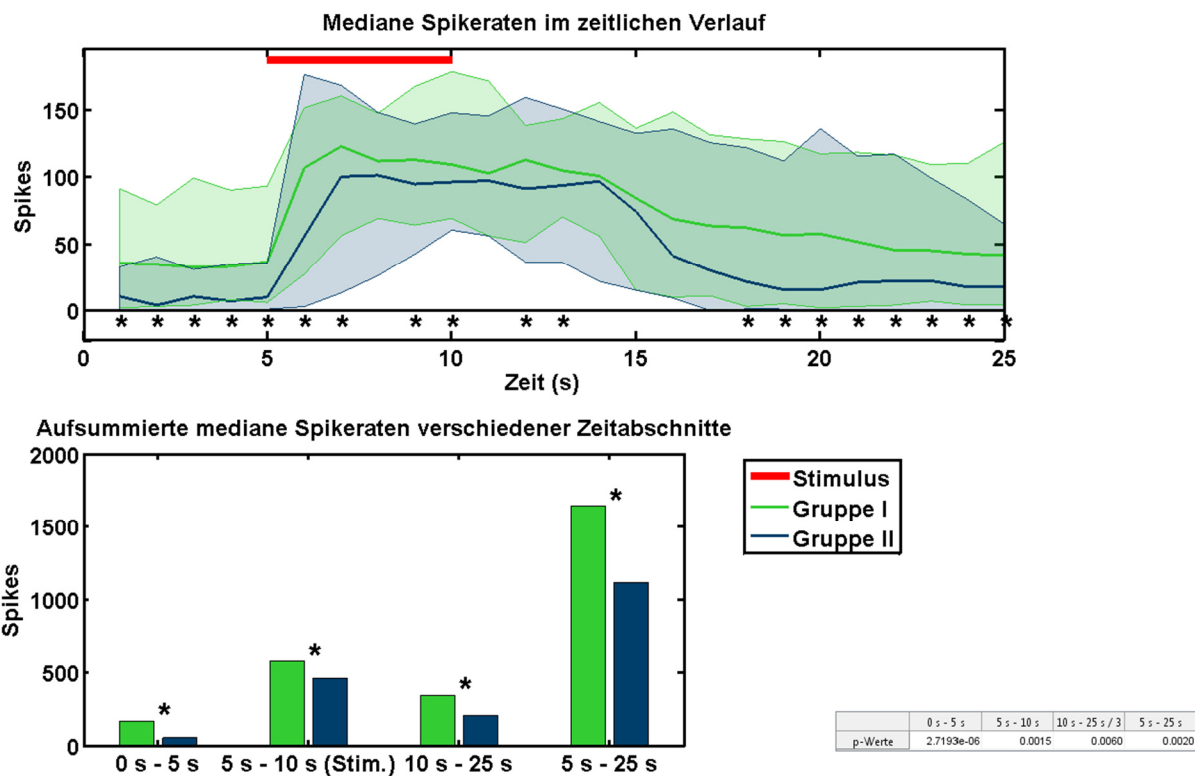


Abbildung 139: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (C/-, n = 30) und der Gruppe II (K/-, n = 32) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

30 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen über den gesamten Messzeitraum signifikante Unterschiede (0 s – 5 s:  $p = 0,0000027$ , 5 s – 10 s:  $p = 0,0015$ , 10 s – 25 s:  $p = 0,0060$ , 5 s – 25 s:  $p = 0,0020$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

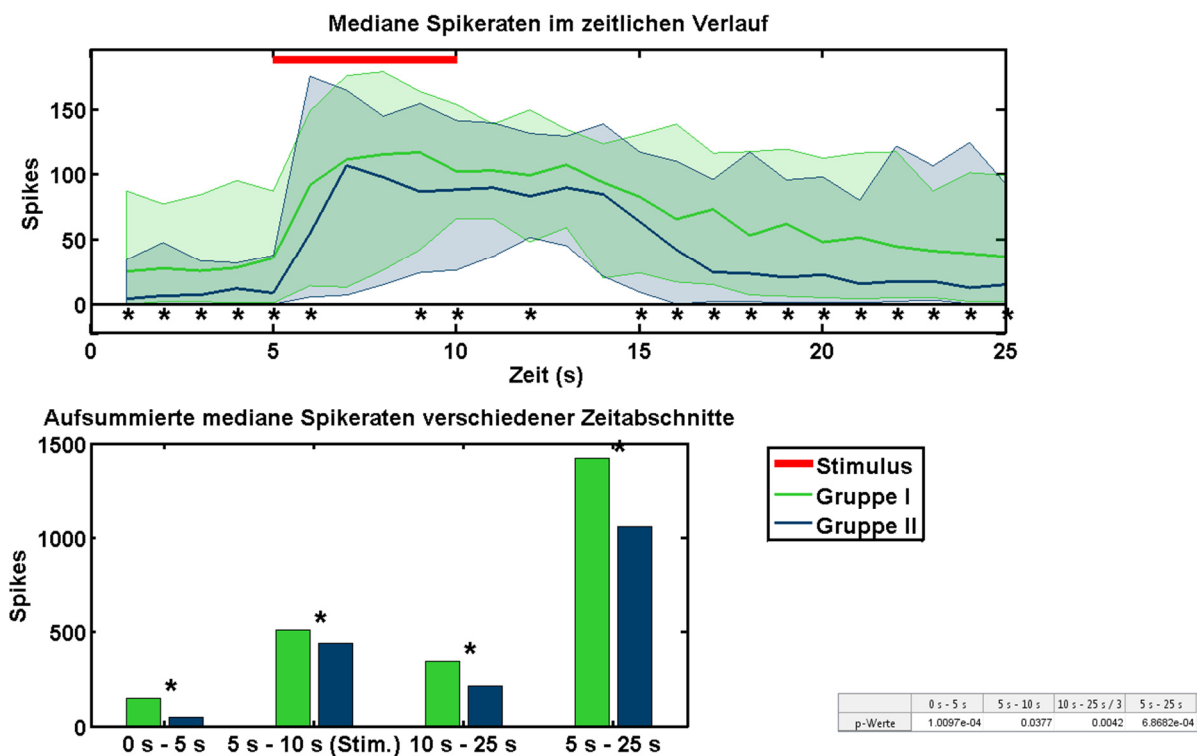


Abbildung 140: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (C/-, n = 30) und der Gruppe II (K/-, n = 32) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

45 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen über den gesamten Messzeitraum signifikante Unterschiede (0 s – 5 s:  $p = 0,00010$ , 5 s – 10 s:  $p = 0,0377$ , 10 s – 25 s:  $p = 0,0042$ , 5 s – 25 s:  $p = 0,000687$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

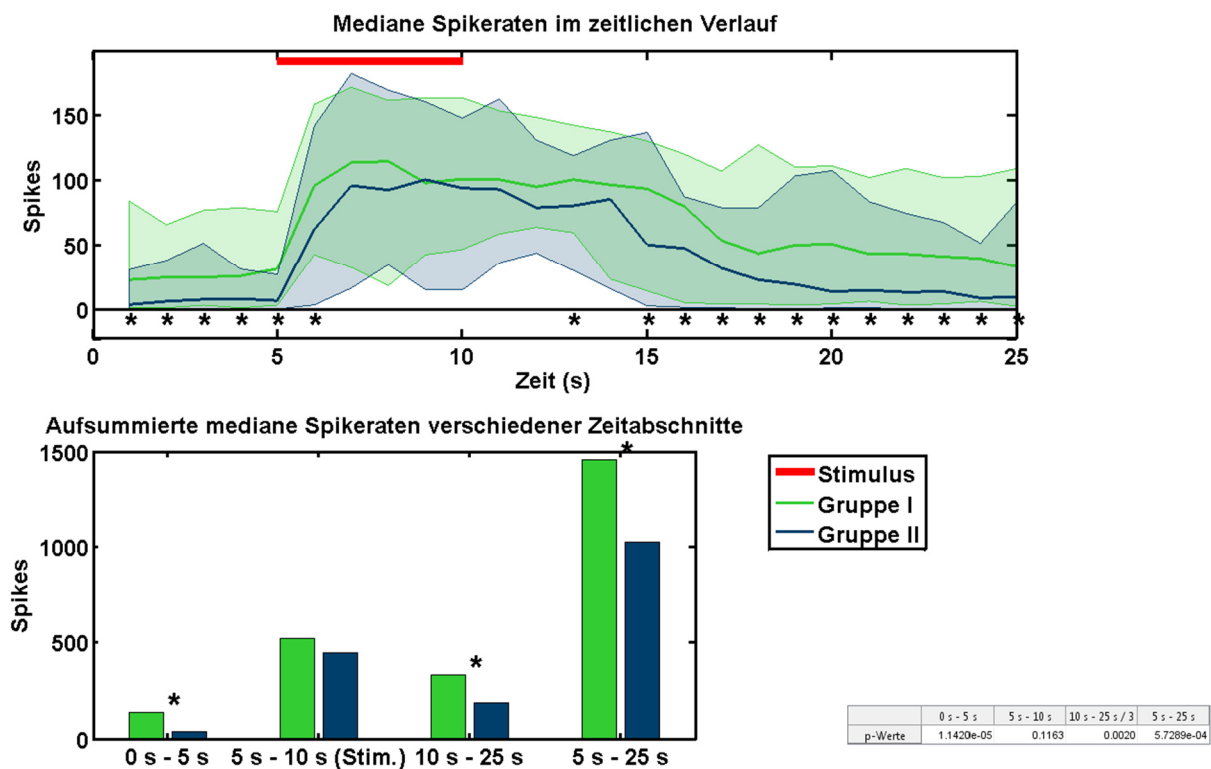


Abbildung 141: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (C/-, n = 30) und der Gruppe II (K/-, n = 32) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 60 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,000011$ ), im Zeitabschnitt nach dem Stimulus ( $p = 0,0020$ ), und über 20 Sekunden ab Stimulusbeginn ( $p = 0,00057$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

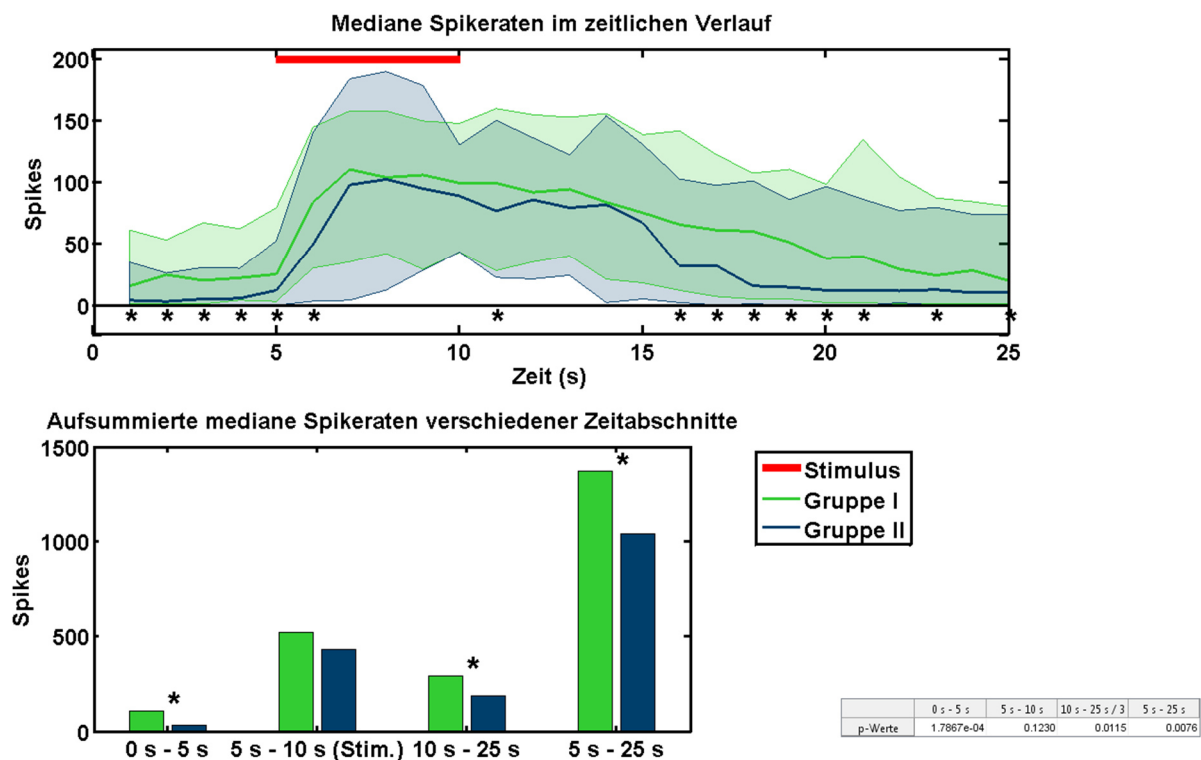


Abbildung 142: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (C/-, n = 30) und der Gruppe II (K/-, n = 32) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 75 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,000179$ ), im Zeitabschnitt nach dem Stimulus ( $p = 0,0115$ ), und über 20 Sekunden ab Stimulusbeginn ( $p = 0,0076$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.



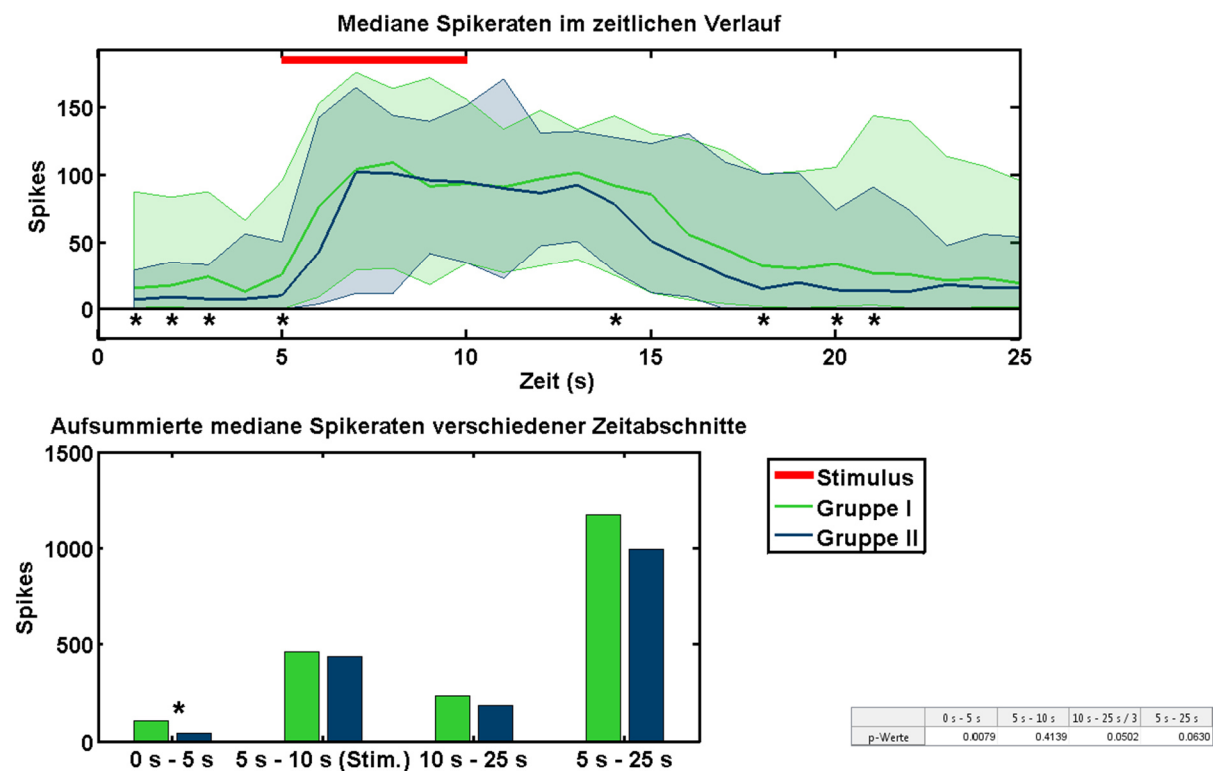


Abbildung 143: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (C/-, n = 30) und der Gruppe II (K/-, n = 32) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

90 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0079$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

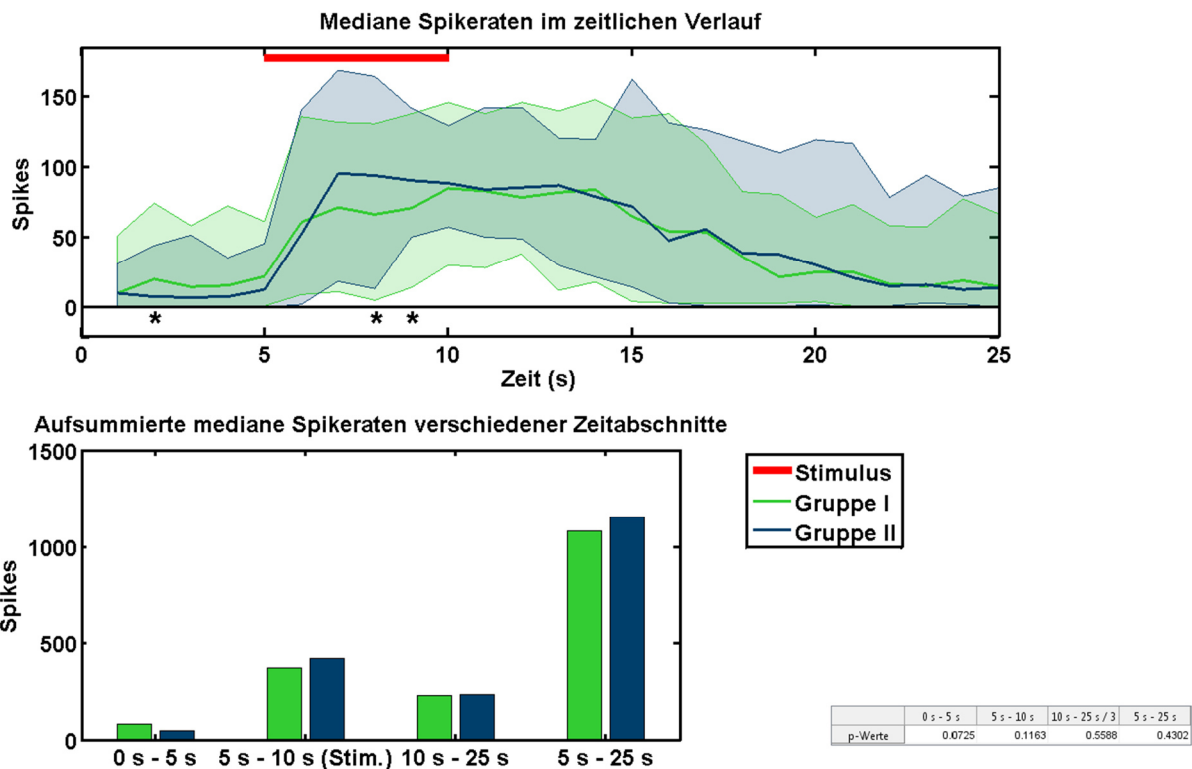


Abbildung 144: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (C/-, n = 30) und der Gruppe II (K/-, n = 32) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 120 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

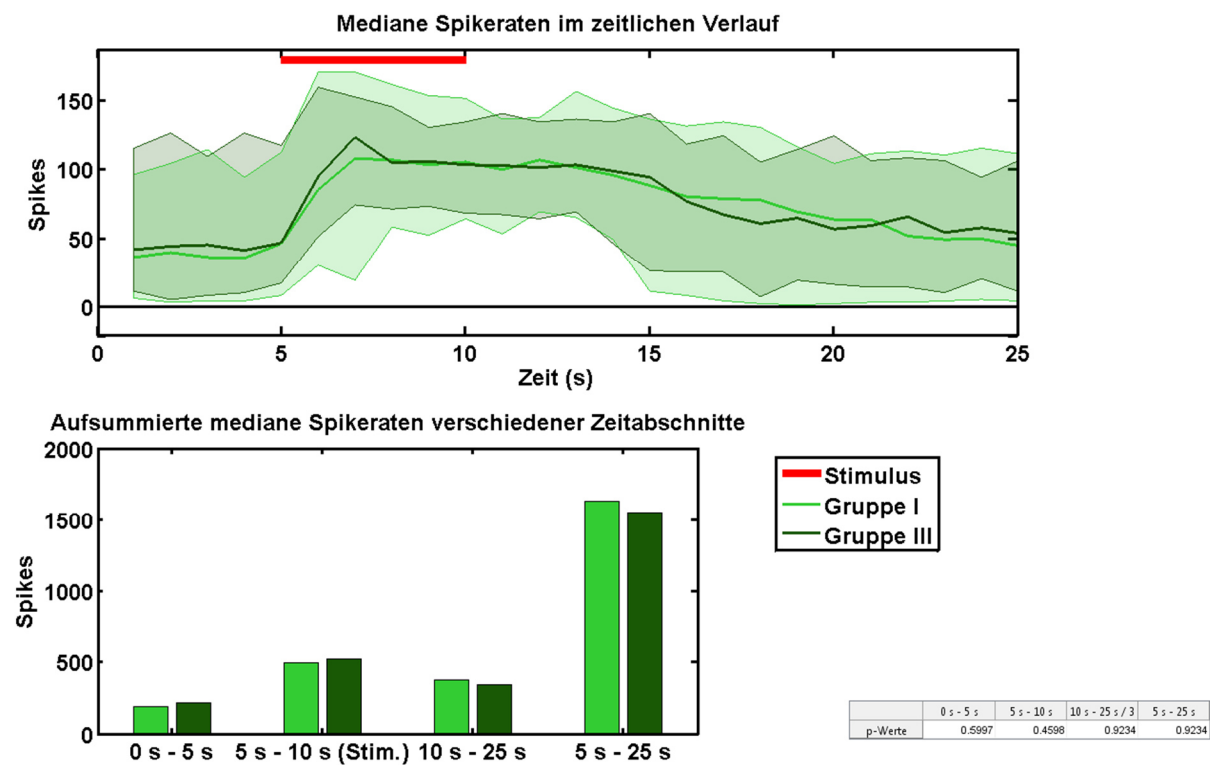


Abbildung 145: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (C/-, n = 30) und der Gruppe III (C/T, n = 30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

Vortest; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

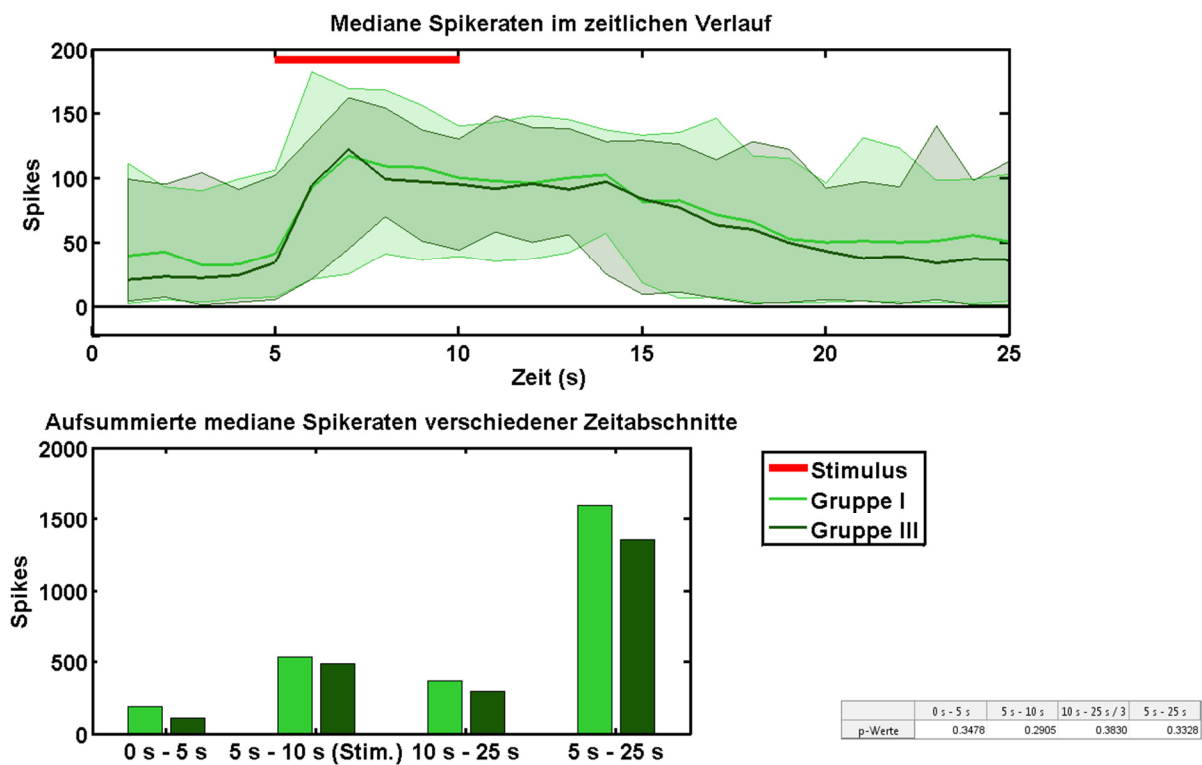


Abbildung 146: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (C/-, n = 30) und der Gruppe III (C/T, n = 30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

