
Universität für Bodenkultur, Wien

Department für Chemie

Abteilung für Analytische Chemie

LC-MS Analyse von Bienenpollen aus städtischen und landwirtschaftlich genutzten Gebieten

Diplomarbeit

Eingereicht von: Dipl.-Ing. David Blöchl

Matrikelnummer: h0706743

Betreuer:

Assoc. Prof. Dr. Stephan Hann

Hedda Drexler

Wien, November 2016

Danksagung

Allen voran möchte mich ganz besonders bei meinem Diplomarbeitsbetreuer Prof. Dr. Stephan Hann bedanken. Für die sehr gute Betreuung, angefangen von der Vergabe des Themas bis hin zur Endkorrektur der Diplomarbeit, bin ich sehr dankbar. Er half mir stets mit sehr kompetenten und hilfreichen Ideen und hatte immer Zeit für meine - besonders die Analytik betreffenden - Fragen.

Auch bei seinem Team möchte ich mich herzlichst bedanken. Allen voran natürlich bei Hedda Drexler, die mir von Beginn der Arbeiten an sowohl die Grundlagen als auch Wichtigkeiten und Besonderheiten der Ion Trap, der Analytik, der Arbeiten in den Labors und der Stöchiometrie erklärte. Vor allem war sie mit mir und meinen Fragen sehr geduldig, insbesondere auch dann, wenn wir auf Probleme und Ungenauigkeiten stießen, die nicht geplant waren oder wo wir anfangs nicht weiter wussten.

Außerdem möchte ich Teresa, Karin, Anna, Stefan, Gerrit, Tim und Louis danken. Es war eine sehr lehrreiche, schöne und lustige Zeit und ich werde noch länger an die Mittags- und Kaffeepausen mit tollen Speisen und vielen interessanten, abwechslungsreichen und ausgefallenen Diskussionen und Themen zurückdenken.

Bei Dr. Stefan Mandl möchte ich mich für die untersuchten Bienenbrotproben bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich aber natürlich bei meinen Eltern und meiner Schwester Julia bedanken, die mir das alles ermöglichten und mich unterstützt und gefördert haben, vor allem weil sie mir immer Druck machten, endlich fertig zu werden. Auch bei meiner Freundin Anela, die mit mir den Alltag meistert, mich bezüglich dieser Diplomarbeit motivierte und die mir mit ihren kritischen Gedanken bei der Endkorrektur half und mich bei Problemen aufbaute, bedanke ich mich.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	1
Zusammenfassung	2
1. Einleitung	3
2. Literatur	5
2.1. Die Honigbiene – <i>Apis mellifera</i>	5
2.1.1. Funktion und Wichtigkeit der Honigbiene	5
2.1.2. Bienensterben	6
2.2. Pestizide	7
2.2.1. Allgemeines	7
2.2.2. Neonicotinoide	9
2.2.3. Entwicklung und Geschichte	10
2.2.4. Chemie der Neonicotinoide	10
2.2.5. Wirkungsweise	12
2.2.6. Anwendung und Einschränkung	12
2.3. Neonicotinoide und Honigbienen	17
2.3.1. Exposition durch Rückstände in Nektar und Pollen	18
2.3.2. Exposition durch Granulatstäube bei der Aussaat von behandeltem Saatgut	18
2.3.3. Exposition durch Guttationsflüssigkeit	19
2.3.4. Einfluss, Nebeneffekte und Toxizität von Neonicotinoiden auf Honigbienen	20
2.4. Bienenbrot bzw. Pollen	23
2.4.1. Definition und Zusammensetzung von Pollen	23
2.4.2. Relevanz für die menschliche Ernährung	24
2.4.3. Pestizidrückstände	25
3. Analyse	28
3.1. Einführung	28
3.2. Experiment	28
3.2.1. Chemikalien	28
3.2.2. Standardlösungen	29
3.2.3. Standardaddition	30
3.2.4. Proben	31
3.2.5. Probenvorbereitung	31
3.2.6. Analyse durch LC-MS Ionenfalle	31

4.	Ergebnisse	34
4.1.	Methodenentwicklung	34
4.1.1.	Probenvorbereitung	34
4.1.2.	LC Optimierung	34
4.1.3.	Optimierung der MS Bedingungen	35
4.2.	Validierung.....	37
4.2.1.	Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze	37
4.2.2.	Linearität	38
4.2.3.	Wiederfindung und Präzision	41
4.3.	Analyse der Bienenbrotproben	44
5.	Diskussion	47
6.	Tabellenverzeichnis.....	49
7.	Abbildungsverzeichnis	50
8.	Quellenverzeichnis	51
9.	Anhang	58

Abkürzungen

ACN	Acetonitrile
CCD	Völkercollaps, englisch „Colony Collapse Disorder“
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority)
EU	Europäische Union
MoA	Wirkmodus, englisch „mode of action“
MRL	Rückstandshöchstgrenze, englisch “maximum residue level”
nAChR	nikotinerger Acetylcholin Rezeptor
LOD	Nachweisgrenze, englisch „Limit of detection“
LOQ	Bestimmungsgrenze, englisch „Limit of quantification“
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm

Abstract

The important role of pesticides is undeniable. Especially neonicotinoides have a very important role in our global agriculture. However, pollinators like honeybees might come in contact with plant protection chemicals because of the many different ways of contamination. Main aim of this thesis was the development and validation of a method for the selective quantification and evaluation of the neonicotinoides acetamiprid, clothianidin, imidacloprid, thiacloprid and thiamethoxam in samples of beebread. Samples were extracted with the QuEChERS method and acetamiprid – d3 and thiamethoxam – d3 were used as internal standards together with external calibration for quantification of the compounds. All measurements were performed with an iontrap LC-MS system. The method was evaluated regarding quality factors like limit of detection, limit of quantification, linearity, recovery and precision. Recovery was between 73 and 139%. Limit of detection and limit of quantification were between 0,01 mg kg⁻¹ and 0,35 mg kg⁻¹. 71 samples of different regions in Lower Austria were analysed, with the result that the target analytes could not be detected in the samples. Out of all the neonicotinoids only Imidacloprid contaminated one sample. However, the amount of the analyte was at the LOD of the method. No violation of the maximum residue limits (MRL) has been observed.

Zusammenfassung

Die wichtige Rolle von Pflanzenschutzmitteln ist unbestreitbar. Besonders Neonicotinoide nehmen derzeit eine wichtige Aufgabe in unserer globalen Landwirtschaft ein. Aufgrund der intensiven und weit verbreiteten Anwendung können aber auch Bestäuber wie Honigbienen durch die Vielzahl möglicher Kontaminationswege damit in Kontakt kommen. Hauptziel dieser Diplomarbeit war die Entwicklung und Validierung einer Methode zur selektiven Bestimmung und Quantifizierung der Neonicotinoide Acetamiprid, Clothianidin, Imidacloprid, Thiacloprid und Thiamethoxam in Bienenbrotproben. Die Probenaufarbeitung basierte auf der QuEChERS Extraktionsmethode. Als interne Standards wurden Acetamiprid – d3 und Thiamethoxam – d3 gemeinsam mit der externen Kalibration zur Quantifizierung der Substanzen verwendet. Die Messungen erfolgten mit einem LC-MS System mit Ionenfalle. Die Methode wurde durch Qualitätsfaktoren, wie Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze, Linearität, Wiederfindung und Präzision charakterisiert. Die Wiederfindung betrug zwischen 73 und 139%. Nachweis- und Bestimmungsgrenze der Methode waren zwischen 0,01 mg kg⁻¹ und 0,35 mg kg⁻¹. Es wurden 71 Proben unterschiedlicher Regionen Niederösterreichs analysiert, wobei die Analyten in keiner Probe detektiert werden konnten. Nur bei einer Probe wurde das Neonicotinoid Imidacloprid detektiert, der Wert lag aber an der Nachweisgrenze der Methode. Zusammenfassend ergab die Studie, dass in keinem Fall die Rückstandshöchstgrenzen (MRL) überschritten wurden.

1. Einleitung

Pflanzenschutzmittel nehmen derzeit eine wichtige Rolle in der globalen Landwirtschaft ein und sind immer häufiger auch für Konsumenten wichtig, da diese eine qualitativ hochwertige und sichere Versorgung mit Lebensmitteln in Hinblick auf eine gesunde Ernährung gewährleistet sehen wollen. Die stetige Notwendigkeit, moderne chemische Pestizide wie Neonicotinoide für einen effizienten Pflanzenschutz zu verwenden und dadurch nachhaltig Erträge für eine wachsende Weltbevölkerung zu sichern, kann nicht bestritten werden. Diese Abhängigkeit wird jedenfalls auch von den Umsatzzahlen bestätigt. Aber die Kenntnis, das Bewusstsein und zunehmende Zweifel der Bevölkerung über Lebensmittel und Umwelt, in Kombination mit schockierenden Schlagzeilen in den Medien über den wachsenden Rückgang von Bestäubern (allen voran Honigbienen) und vor allem deren häufigeren Völkerverlusten, führten zu vielen Fragen und Sorgen und erregten starke Aufmerksamkeit (BECHER et al. 2013, POTTS et al. 2010). Obwohl mehrere Stressfaktoren als potentielle Gründe in Betracht gezogen wurden, wurde vor allem die derzeitige moderne Landwirtschaft und deren Insektizide, wie etwa die intensiv genutzten Neonicotinoide, welche zum Schutz kultivierter Nutzpflanzen verwendet werden, als Hauptverursacher verdächtigt. Durch die Bestäubung kommen Honigbienen und andere Bestäuber unweigerlich in Kontakt mit verschiedensten Schadstoffen, auch Pestiziden, weil diese zum Schutz der Pflanzen verwendet werden. Solche breitflächig genutzten und für Honigbienen toxischen Substanzen wurden in verschiedensten Produkten von Honigbienen vorgefunden, weshalb Imker und auch Wissenschaftler davon ausgehen, dass diese einen großen Einfluss auf die Schwächung bis hin zur Mortalität der Honigbienen haben.

Aus diesem Grund ist es wichtig, analytische Methoden zu entwickeln und zu nutzen, um solche verdächtigen Pestizide bis in kleinste Mengen zu detektieren und zu quantifizieren.

In dieser Arbeit fokussieren wir uns daher auf die analytische Methodik hinsichtlich der Detektion und Quantifikation von Neonicotinoiden in Bienenpollen bzw. Bienenbrot.

Ziel dieser Arbeit war die Analyse von Bienenbrotproben auf Neonicotinoidrückstände. Insbesondere wurde

- die Entwicklung einer LC-MS Methode zur selektiven Analyse von ausgewählten Neonicotinoiden,
- die Adaption der QuEChERS Extraktionsmethode anhand vorhandener Literatur
- die Quantifizierung mit Hilfe deuterierter interner Standards

untersucht.

Durchgeführt wurde die Arbeit von August 2014 bis Juni 2015 in der Abteilung für Analytische Chemie am Department für Chemie an der Universität für Bodenkultur, Wien. Dabei wurden 71 Bienenbrotproben mithilfe deuterierter interner Standards analysiert. Dem vorhergehend wurde zuerst jedoch eine LC-MS Methode entwickelt und die QuEChERS Extraktionsmethode angepasst und optimiert. Die Methode wurde anschließend nach EURACHEM (2014) und SANCO (2013) validiert und die Proben gemessen. Ein Teil der Arbeit wurde von der Stadt Wien, bzw. dem Hochschuljubiläumsfonds der Stadt Wien gefördert, wofür sich der Autor an dieser Stelle bedanken möchte.