15 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

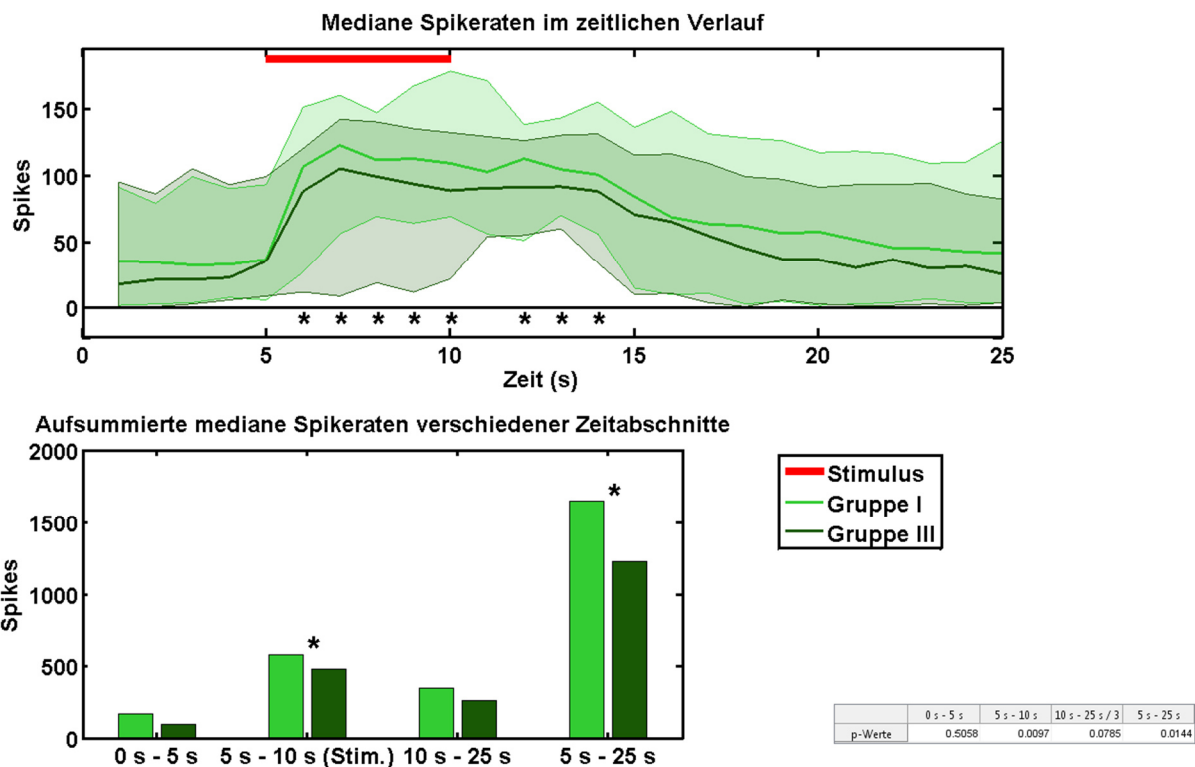


Abbildung 147: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (C/-, n = 30) und der Gruppe III (C/T, n = 30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 30 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt während des Stimulus ( $p = 0,0097$ ) und über 20 Sekunden ab Stimulusbeginn ( $p = 0,0144$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

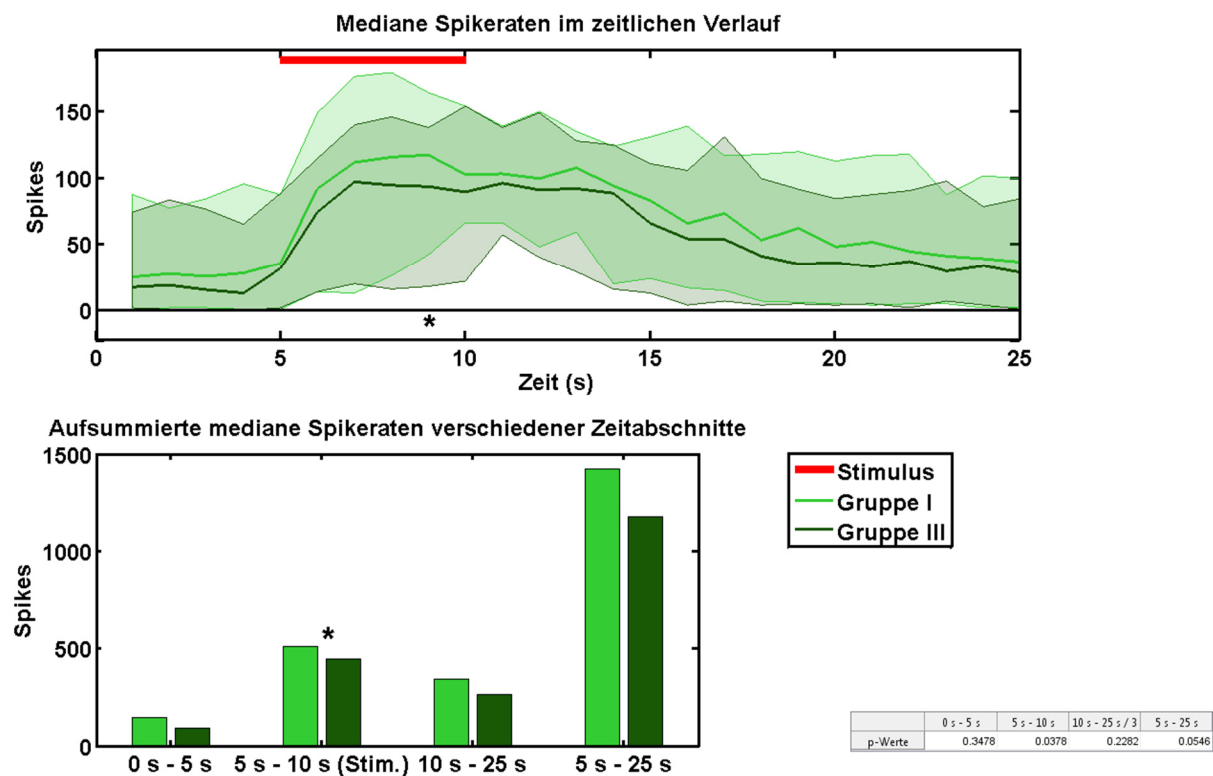


Abbildung 148: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (C/-, n = 30) und der Gruppe III (C/T, n = 30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

45 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt während des Stimulus ( $p = 0,0378$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

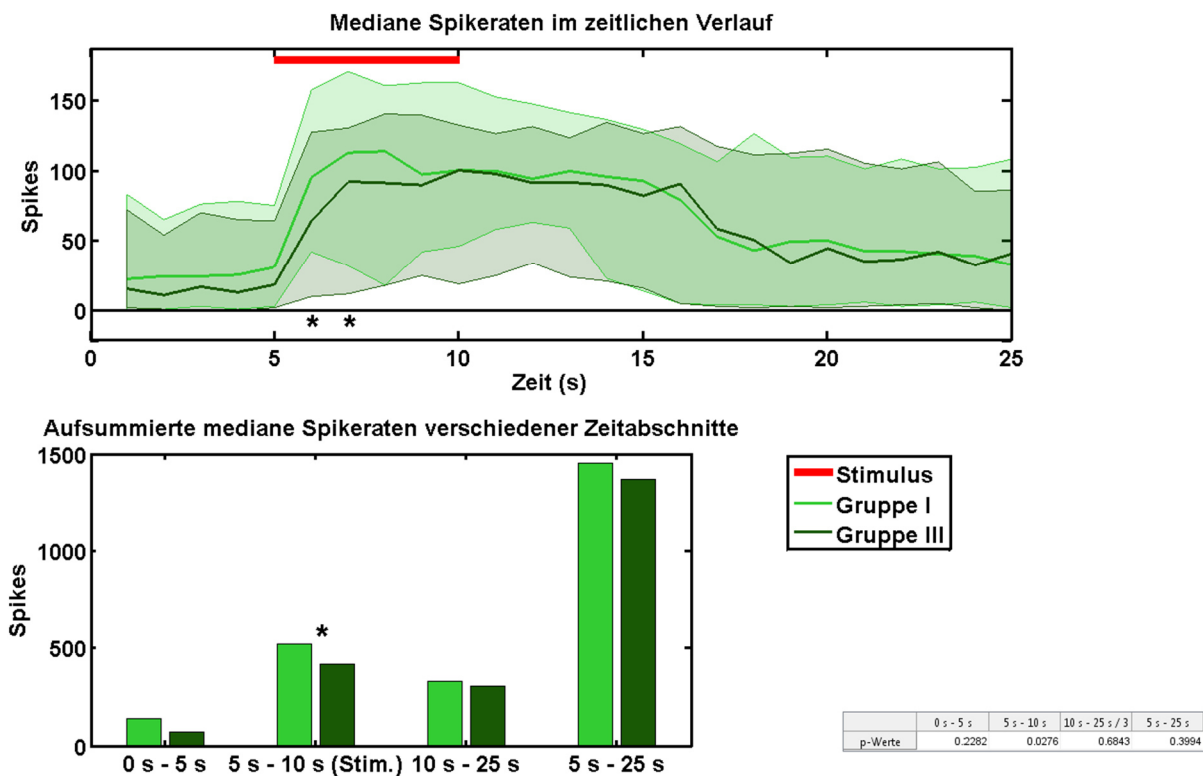


Abbildung 149: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (C/-, n = 30) und der Gruppe III (C/T, n = 30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 60 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt während des Stimulus ( $p = 0,0276$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

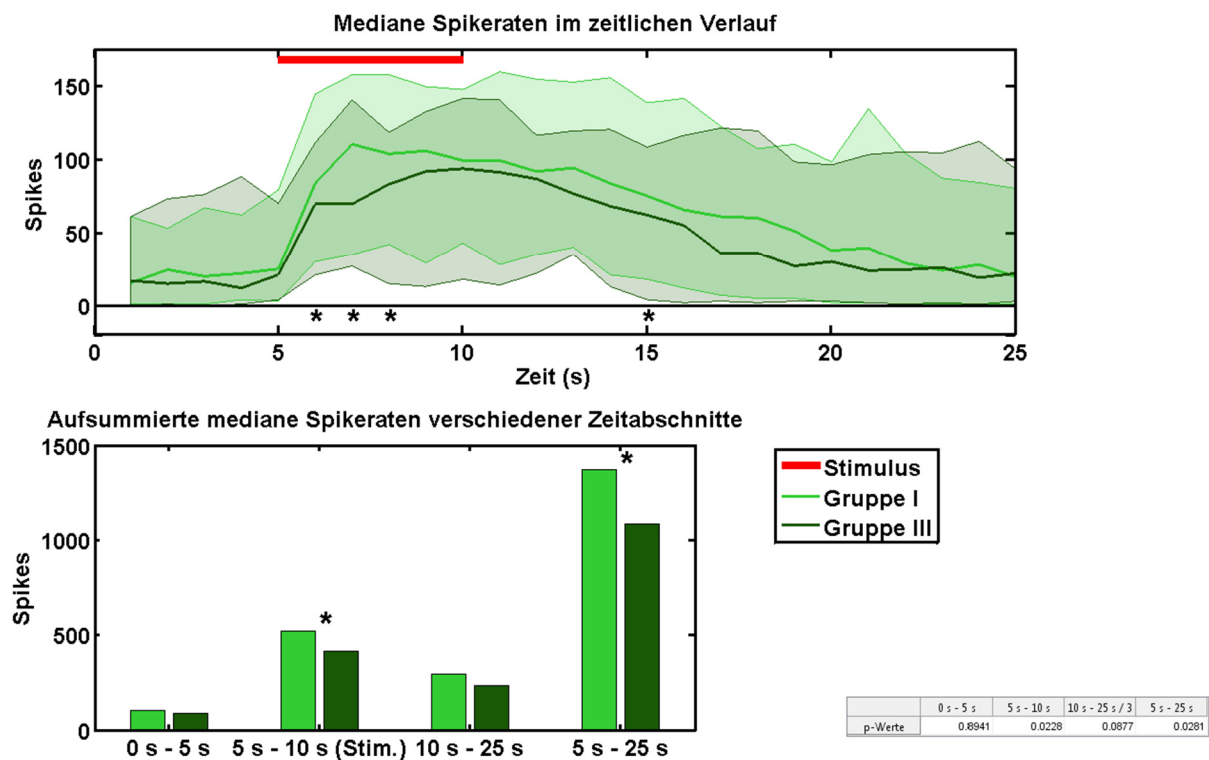


Abbildung 150: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (C/-, n = 30) und der Gruppe III (C/T, n = 30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

75 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt während des Stimulus ( $p = 0,0228$ ), und über 20 Sekunden ab Stimulusbeginn ( $p = 0,0281$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.



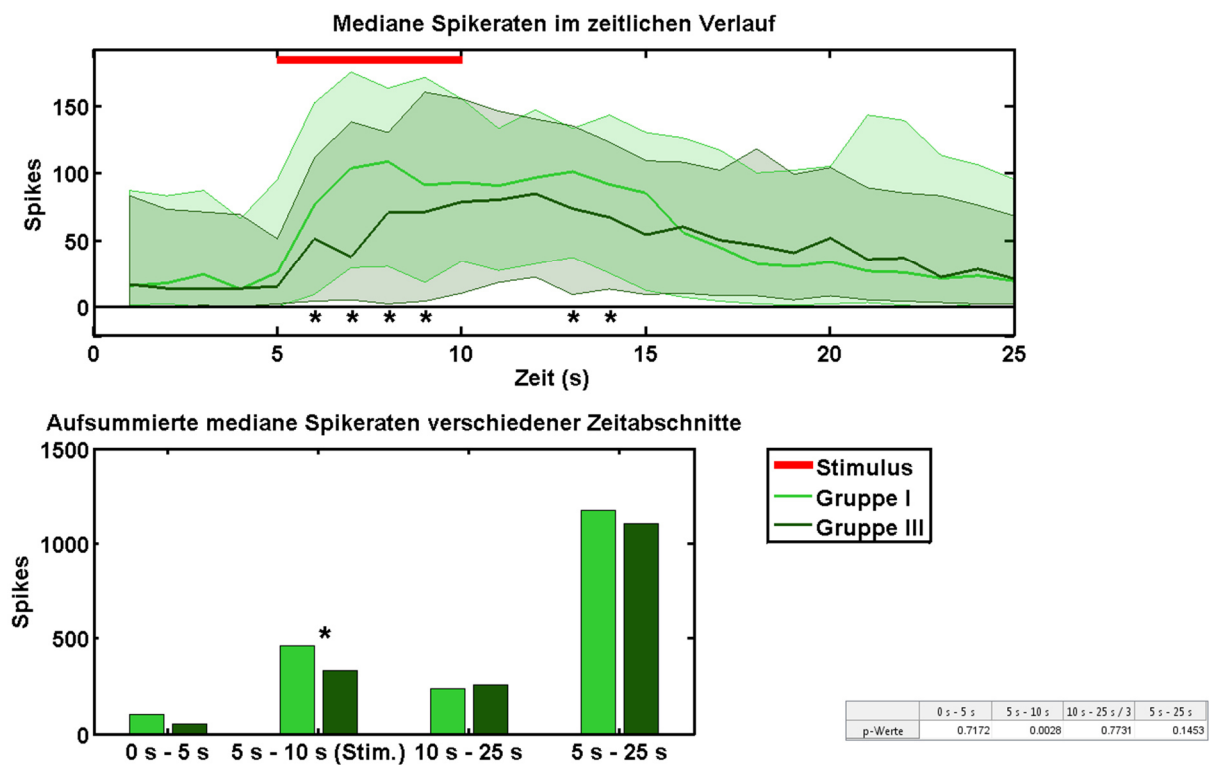


Abbildung 151: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (C/-, n = 30) und der Gruppe III (C/T, n = 30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

90 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt während des Stimulus ( $p = 0,0028$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

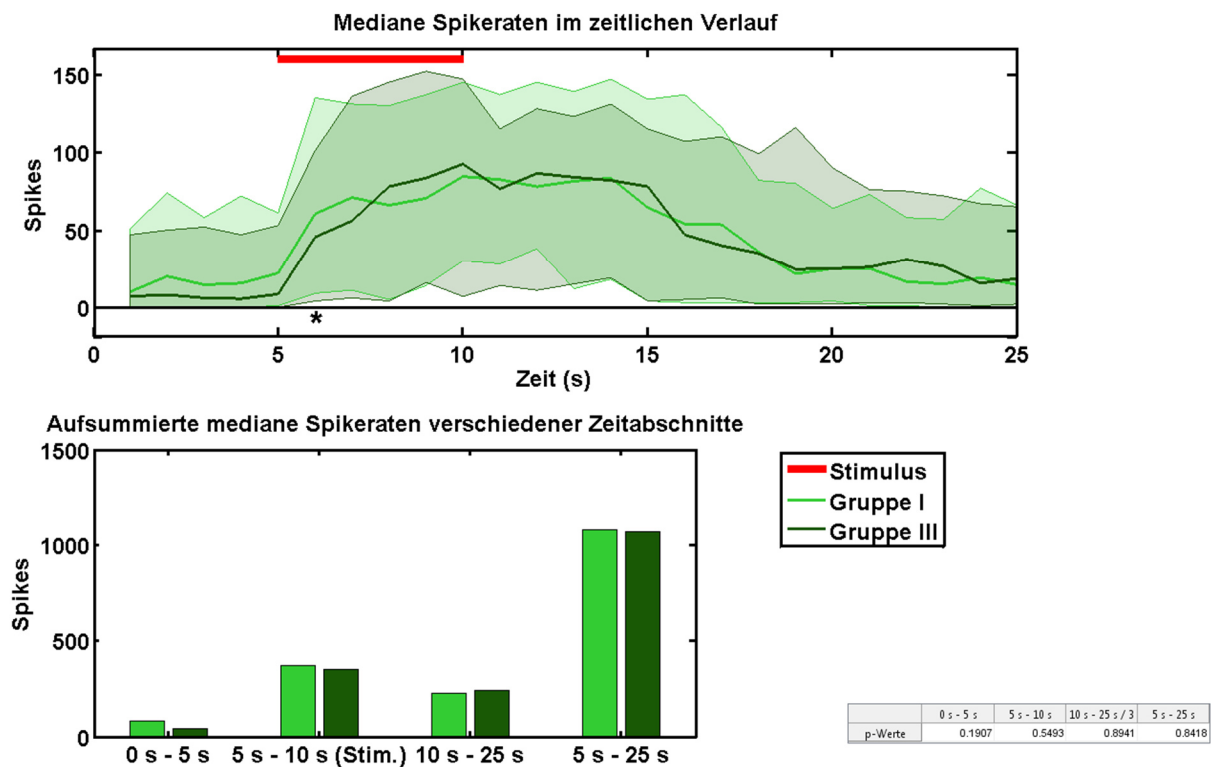


Abbildung 152: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (C/-, n = 30) und der Gruppe III (C/T, n = 30) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

120 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

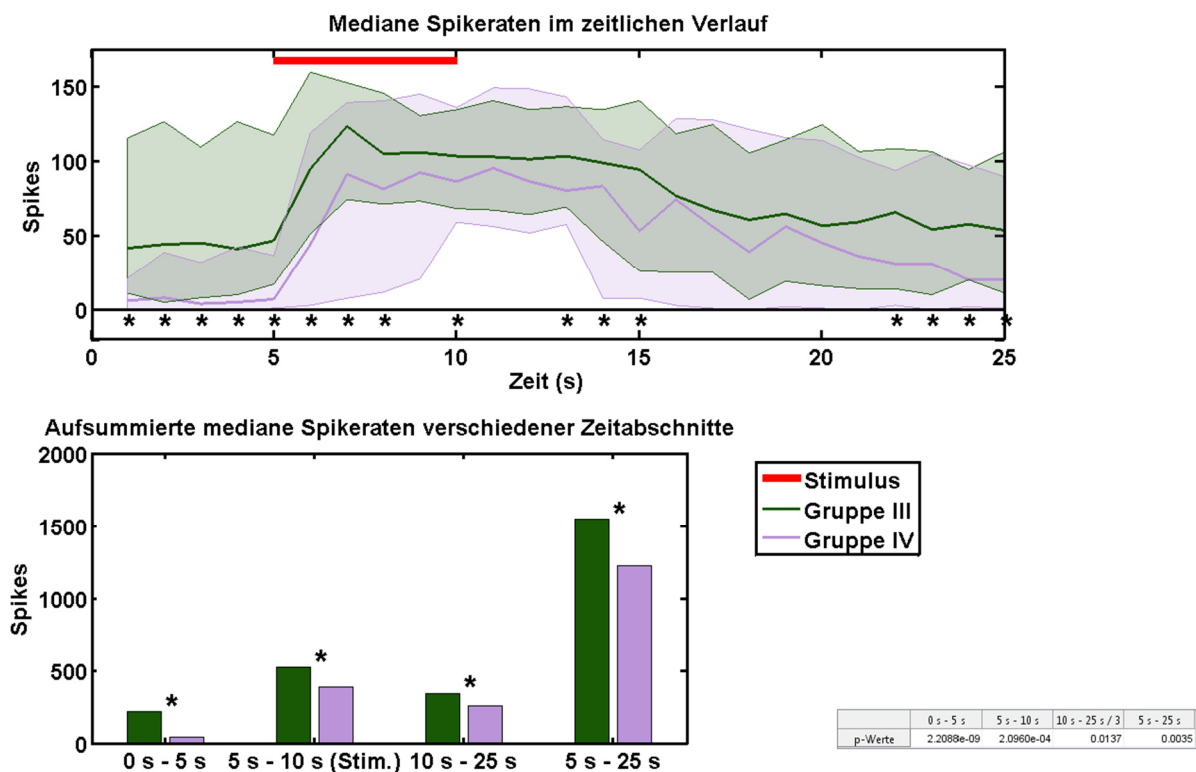


Abbildung 153: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe III (C/T, n = 30) und der Gruppe IV (K/T, n = 29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. Vortest; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen über den gesamten Messzeitraum signifikante Unterschiede (0 s – 5 s: p = 0,0000000022, 5 s – 10 s: p = 0,00021, 10 s – 25 s: p = 0,0137, 5 s – 25 s: p = 0,0035). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \*p ≤ 0,05 Wilcoxon Ranksum Test.

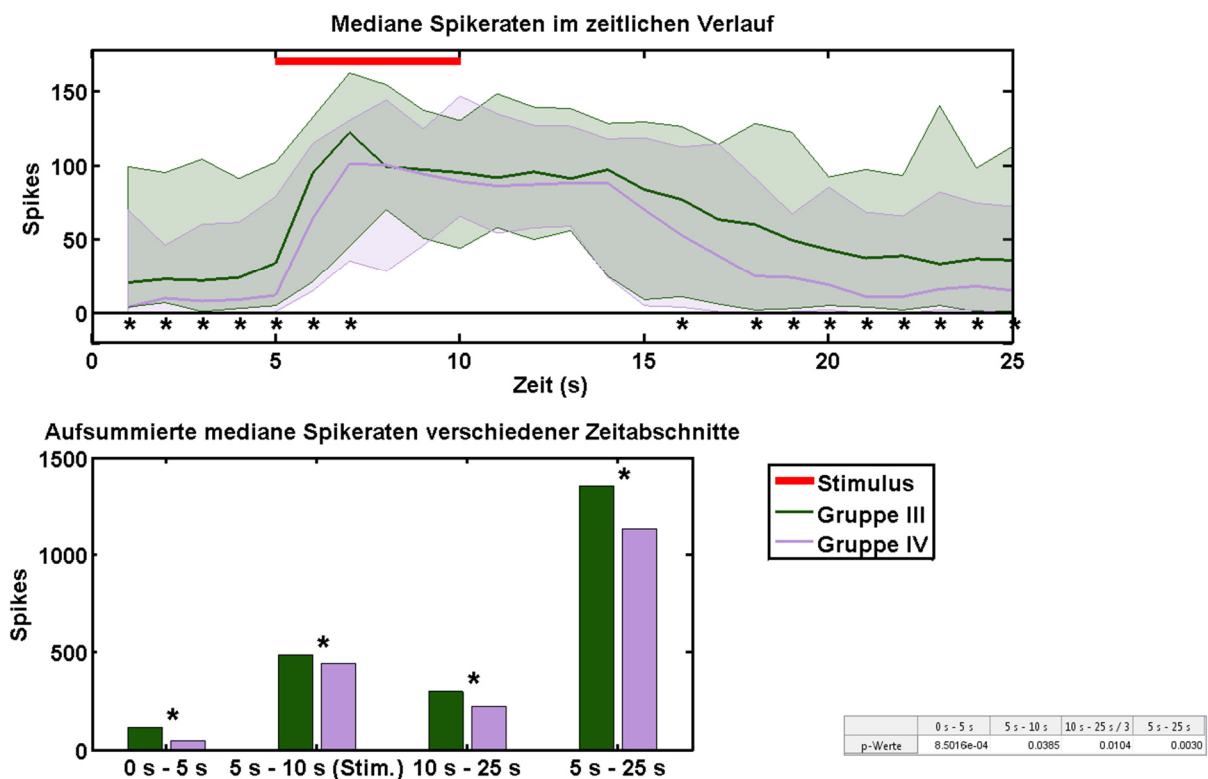


Abbildung 154: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe III (C/T, n = 30) und der Gruppe IV (K/T, n = 29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 15 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen über den gesamten Messzeitraum signifikante Unterschiede (0 s – 5 s: p = 0,00085, 5 s – 10 s: p = 0,0385, 10 s – 25 s: p = 0,0104, 5 s – 25 s: p = 0,0030). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \*p ≤ 0,05 Wilcoxon Ranksum Test.

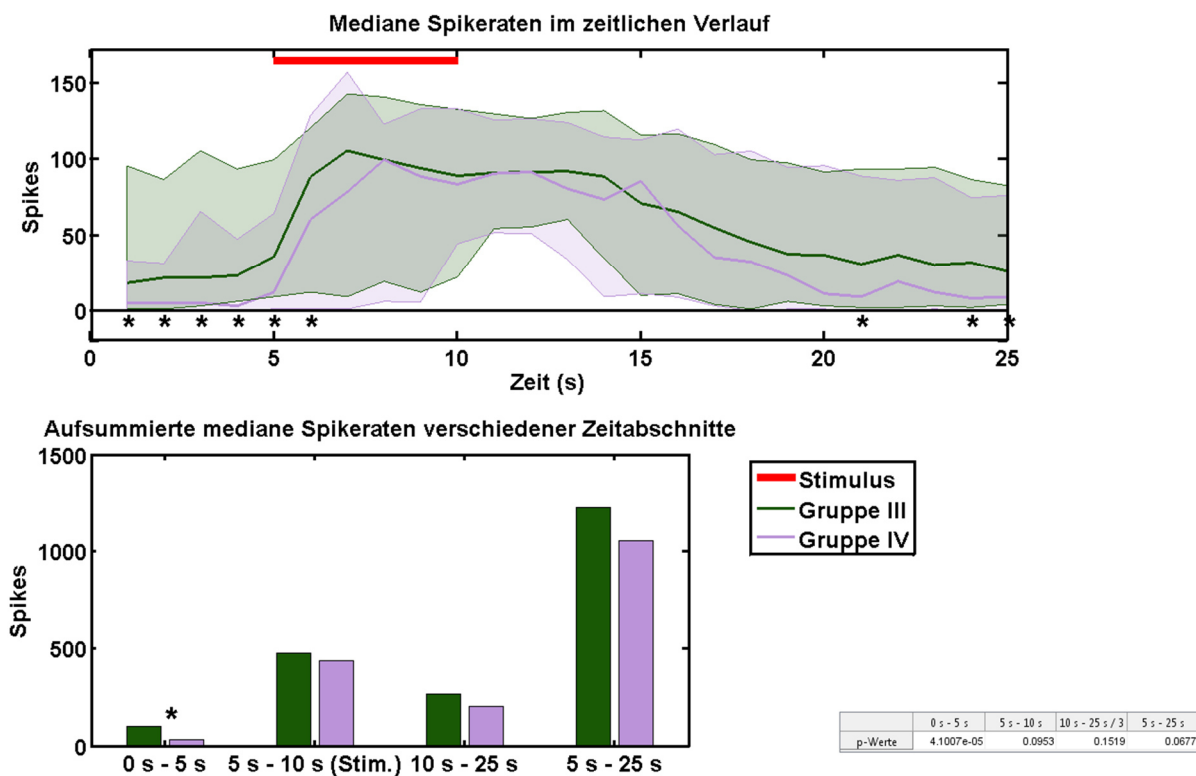


Abbildung 155: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe III (C/T, n = 30) und der Gruppe IV (K/T, n = 29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 30 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,000041$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

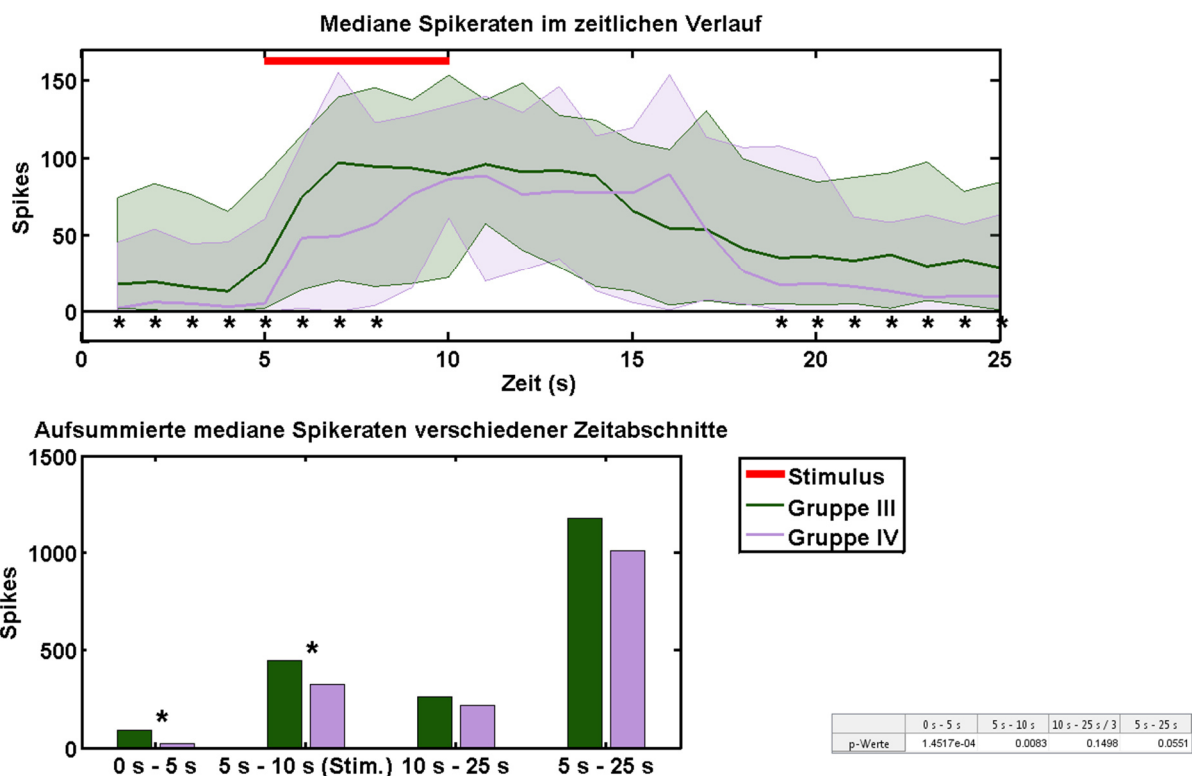


Abbildung 156: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe III (C/T, n = 30) und der Gruppe IV (K/T, n = 29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 45 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,00015$ ), und im Zeitabschnitt während des Stimulus ( $p = 0,0083$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

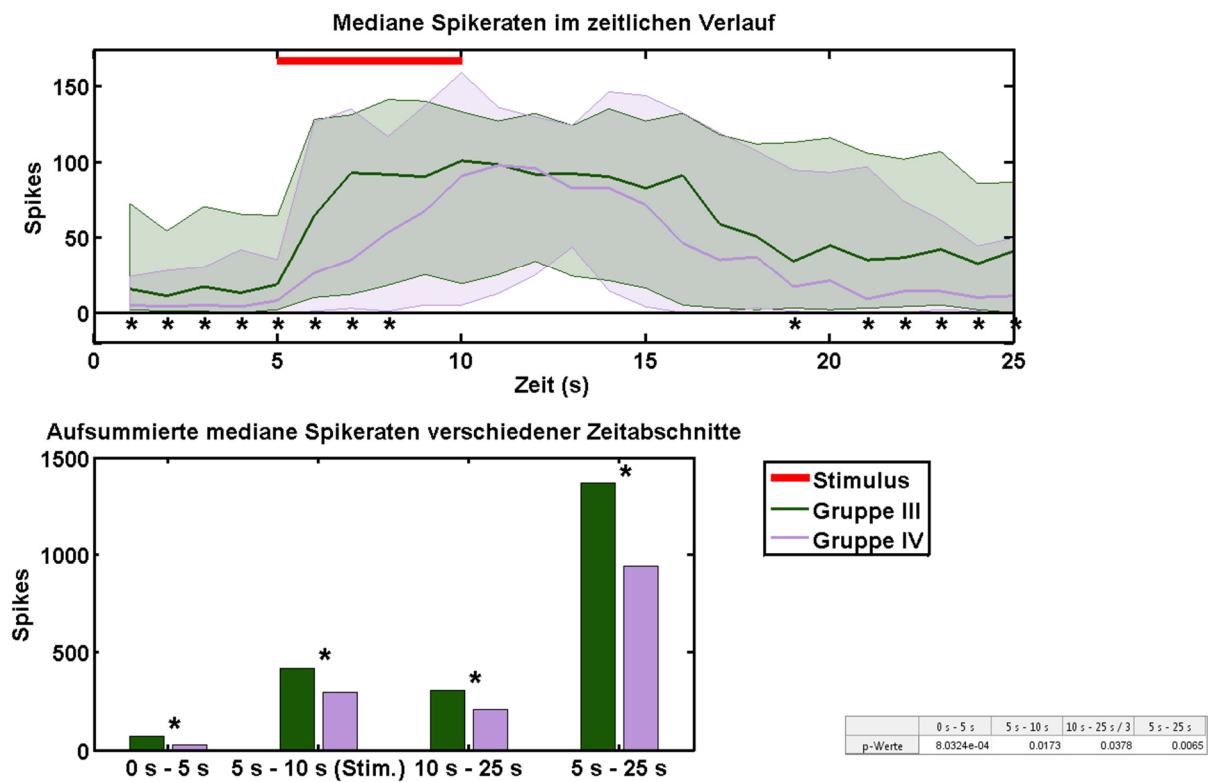


Abbildung 157: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe III (C/T, n = 30) und der Gruppe IV (K/T, n = 29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 60 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen über den gesamten Messzeitraum signifikante Unterschiede (0 s – 5 s: p = 0,00080, 5 s – 10 s: p = 0,0173, 10 s – 25 s: p = 0,0378, 5 s – 25 s: p = 0,0065). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \*p ≤ 0,05 Wilcoxon Ranksum Test.

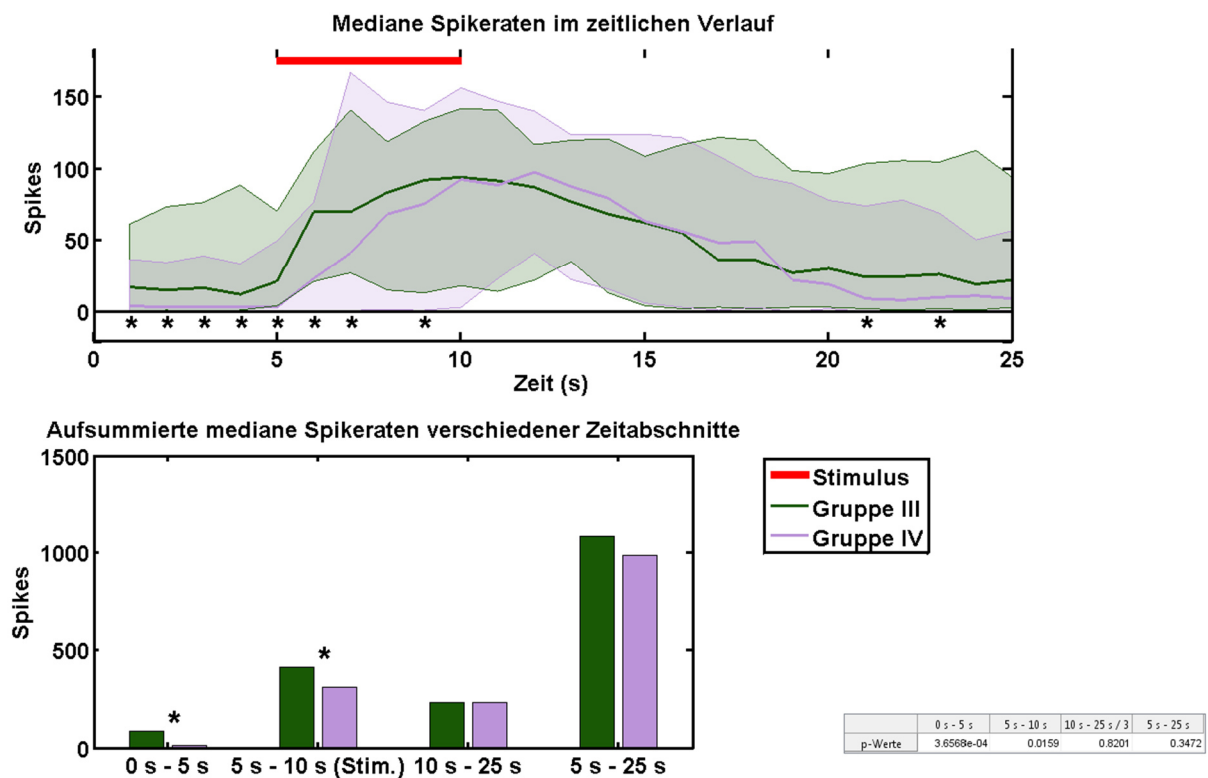


Abbildung 158: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe III (C/T, n = 30) und der Gruppe IV (K/T, n = 29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 75 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,00037$ ), und im Zeitabschnitt während des Stimulus ( $p = 0,0159$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.



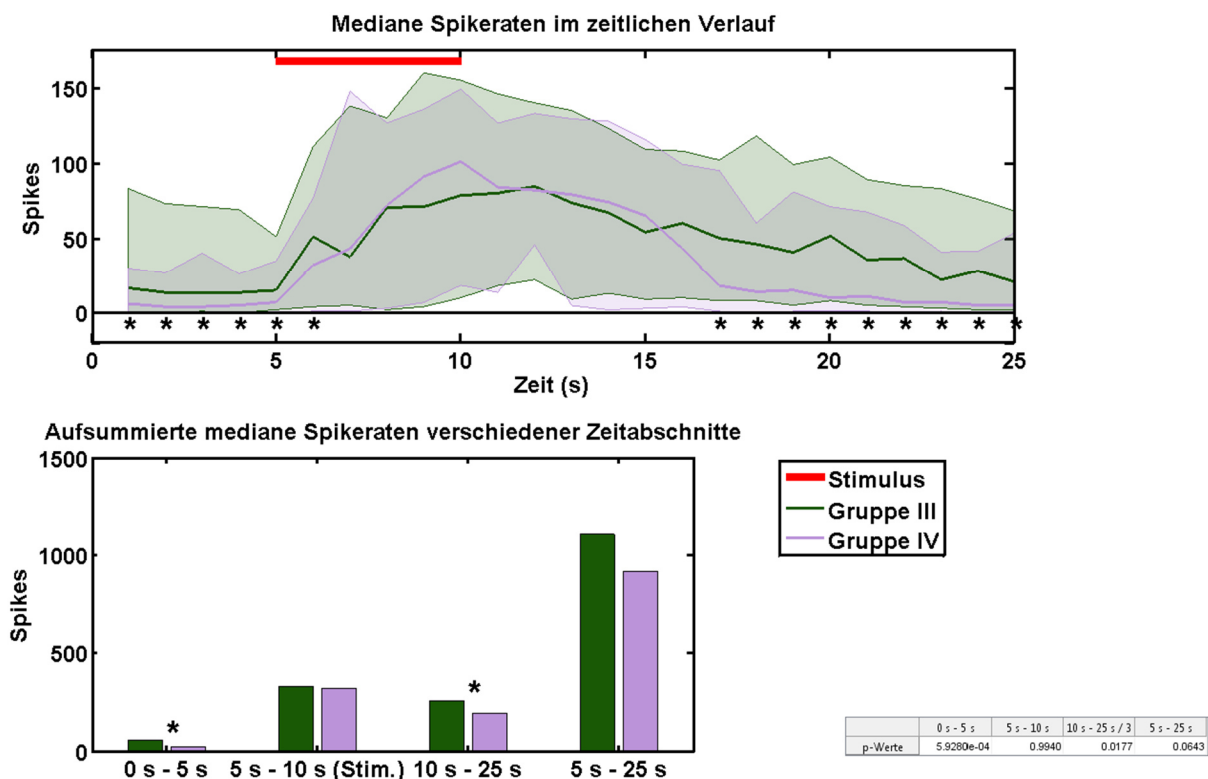


Abbildung 159: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe III (C/T, n = 30) und der Gruppe IV (K/T, n = 29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 90 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,000593$ ), und im Zeitabschnitt nach dem Stimulus ( $p = 0,0177$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

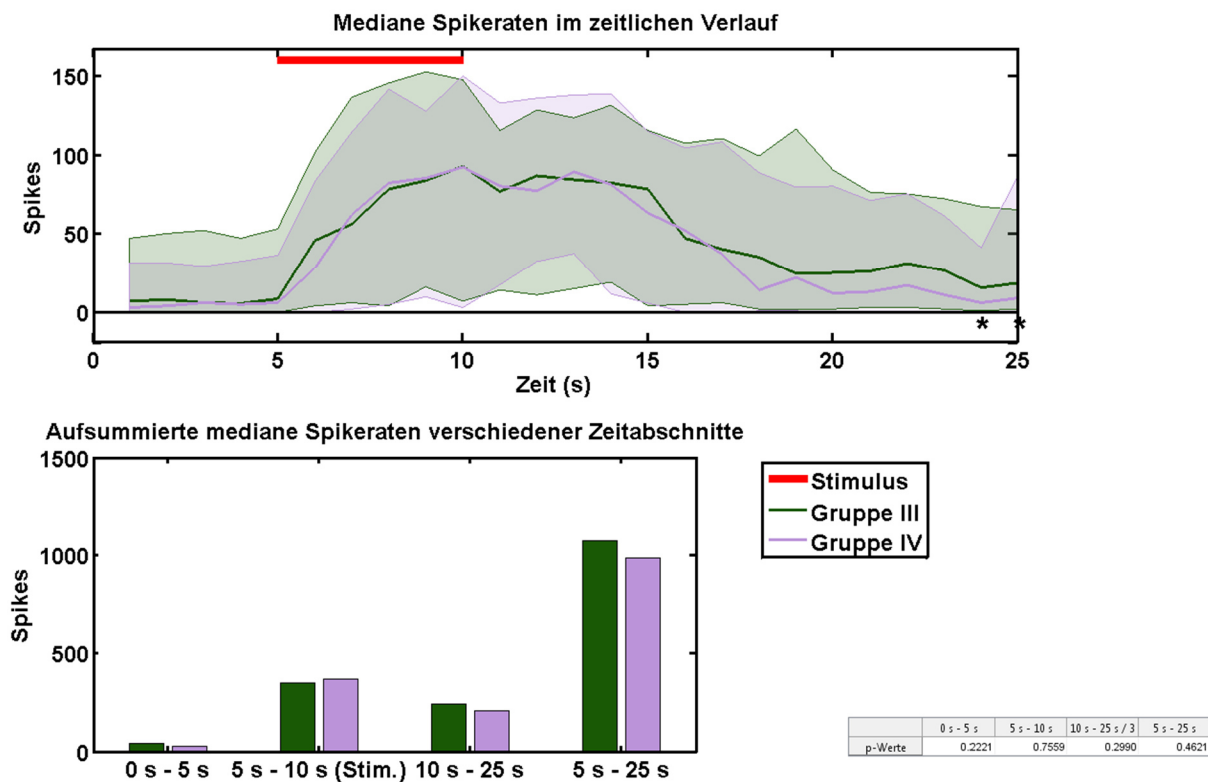


Abbildung 160: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe III (C/T, n = 30) und der Gruppe IV (K/T, n = 29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 120 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

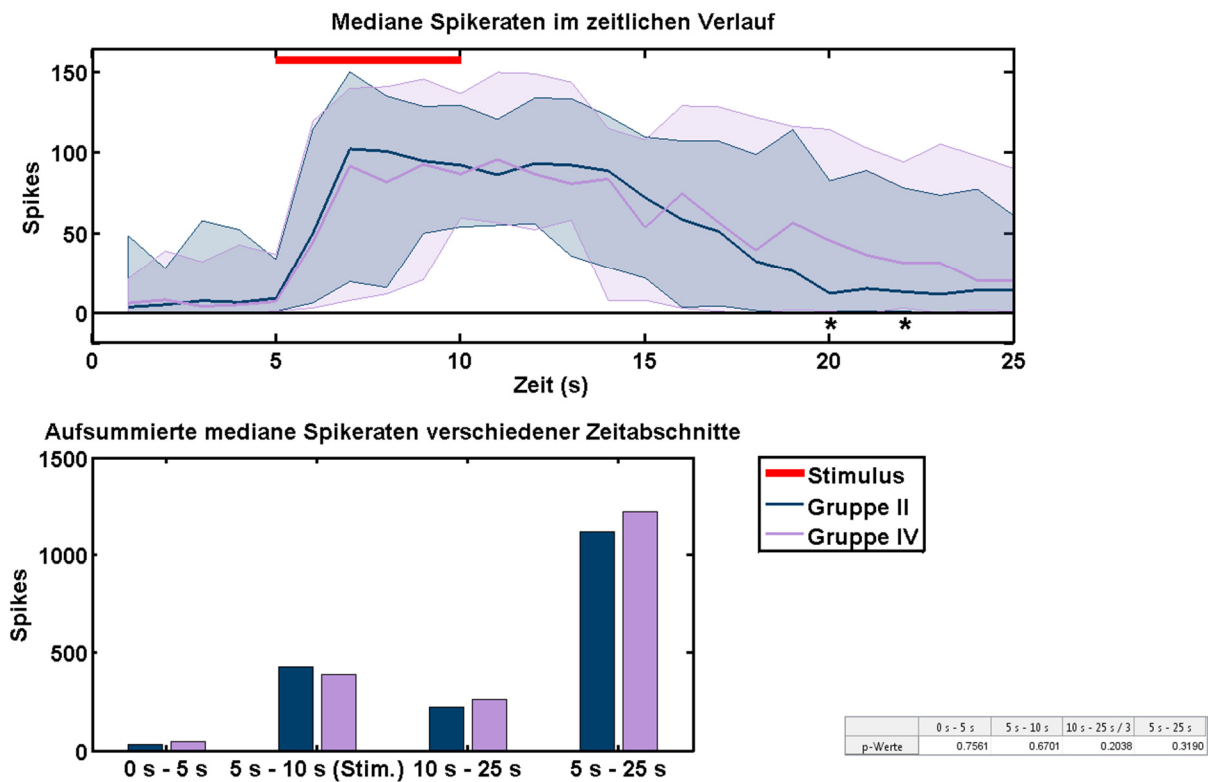


Abbildung 161: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe II (K/-, n = 32) und der Gruppe IV (K/T, n = 29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

Vortest; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksom Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