2. Literatur

2.1. Die Honigbiene – *Apis mellifera*

Die Honigbiene, *Apis mellifera*, ist eine der bedeutendsten und bekanntesten Insekten. Sie spielt unter anderem aufgrund der Bestäubung und der Nutzung der Bienenprodukte eine wichtige Rolle in der Natur und somit auch für den Menschen.

Honigbienen werden seit etwa 10.000 Jahren aktiv gehalten und intensiv genutzt (MANDL UND SUKOPP 2011). Sie gehören zur Ordnung der Hymenoptera oder Hautflügler und zur Familie der Apidae oder Echten Bienen. In der Gattung *Apis* gibt es 9 Bienenarten mit mehreren Rassen (Unterarten), wobei in Österreich die bedeutendsten Arten *Apis mellifera*, auch genannt „westliche (europäische) Biene“, sowie die Rasse *Apis mellifera carnica*, auch genannt „Kärntner Biene“ sind. Seltener gibt es in Österreich auch noch *Apis mellifera mellifera*. Die Rasse Carnica hat aufgrund ihres dunklen Körpers ein grau dunkles Erscheinungsbild mit vielen dichten, kurzen Härchen. Die Rasse ist sanftmütig, schwarmträge und erbringt eine gute Honigleistung. Seit Kurzem wird auch auf eine bessere Toleranz gegenüber der Milbe *Varroa destructor* selektiert und hingearbeitet (ACA 2015).

In Österreich gibt es derzeit circa 25.100 Imker mit circa 367.500 Bienenvölkern, wobei die Mehrheit der Imker Kleinbetriebe mit durchschnittlich rund 12,4 Völkern sind. Nur knapp ein Prozent der Berufsimker besitzen mehr als 150 Völker. In den Bundesländern Steiermark und Oberösterreich sind mit 45% die meisten Imker heimisch (MLÖ 2014). Im Vergleich dazu gibt es in der EU circa 700.000 Imker, wobei rund 97%, welche 67% der Gesamtbienenvölker besitzen, keine Berufsimker sind. Die jährliche Honigproduktion in der EU wird auf 200.000 Tonnen geschätzt (EC 2010).

2.1.1. Funktion und Wichtigkeit der Honigbiene

Nahrungssuchende Bienen fliegen von Blüte zu Blüte und sammeln im Umkreis von mehr als fünf Kilometer Pollen und Nektar sowohl für die eigene Ernährung als auch für die Fütterung und Aufzucht der Brut des Bienenvolkes. Als Generalisten bestäuben sie verschiedenste Pflanzen von natürlichen und landwirtschaftlichen Ökosystemen und produzieren nicht nur Honig, sondern auch Pollen, Wachs, Propolis, Gelee Royal und Bienengift. Die jährliche Honigproduktion liegt in Österreich zwischen 5.200 und 6.500 Tonnen und deckt bei einem pro Kopf Verbrauch von 1,2 kg nur etwas mehr als die Hälfte des tatsächlichen Bedarfes (MLÖ 2014).

Noch viel wichtiger als die Honigproduktion selbst, ist jedoch die Bestäubung durch Honigbienen. Durch die Bestäubung tragen diese zur Fruchtentwicklung und Vermehrung bei. Indirekt und direkt wird durch die Bestäubung von Nahrungs- und Faserpflanzen für den Menschen eine wichtige ökonomische Funktion erhalten und die biodiversen, ästhetischen, kulturellen und der Erholung

dienenden Aspekte gefördert (CSPNA 2007). GALLAI et al. (2009) beschreiben einen globalen wirtschaftlichen Nutzen der Bestäubung der wichtigsten 100 Nutzpflanzen in Höhe von EUR 153 Milliarden. Das entspricht etwa 10% des Wertes der landwirtschaftlichen Produktion für die menschliche Ernährung weltweit, wobei Gemüse, Obst, Ölfrüchte, Nüsse und Gewürze die wichtigsten Güter darstellen. Einflüsse auf nichtlandwirtschaftliche Produktion, wie etwa Tierproduktion und natürliche Vegetation, sind dabei noch gar nicht miteinberechnet.

2.1.2. Bienensterben

Weltweit wurde in den letzten Jahren in mehreren unterschiedlichen Regionen ein Rückgang einiger Bestäuber verzeichnet und vor allem bei Honigbienen wurde dieser am Besten dokumentiert (CSPNA 2007). Dieser Rückgang in ganz Nordamerika, Europa, Japan sowie dem Mittleren Osten führte zu großer Aufmerksamkeit. Da, wie bereits oben ausgeführt, die Bestäubung ein so wichtiger Vorgang für die Nahrungsmittelproduktion und die Erhaltung der biodiversen Umwelt ist, wird sehr viel Forschung in diese Richtung betrieben. Eine generelle Meinung zur Ursache des Bienensterbens ist, dass mehrere Faktoren, und besonders eine Kombination und Interaktion dieser, dafür verantwortlich sind. In der Wissenschaft wird dies häufig als Völkerkollaps (engl. „Colony Collapse Disorder“, CCD) bezeichnet. Dabei wird zwischen biotischen (Parasiten, Schädlinge, Fraßfeinde, Ressourcen) und abiotischen (Schadstoffe, Pestizide, Klima) Stressfaktoren unterschieden. Laut FAROOQUI (2013) seien Überwinterungsausfälle von 10% normal. Bereits in den 1960 – 1970er Jahren gab es erste große Volksverluste aufgrund von durch Pestiziden, Schädlingen und extremen Wetterbedingungen.

Der Völkerkollaps unterscheidet sich jedoch von den vergangenen Ausfällen. In den letzten Jahren kam es nämlich vermehrt zu dem unerklärlichen Phänomen, dass es, trotz ausreichender Nahrungsversorgung (Honig und Pollen) und Bruttätigkeit in den Völkern, nur eine geringe Anzahl von erwachsenen Bienen im Volk gab, die mit der Königin im Volk zurückgelassen wurden. Im Jahr 2007 führte das in den USA zu Ausfällen von 80 – 100% (Oldroyd 2007). Mehrere Studien wurden in der Folge über CCD publiziert (Committee on the Status of Pollinators in North America (CSPNA) 2007, Bee Mortality and Bee Surveillance in Europe (AFSSA) 2009, FAROOQUI 2013, SANCHEZ-BAYO UND GOKA 2014, SIMON-DELISO 2014a). Es werden insgesamt mehrere Gründe für CCD genannt, jedoch bestehen nach wie vor noch einige Unsicherheiten, die erst belegt werden müssen, um eine klare Aussage treffen zu können (EFSA 2014).

Mögliche Parameter für CCD ist, wie schon erwähnt, das Zusammenwirken mehrerer Stressfaktoren. Der Fokus liegt dabei bei den parasitischen Milben *Varroa destructor* (die Varroa Milbe) und *Acarapis woodi* (die Tracheen Milbe), *Paenibacillus larvae* (die Amerikanische Faulbrut) und seit kurzem *Aethina tumida* (der Kleine Bienenstockkäfer), die alle nach Europa eingeschleppt wurden. Aber auch Viren, wie der Flügeldeformationsvirus (engl. „Deformed Wing Virus“, DWV) und der

Akute Bienenparalysevirus (engl. „Acute Bee Paralysis Virus“, ABPV) sollen aufgrund einseitiger oder falscher Ernährung, Habitatverlusten durch Monokulturen und klimatischen Änderungen zur Dezimierung beitragen. Eine ausgewogene Ernährung mit Kohlenhydraten, Proteinen, Fetten, Mineralstoffen und Vitaminen aus Nektar und Pollen ist für das Überleben von Bienenvölkern entscheidend (BROTSCHNEIDER UND CRAILSHEIM 2010).

Einen großen Einfluss auf die Mortalität bei Honigbienen soll auch der Einsatz von diversen Pestiziden und Toxinen, besonders Akarizide und Insektizide wie im Speziellen Neonicotinoide, in und außerhalb des Stockes haben (CSPNA 2007). So besteht für Bienen ein grundsätzlich hohes Risiko bei einjährigen Nutzpflanzen zu Beginn der Vegetationsphase und später im Jahr bei mehrjährigen Kulturen, weil das jene Zeitpunkte sind, in denen Pflanzenschutzmittel am häufigsten verwendet werden (BARMAZ et al. 2010). Typische Erscheinungen von Vergiftungen sind große Mengen von toten, kriechenden und mit den Fühlern stark zuckenden Bienen vor den Völkern. Honigbienen sollen auch Probleme mit Flug und Orientierung, vermindertem Lern- und Erinnerungsvermögen sowie der Futtersuche haben (DECOURTYE UND DEVILLERS 2010). SIMONDELSON (2014b) berichtet über signifikante Einflüsse von Fungiziden und intensiver Landwirtschaft mit wenigen Grünflächen in der Nähe von Bienenvölkern. Weiters ist es relevant, geringe subletale aber konstante Rückstände mit toxischen Mengen, wo auch die Zeit und Häufigkeit der Exposition berücksichtigt wird, zu untersuchen (HALM et al. 2006, SANCHEZ-BAYOUND GOKA 2014).

Neben diesen möglichen Einflüssen gibt es auch noch einige weitere Faktoren, wie etwa gentechnisch modifizierte Pflanzen, elektromagnetische Strahlung, die Verarmung der genetischen Diversität in der Königinnenzucht und ernährungsbedingter Stress, die für Volksausfälle verantwortlich sein können. Zu diesen gibt es jedoch noch keine eindeutig abgeklärten Fakten (FAROOQUI 2013).

In dieser Arbeit beziehen wir uns aber trotz der vielen möglichen Theorien des Bienensterbens oder CCD, insbesondere aufgrund der Aktualität des Themas, allen voran auf Rückstände von Pestiziden in Bienenpollen.

2.2. Pestizide

2.2.1. Allgemeines

Es ist davon auszugehen, dass die Menschen schon von Beginn der Landwirtschaft an mit Unkräutern, Krankheiten und Schädlingen, die deren Pflanzen befielen, umgehen mussten. Dieser Umstand wurde bereits 2.500 – 1.500 vor Christi von Chinesen und Sumerern beschrieben, die nachweislich erstmals Schwefel und pflanzliche Stoffe als Pflanzenschutzmittel benutzten (OERKE 2006). Aber erst seit der Moderne, insbesondere seit der Industriellen Revolution, wurden effektive Pflanzenschutzmittel

verwendet. Aufgrund des Einsatzes von Düngern sowie der Entwicklung besserer Sorten, erhöhten sich die Qualität und der Umfang der Ernteerträge und gewährleisteten eine sichere und bessere Ernährung, welche die Kennzeichen der Grünen Revolution sind. Durch die Kombination dieser Faktoren konnte eine Verdopplung der weltweiten Nahrungsproduktion in den letzten 40 Jahren erreicht werden.

Richtige anorganische und auch synthetische Pestizide für größere und intensiver genutzte Flächen wurden jedoch erst um 1850 erfunden. Veranlasst wurde diese Entwicklung durch *Phytophthora infestans*, die Kraut- und Knollenfäule. Im Zuge dieser Pflanzenfäule emigrierten in den Jahren 1845 – 1857 Millionen Iren oder starben an Hunger. Eine weitere bekannte und unabsichtlich eingeführte Krankheit war 1878 in Frankreich *Peronospora farinos*, der Weinrebenmehltau. Mit Hilfe der sogenannten Bordeaux Brühe, Kupfersulfat, entdeckt von Pierre Millardet, konnte jedoch eine weitere Katastrophe vermieden werden. Dennoch kam die Entwicklung von Pestiziden für einige Krankheiten zu spät (HALLMANN et al. 2007).