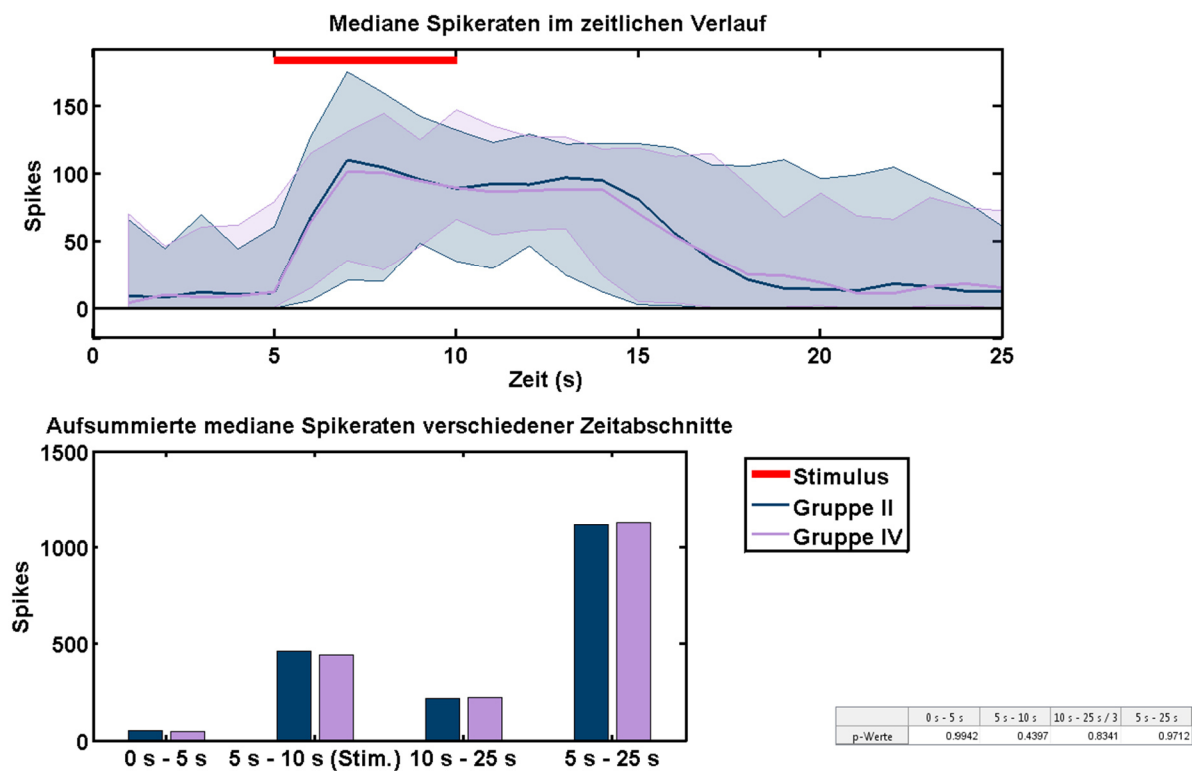


Abbildung 162: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe II (K/-, n = 32) und der Gruppe IV (K/T, n = 29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

15 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

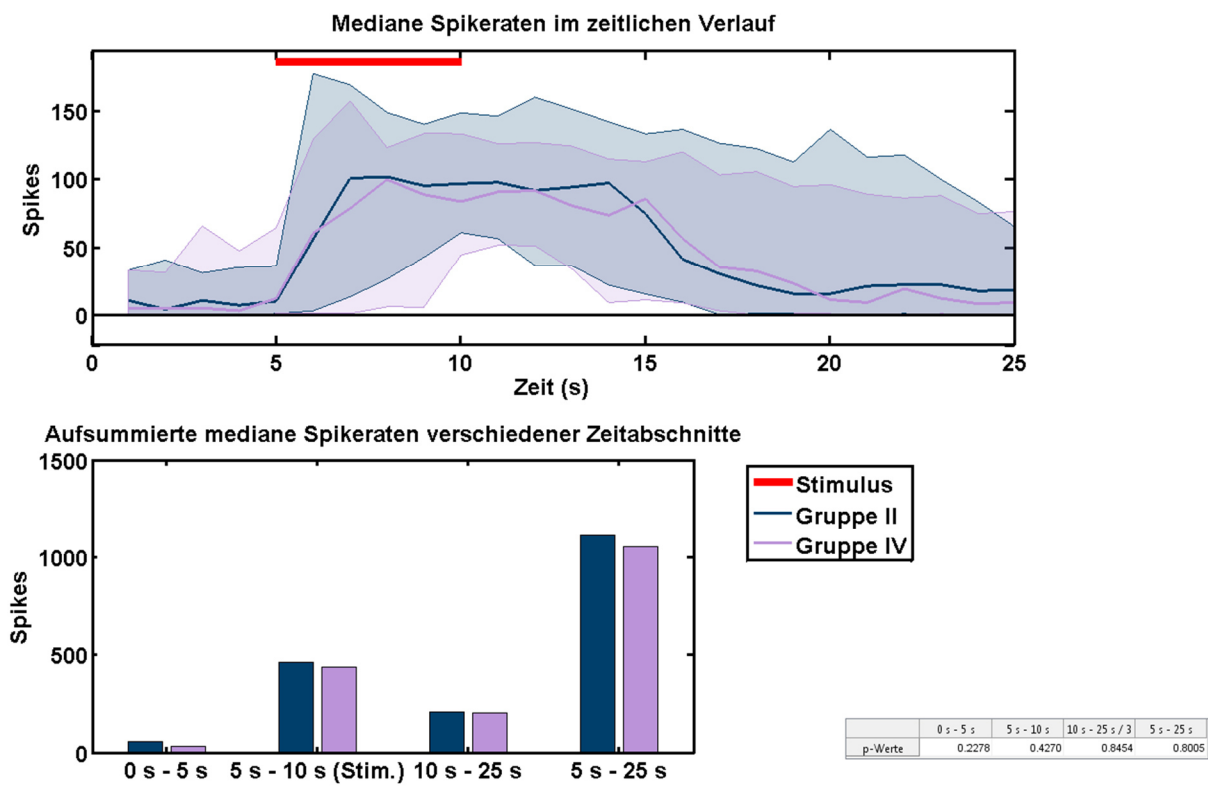


Abbildung 163: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe II (K/-, n = 32) und der Gruppe IV (K/T, n = 29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 30 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

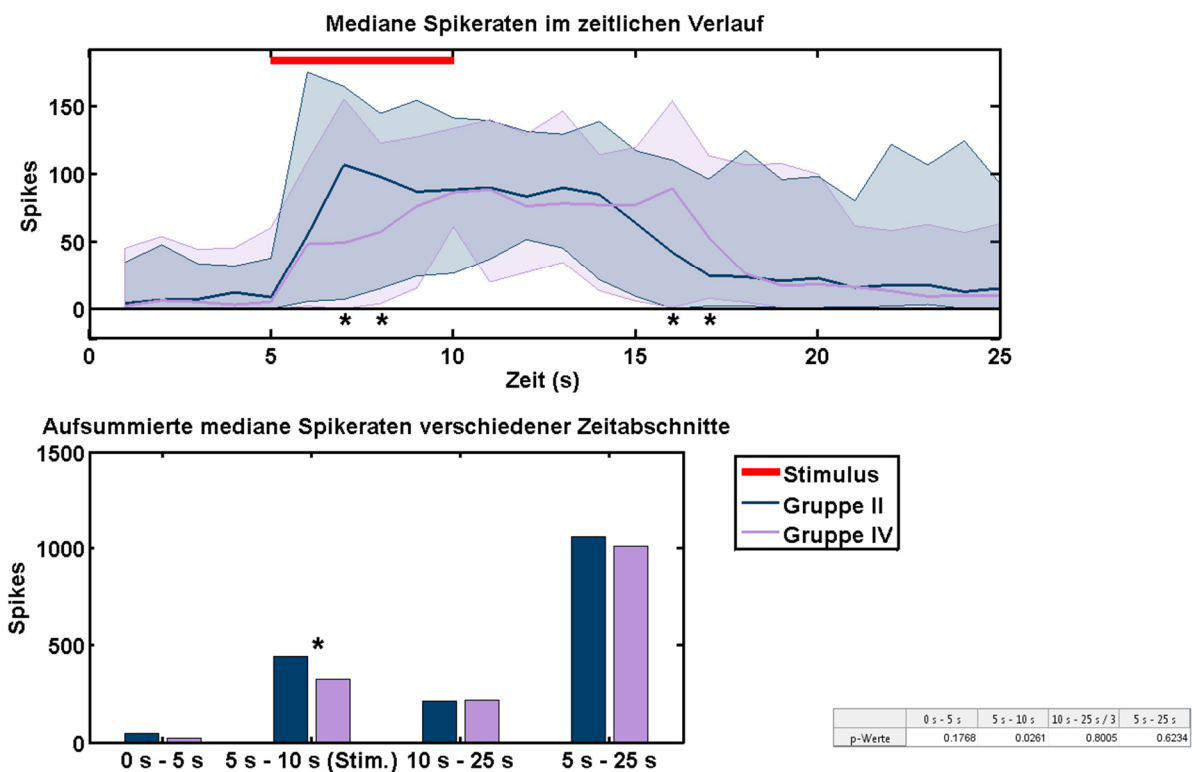


Abbildung 164: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe II (K/-, n = 32) und der Gruppe IV (K/T, n = 29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 45 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt während des Stimulus ( $p = 0,0261$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

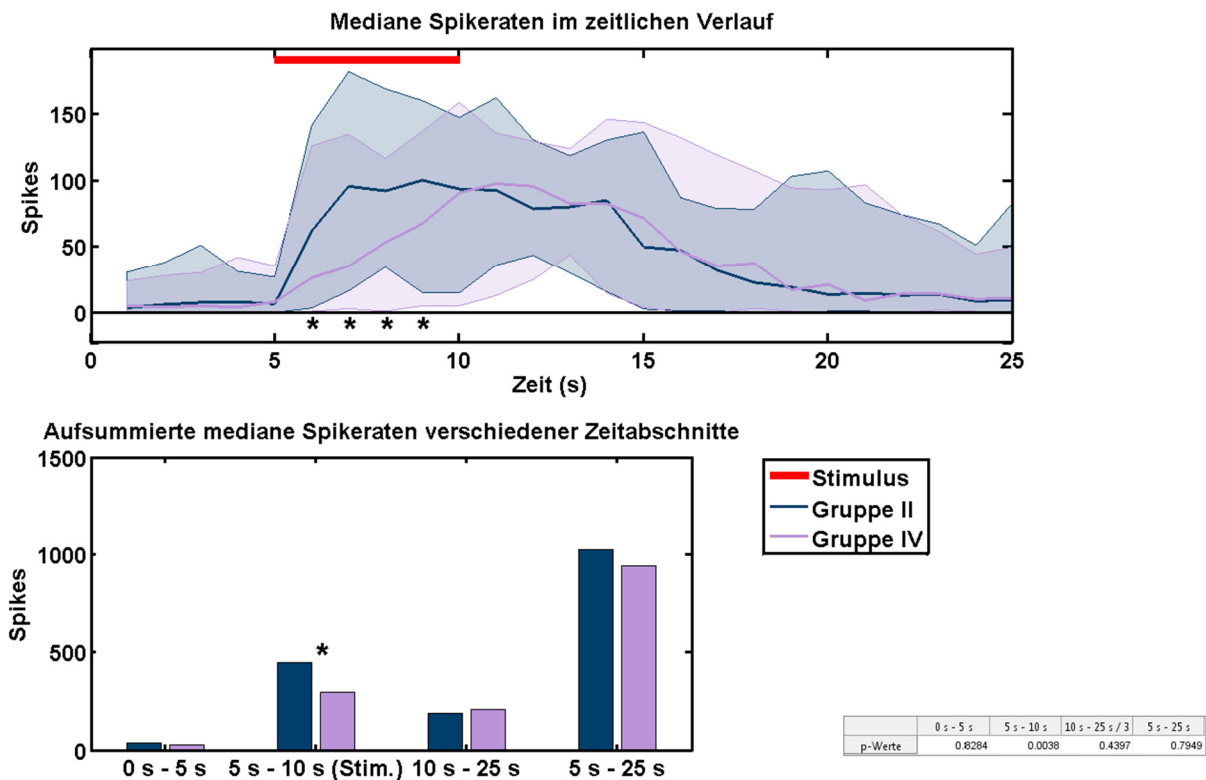


Abbildung 165: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe II (K/-, n = 32) und der Gruppe IV (K/T, n = 29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 60 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt während des Stimulus (p = 0,0038). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \*p ≤ 0,05 Wilcoxon Ranksum Test.

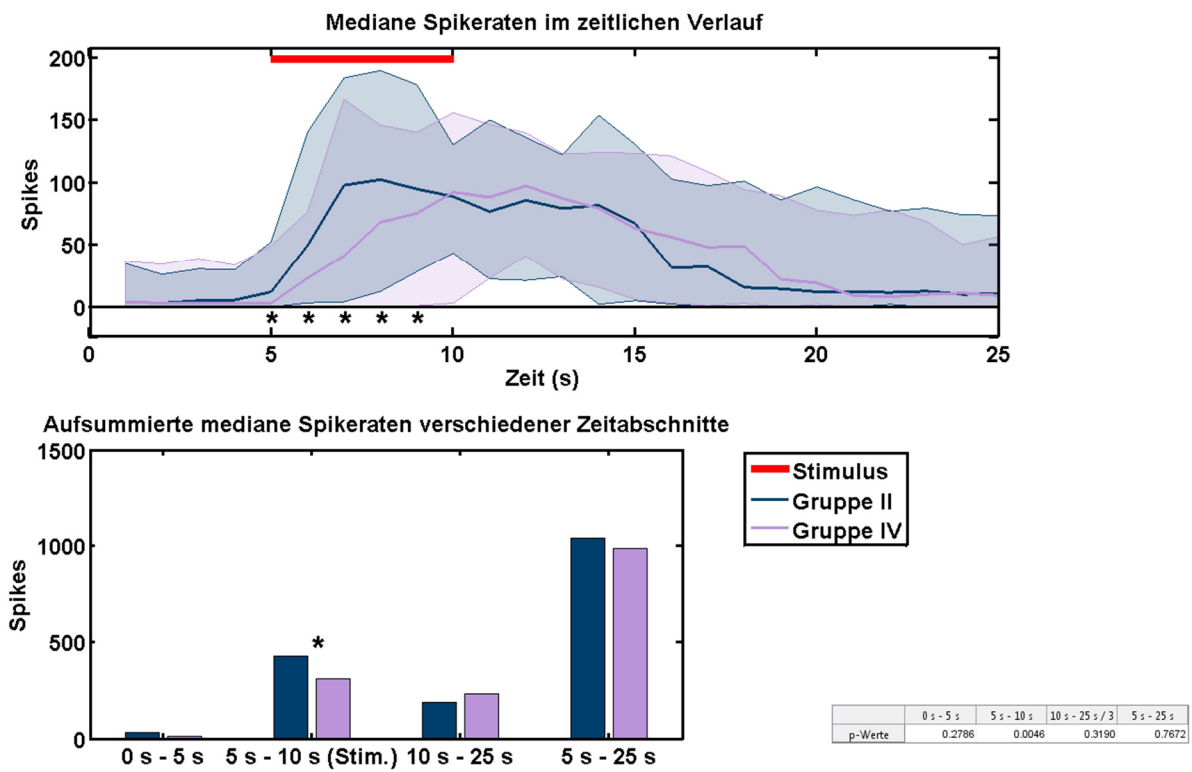


Abbildung 166: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe II (K/-, n = 32) und der Gruppe IV (K/T, n = 29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 75 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt während des Stimulus ( $p = 0,0046$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.



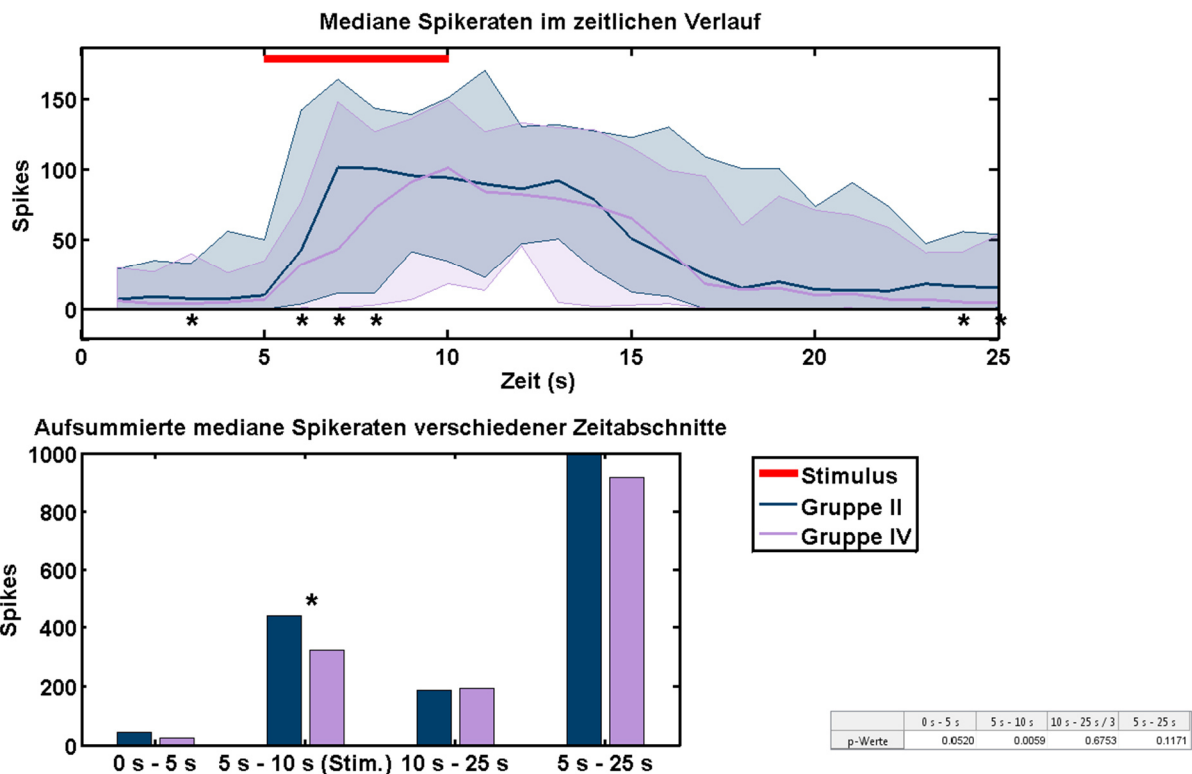


Abbildung 167: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe II (K/-, n = 32) und der Gruppe IV (K/T, n = 29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 90 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt während des Stimulus ( $p = 0,0059$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

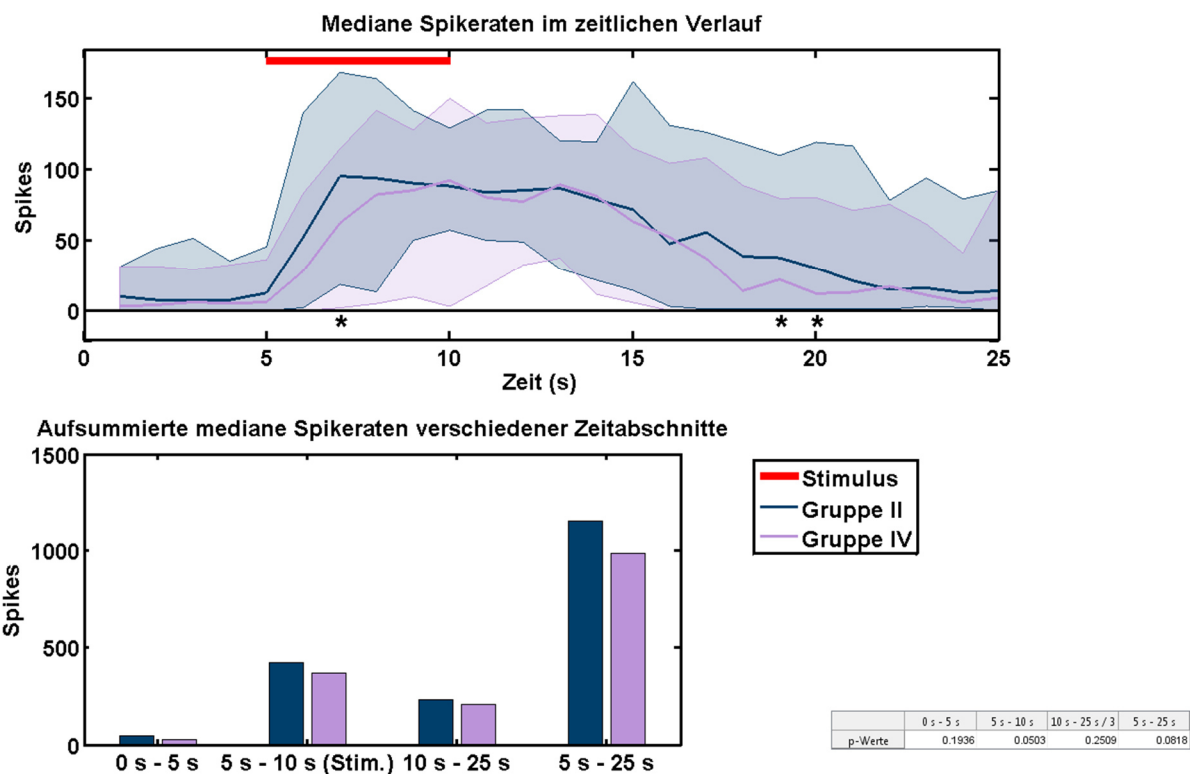


Abbildung 168: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe II (K/-, n = 32) und der Gruppe IV (K/T, n = 29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 120 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

## Thiacloprid

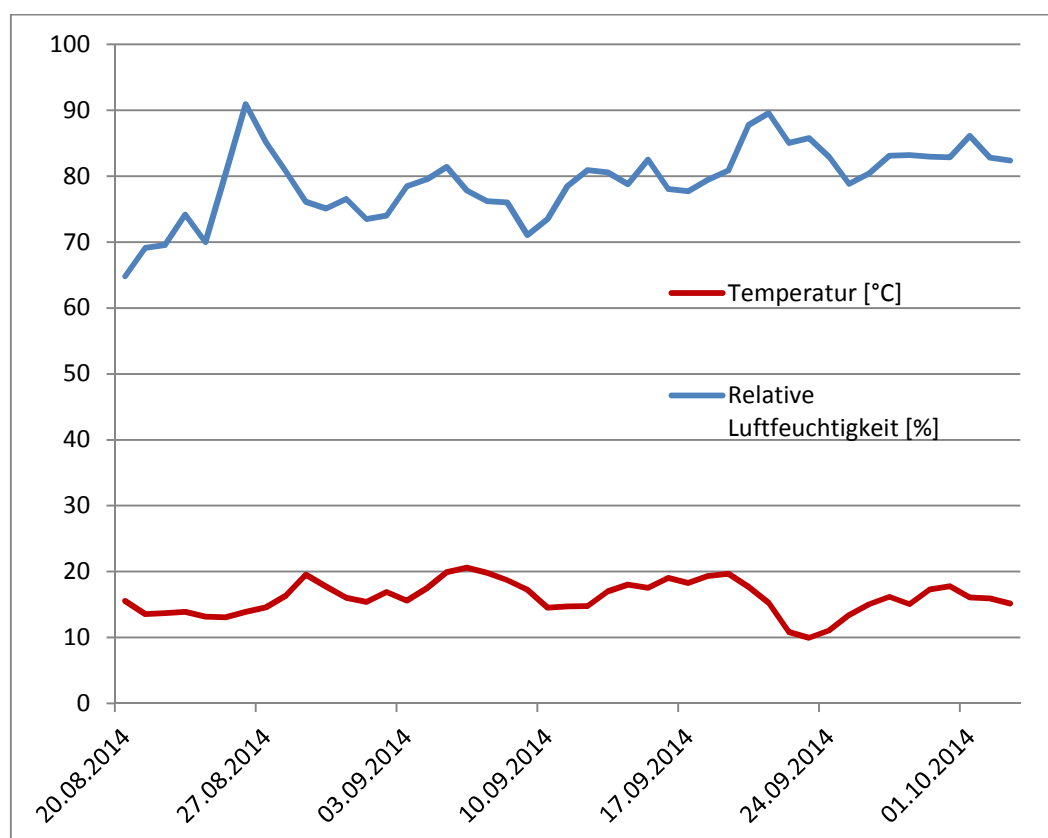


Abbildung 169: Wetterdaten über den gesamten Versuchszeitraum.  
Temperatur in °C und Relative Luftfeuchtigkeit in % über den Zeitraum des Versuchs (gemessen mit EL-USB-2-LCD, Data Logger, Lascar Electronics Ltd., Salisbury, United Kingdom).

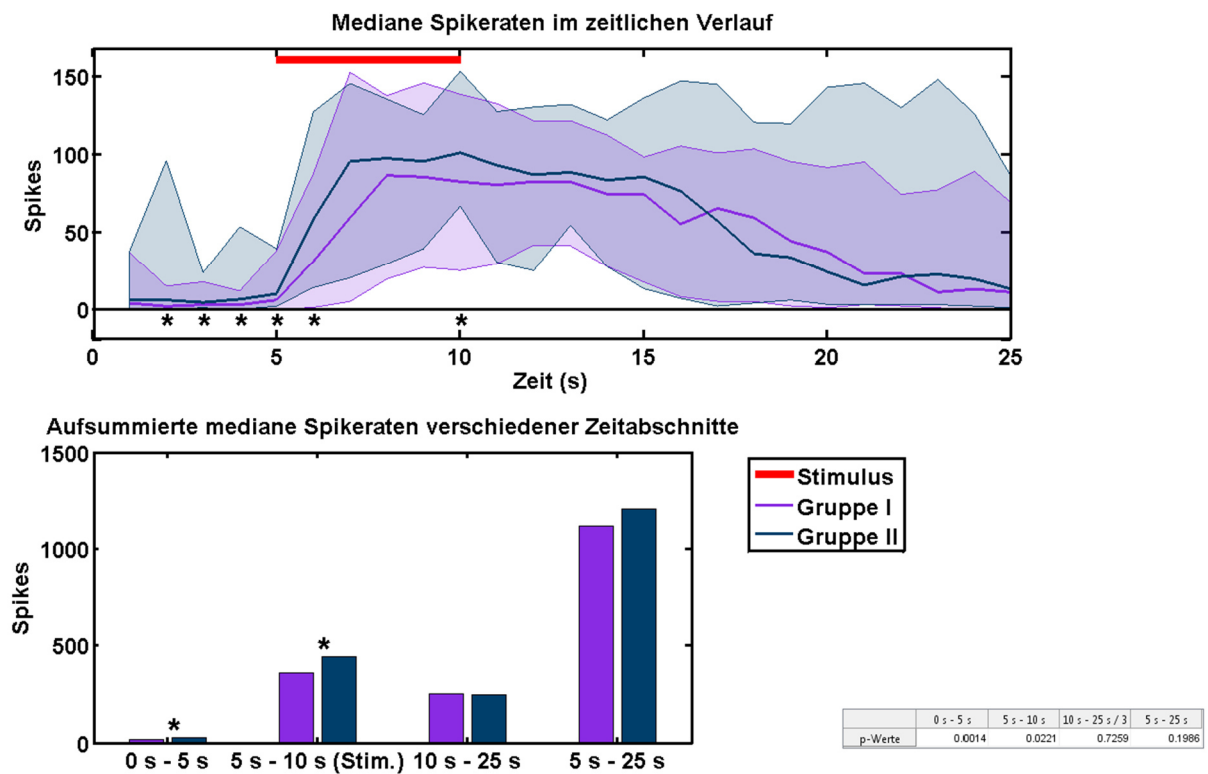


Abbildung 170: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (T/-, n = 31) und der Gruppe II (K/-, n = 32) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

Vortest; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0014$ ) und im Zeitabschnitt während des Stimulus ( $p = 0,0221$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

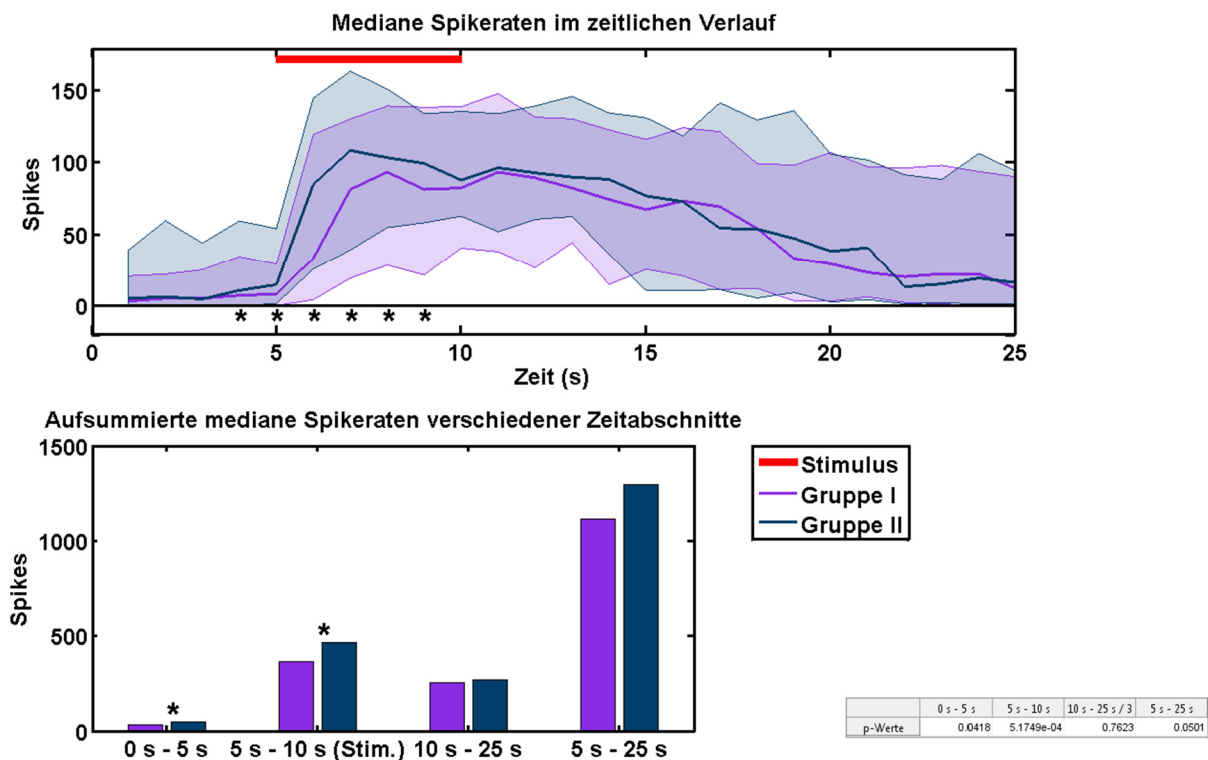


Abbildung 171: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (T/-, n = 31) und der Gruppe II (K/-, n = 32) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 15 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0418$ ), und im Zeitabschnitt während des Stimulus ( $p = 0,00052$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

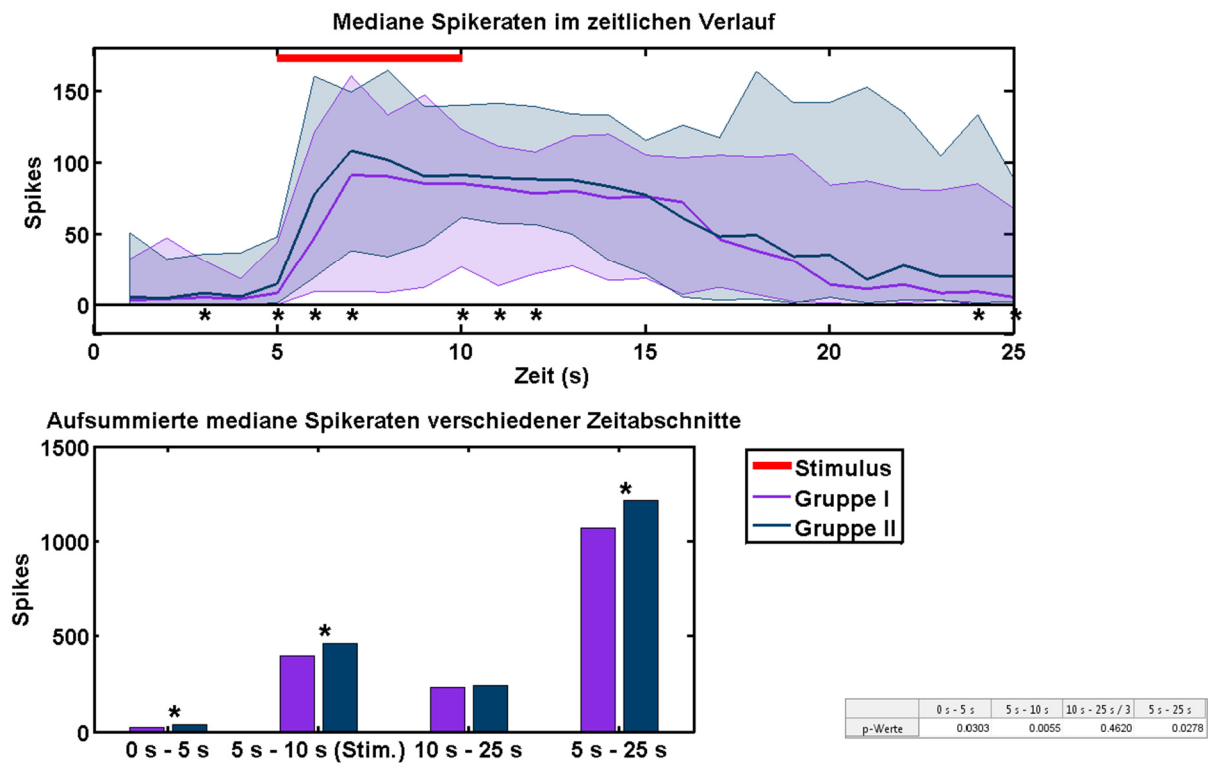


Abbildung 172: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (T/-, n = 31) und der Gruppe II (K/-, n = 32) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 30 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0303$ ), im Zeitabschnitt während des Stimulus ( $p = 0,0055$ ) und im Zeitabschnitt über 20 Sekunden ab Stimulusbeginn ( $p = 0,0278$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

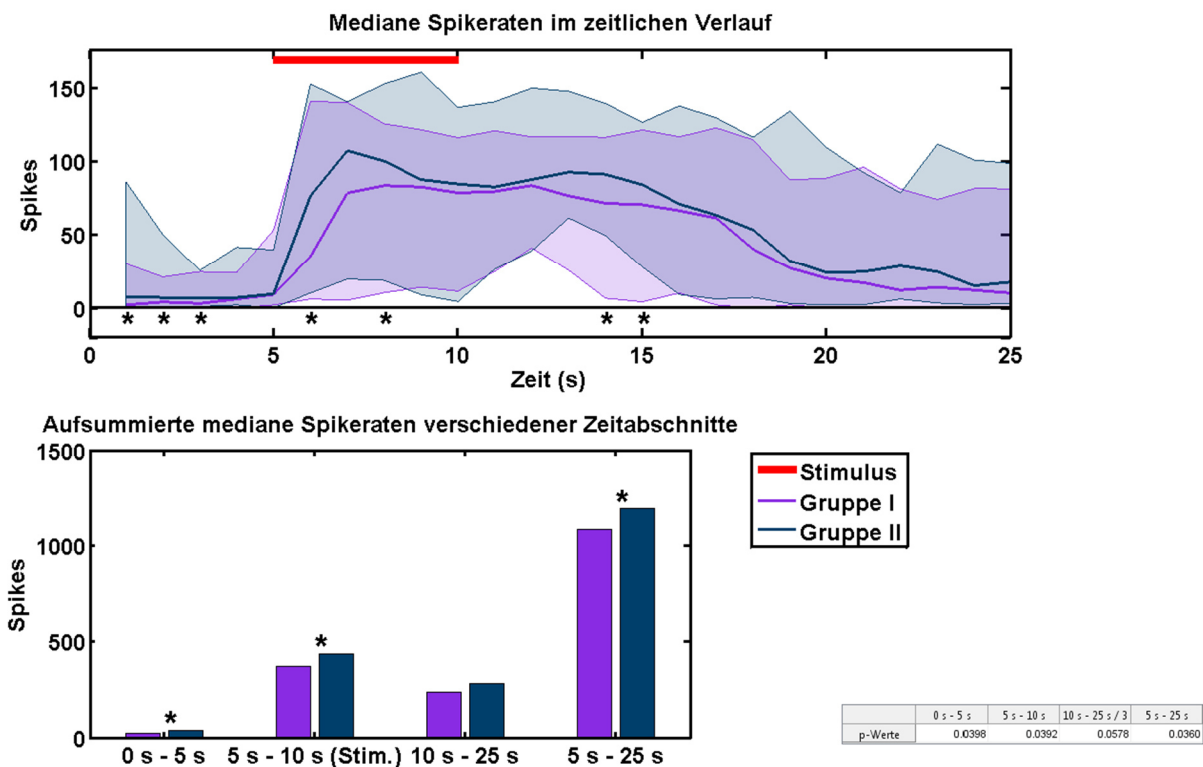


Abbildung 173: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (T/-, n = 31) und der Gruppe II (K/-, n = 32) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 45 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0398$ ), im Zeitabschnitt während des Stimulus ( $p = 0,0392$ ) und im Zeitabschnitt über 20 Sekunden ab Stimulusbeginn ( $p = 0,0360$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

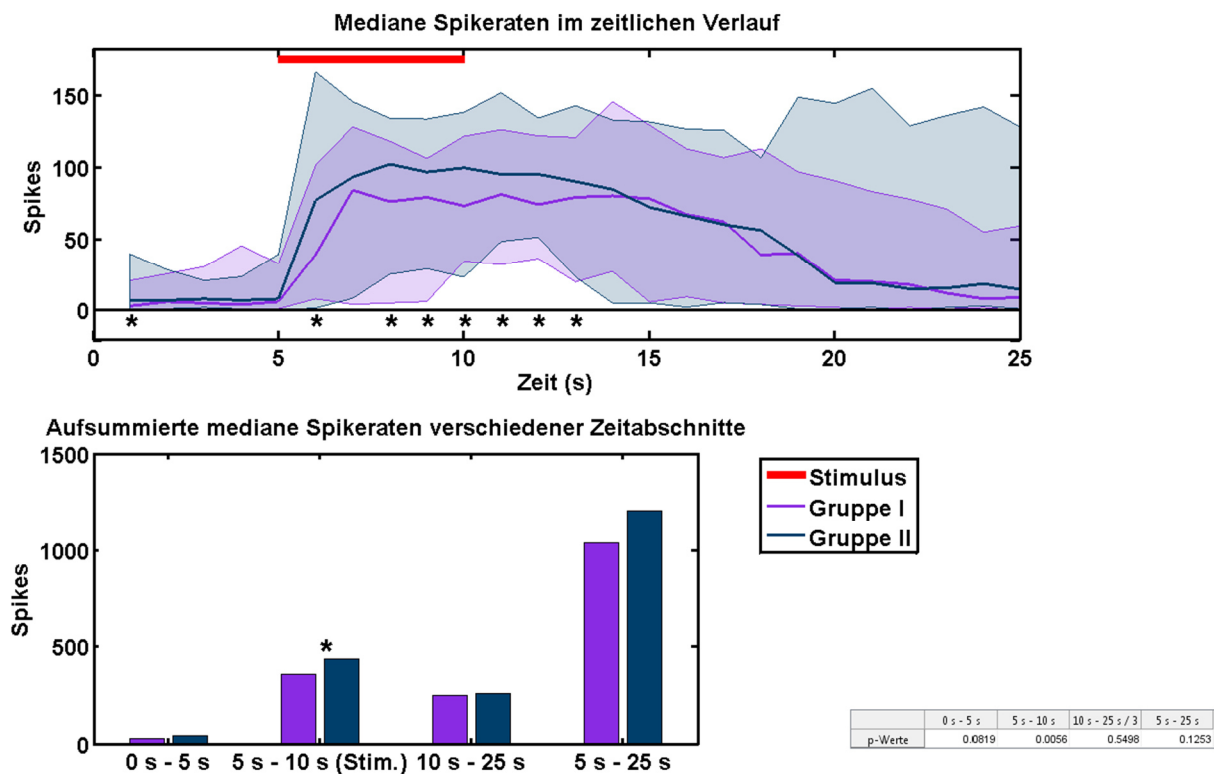


Abbildung 174: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (T/-, n = 31) und der Gruppe II (K/-, n = 32) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 60 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt während des Stimulus (p = 0,0056). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \*p ≤ 0,05 Wilcoxon Ranksum Test.



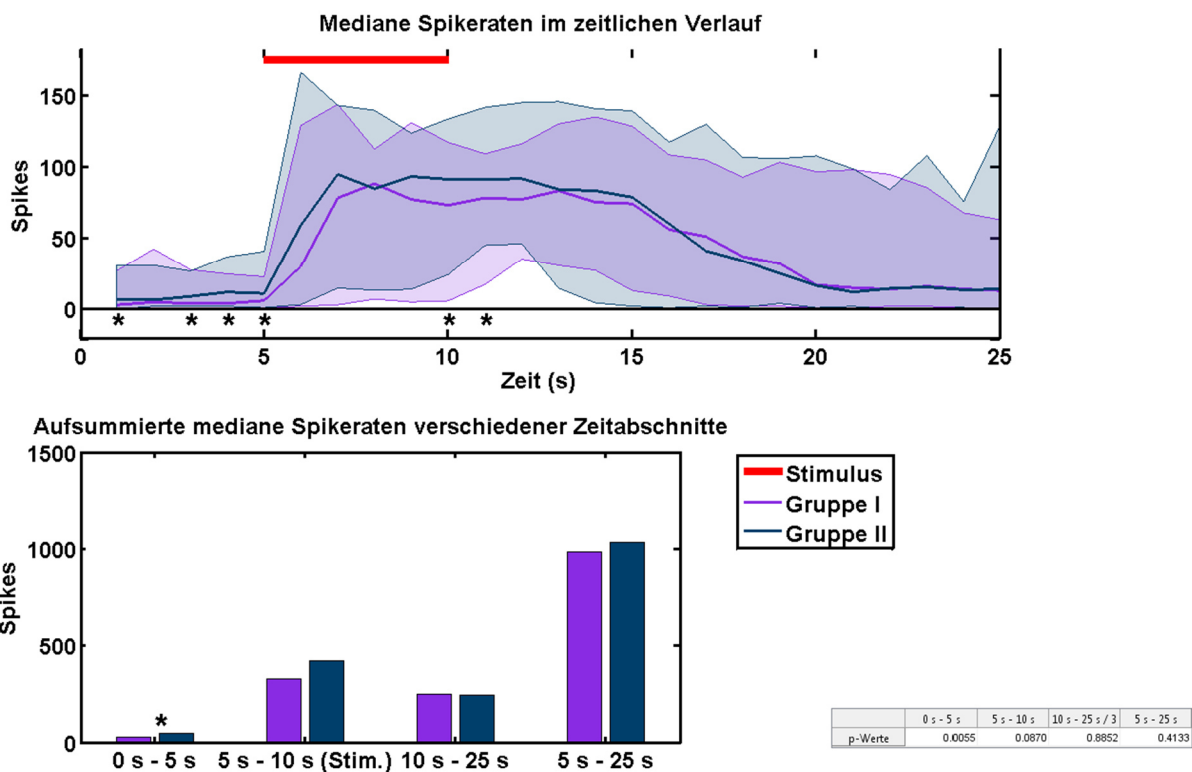


Abbildung 175: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (T/-, n = 31) und der Gruppe II (K/-, n = 32) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 75 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0055$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

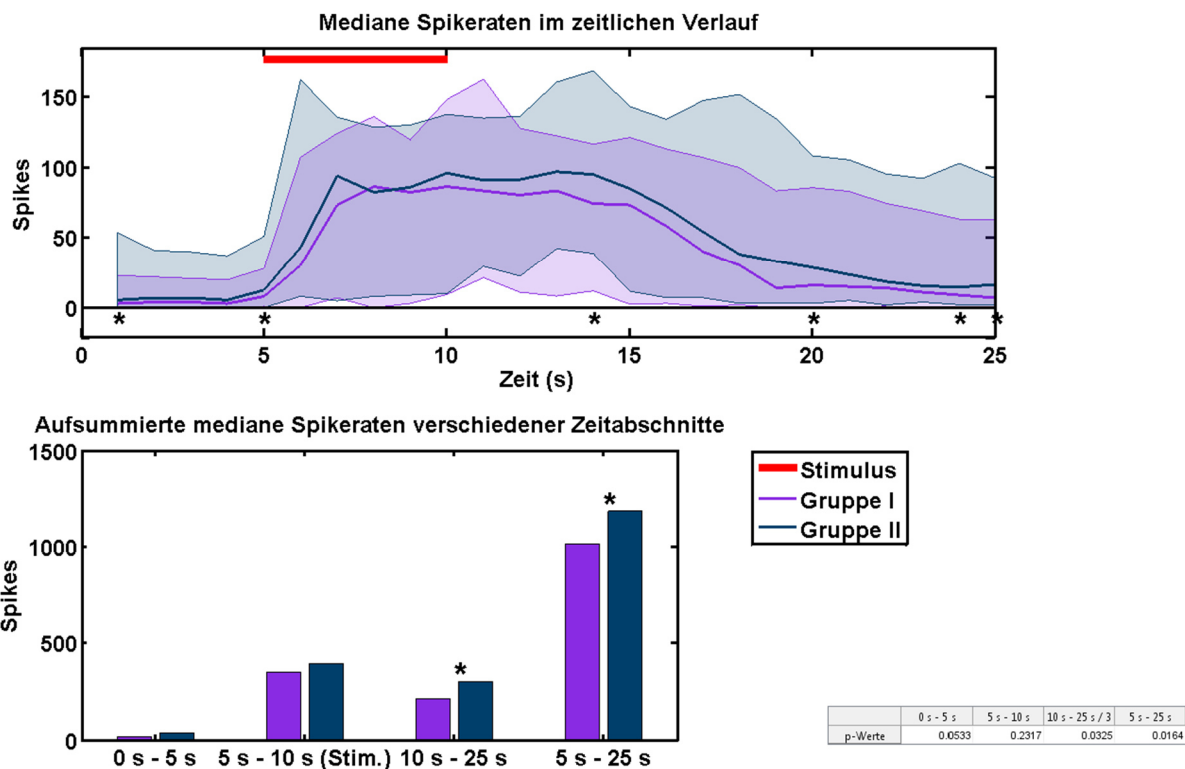


Abbildung 176: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (T/-, n = 31) und der Gruppe II (K/-, n = 32) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 90 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt nach dem Stimulus ( $p = 0,0325$ ) und im Zeitabschnitt über 20 Sekunden nach Stimulusbeginn ( $p = 0,0164$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

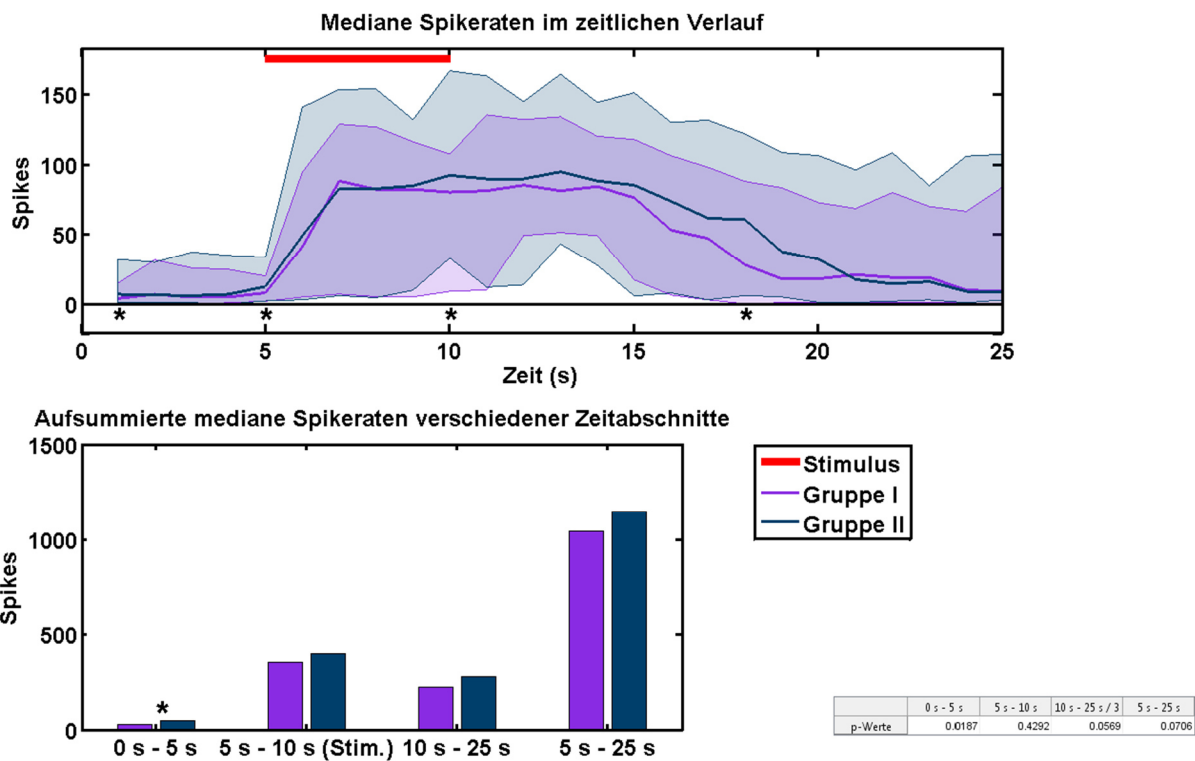


Abbildung 177: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (T/-, n = 31) und der Gruppe II (K/-, n = 32) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 120 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0187$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