Seit dieser Zeit an, insbesondere nach dem Zweiten Weltkrieg, kam es zu einem wesentlichen Fortschritt, welcher bis heute andauert. Neben diesem immensen Fortschritt kam es aber auch zu wachsender Kritik und Zweifeln gegenüber Pflanzenschutzmitteln. Vermehrt stand man diesen Mitteln kritisch gegenüber, weil davon Lebensmittel betroffen sind. Besonders das Buch „Silent Spring“ von Rachel Carson aus dem Jahre 1962, war eine Sensation und führte zu weitem Interesse und Diskussionen. Rachel Carson schrieb in ihrem Buch über die Gefahr von chemischen Pestiziden, vor allem über das chlorierte Insektizid DDT. Die Veröffentlichung des Buches führte zu einer verantwortlicheren Handhabung und auch dem Verbot von einigen Pflanzenschutzmitteln und Wirkstoffen, sowie zu den ersten Gesetzen, welche zum Schutz der Umwelt eingeführt wurden (HALLMANN et al. 2007, REDLICH 1999).

Aufgrund einer weltweit wachsenden Bevölkerung und des damit verbundenen steigenden Bedarfs an Lebensmitteln ist der Gebrauch von Pflanzenschutzmittel jedoch unausweichlich. Im Jahr 2050 werden ca. 70% mehr Nahrung für weitere 2,3 Milliarden Menschen notwendig sein. 90% der prognostizierten, zusätzlich benötigten Lebensmittelmengen sollen durch höhere Erträge und einer Intensivierung des Anbaus durch Hohertragssorten, Düngung und verbessertes Wasser- und Bodenmanagement entstehen. Der limitierende Faktor aber ist nutzbares Ackerland, was zur Folge hat, dass sich die Ackerflächen in den Entwicklungsländer um ca. 120 Millionen Hektar vergrößern müssten. Diese Expansionen gehen jedoch hauptsächlich auf Kosten von verschiedensten natürlichen Habitaten und Ökosystemen welche durch einfache ackerbauliche Ökosysteme ersetzt werden. Außerdem sind wachsende Erträge häufig mit höherer Empfänglichkeit von Schädlingen und Krankheiten verbunden (FAO 2014, OERKE 2006). Deshalb benötigen hohe Produktivität und

einseitige Monokulturen eine Intensivierung der den Schutzmaßnahmen vor Krankheiten und Schädlingen, um den hohen Ansprüchen gerecht zu werden. Gesamtertragsverluste sind unter solchen Produktionsbedingungen nämlich deutlich höher. OERKE (2006) schreibt, dass seit 1960, trotz einer vermehrten Verwendung von Pflanzenschutzmitteln, die Ernteverluste nicht sanken, sondern im Gegenteil sich sogar aufgrund der Verminderung von natürlichen und nützlichen Gegnern von Schädlingen durch den exzessiven Gebrauch von Pestiziden erhöhten. Natürlich erhöhen Pflanzenschutzmittel jedoch in vielen Gebieten auch die Produktivität und sind oftmals notwendig, um Vorteile für Produzenten und im weiteren Sinn für Konsumenten in Form von Nahrungssicherheit zu gewährleisten. Diese Abhängigkeit von chemischen Pflanzenschutzmitteln zeigt sich im vorherrschenden Markt von rund 3 Millionen Tonnen und Ausgaben von USD 40 Milliarden (POPP 2011).

In der gegenwärtigen Situation wächst allerdings der politische und soziale Druck, gewisse Pflanzenschutzmittel zu limitieren, wie in den letzten Monaten für Neonicotinoide und einige andere Wirkstoffe (z.B. Glyphosat) kontroversiell diskutiert wurde, da die menschliche Gesundheit und Umweltqualität gefährdet sind und es zu Akkumulationen schädlicher Substanzen in der Nahrungskette kommen kann. Zudem, und das ist eine Motivation der vorliegenden Arbeit, werden vermutlich auch Nichtzielarten wie zum Beispiel Bestäuber geschädigt und dezimiert.

2.2.2. Neonicotinoide

Organophosphate, Carbamate und Pyrethroide dominieren seit den 1970er den Insektizidmarkt. Seit den letzten Jahren sind Neonicotinoide die bedeutendsten Insektizide am Pflanzenschutzmarkt. Grund dafür ist die gute Aktivität gegen Insekten, welche resistent gegenüber anderen Insektiziden wie Organophosphate, Carbamate, Pyrethroide, chlorierte Hydrocarbonate, etc. sind. Weiters wirken Neonicotinoide breit gegen Insekten und daher indirekt auch gegen Viren, weil diese von Insekten übertragen werden. Weitere Vorteile der Neonicotinoide sind insbesondere eine exzellente Aufnahme und Translokation in Pflanzen durch deren systemischen Eigenschaften, die geringen Applikationsraten und ein gutes Sicherheitsprofil für Konsumenten und Anwender aufgrund einer relativ neuen, modernen Wirkungsweise (MAIENFISCH et al. 2001, SIMON – DELSO 2014).

Derzeit gibt es sieben kommerziell gut etablierte Neonicotinoide, die in verschiedene Subklassen eingeteilt werden. **Imidacloprid** als erstes Neonicotinoid (Bayer Crop Science AG), **Nitenpyram** (Sumitomo Chemical Takeda Agro Company), **Acetamiprid** (Nippon Soda) und **Thiacloprid** (Bayer Crop Science AG) zählen zu den Wirkstoffen der ersten Generation. Zur zweiten Generation zählen **Thiamethoxam** (Syngenta AG) und **Clothianidin** (Sumitomo Chemical Takeda Agro Company/ Bayer Crop Science AG), ein Metabolit von Thiamethoxam. Zur dritten Generation zählt schließlich **Dinotefuran** (Mitsui Chemicals). Das jüngste Neonicotinoid **Sulfoxaflor** (Dow Agrosiences) aus der

vierten Generation, soll laut Herstellern aufgrund einer einzigartigen Struktur zahlreiche Vorteile gegenüber den anderen Neonicotinoiden aufweisen (CUTLER 2012, YUANMING 2010).

2.2.3. Entwicklung und Geschichte

Die Entwicklung der Neonicotinoide begann Anfang der 1970er mit der Identifizierung von fünf- und sechsgliedrig gesättigten Nitromethylenen, die Heterocyclen enthalten, welche mit nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) von Insekten reagieren. Diese Entdeckung erfolgte durch das „Biological Research Center“ der alten „Shell Development Company“ in Modesto, Kalifornien, durch SOLOWAY et al., die die Substanz (Dibromnitromethyl)-3-methylpyridin von Henry Feuer von der Purdue Universität erhielten. Durch die Optimierung dieser Substanz erhielten sie Nitroenaminithiazin, das wie Nikotin auch auf die nAChRs wirkt. Es wies jedoch eine weit höhere Wirksamkeit auf und eine fast 1.700-mal höhere Wirkung gegen *Helicoverpa zea*, dem Baumwollkapselbohrer. Zudem war der Wirkstoff weitaus weniger toxisch gegenüber Fischen und Warmblütern. Es wurde jedoch aufgrund der Lichtsensitivität und der eingeschränkten Effizienz nicht als Pflanzenschutzmittel kommerzialisiert. Erst nach einer weiterer Optimierung und Synthetisierung im Zuge eines Projektes von Nihon Tokushu Noyaku Seizo KK, später Bayer Crop Science KK Japan, und mit intensiver Erforschung von stabilieren funktionellen Gruppen, konnte **Imidacloprid** (NTN33893), welches ein [=N-NO₂] Chromophor enthält, entwickelt werden. Das war die Geburtsstunde der Neonicotinoide. Imidacloprid hatte eine 1.000-fach bessere Wirksamkeit, als das natürliche Insektizid Nikotin und eine 125-fach bessere Wirkung als Niathizin. Nach weiterführenden Forschungsarbeiten zum [=N-CN] Chromophor wurde schließlich auch das Insektizid **Thiacloprid** entwickelt. Die Veröffentlichung der Ergebnisse und Patente führte zu wissenschaftlicher Arbeit von Nippon Soda und zeigte die exzellente Wirksamkeit von Imidacloprid gegen *Homoptera* und *Heteroptera*. Die Schwächen gegen *Lepidoptera* führten zur weiteren Entwicklung des Insektizids **Acetamiprid** (Yamada et al. 1999). 1985 begannen Ciba – Geigy, später Novartis und dann Syngenta, mit der Erforschung von Neonicotinoiden. Diese konnten die insektizide Wirksamkeit gegen saugende Insekten mit einer Methylgruppe und der Optimierung von Oxadiazinen erhöhen. Die Forschungsarbeiten resultierten im Wirkstoff **Thiamethoxam**, das ebenso an nAChR bindet. Durch diesen enormen Erfolg von Neonicotinoiden kam es zu einer intensiven Forschung unterschiedlicher Agrochemikalien der Firmen, wodurch auch noch weitere Wirkstoffe entwickelt wurden (JESCHKE et al. 2013, REDLICH 1999, SCHÄFER 2008, YAMAMOTO 1999).

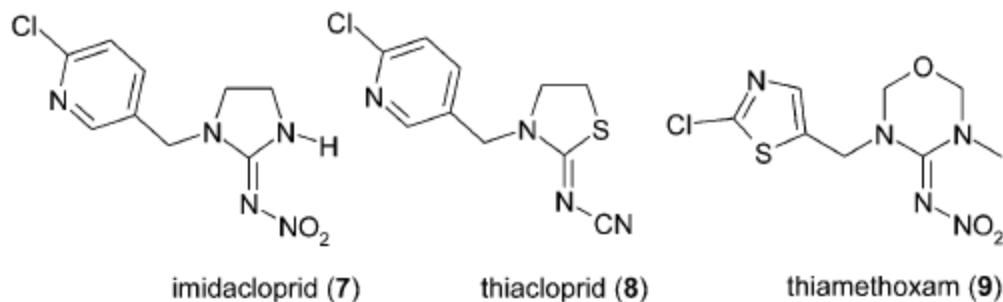
2.2.4. Chemie der Neonicotinoide

Die ersten drei Generationen von Neonicotinoiden resultieren durch unterschiedliche chemische Gruppen. Imidacloprid, Nitenpyram, Acetamiprid und Thiacloprid der ersten Generation enthalten einen 6-Chlor-3-pyridyl-Rest, Thiamethoxam und Clothianidin der zweiten Generation einen 2-Chlor-5-thiazolyl-Rest und Dinotefuran einen Tetrahydro-3-furanyl-Rest.