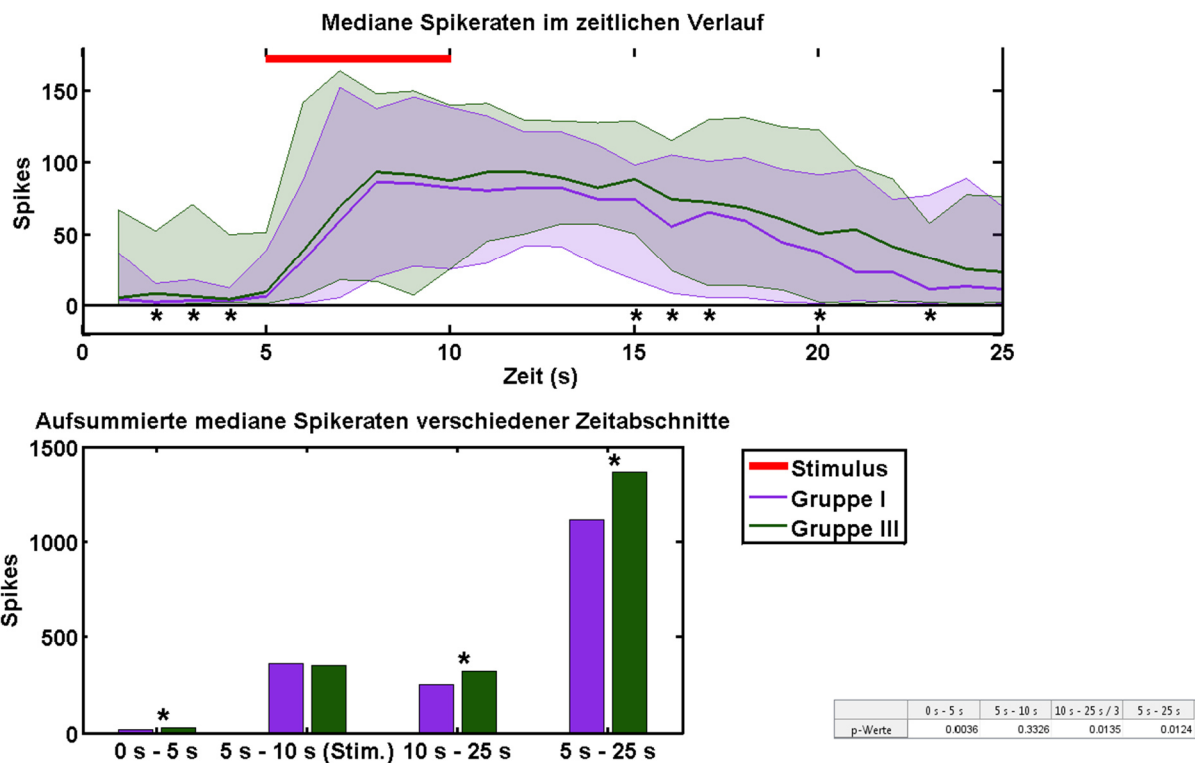


Abbildung 178: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (T/-, n = 31) und der Gruppe III (T/C, n = 29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.  
 Vortest; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0036$ ), im Zeitabschnitt nach dem Stimulus ( $p = 0,0135$ ) und im Zeitabschnitt über 20 Sekunden nach Stimulusbeginn ( $p = 0,0124$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

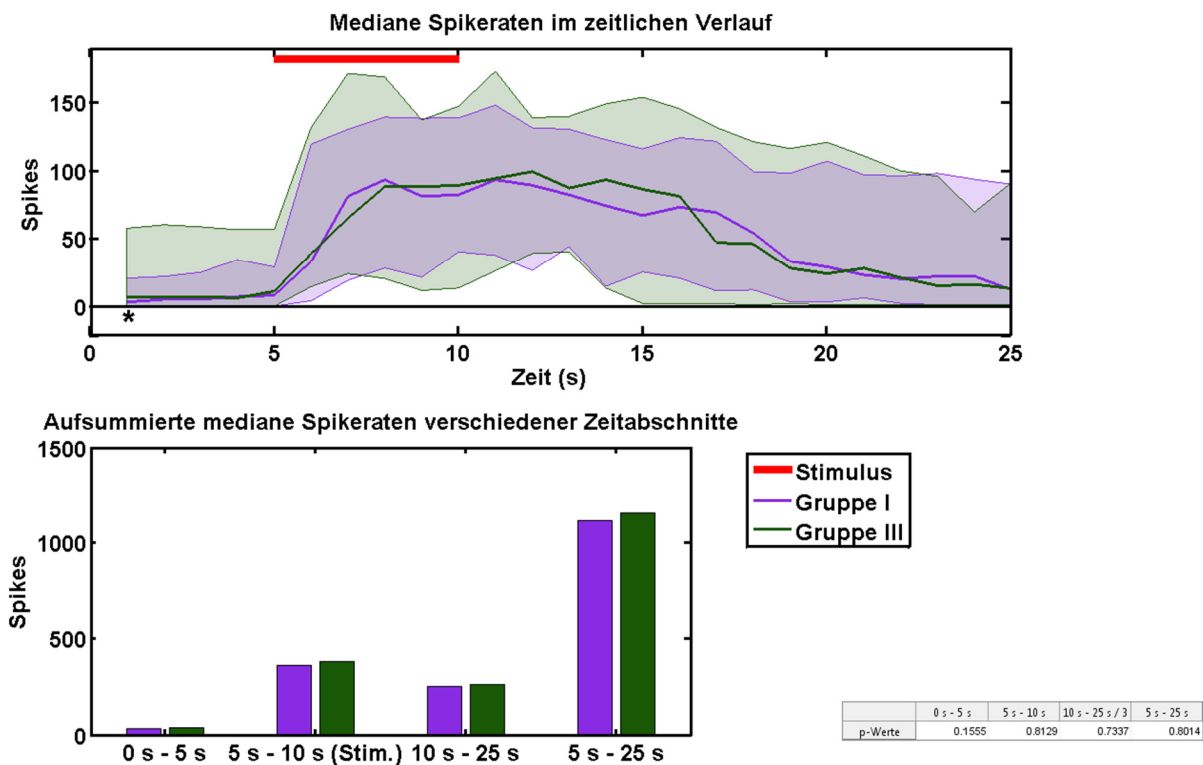


Abbildung 179: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (T/-, n = 31) und der Gruppe III (T/C, n = 29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 15 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

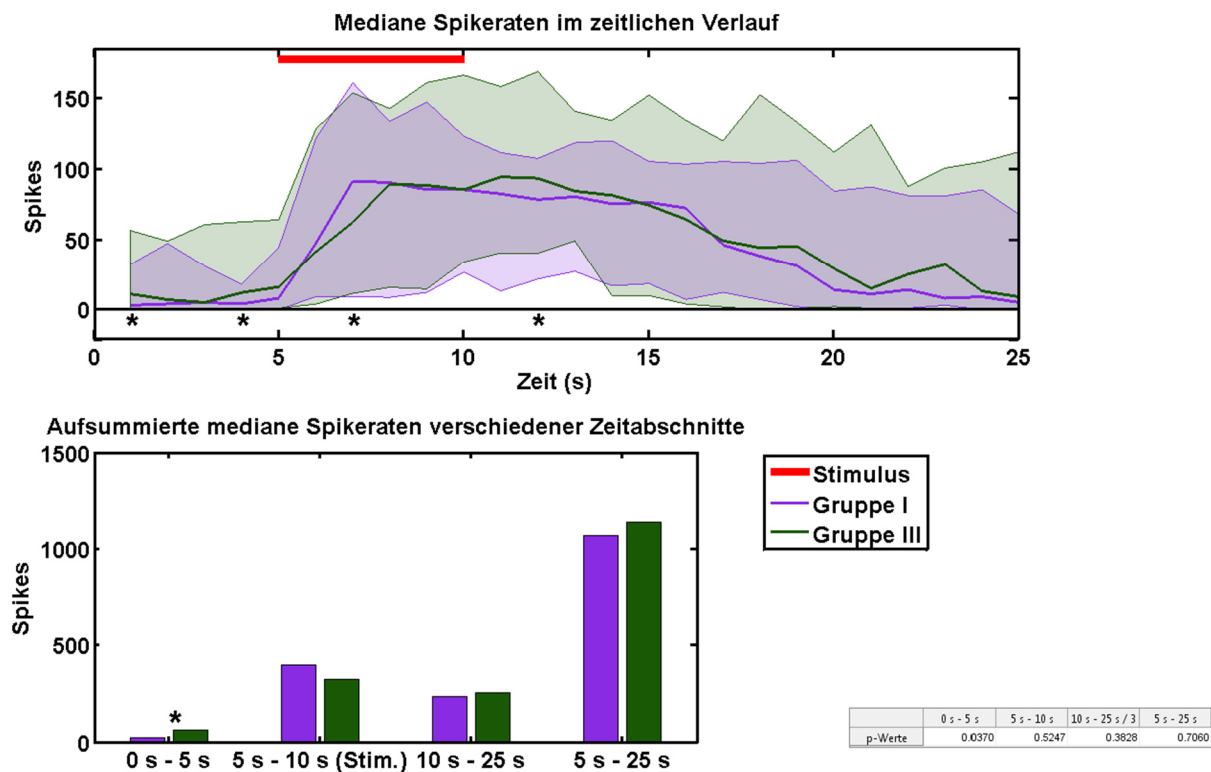


Abbildung 180: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (T/-, n = 31) und der Gruppe III (T/C, n = 29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 30 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0370$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

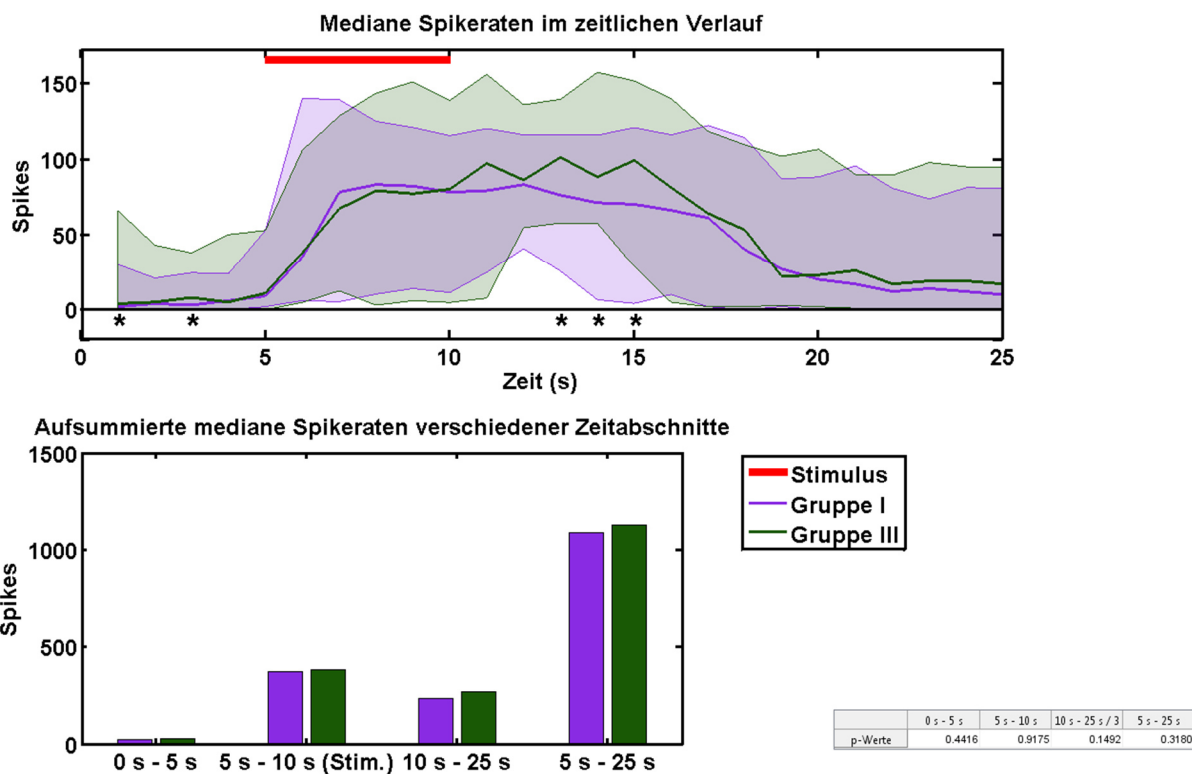


Abbildung 181: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (T/-, n = 31) und der Gruppe III (T/C, n = 29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 45 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

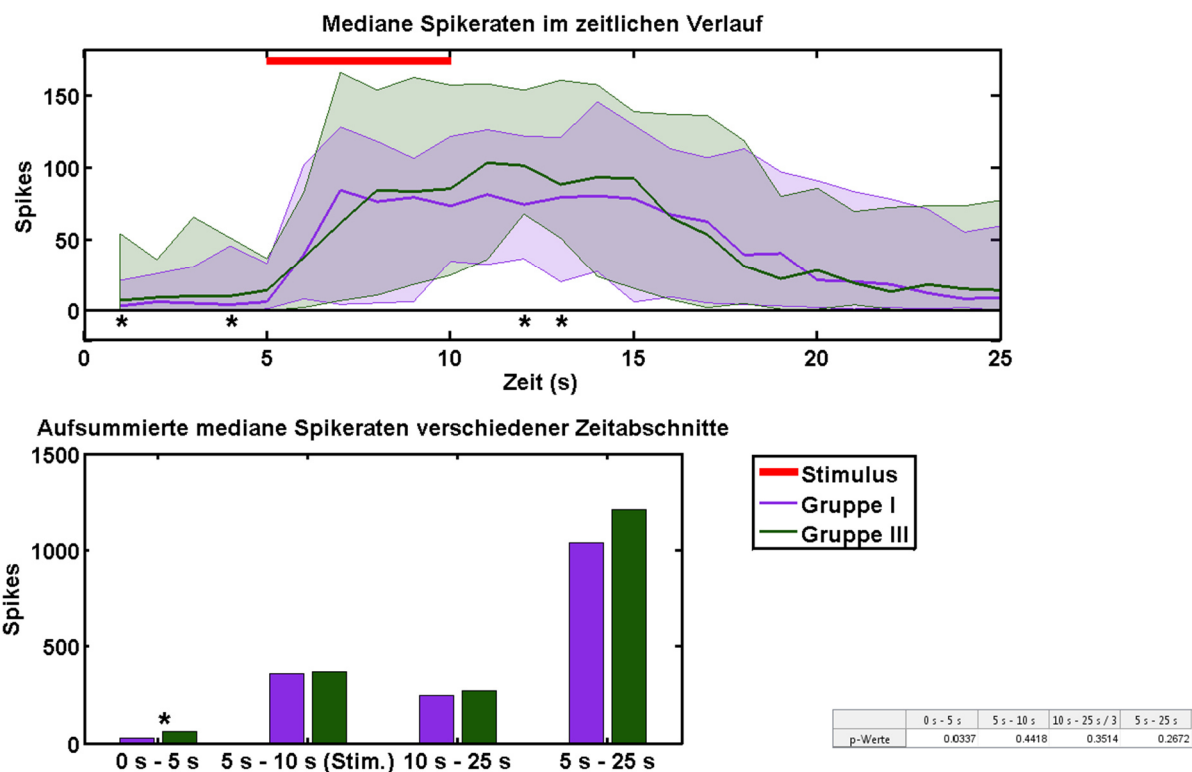


Abbildung 182: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (T/-, n = 31) und der Gruppe III (T/C, n = 29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 60 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn (p = 0,0337). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \*p ≤ 0,05 Wilcoxon Ranksum Test.



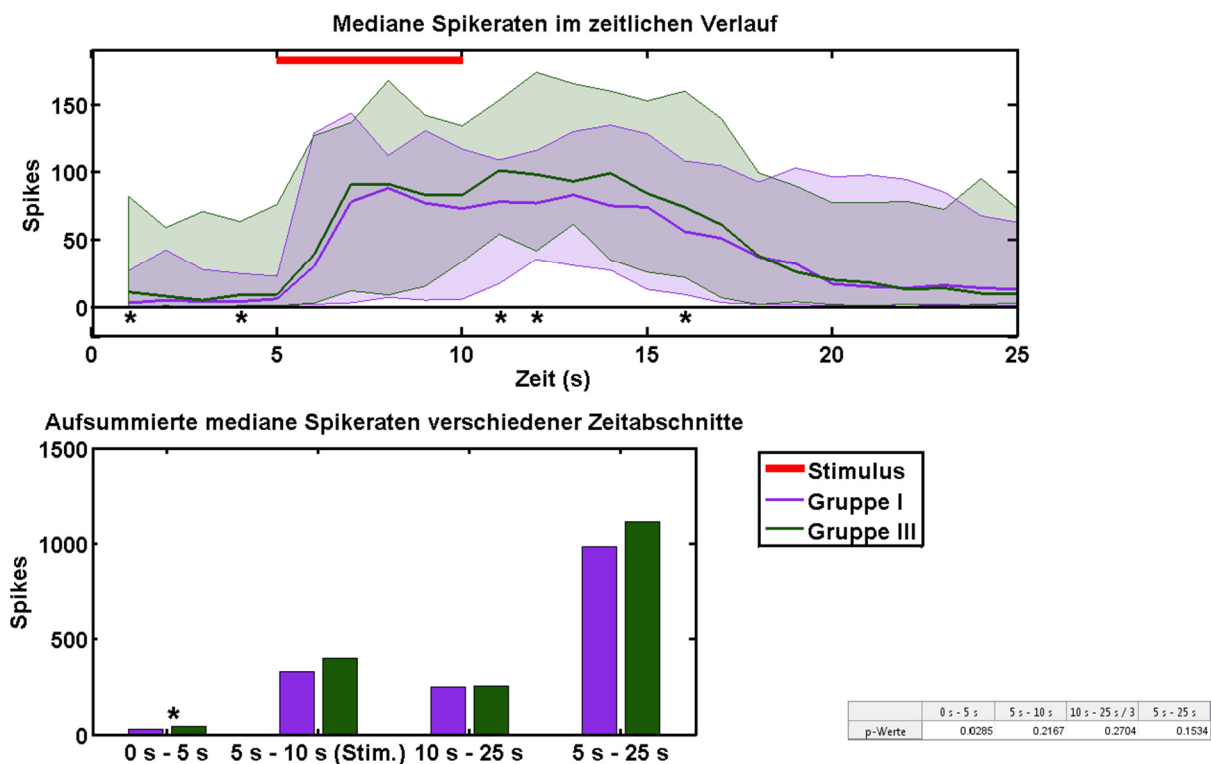


Abbildung 183: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (T/-, n = 31) und der Gruppe III (T/C, n = 29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 75 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0285$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

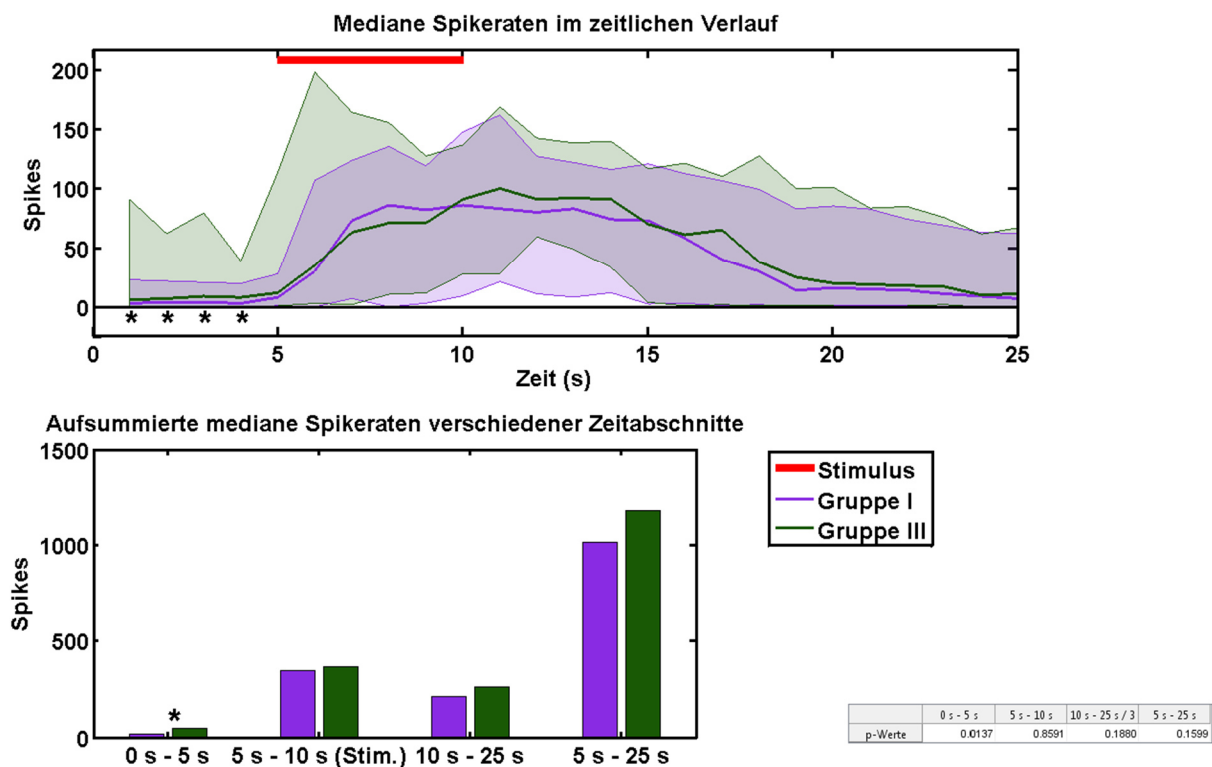


Abbildung 184: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (T/-, n = 31) und der Gruppe III (T/C, n = 29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

90 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0137$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

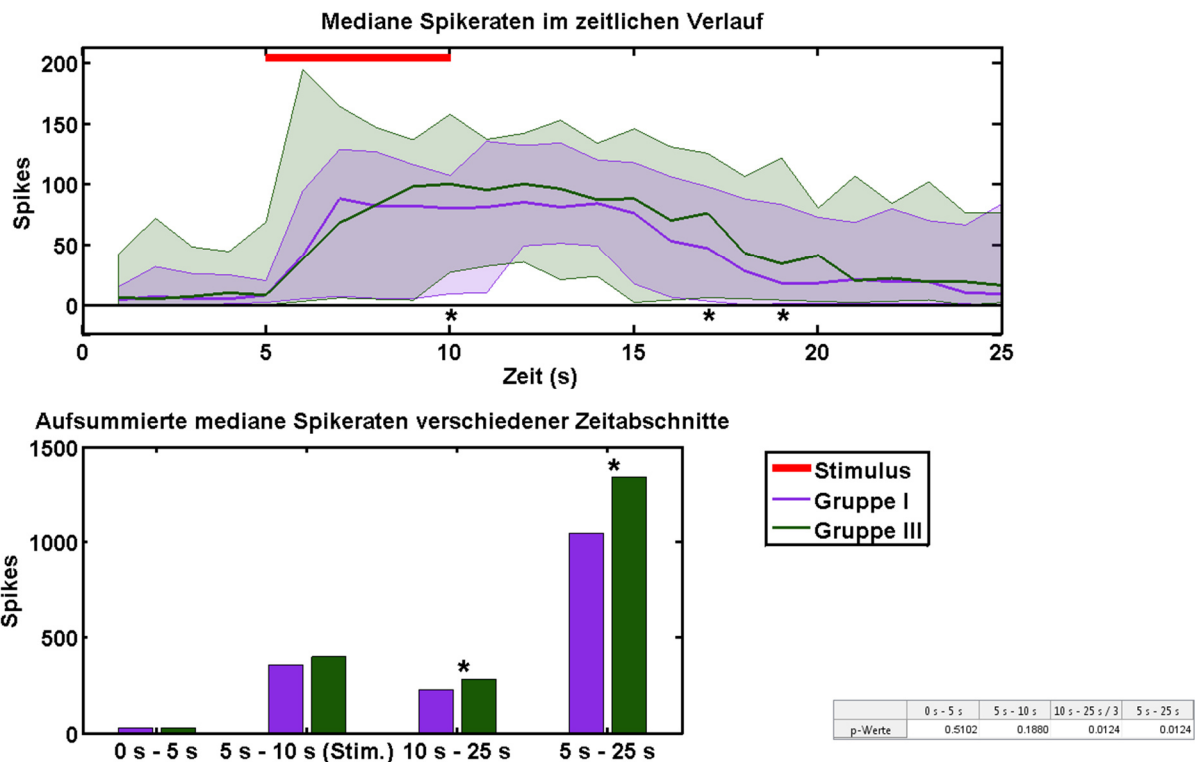


Abbildung 185: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe I (T/-, n = 31) und der Gruppe III (T/C, n = 29) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 120 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt nach dem Stimulus ( $p = 0,0124$ ) und im Zeitabschnitt über 20 Sekunden ab Stimulusbeginn ( $p = 0,0124$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen; \* $p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

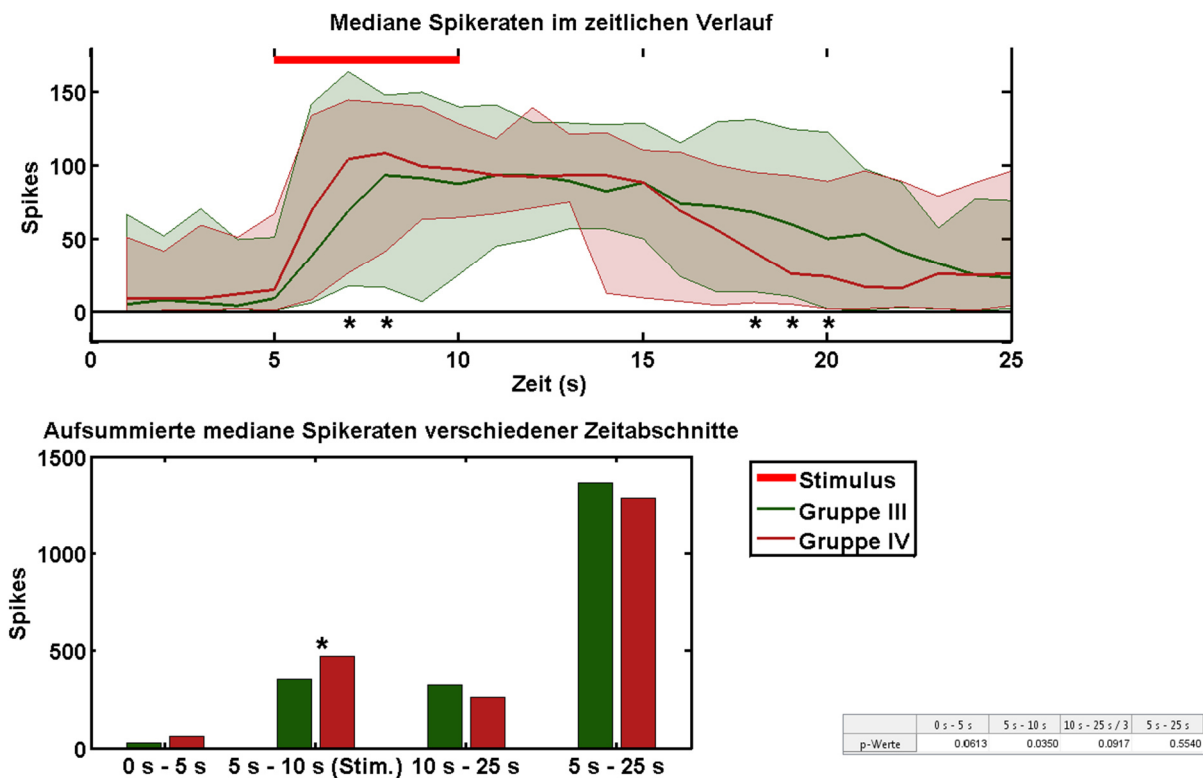


Abbildung 186: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe III (T/C, n = 29) und der Gruppe IV (K/C, n = 31) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. Vortest; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt während des Stimulus ( $p = 0,0350$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

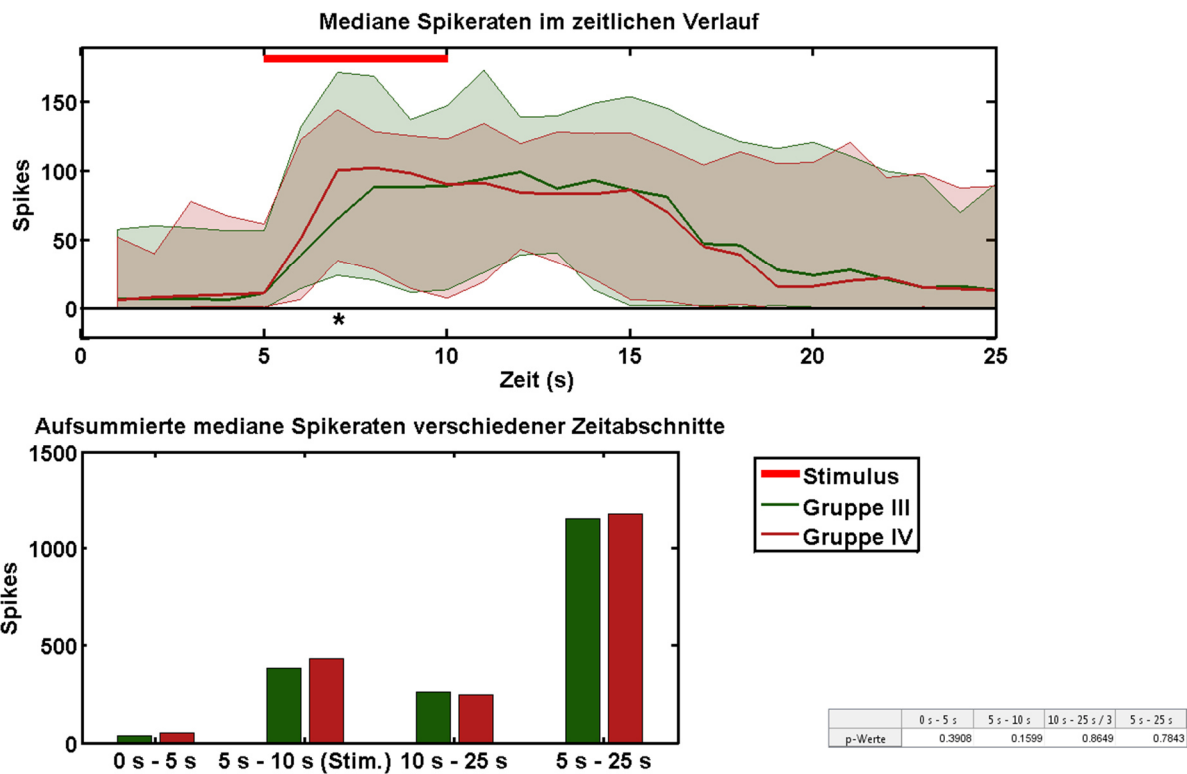


Abbildung 187: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe III (T/C, n = 29) und der Gruppe IV (K/C, n = 31) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

15 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

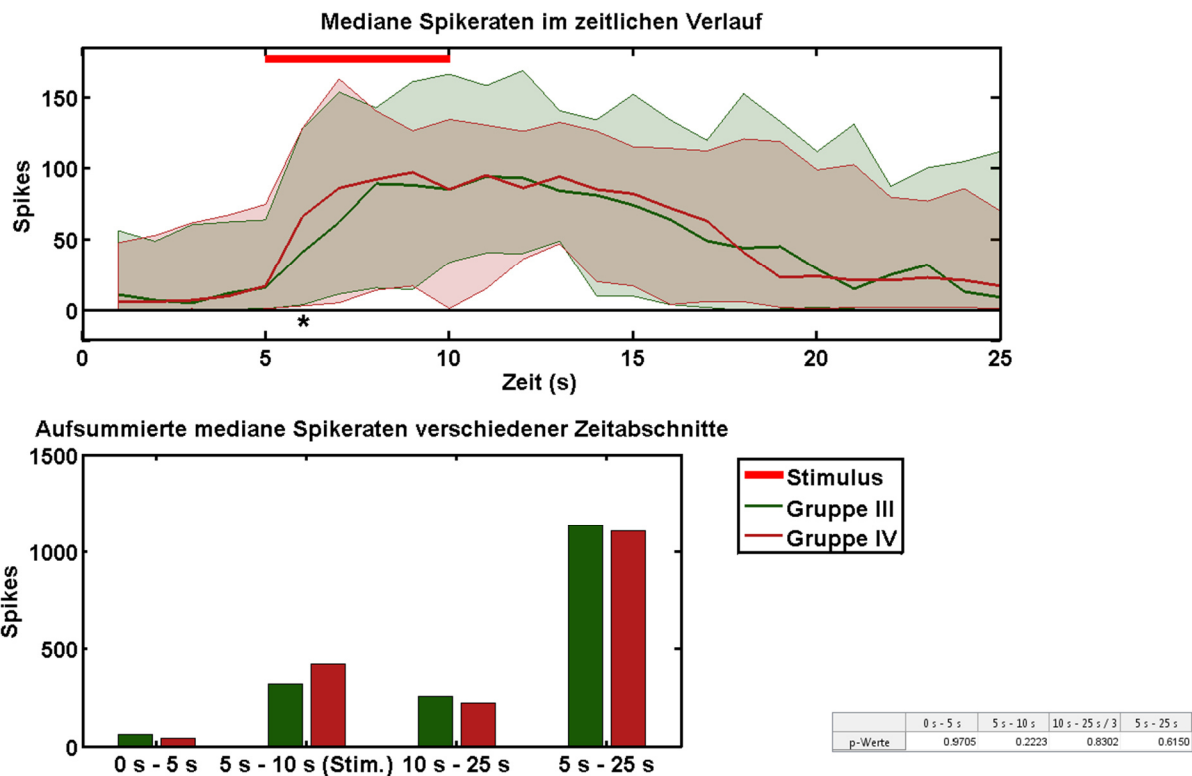


Abbildung 188: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe III (T/C, n = 29) und der Gruppe IV (K/C, n = 31) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 30 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

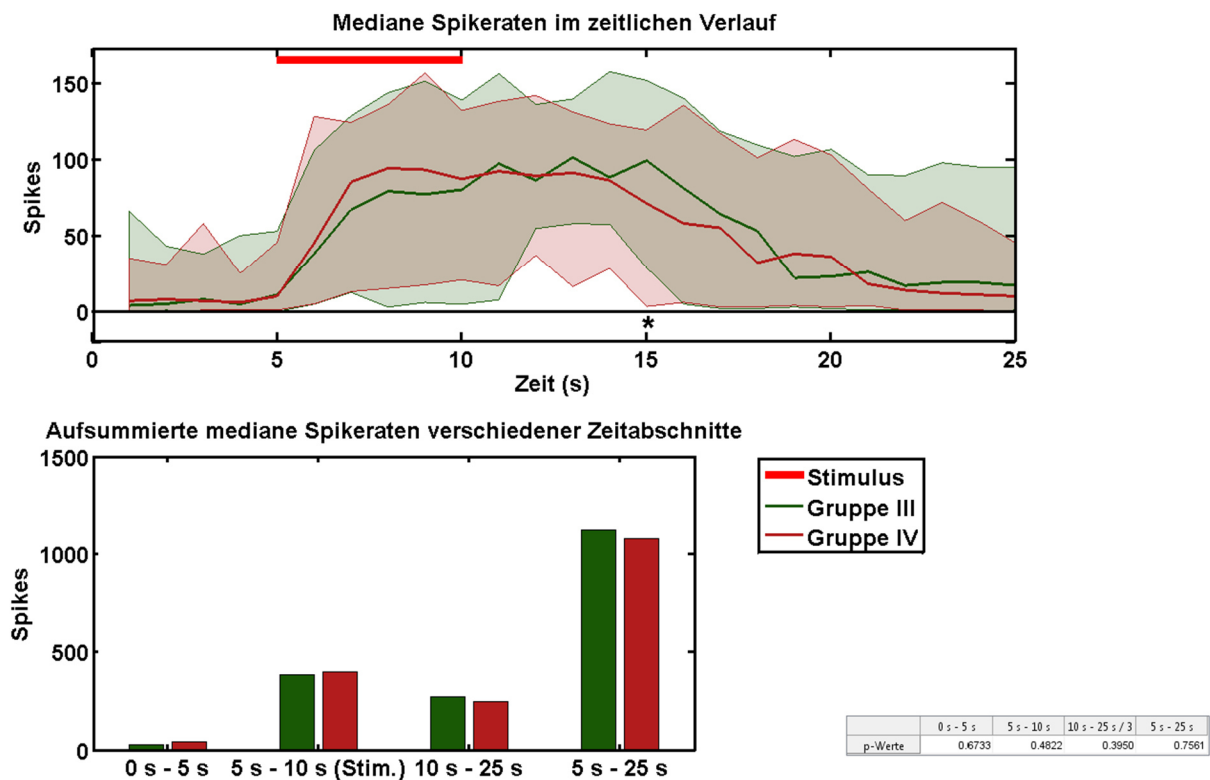


Abbildung 189: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe III (T/C, n = 29) und der Gruppe IV (K/C, n = 31) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 45 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

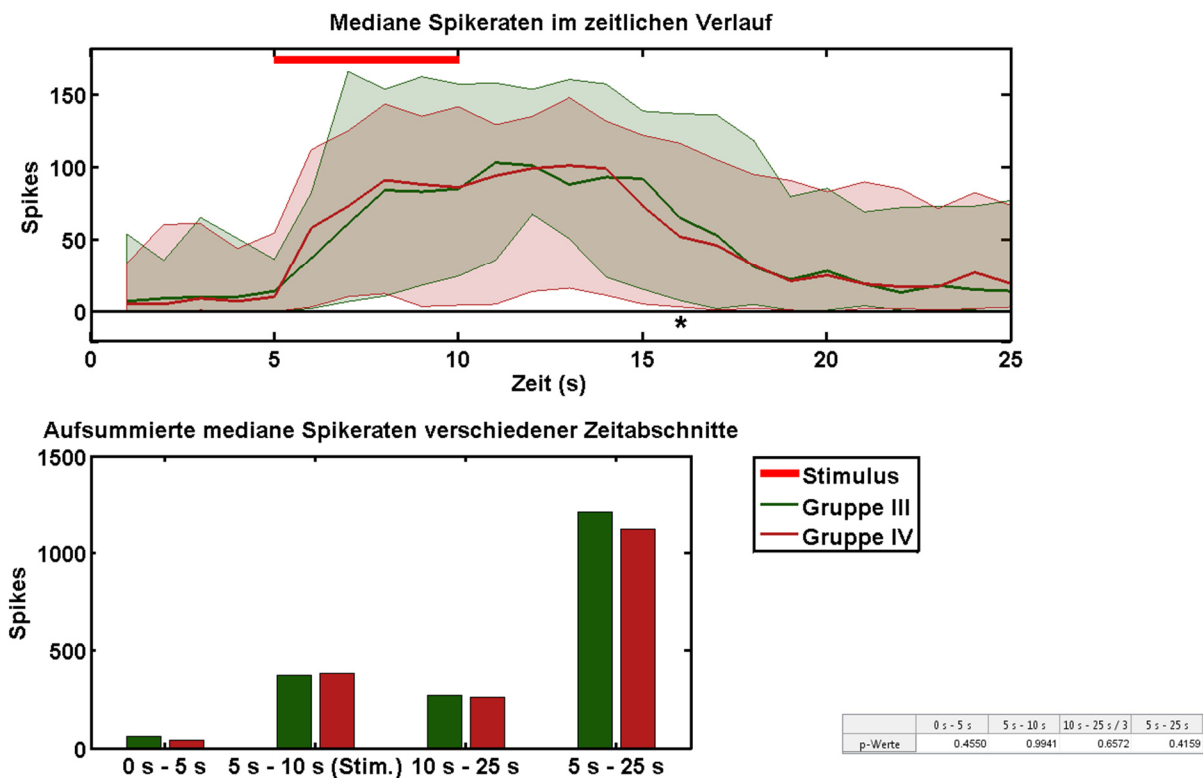


Abbildung 190: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe III (T/C, n = 29) und der Gruppe IV (K/C, n = 31) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 60 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.



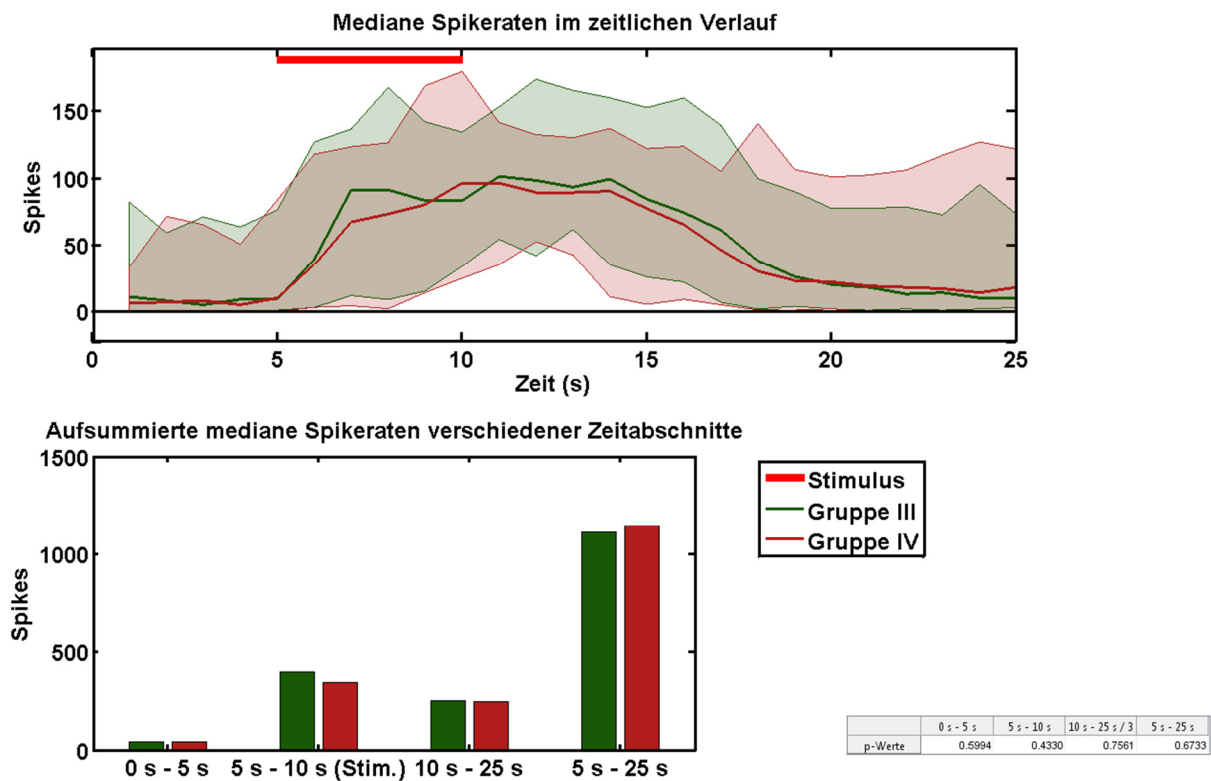


Abbildung 191: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe III (T/C, n = 29) und der Gruppe IV (K/C, n = 31) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 75 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

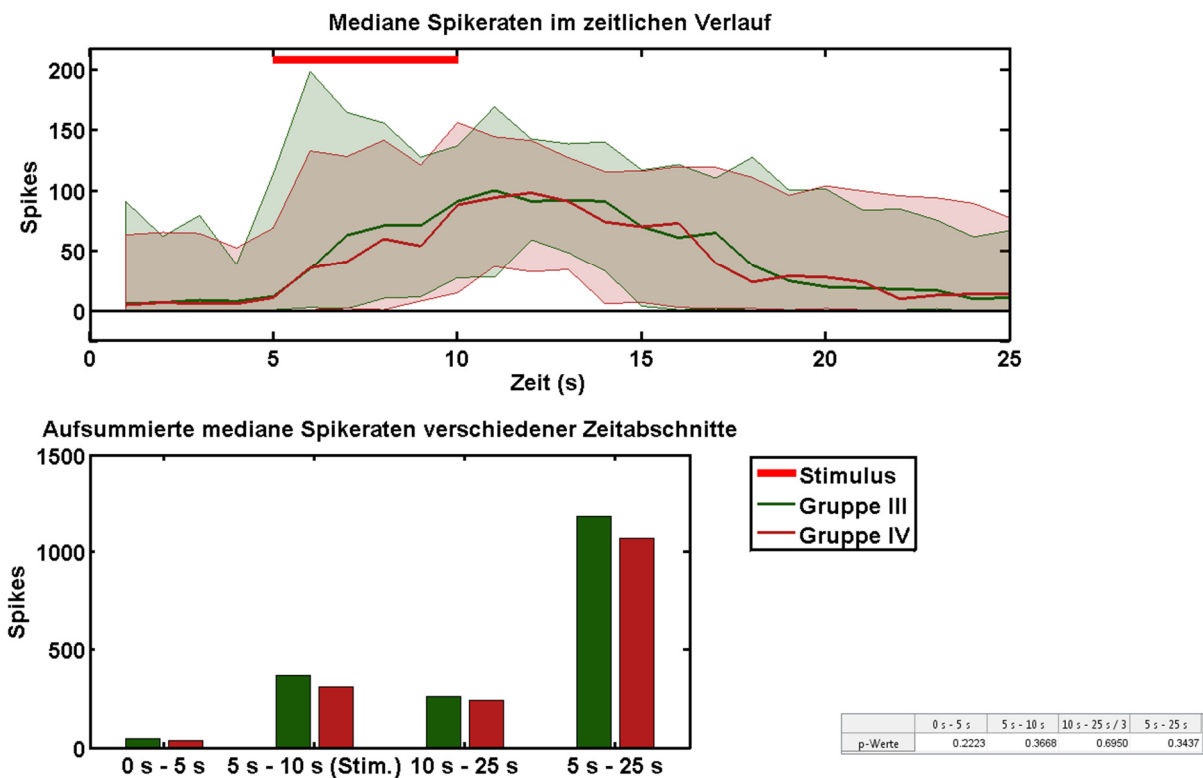


Abbildung 192: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe III (T/C, n = 29) und der Gruppe IV (K/C, n = 31) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 90 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

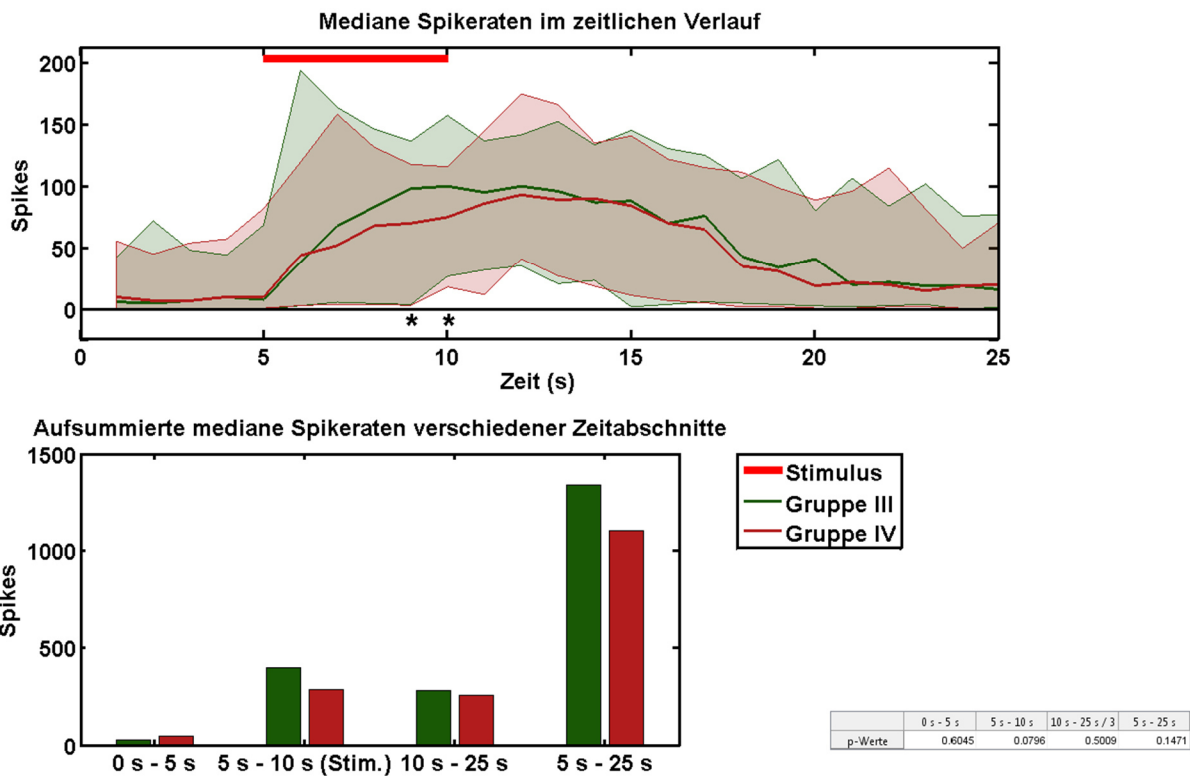


Abbildung 193: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe III (T/C, n = 29) und der Gruppe IV (K/C, n = 31) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 120 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

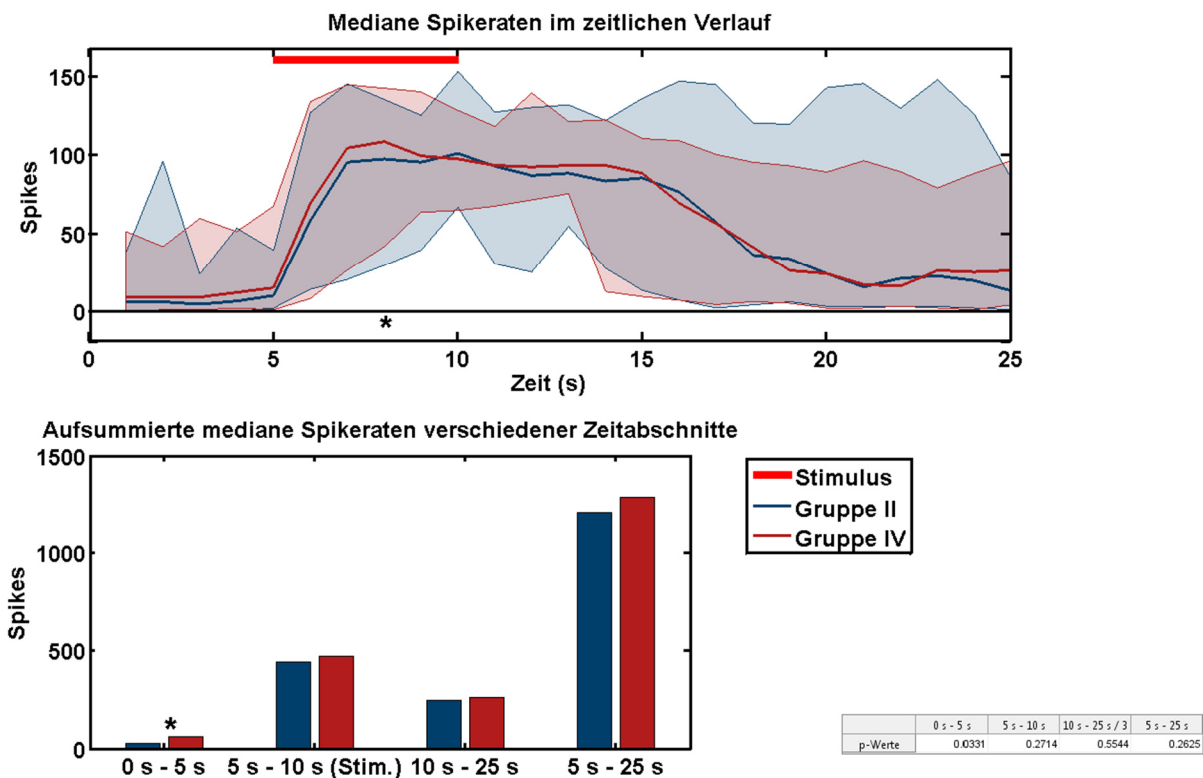


Abbildung 194: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe II (K/-, n = 32) und der Gruppe IV (K/C, n = 31) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. Vortest; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; signifikante Unterschiede bestehen im Zeitabschnitt 5 Sekunden vor Stimulusbeginn ( $p = 0,0331$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen;  $*p \leq 0,05$  Wilcoxon Ranksum Test.