In Bezug auf die chemische Struktur (Abbildung 1) können zyklische (Imidacloprid, Thiacloprid und Thiamethoxam) und nicht – zyklische (Acetamiprid, Clothianidin, Dinotefuran und Nitenpyram) Neonicotinoide unterschieden werden (JESCHKE et al. 2013, SCHÄFER 2008).

nAChR agonists (neonicotinoids):

Ring systems:



Noncyclic structures:

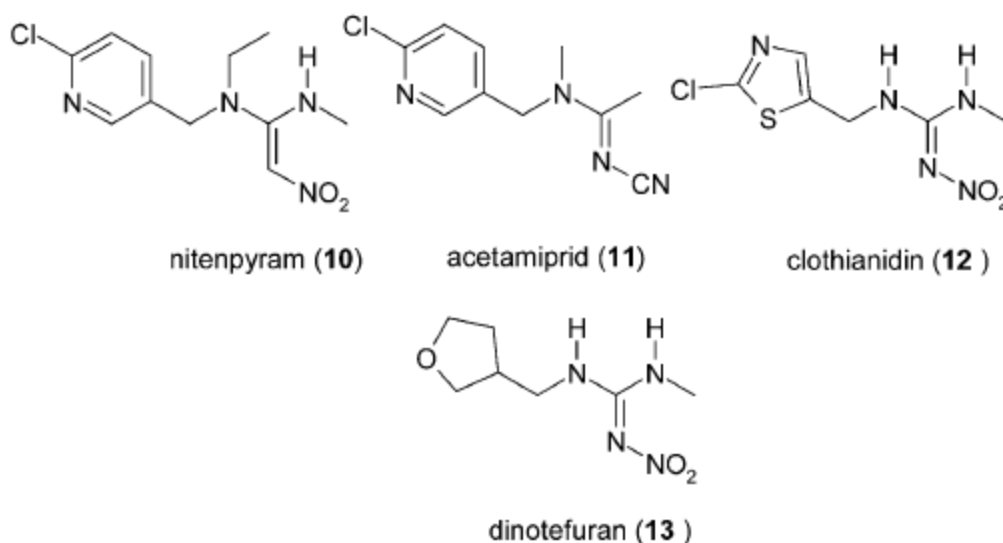


Abbildung 1: Chemische Struktur der kommerziellen Neonicotinoide mit Ringsystemen und nicht- zyklischen Strukturen (JESCHKE et al. 2013).

Neonicotinoide haben eine Molekülmasse zwischen 250 und 300 g/mol und eine Wasserlöslichkeit von 184 – 4.100 mg/L bei 20°C und einem pH von 4 – 5 (CRL DATA POOL). Kommerziell genutzten Pflanzenschutzmitteln, so auch Neonicotinoiden, werden häufig zusätzliche Substanzen beigemischt, um die Eigenschaften und das Verhalten der reinen Wirkstoffe zu verändern, und dadurch deren Wirkung zu verbessern.

2.2.5. Wirkungsweise

Die Ähnlichkeit zwischen Nikotin und dem Neonicotinoid Imidacloprid ist erstaunlich. Für Säugetiere ist Nikotin jedoch sehr toxisch, wohingegen Neonicotinoide aufgrund der Unterschiede in der Bindungsaffinität und der Wirkungsstärke in den nAChR nur geringe Toxizität aufweisen.

Generell kontrollieren die membranständigen nAChR Ionenkanäle, erlauben ein neues Aktionspotential in der postsynaptischen Zelle und sind direkt bei der Öffnung der Ionenkanäle beteiligt. Nach der Erregung wird das Acetylcholin, das in der präsynaptischen Membran gespeichert ist, freigesetzt, durch den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Membran diffundiert und reagiert schließlich mit dem Rezeptor. Befindet sich dort ein Agonist wie Acetylcholin oder Nikotin bzw. Neonicotinoide, die an die α – Untereinheiten der Rezeptoren binden, öffnet sich der Ionenkanal und Natrium- und Calciumionen fließen vom extrazellulären Teil in das Zytosol der Zelle. Das resultiert in einer weiteren Depolarisierung der postsynaptischen Membran und einem neuen Aktionspotential. In weiterer Folge diffundiert Acetylcholin und der Ionenkanal schließt sich. Vor einem neuen Signal wird Acetylcholin durch Acetylcholinesterase hydrolysiert. Mit Nikotin bzw. Neonicotinoiden geschieht das genauso, jedoch in geringerem Ausmaß. Bei entsprechend hohen Konzentrationen hingegen depolarisiert die Zellmembran ununterbrochen und es kommt zu einer Blockierung des Signals, was zum Tod führt (SCHÄFER 2008). Neonicotinoide binden antagonistisch an die synaptischen nAChR von Insekten und reagieren selektiv auf das zentrale Nervensystem, das in der Überaktivierung des cholinergen Neurons resultiert und zu Lähmung oder sogar Tod des Insekts führt. Vertebraten haben andere nAChR Bindungsstellen des Nervensystems mit weniger Rezeptoren affin zu Neonicotinoiden, was in einer geringeren Toxizität resultiert. H. H. Dale teilte die Acetylcholinrezeptoren in zwei Gruppen von Rezeptoren: mukariner und nikotinerger Acetylcholinrezeptoren (nAChR), wobei nikotinerger besser erforscht sind. Diese sind in den Gehirnhomogenaten des somatischen Nervensystems für die Stimulierung der Nervleitung platziert und in mindestens 17 Untereinheiten eingeteilt (OKAZAWA et al. 1998, SCHÄFER 2008, YAMAMOTO 1999).

2.2.6. Anwendung und Einschränkung

Neonicotinoide haben eine enorme landwirtschaftliche Bedeutung und können aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften bei vielen Nutzpflanzen als Insektizid eingesetzt werden. Unter anderem werden sie als Spritz- und Beizmittel angewandt und haben eine exzellente schnelle und länger anhaltende Wirkung aufgrund rascher Blatt- und Wurzel Aufnahme und einem akropetalen Transport. Bei der prophylaktischen Beizung oder Saatgutbehandlung, bei welcher Neonicotinoide die am häufigsten genutzten systemischen Wirkstoffe sind, werden Insektizide und bzw. oder Fungizide an verschiedenste Samen angelagert, welche die Pflanze in unterschiedlichen Gewebeteilen aufnimmt. Dabei entsteht eine „protektive Zone“ dieser Wirkstoffe gegen Schädlinge und Krankheiten im Boden.

Weil das Produkt aber von der Pflanze systemisch aufgenommen wird, befindet es sich daher auch in Pollen, Nektar und Guttationstropfen (FAIRBROTHER et al. 2014, NUYTENS et al. 2013).

Die breite Reichweite der erfolgreichen Anwendung inkludiert viele verschiedene Schädlinge von phytophagen (beißenden) und phytosugen (saugenden) Insekten in der Landwirtschaft. Beispiele für derartige Insekten sind Zikaden, Thripse, Blattläuse, Grashüpfer, Käfer, Schmetterlinge, Minier- und Fruchtmotten sowie Drahtwürmer. Auch die Verwendung zur Saatgutbehandlung ist weit verbreitet. Darüber hinaus werden Neonicotinoide auch in nicht – landwirtschaftlichen Gebieten genutzt, wie etwa in Haus und Garten. Angewendet werden sie insbesondere für die Bekämpfung von Termiten, Kakerlaken und Ameisen sowie zur Kontrolle von Ektoparasiten bei Hund und Katze gegen Flöhe, Läuse, Zecken, etc. (MAIENFISCH et al. 2001, YAMADA et al. 1999).

Imidacloprid (Admire, Confidor, Gaucho) und Thiamethoxam (Actara, Cruiser) sind jedenfalls die bedeutendsten Neonicotinoide mit einem Verkaufsvolumen von USD 665 bzw. 300 Millionen. Imidacloprid ist weltweit das erfolgreichste Insektizid und wird in mehr als 120 Ländern bei 140 landwirtschaftlichen Pflanzen sowie in der Veterinärmedizin angewandt. In der Europäischen Union werden nach Imidacloprid und Thiamethoxam Thiacloprid und Acetamiprid am meisten verwendet. Clothianidin wird relativ wenig genutzt (EFSA 2012).

Trotz des weiterhin wachsenden Neonicotinoidmarktes, welcher einen Marktanteil von 16 Prozent am gesamten Agrarchemikalienmarkt mit einem Volumen von EUR 7,162 Milliarden aufweist, wurde für die Wirkstoffe Clothianidin, Thiamethoxam und Imidacloprid am 24. Mai 2013 in der gesamten Europäischen Union mit der Durchführungsverordnung (EU) Nr. 485/2013 ein Verbot der Anwendung für zwei Jahre ausgesprochen. Eine Übergangsfrist, im Sinne einer Aufbrauchfrist, der Substanzen wurde bis Ende November 2014 erlassen, nachdem die EFSA für diese Wirkstoffe eine Risikobewertung in Bezug auf Bienen vorlegte. Es wurde ein hohes akutes Risiko für Bienen bei mehreren Kulturen aufgrund dieser drei Neonicotinoide ermittelt. Als Risiken wurde insbesondere die Exposition durch Staub von behandeltem Saatgut bei manchen Kulturen, Rückstände in kontaminiertem Pollen und Nektar, die Guttationsflüssigkeit bei Mais und die Datenlücken bezüglich Langzeitrisiken für Honigbienen eingestuft. Deshalb betraf diese Verordnung auch nur jene Wirkstoffe, die bei für Bienen interessanten Kulturen genutzt werden, wobei Kulturen, die vor der Blüte geerntet werden – mit Ausnahme von Gewächshäusern und Wintergetreide - als für Bienen uninteressant gelten. Innerhalb dieser zwei Jahren hätte es aber zu einer Überprüfung wissenschaftlicher Erkenntnisse kommen sollen, der Zeitraum wurde aber verlängert (CHEUNG et al. 2006, EK 2013).

Generell sind in der Europäischen Union Pflanzenschutzmittel durch die Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 geregelt, die am 14. Juni 2011 in Kraft trat und damit die Richtlinien 79/117/EWG und 91/414/EWG des Rates aufhob und ersetzte. Hauptpunkte dieser Verordnung sind die EU – weite Genehmigung von Pflanzenschutzmitteln, deren Eigenschaften sowie Risiken von Wirkstoffen, Safener und Synergisten. Wirkstoffe, die den Vorgaben und Verordnungen entsprechen, sind für eine Dauer von maximal 15 Jahren, die auch verlängert werden kann, in die Liste der Durchführungsverordnung (EU) Nr. 540/2011 der Kommission aufgenommen und müssen von den Mitgliedsstaaten autorisiert werden. Die in die Liste aufgenommenen Produkte können aber auch wieder zurückgezogen werden, wenn es alternative Produkte geben sollte, die besser und sicherer sind. Die Verordnungen (EU) Nr. 283/2013 und Nr. 284/2013 der Kommission enthalten eine Liste von Studien und Tests über Wirkstoffe und Pflanzenschutzmittel, die mit der Verordnung (EU) Nr. 546/2011 der Kommission einheitliche Grundsätze für die Bewertung, Zulassung und Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmittel für Mitgliedsstaaten vorgeben.

Acetamiprid, Clothianidin, Imidacloprid, Thiacloprid und Thiamethoxam finden sich in der Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 wieder. Die Neonicotinoide Dinotefuran und Nitenpyram wurden innerhalb der Europäischen Union nie autorisiert und angemeldet, sodass es auch keine Pflanzenschutzmittel mit diesen Wirkstoffen in der Europäischen Union gibt. Auch das neue Pestizid Sulfoxaflor wurde bis dato in der Europäischen Union noch nicht zugelassen (EU PESTICIDES DATABASE). Dementsprechend finden sich in Österreich auch keine Pflanzenschutzmittel, die diese Wirkstoffe enthalten.

Tabelle 1 listet die fünf in Österreich zugelassenen Neonicotinoide mit deren Handelsbezeichnung und wichtigen Beispielen von Kulturen, in welchen diese appliziert werden (Verzeichnis der in Österreich zugelassenen / genehmigten Pflanzenschutzmittel). Diese zeigt die umfangreiche Verwendung an Kulturen und daher die große Relevanz der Neonicotinoide in der Landwirtschaft.