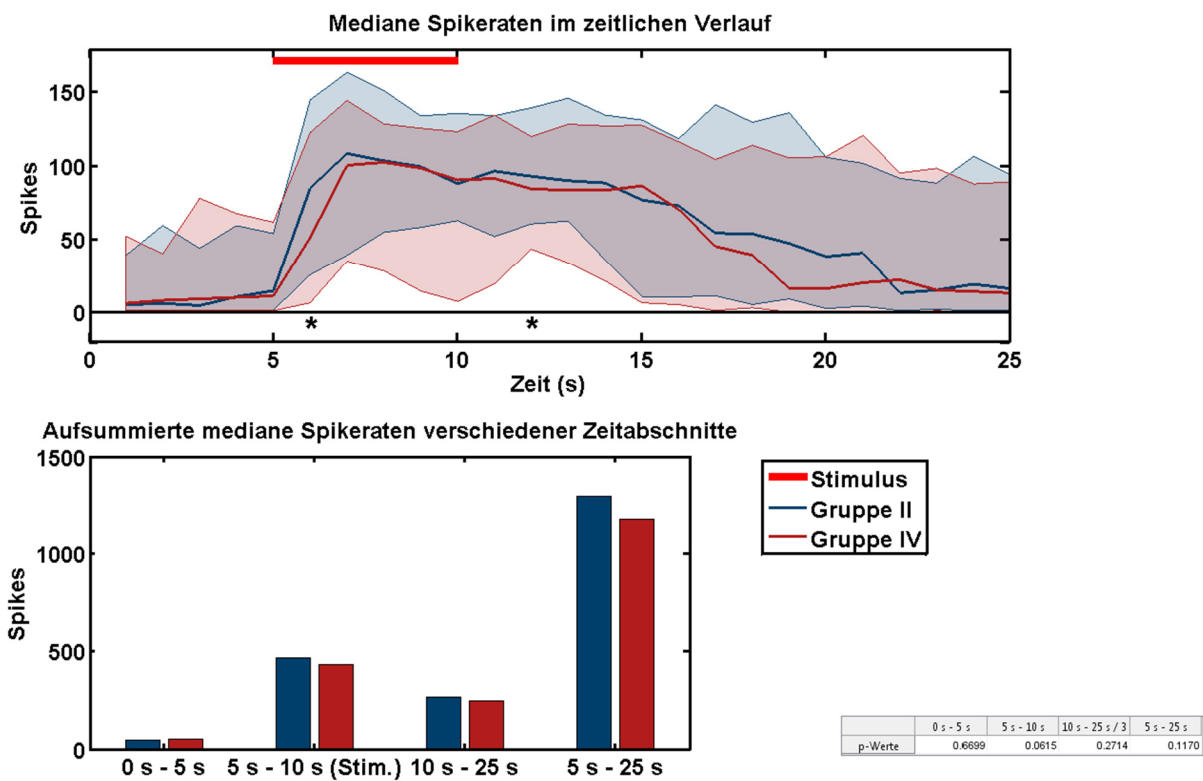


Abbildung 195: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe II (K/-, n = 32) und der Gruppe IV (K/C, n = 31) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 15 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

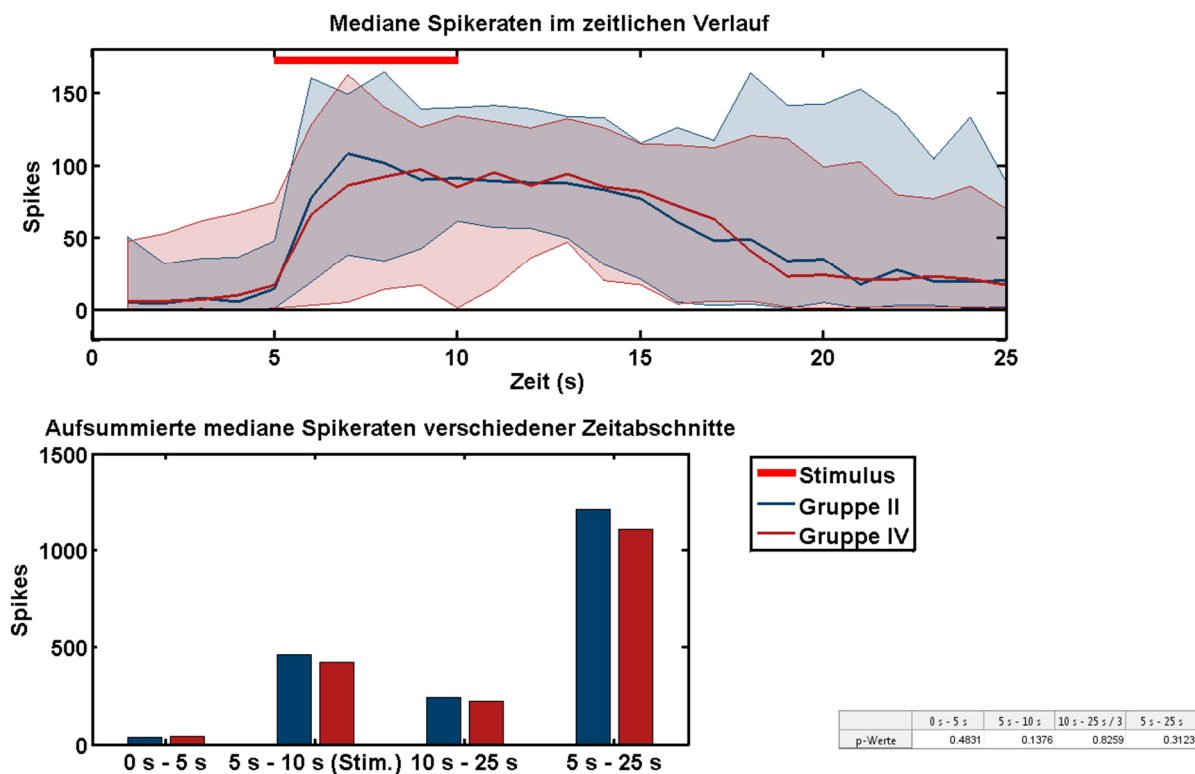


Abbildung 196: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe II (K/-, n = 32) und der Gruppe IV (K/C, n = 31) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden.

30 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

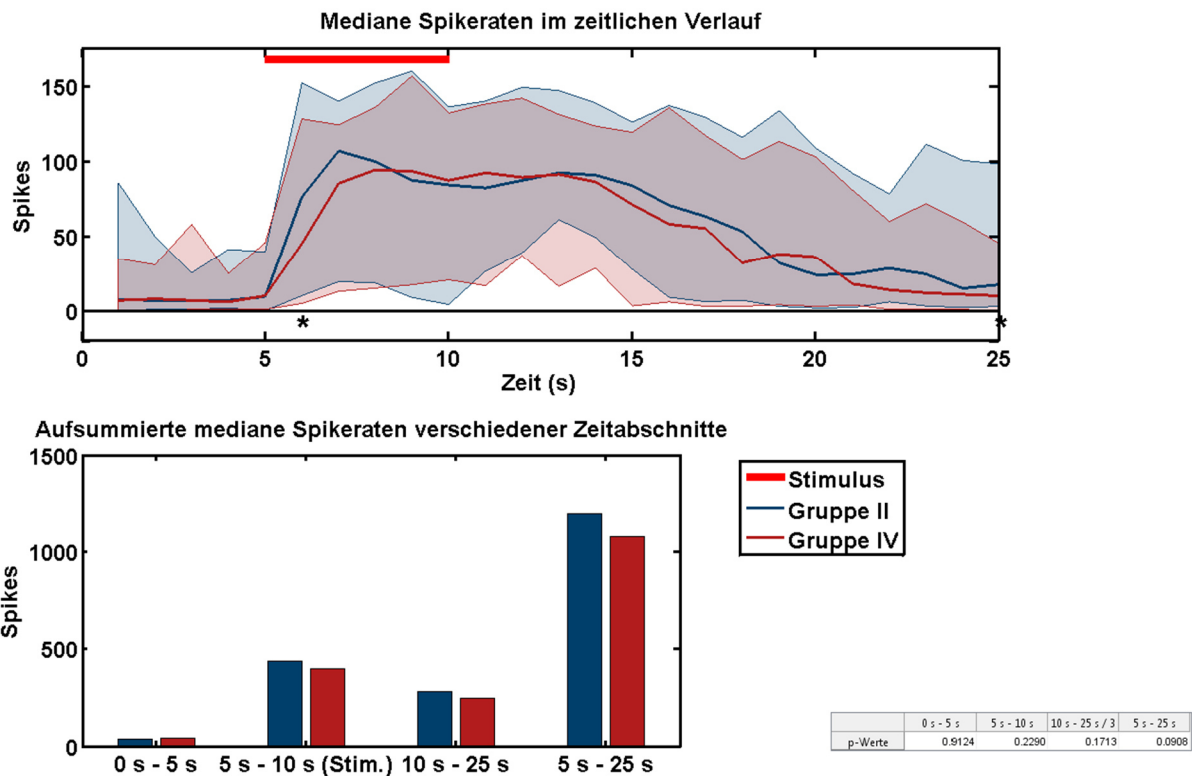


Abbildung 197: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe II (K/-, n = 32) und der Gruppe IV (K/C, n = 31) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 45 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

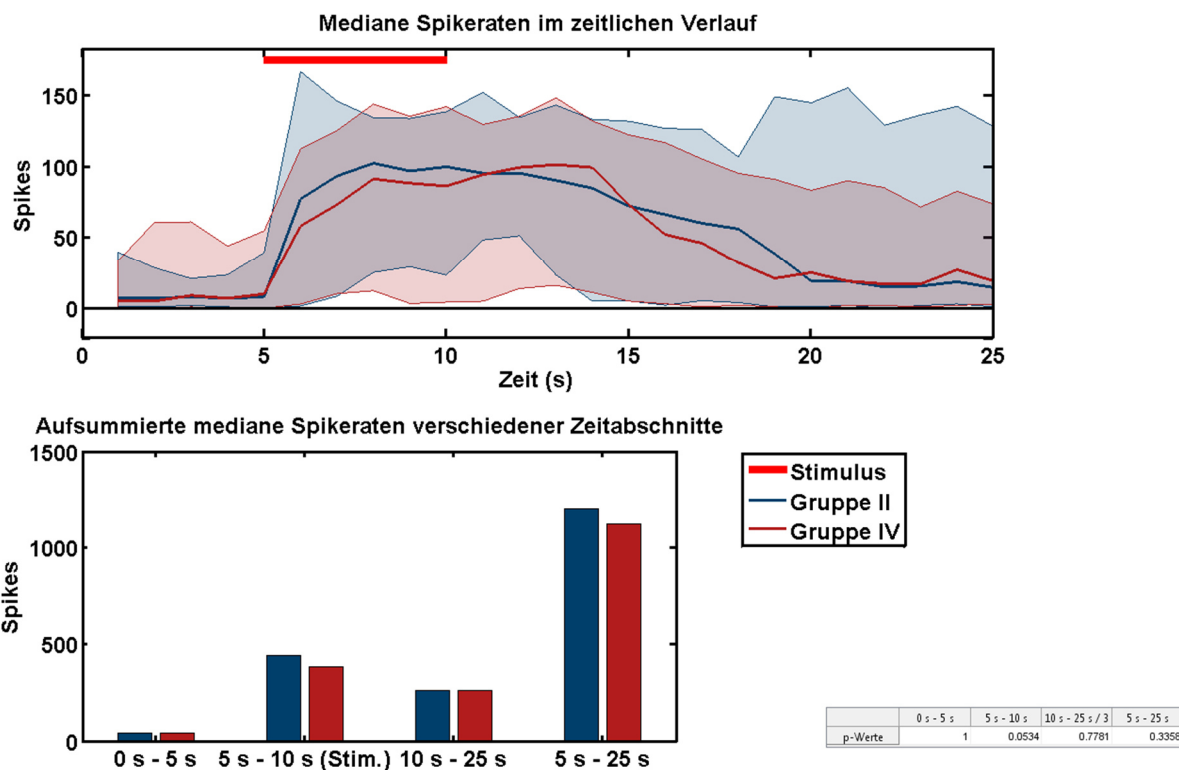


Abbildung 198: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe II (K/-, n = 32) und der Gruppe IV (K/C, n = 31) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 60 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.



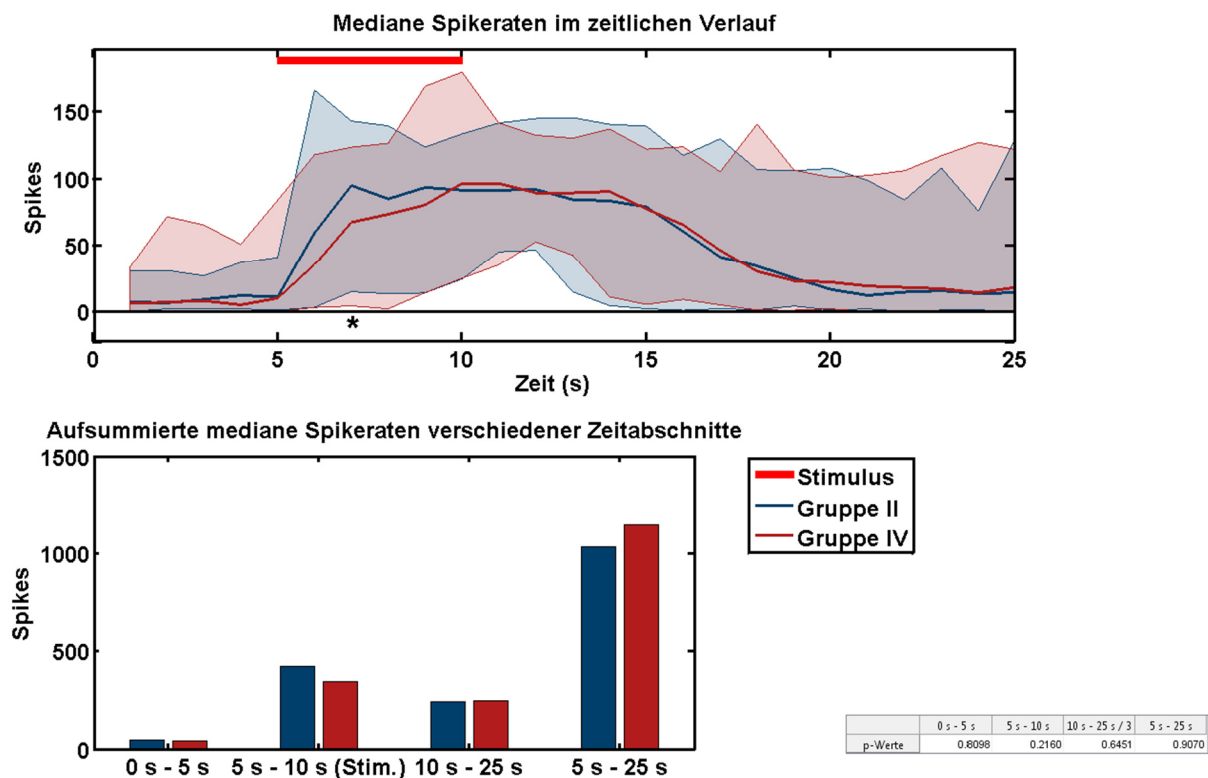


Abbildung 199: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe II (K/-, n = 32) und der Gruppe IV (K/C, n = 31) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 75 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

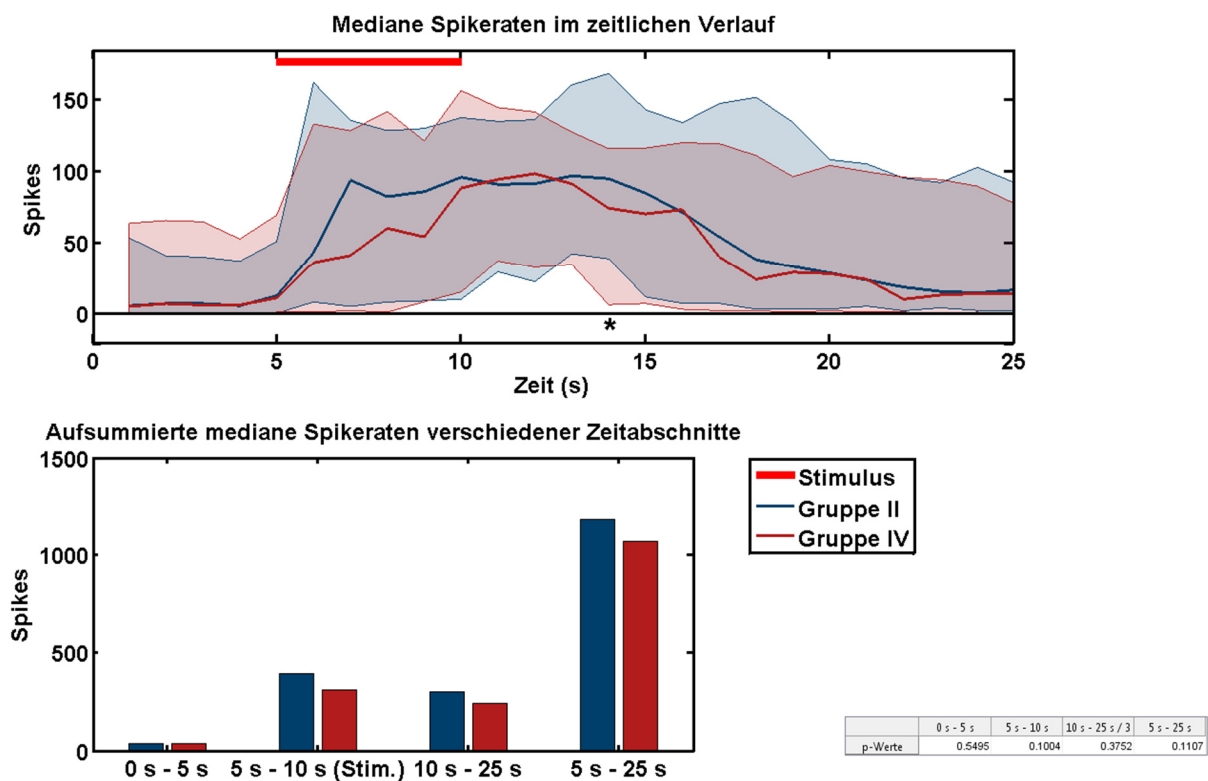


Abbildung 200: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe II (K/-, n = 32) und der Gruppe IV (K/C, n = 31) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 90 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.

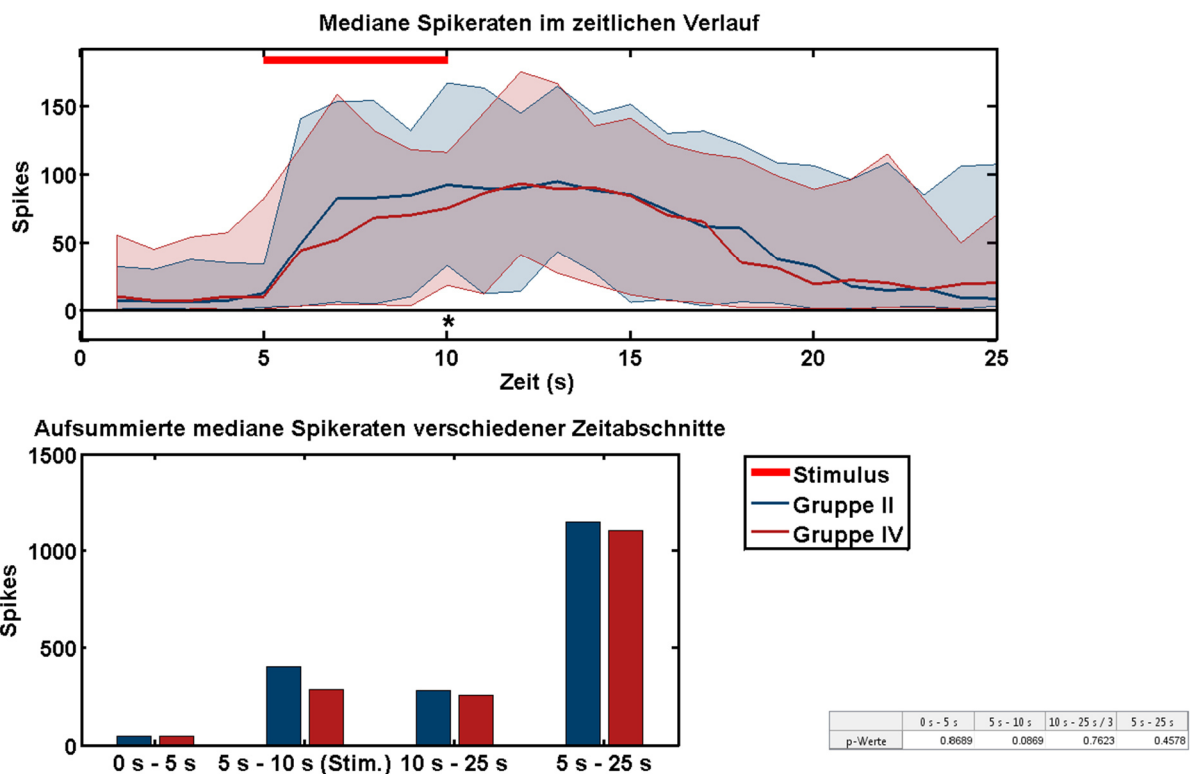


Abbildung 201: Vergleich der medianen Spikeraten der Gruppe II (K/-, n = 32) und der Gruppe IV (K/C, n = 31) im Verlauf und in verschiedenen Zeitabschnitten der ausgewerteten 25 Sekunden. 120 Minuten nach der Fütterung; schraffierte Flächen: In diesem Bereich liegen 90 % der Daten der jeweiligen Gruppe; es bestehen keine signifikanten Unterschiede (getestet mit Wilcoxon Ranksum Test,  $p \leq 0,05$ ). Im Abschnitt „10 s – 25 s“ wurde die Spikeanzahl durch 3 geteilt, um eine Vergleichbarkeit mit den ersten beiden Zeitabschnitten zu ermöglichen.