Tabelle 1: Derzeit in Österreich zugelassene Neonicotinoide mit deren Zulassungsjahr in der Europäischen Union, die jeweilige Handelsbezeichnung sowie Beispiele für Kulturen und Applikation (Pflanzenschutzmittelregister: Verzeichnis der in Österreich zugelassenen / genehmigten Pflanzenschutzmittel - Stand: 23.11.2014, EU PESTICIDE DATABASE).

Wirkstoff	Handelsbezeichnung	Beispiele für Kulturen und Applikation
Acetamiprid (2005)	Mospilan 20 SG	Kartoffel, Kernobst, Kirschen, Raps, Pflaumen, Zierpflanzenkulturen (Sprühapplikation)
Clothianidin (2006)	Dantop	Kartoffel (Saatgutbehandlung)
Imidacloprid (2009)	Confidor 70 WG	Apfel, Kirsche, Paprika, Salat, Tabak, Tomaten, Weinreben, Gurke, Hopfen (Sprühapplikation)
	Gaucho 600 FS	Getreide, Zwiebel (Saatgutbehandlung), Kartoffel (Pflanzgutbehandlung)
	Sombrero	Futter- und Zuckerrübe (Saatgutbehandlung)
Thiacloprid (2005)	Biscaya	Ackerbohne, Erbsen, Gerste, Hafer, Kartoffel, Mais, Mohn, Raps, Roggen, Senf, Triticale, Weizen (Spühapplikation)
	Calypso	Chinakohl, Kartoffel, Kernobst, Marillen (Sprühapplikation)
	Calypso Perfekt AF	Beeren, Gurke, Kernobst, Kohlgemüse, Paprika, Tomaten, Kräuter (Sprühapplikation)
Thiamethoxam (2007)	Actara	Kartoffel (Sprühapplikation)
	Cruiser	Futter- und Zuckerrübe (Saatgutbehandlung)

JESCHKE et al. (2011) berichtet, dass Saatgutbehandlung und Bodenbehandlung mit circa 60 % der weltweiten Nutzung den Großteil der Applikationsmethoden ausmachen. Daneben gibt es weiters auch Sprühapplikation, Pflanzgutbehandlung, Granulatapplikation, Chemigation, Mischungen mit Beregnungswasser etc. Laut EFSA (2012) werden in der Europäischen Union aber circa 70% der am Feld genutzten Neonicotinoide per Sprühapplikation ausgebracht und weniger als 20% durch Saatgutbehandlung oder andere Methoden der Applikation. Die Anwendung und Verteilung der fünf hauptgenutzten Neonicotinoide in der Europäischen Union sind in Abbildung 2 abgebildet. Bei der Saatgutbehandlung, zu der die Saatgutbeizung, Inkrustierung und Pillierung gehören, wird Saatgut prophylaktisch behandelt, um die Pflanze vor Schädlingen und Pilzen zu schützen. Dabei wird der Wirkstoff während des Wachstums der Pflanze aufgenommen und innerhalb dieser verteilt, wodurch

die Pflanze längerfristig für Schädlinge giftig ist (BAYER CROP SCIENCE 2004). Bestes Beispiel dieser Behandlungsart ist wohl Mais, aber auch bei Getreide, Soja, Raps und Baumwolle wird diese Methode routinemäßig verwendet, um unerwünschte Schädlinge zu eliminieren. Die Wirkstoffe Clothianidin, Imidacloprid und Thiamethoxam werden zur Saatgutbehandlung verwendet. Zwischen 2009 und 2011 wurde Clothianidin jährlich auf 18,6 Millionen Hektar landwirtschaftlicher Fläche verwendet, wobei der Anteil von Mais, *Zea mays*, 18,2 Millionen Hektar ausmachen (BRASSARD 2012).

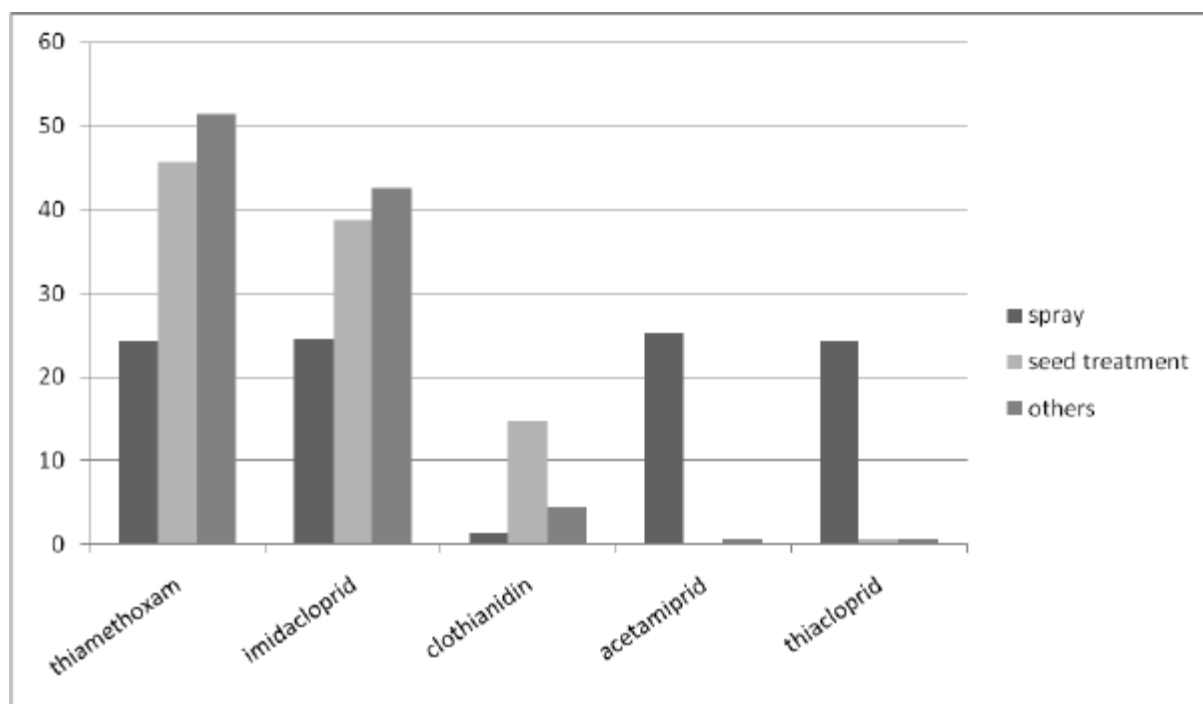


Abbildung 2: Übersicht der Anzahl (%) verwendeter autorisierter Wirkstoffe Thiamethoxam, Imidacloprid, Clothianidin, Acetamiprid und Thiacloprid für die Applikationsmethoden „spray“ (Sprühapplikation), „seed treatment“ (Beizung) und „others“ (andere) (EFSA 2012).

Acetamiprid und Thiacloprid werden hauptsächlich zur Sprühapplikation verwendet, welche einen direkten aber eher kurzfristigen Schutz für Pflanzen darstellt. Imidacloprid, Thiacloprid und Thiamethoxam finden daher auch Anwendungen bei der Saatgutbehandlung.

Saatgutbehandlung mit Neonicotinoiden wird weltweit angewendet und ist weitgehend die einzige Möglichkeit dieser Form der Prophylaxe, weil es kaum Alternativen dazu gibt. Diese Methode wurde ursprünglich entwickelt, um den Einfluss auf Nichtzielarten zu reduzieren und sollte eine sichere Methode sein, um die Abdrift von Pflanzenschutzmitteln zu minimieren. Dementsprechend gibt es auch kaum Möglichkeiten, unbehandeltes Saatgut zu erwerben (KOCH et al. 2005). Vermehrt sprechen allerdings Studien gegen diese Form der Saatgutbehandlung. Außerdem werden Neonicotinoide in einer anderen Anwendung auch in Form von Granulaten, welche auch in den EU- Mitgliedsstaaten

erlaubt sind bei der Aussaat von Kulturpflanzen beigegeben und mitausgesät bzw. direkt in den Boden ausgebracht.

Trotz des enormen Umsatzes von Neonicotinoiden und den vielen Beispielen, wie diese effektiv eingesetzt werden können, ist es weniger klar, inwiefern diese Wirkstoffe zu einer Erhöhung der Erträge in der Landwirtschaft beigetragen haben. Denn die Erträge von fast allen landwirtschaftlichen Kulturen haben in den letzten 60 Jahren zugenommen. Neben einem erhöhten Einsatz von Pflanzenschutzmitteln, gibt es dafür aber mehrere andere mögliche Gründe, wie etwa die breitflächige Verwendung von mineralischem Dünger und verbesserter Sorten sowie die Anwendung neuer Methoden im Pflanzenbau und in der Landtechnik. Bei Raps zum Beispiel ist in Großbritannien in den letzten 30 Jahren nur eine minimale Veränderung der Erträge zu erkennen, obwohl bei dieser Kultur breitflächig Neonicotinoide, sowohl für die Saatgutbehandlung als auch für die Sprühapplikation verwendet werden (DEFRA 2015). Deshalb wäre es wichtig zu zeigen, ob bzw. wie diese Gruppe von Pflanzenschutzmitteln zu höheren Erträgen beigesteuert hat und wie effektiv diese im Vergleich zu anderen Möglichkeiten sind, um auch zukünftige Entscheidungen zur Verwendung von Pestiziden nachhaltiger fällen zu können.

2.3. Neonicotinoide und Honigbienen

Aufgrund der vielen Applikationsformen von Neonicotinoiden gibt es zahlreiche Möglichkeiten auf welche Art und Weise Honigbienen in Kontakt mit Neonicotinoiden kommen können. Grundsätzlich werden diese entweder zur Saatgutbehandlung oder durch Sprühapplikation verwendet. Die Saatgutbehandlung, insbesondere die Saatbeizung, sowie der systemische Transport der Wirkstoffe in die Pflanzen bereiten Wissenschaftlern große Sorgen hinsichtlich der Nützlinge und vor allem Bestäuber wie Honigbienen. Das Problem liegt, wie schon dargelegt, insbesondere darin, dass kleine Mengen von Neonicotinoiden durch den systemischen Transport nicht nur in die Blätter und den Stamm, sondern auch in den Nektar und den Pollen gelangen. Die Methode der Sprühapplikation soll sogar noch höhere Rückstände verursachen (EFSA 2012). Aus diesem Grund forderte die Europäische Kommission die EFSA auf, eine Risikobewertung für Bienen durchzuführen. Prinzipiell ist zwischen äußerlichem Kontakt und oralem Kontakt über die Nahrungsaufnahme zu unterscheiden. Im Zuge der Risikowertung konzentrierte sich die EFSA auf drei Expositionspfade: Exposition durch Rückstände in Nektar und Pollen von behandelten Pflanzen, Exposition durch bei Aussaat von behandeltem Saatgut oder Granulat entstehende Stäube von nicht sachgerechten Saatgutmaschinen und Exposition durch Guttationsflüssigkeit (EFSA 2013a).

2.3.1. Exposition durch Rückstände in Nektar und Pollen

BONMATIN et al. (2005) konnte den systemischen Charakter von mit Neonicotinoiden, insbesondere mit Imidacloprid, behandeltem Saatgut bei Mais und Sonnenblume zeigen, indem sie diese in Nektar, Pollen, Stamm und Blättern nachwies. Nektar und Pollen werden von Bienen und anderen Insekten gesammelt und sind ein wichtiger Bestandteil ihrer Nahrung. Studien über Expositionen gibt es hauptsächlich von Honigbienen und Hummeln, wobei es zu Kontaminationen ausschließlich durch Rückstände aus Blüten und durch Pflanzensäfte kommen kann. Gewöhnlich sind Konzentrationen in Pollen höher als in Nektar, wobei die Menge der Rückstände jeweils von der Pflanze abhängt. Einer der Hauptpunkte für diesen Expositionsgrad ist aber die Attraktivität einer Pflanze für Bestäuber. Diese Frage ist insbesondere deshalb wesentlich, weil vor allem einige mit Neonicotinoiden behandelte Pflanzen bereits geerntet werden, bevor diese blühen und somit kein Risiko darstellen, oder gar keinen Nektar oder Pollen produzieren. Für Bestäuber attraktive Pflanzen sind zum Beispiel Sonnenblume, Mohn, Raps, Senf und Mais und stehen im Gegensatz zur Zuckerrübe und Getreide wie Weizen, Gerste und Roggen, welche für Honigbienen aber nicht attraktiv sind (EFSA 2013a). Jedoch können für andere Bestäuber Pflanzen wichtig sein, die es für Bienen nicht sind. Diese Variabilität zeigt, dass Kontaminationen nur sehr schwer kontrollierbar und vorhersagbar sind, aber hohe Rückstände immer wieder möglich sein können. Weiters muss angemerkt werden, dass Nützlinge wie Bestäuber sehr wahrscheinlich von mehreren Pflanzenschutzmittel bzw. Wirkstoffen gemeinsam oder zu unterschiedlichen Zeitpunkten kontaminiert werden und nicht nur von einem einzelnen (PARADIS et al. 2014). Die EFSA fand bei der Saatgutbehandlung Neonicotinoidrückstände von $<0,001 - 0,0086 \text{ mg kg}^{-1}$ in Nektar und $<0,001 - 0,051 \text{ mg kg}^{-1}$ in Pollen für die Kulturen Mais, Raps, Sonnenblume, Luzerne und Phacelia (EFSA 2012).

2.3.2. Exposition durch Granulatstäube bei der Aussaat von behandeltem Saatgut

GREATTI et al. (2003) zeigte als erste die Pestizidabdrift von Saatgut, das mit Neonicotinoiden behandelt wurde, so genanntes „gebeiztes“ oder „pilliertes“ Saatgut. Dabei kommt es zu einem Abrieb des Beizmittels vom Saatgut während der Aussaat in Form von Staub, auch bei neuen pneumatischen Sähmaschinen. So werden bei der Saatgutbehandlung zwar 80 - 98% der Wirkstoffe vom Saatgut aufgenommen, ein kleiner Teil aber geht bei der Aussaat verloren. Dieser reicht jedoch aus, um für Honigbienen tödlich zu sein (GIROLAMI et al. 2012, TAPPARO et al. 2012). Verschlimmert wird diese Drift durch Stoffe wie Graphit und Talk, die direkt in die Sähmaschine beigegeben werden, um eine bessere und flüssigere Aussaat zu ermöglichen. Diese Stoffe können jedoch nicht immer vollständig am Saatgut angebracht werden. Durch den Kontakt mit behandeltem Saatgut werden diese Stäube im Laufe der Saat oder spätestens bei der Reinigung der Maschine am Feld ausgebracht und fungieren so als Träger der Pestizide. Dieser Staub kann Nichtzielarten, besonders bei der Abdrift von Feldern und der Kontamination der Umgebung, durch den Kontakt oder die Ernährung von Lebewesen mit

Pflanzen mit diesen pestizidkontaminierten Stäuben, gefährden. So wurde dieser mit Pflanzenschutzmittel kontaminierte Staub an Narzissen in näherer Umgebung von Feldern gefunden, die um die Zeit der Aussaat von Mais wachsen (KRUPKE et al. 2012). GIROLAMI et al. (2012) konnten zeigen, dass Bienen, die über Felder fliegen, auf denen gebeiztes Saatgut ausgebracht wird, letale Dosen von einigen hundert Nanogramm aufweisen können, was ein Grund für den weltweit vorkommenden Totenfall von Bienen sein könnte. So gab es auch in der Landtechnik verpflichtende Maßnahmen für Landwirte, die Ausstattung der Sähmaschinen zu verbessern und die Pestizidabdrift zu minimieren. Dabei wurden verschiedenste Vorrichtungen, so genannte „Deflektoren“, bei pneumatischen Sämaschinen entwickelt und eingesetzt, die gebeiztes Saatgut und vor allem auch die Stäube davon direkt und in den Boden einarbeiten. Dadurch sollen die Aussaatbedingungen verbessert und mögliche Staubbelastungen eliminiert bzw. minimiert werden. Trotzdem befindet sich dieser Staub und daher Neonicotinoide durch die Aussaat von behandeltem Saatgut oder durch das Verwenden von Granulaten im Boden. Die Situation wird bei einer häufigen Verwendung noch verschärft, da dies zur Akkumulationen im Boden führt (BONMATIN 2015).

2.3.3. Exposition durch Guttationsflüssigkeit

Neben der Aufnahme von Neonicotinoiden in Form von Nektar oder Pollen, spielen auch Guttationstropfen eine wichtige Rolle in der Exposition von Bestäubern. Guttation ist ein generelles Phänomen, welches auf natürliche Weise durch hohen Wurzelndruck und niedrige Transpiration der Pflanze entsteht. Pflanzen, Sorten und Umweltbedingungen haben unterschiedliche Einflüsse und Auswirkungen auf die Bildung von Guttationstropfen. Dabei bilden sich bei besonderen klimatischen Bedingungen insbesondere am frühen Morgen und in der Nacht bei hoher Luftfeuchtigkeit und niedriger Temperatur kleine Tropfen. Diese Tropfen entstehen an natürlichen Öffnungen, den Hydathoden, die sich an den Blattspitzen, Blatträndern und den Stomata befinden. Guttationstropfen sind klar durchsichtig und enthalten Zucker, Aminosäuren, Proteine, Enzyme, Pflanzenhormone, Vitamine aber auch Toxine etc. und können für Bienen als mögliche Wasserquelle angesehen werden, weshalb diese damit in Kontakt kommen. GIROLAMI et al. (2009) konnte sogar zeigen, dass Guttationstropfen bei Mais Stoffmengen enthalten können, welche der Konzentration von Wirkstoffen ähnlich jener von Sprühapplikation entsprechen können. Man fand Konzentrationen über 10 mg/L bis sogar 200 mg/L, die bei Bienen zum Tod innerhalb einiger Minuten führen (FAIRBROTHER et al. 2014, SING AND SING 2013, SINGH 2014, THOMPSON 2010). Guttationstropfen von mit Saatgut behandelten landwirtschaftlichen Kulturen können daher eine weitere Kontaktquelle für Honigbienen mit Neonicotinoiden darstellen. Die Schäden von Völkern sind aber eher gering und Auswirkungen auf Brut, Überwinterung und Volksstärke wurden laut den oben genannten Quellen nicht untersucht bzw. sind auch als gering einzuschätzen. Weiters kann die Exposition durch Guttationsflüssigkeit nicht mit der Exposition durch Rückstände in Nektar und Pollen verglichen werden. Es kommt zu einem minimierten Risiko bei Verfügbarkeit von alternativen Wasserquellen und bei größeren Entfernungen

von den behandelten Pflanzen weil Bienen permanente Wasserquellen bevorzugen. Deshalb schätzt die EFSA das Risiko der Exposition mit Guttationsflüssigkeit bei Mais, Raps und Zuckerrübe als gering ein. Jedoch kommt es immer auf die Umweltbedingungen an. Laut EFSA sei weiteres Wissen notwendig, um eine eindeutigere Aussage, inwiefern Bienen dadurch geschädigt werden, treffen zu können (EFSA 2013a).

2.3.4. Einfluss, Nebeneffekte und Toxizität von Neonicotinoiden auf Honigbienen

Die Entdeckung und Verwendung von Neonicotinoiden ist ein bedeutender Punkt in Schädlings- und Resistenzmanagementprogrammen. Laut JESCHKE UND NAUEN (2008) stellen diese Wirkstoffe jedoch nur ein geringes Risiko für die Umwelt und Nichtzielorganismen dar. Relevante Einflüsse für das derzeitige Bienensterben seien biotische und abiotische Faktoren wie Ernährung, Klima, Krankheiten, Parasiten und die *Varroa* Milbe. Trotzdem gibt es vor allem mehrere Kritikpunkte, die sich auf die Saatgutbehandlung und die Spritzapplikation belaufen, weil die meisten Neonicotinoidwirkstoffe toxisch für Honigbienen sind.

Bezüglich der Nebeneffekte von Neonicotinoiden ist anzuführen, dass diese im Boden gespeichert werden und für längere Zeit, sogar für einige Jahre, dort präsent sein können. BONMATIN et al. (2005) beschäftigten sich mit Imidacloprid in Böden. Dabei untersuchte er 74 Böden unterschiedlicher Typen, klimatischer Bedingungen und landwirtschaftlicher Nutzung. Imidacloprid konnte in 91% der untersuchten Böden gefunden werden, obwohl nur auf 15% der Flächen des damaligen Jahres das behandelte Saatgut ausgebracht wurde. Von den Flächen, auf denen behandeltes Saatgut im selben Jahr verwendet wurde, konnte man Imidacloprid zu 100% nachweisen. Zu 97% fand man Imidacloprid in Böden, bei denen in den vergangenen zwei Anbaujahren vor der Forschung Saatgut behandelt wurde. Weiters zeigte die Studie, dass sich das benutzte Neonicotinoid in den Böden ansammelte, wo es bereits zwei Jahre zuvor verwendet wurde, das heißt einen höheren Wert hatte. Jedoch gibt es kaum systematische Faktoren, die die Persistenz von Neonicotinoiden zeigen und warum sich veröffentlichte Studien derart stark unterscheiden. Grund dafür sind stark variierende Faktoren wie Bodentyp, ultraviolette Strahlung, Temperatur, pH und Wassergehalt. So können im Boden die Halbwertszeiten von Neonicotinoiden 200 bis hin zu 1000 Tage betragen und somit für Monate und sogar Jahre danach bestehen bleiben. Der Transport im Boden kann durch Versickerung in tiefere Bodenschichten und in das Grundwasser erfolgen. Der Abbau selbst erfolgt durch photolytische, hydrolytische und mikrobielle Zersetzung statt, ebenso wie durch Pflanzenaufnahme und Fixierung durch Bodenpartikel. Besonders bei einem hohen organischen Anteil und in trockenen und kalten Verhältnissen kommt es zu einer hohen Persistenz von Neonicotinoiden. JONES et al. (2014) zeigen auch, dass Imidacloprid - mit Bedingungen wie es in Großbritanniens typischer landwirtschaftlicher Verwendung üblich ist - in den Böden persistenter ist als Chlothianidin und Thiamethoxam, obwohl diese beiden Wirkstoffe dort Imidacloprid bereits ersetzt haben.

Genauso wie in Böden, können auch in aquatischen Umwelten Insektizide festgestellt werden. So fanden STARNER UND GOH (2012) in 89% der gesammelten Wasserproben aus drei Regionen Kaliforniens Imidaclopridrückstände. Davon überschritten 19% die Werte der „United States Environmental Protection Agency“ für Wasserlebewesen, welche auch in der Euroäischen Union und Kanada ähnliche Maßstäbe aufweisen. Hingegen gibt es auch Studien aus Kanadas landwirtschaftlich intensiv genutzten Flächen mit regulärem Einsatz von Neonicotinoiden, welche keinerlei diesbezüglichen Nachweis im Grundwasser liefern (CCME 2007). Bezüglich des Abbaus von Neonicotinoiden im Wasser zeigt Imidacloprid bei kühlen Temperaturen und Dunkelheit eine bessere Stabilität, als bei warmen Temperaturen und einer Aussetzung von Licht. Dennoch kommt es zu keinem vollständigen Abbau der Substanzen (TISLER et al. 2009).

Trotz dieser unterschiedlichsten Faktoren weiß man umso weniger über die Metabolite und Abbauprodukte Bescheid. Diese sind besonders für Wirbeltiere toxischer als deren Ausgangsprodukte und stellen somit die eigentliche Hauptgefahr dar (BONMATIN et al. 2015).

Die Frage ist jedoch, inwiefern typische Expositionsmengen für Populationen oder Einzeltiere zu signifikanten Einflüssen führen können. Denn mit Sicherheit sind genug Lebewesen durch die weite Verwendung von Neonicotinoiden exponiert, vor allem jene, welche in engem Kontakt mit Ackerland leben.

Mehrere Studien haben die Toxizität von Neonicotinoiden untersucht. Die Bewertung von Toxizitätsgefahren für Honigbienen wird dabei durch Labor-, semi – Feld- und Feldexperimenten getestet. Auf Grund der Wirkung auf die nAChR weisen diese für Insekten eine höhere Toxizität, als Säugetiere auf. Typische LD₅₀ Werte für Neonicotinoide variieren zwischen 0,82 – 88 ng pro Insekt, die jedoch aus den unterschiedlichen aber entscheidenden Gewichtsunterschieden resultieren. LD₅₀ definiert die Menge einer Substanz, die 50% der damit ausgesetzten Individuen tötet (GOULSON 2012).

Die meisten Diskussionen bezüglich Toxizität haben sich aber auf Honigbienen konzentriert. Sehr wichtig für die akute letale Toxizität bei Insekten ist der Expositionsweg, weil orale Aussetzung toxischer ist, als der direkte Kontakt. Das resultiert aus einer schwächeren Hydrophobie und Penetration der Neonicotinoide durch die Insektenkutikula. Die orale LD₅₀ variiert sehr stark in Studien, wobei Imidacloprid, Clothianidin, Thiamethoxam, Nitenpyram und Dinotefuran, die alle Nitro - Gruppen beinhalten, eine höhere Toxizität für Honigbienen zeigen als Acetamiprid und Thiacloprid, die eine Cyano – Gruppe besitzen. Insgesamt ist Imidacloprid das am häufigsten untersuchte Neonicotinoid (IWASA et al. 2004, LAURINO et al. 2011).

Tabelle 2 listet die akute orale Toxizität und Kontakttoxizität LD₅₀ von Bienen [$\mu\text{g}/\text{Biene}$] für die Neonicotinoide Acetamiprid, Clothianidin, Imidacoprid, Thiacloprid und Thiamethoxam. Metabolite von Neonicotinoiden korrelieren auch mit der Toxizität. Das Alter der Bienen, Volk, Unterarten, Jahreszeit, Ernährung und Gesundheitszustand der Bienen beeinflussen diese jedoch sehr und führen zu einer höheren Sensitivität für Pestizide und Pathogene, welche in Studien immer mitberücksichtigt werden sollten (NAUEN et al. 2001, PETTIS et al. 2013). Bei einer Beizungsrate von 0,25 - 1,25 mg/Samen dieser Substanzen werden die akuten Toxizitäten für eine Biene jedoch weit überschritten (KRUPKE et al. 2012). Diese Variabilität und Unsicherheit vieler Experimente erhöht aber die Probleme und Schwierigkeiten bei Studien immens, die ausschlaggebend für eine eindeutige Aussage von Pestizidmanagement wären.

Tabelle 2: Akute orale Toxizität und Kontakttoxizität LD₅₀ in $\mu\text{g}/\text{Biene}$ für die wichtigsten Neonicotinoidwirkstoffe Acetamiprid, Clothianidin, Imidacoprid, Thiacloprid und Thiamethoxam (EFSA 2012).

Wirkstoff	Akute orale Toxizität pro Biene LD₅₀ [μg]	Akute Kontakt Toxizität pro Biene LD₅₀ [μg]
Acetamiprid	14.530	8.090
Clothianidin	0.004	0.028
Imidacloprid	0.004	0.081
Thiacloprid	17.320	38.820
Thiamethoxam	0.005	0.024

Wichtig bei der Beurteilung von Toxizität ist, dass eine breitflächige und intensive Nutzung von Pflanzenschutzmitteln stets auch eine Kehrseite hat. Aufgrund der Bevorzugung von Phänotypen resultiert die Bildung von Resistenzen, die bei einigen Insektenarten bereits nachweislich für Neonicotinoide existieren. Resistenzen entstehen durch eine falsche oder zu intensive Nutzung von Insektiziden oder Akariziden gegen Schädlinge. Dadurch kommt es zur Selektion von insensiblen Formen, sodass ganze Populationen resistent werden können. Resistenz ist definiert als “a heritable change in the sensitivity of a pest population that is reflected in the repeated failure of a product to achieve the expected level of control when used according to the label recommendation for that pest species” (IRAC 2014). Oft führt eine Resistenz gegen einen gewissen Wirkstoff auch zur Kreuzresistenz gegenüber anderen chemisch verwandten Substanzen, welche auf einer genetischen Änderung basieren. Denn Wirkstoffe einer bestimmten chemischen Gruppe haben denselben Zielort und teilen so einen gemeinsamen Wirkmodus. Dies hat zur Folge, dass eine Substanz nicht mehr wirksam gegenüber Schädlingen ist. Darüber hinaus hat es die Folge, dass nicht nur ein Wirkstoff funktionslos ist, sondern alle Wirkstoffe mit demselben Wirkmodus keine Effektivität mehr zeigen. Daher ist es das Ziel eines guten und erfolgreichen Resistenzmanagements, die Evolution der Resistenz zu verhindern bzw. zu verzögern. Die Resistenz zu verhindern ist jedenfalls einfacher, als die Empfänglichkeit eines Schädlings gegenüber einem Wirkstoff wieder hervorzurufen (IRAC 2014).

So kommt es bei der Kartoffel, einer Kultur, in der die Anwendung der Neonicotinoide sehr häufig ist, bereits zu ersten Resistenzen. So beschreibt SLADAN et al. (2012) und SZENDREI et al. (2012), dass es bereits in der USA und Serbien eine häufige Resistenz der Kartoffelkäfer, *Leptinotarsa decemlineata*, gegenüber Imidacloprid gibt. Erste Populationen sind auch in manchen Gebieten gegenüber Thiamethoxam resistent. Weiters ist es auch schon bei einigen anderen wichtigen Schädlingen zu Mutationen in den nAChR gekommen, die zu minimierter Sensitivität gegenüber Neonicotinoiden führten (CROSTHWAITE et al. 2014, IRAC 2014).

2.4. Bienenbrot bzw. Pollen

Eine ausgewogene Ernährung mit ausreichend Kohlenhydraten, Proteinen, Fetten, Vitaminen und Mineralstoffen ist für die Aufzucht der Brut, der Entwicklung der Arbeiterinnen von Honigbienen und somit für das Überleben des Bienenvolkes unerlässlich. Im Superorganismus Honigbiene hängen diese Faktoren eng miteinander zusammen und das Fehlen einer dieser Faktoren wirkt sich negativ auf die anderen aus. So benötigen Honigbienen prinzipiell nur Nektar und Pollen, um die ernährungsphysiologischen Bedingungen zu erfüllen. Denn Honig ist nur konzentrierter Nektar aus Blüten oder zuckerhaltigen Ausscheidungen von Insekten. Blütenpollen ist die einzige natürliche Proteinquelle für Honigbienen, weshalb dieser auch sehr wichtig für Bienen ist (BROTSCHNEIDER UND CRAILSHEIM 2010).

2.4.1. Definition und Zusammensetzung von Pollen

Pollen wird in den Antheren (Staubblättern) von Blüten gebildet und stellt den männlichen Samen dar. Dieser besteht aus vielen Mikrosporen, den Pollenkörnern, die je nach Pflanzenart in Form, Größe, Farbe, Keimöffnung und Oberfläche stark variieren. Daher kann mit dem Pollen jede Pflanzenart charakterisiert werden und man kann auch die botanische Herkunft des Pollens bestimmen. Im weiteren Sinne kann man dadurch in der Palynologie, dem Studium von Sporen und Pollenkörnern, auf die geografische Herkunft schließen. Da man Pollen auch in Honig, Gelee Royal und Propolis findet, können dadurch auch diese Produkte auf ihre botanische und geografische Herkunft untersucht werden.

Bienen fliegen von Blüte zu Blüte um Nektar und Pollen zu sammeln. Pollen werden in sogenannten Pollenhöschchen mit dem Pollenkamm auf den Hinterbeinen gesammelt, haften aber auch am Haarkleid des gesamten Körpers der Bienen. Dabei werden kleine Mengen der Pollenkörner von Blüte zu Blüte übertragen, und führen zur Bestäubung, wodurch es anschließend zur Befruchtung, der Bildung der Frucht und somit zur Vermehrung der Pflanze kommt. Mit dem gesammelten Pollen der Pollenhöschchen bringen Honigbienen pro Flug zwischen 8 und 20 mg in das Volk und müssen dafür ca. 80 Blüten befliegen. Pollen stellt die einzige Proteinversorgung dar und wird besonders für die

Aufzucht der Larven verwendet. Bei ungenügender Proteinversorgung durch Pollen wird die Anzahl an produzierten Larven minimiert. Zur Eigenversorgung benötigt ein Bienenvolk pro Jahr an die 35 kg Pollen. Dementsprechend wichtig ist Pollen für die Ernährung von Bienen. Die Qualität und die Vielfalt von Pollen sind entscheidend für die Physiologie und vor allem für die Toleranz von Honigbienen gegenüber Infektionen von Schädlingen und Krankheiten (BROTSCHEIDER UND CRAILSHEIM 2010, DI PASQUALE et al. 2013).

Bienenbrot bezeichnet den in den Waben eingelagerten Pollen. Dieser wird von den Honigbienen mit Enzymen, organischen Säuren und Honig fermentiert und somit haltbar gemacht, weil dadurch auch der Wassergehalt sinkt. Dieser eingelagerte Pollen wird auch mit einer Honig – Propolissschicht überzogen und verschlossen, um Pilz – oder Bakterienbefall zu verhindern. Prinzipiell hat Bienenbrot die gleichen Inhaltsstoffe wie Pollen. Jedoch ist frischer Pollen direkt von den Blüten nicht haltbar und müsste getrocknet werden, wie er auch für den menschlichen Verzehr verkauft wird. So werden durch die Fermentierung oder Aufbereitung der Bienen manche Stoffe aufgeschlossen und für den Stoffwechsel des menschlichen Körpers besser verfügbar gemacht.

Die Ernte von Bienenbrot ist in Mitteleuropa eher untypisch und die erhältlichen Produkte stammen meist aus Ost – und Südeuropa, wo dieses mechanisch mit „Pollenhebern“ aus den Waben geerntet wird. Pollen wird in unterschiedlichsten Pollenfallen geerntet, die den Pollensammlerinnen den Pollen der Hinterbeine abstreifen, wenn diese in den Bienenstock zurückkehren. Anschließend wird dieser getrocknet und so haltbar gemacht.

Je nach Herkunft der Pollen kann dieser von verschiedensten Pflanzen stammen und dementsprechend kann die Zusammensetzung variieren. Generell besteht dieser aus rund 15 - 55% Kohlenhydrate, 10 - 40% Proteinen, ca. 12% Aminosäuren, einem breiten Spektrum an Mineralstoffen wie Kalium, Magnesium, Kalzium, Eisen, Silizium, Phosphor, Vitaminen (B1 – B12, C, D, E, K), Fett (Alpha Linolensäure), sekundären Pflanzenstoffen, Phosphate, Amylase, Saccharase, Rutin, antibiotischen Substanzen und Hormonen (BORT 2010).

2.4.2. Relevanz für die menschliche Ernährung

Obwohl Bienenpollen und andere Bienenprodukte für die menschliche Ernährung nur eine untergeordnete Rolle spielen, wären diese ein ideales Lebensmittel, weil sie alle Stoffe enthalten, die der menschliche Organismus braucht. Bienenpollen ist reich an Stoffen, die der menschliche Körper selbst nicht produzieren kann, sodass diese mit der Nahrung zugeführt werden müssen. Insgesamt hat er eine sehr gute Wirkung auf den menschlichen Stoffwechsel und kann besonders bei Leistungsschwäche, Erkrankungen der Leber, erhöhten Blutfettwerten, Prostataerkrankungen und

Wechseljahrbeschwerden hilfreich sein. Jedoch ist die Produktion im Sinne einer Ernte von Pollen aufwendig und resultiert wahrscheinlich deshalb in einer geringen Nutzung.

Pollen ist auch in Honig enthalten, der ebenfalls ein wertvolles Lebensmittel ist, der aber häufiger für die Ernährung verwendet wird als Pollen. Jedoch gibt es kaum wissenschaftliche Belege für die positive Auswirkung dafür und Honig und andere Bienenprodukte werden hauptsächlich in der Volksheilkunde auf vielfältige Weise genutzt. Honig enthält rund 80% verschiedenste Zucker, 15 – 18% Wasser und nur 3 – 6% Spurennährstoffe, Enzyme, Hormone, aromatische Säuren, Vitamine etc., welche Honig einzigartig in der positiven Wirkung für unseren Stoffwechsel machen. So führt Honig zu einer Verminderung der Belastung mit freien Radikalen und soll das Immunsystem stärken. Weiters konnte eine positive Wirkung im Schlafverhalten, der Verdauung, der Leistungsfähigkeit, bezüglich Muskelkrämpfen und Kopfschmerzen, nicht aber die Verbesserung einiger Blutwerte gezeigt werden. Diese Ernährungsstudie wurde an 50 österreichischen Erwachsenen durchgeführt, die täglich mindestens 50 g Honig aßen, und zeigte, dass Honig einen wichtigen Beitrag zur Stärkung der Gesundheit und Vorbeugung gegen Krankheiten leisten kann (BORT 2010, FRANK 2007).

2.4.3. Pestizidrückstände

Der Einfluss von Pestizidrückständen auf Bestäuber und die wachsenden Sorgen darüber spiegeln sich insbesondere auch in der großen Anzahl an Literatur der letzten Jahre und der Präsenz in den Medien wieder. Denn Konsumenten wollen ein natürliches, gesundes und rückstandsfreies Produkt von hoher Qualität und stellen daher hohe Erwartungen und Ansprüche an Bienenprodukte wie Honig, Pollen, Gelee Royal und Propolis. Dementsprechend gibt es Laboranalysen und Qualitätsuntersuchungen für Bienenprodukte, um der Möglichkeit einer Kontamination mit verschiedensten Substanzen zu minimieren.

Grundsätzlich können Kontaminationen aus der Umwelt oder der Imkerei resultieren. Kontaminanten aus der Umwelt sind Schwermetalle, radioaktive Stoffe, Pestizide wie hauptsächlich Insektizide, aber auch Herbizide, Fungizide und Bakterizide aus der Landwirtschaft, organische Schadstoffe, genetisch modifizierte Organismen und ab und zu auch pathogene Bakterien. In der imkerlichen Praxis können sowohl synthetische als auch natürliche Akarizide und Antibiotika Bienenprodukte kontaminieren, die hauptsächlich aus der Behandlung gegen *Varroa destructor* resultieren. Produkte, die für die Wachsmottenbekämpfung verwendet werden, sind dabei eher irrelevant, weil diese in Österreich nur selten verwendet werden (BOGDANOV 2006). Generell weist Pollen bzw. Bienenbrot höhere Pestizidrückstände auf als Honig, denn aufgrund des lipophilen Charakters der Pollen haften Pestizide besser auf Pollen als auf dem hydrophilen Honig (VON DER OHE UND MARTENS 2011).

Die rohen Bienenprodukte wie Pollen, Nektar, Honigtau und andere Pflanzenausscheidungen können durch Boden, Pflanzen, Wasser und Luft kontaminiert werden. Diese werden dann von Bienen in das Volk transportiert und findet sich in sämtlichen Produkten des Bienenvolkes. Je nach Persistenz bleiben auch Rückstände verschiedenster Pestizide zurück. So können in derzeitigen Bienenprodukten noch immer Rückstände von persistenten Wirkstoffen wie DDT, HCB, Dieldrin etc. gefunden werden, die schon längst verboten sind und auch nicht mehr verwendet werden (SANCHEZ-BAYO UND GOKA 2014). Wenn Honigbienen während der Futtersuche aber mit hochtoxischen Substanzen in Berührung kommen, sterben diese noch bevor sie es zurück in das Volk schaffen. Pestizide werden dadurch gar nicht ins Volk transportiert und sind daher auch nicht in den Bienenprodukten.

Wenn Bienen aber in Kontakt mit großen Mengen an nicht- oder nur mitteltoxischen Substanzen kommen, kann dies keine letalen Folgen haben. So kann es sein, dass Bienen in Berührung mit Substanzen kommen, welche sich dann auch in großen Mengen im Volk ablagern. Wenn diese aber nicht toxisch für Bienen sind, haben diese Rückstände auch keine Auswirkungen, sind aber im Nahrungskreislauf und möglicherweise für Konsumenten schädlich. So können nicht- und mitteltoxische Substanzen in signifikanten Mengen das Bienenvolk kontaminieren und somit auch in Bienenprodukten gefunden werden.

Fraglich ist inwiefern solche subletalen Dosen von möglichen toxischen Substanzen auch schädlich für den Menschen sind. Verschiedenste Untersuchungen und Analysen in Europa und vielen anderen Ländern weisen geringe Mengen an Rückständen von Pestiziden in Bienenprodukten nach. Auch wenn diese Rückstände sehr gering sind können die Konsumenten dadurch beunruhigt werden. Um Konsumenten vor negativen Effekten von Pestiziden in Lebensmitteln zu schützen, dürfen Rückstände deshalb gewisse Rückstandshöchstgrenzen, englisch „maximum residue limits“ (MRL), nicht überschreiten. In der EU und auch in anderen Ländern wurden daher Rückstandshöchstgrenzen von genutzten Wirkstoffen für Bienenprodukte definiert, die eine Höchstmenge von legal tolerierten Pestiziden in oder auf Nahrungsmitteln und Futtermitteln darstellen, wenn Pestizide korrekt angewendet wurden. Denn es ist wichtig den Konsumenten sichere Nahrungsmittel mit keinen oder nur möglichst niedrigen Rückständen zu garantieren. Relevant sind dabei aber nicht nur die Wirkstoffe selbst, sondern auch deren Metabolite. Bei Wirkstoffen ohne spezielle Rückstandshöchstgrenzen einigte man sich auf einen generellen Wert von $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ (EU Pesticide database). Tabelle 3 zeigt die derzeitigen Rückstandshöchstgrenzen der wichtigsten Neonicotinoide Acetamiprid, Clothianidin, Imidacloprid, Thiacloprid und Thiamethoxam für Honig und andere Bienenprodukte wie Gellee Royal und Pollen in der EU.

Tabelle 3: Rückstandshöchstgrenzen für Honig (Gelee Royal, Pollen) in mg kg^{-1} für die wichtigsten Neonicotinoidwirkstoffe Acetamiprid, Clothianidin, Imidacloprid, Thiacloprid und Thiamethoxam in der EU (EU PESTICIDE DATABASE).

Wirkstoff	Rückstandshöchstgrenze für Honig (Gelee Royal, Pollen) [mg kg^{-1}]
Acetamiprid	0,05
Clothianidin	0,01
Imidacloprid	0,05
Thiacloprid	0,20
Thiamethoxam	0,01

Mehrere Studien behandeln die Rückstände von Neonicotinoiden in Bienenprodukten, vor allem Honig. Aber nur eine geringe Anzahl beschäftigt sich dabei mit Kontaminationen in Pollen oder Bienenbrot. Dabei werden Proben gezielt auf Neonicotinoide oder andere Pflanzenschutzmittel untersucht oder es wird eine Analyse auf ein breites Spektrum von Rückständen gemacht. Zum Beispiel untersuchte GIROUD et al. (2013) 32 Bienenbrotproben und fand Rückstände von Imidacloprid ($0,31 \text{ ng g}^{-1}$) und Thiacloprid ($177,1 \text{ ng g}^{-1}$), wobei Thiacloprid in 24 und Thiamethoxam in 12 Proben gefunden wurde. POHORECKA et al. (2012) fanden alle in Raps genutzten Neonicotinoide in Pollen- und Honigproben wieder, jedoch mit geringeren Werten als die akute orale - und Kontakt - LD_{50} . So konnten dabei keine negativen Effekte für Bienen nachgewiesen werden, wobei die Proben aus landwirtschaftlich nicht intensiv genutzten Gebieten stammten. Die häufigsten Pestizide dabei waren Thiamethoxam, Thiacloprid und Acetamiprid. Auch bei Mais fanden POHORECKA et al. (2013) keine Zusammenhänge zwischen Bienenmortalität und Neonicotinoiden, obwohl Rückstände von Clothianidin mit $10 - 41 \text{ ng g}^{-1}$ gefunden wurden. Maispollen wurde außerdem sehr selten in Pollen gefunden. CHEN et al. (2013) konnten Rückstände von Imidacloprid und Thiamethoxam in verschiedensten Pollenproben nachweisen. STONER UND EITZER (2013) entdeckten 60 Pestizide und Metabolite in Pollen und benutzten orale LD_{50} und Kontakt - LD_{50} Werte, um einen „Pollen Gefahr Quotient“ (Pollen Hazard Quotient) zu berechnen, womit alle gefundenen Pflanzenschutzmittel nach deren Gefährlichkeit eingestuft wurden. LAMBERT et al. (2013) hingegen fanden am häufigsten das Fungizid Carbendazim und zwei Akarizide, die für die Behandlung von *Varroa destructor* verwendet werden. Generell waren die Rückstände in Honig häufiger, die Konzentrationen aber waren in Pollen am Höchsten.

3. Analyse

3.1. Einführung

Bienenpollen bzw. Bienenbrot ist eine sehr komplexe Matrix und weist eine hohe Herausforderung an die Analyse von Pestizidrückständen auf. So sind die Methoden für Honig und Pollen ähnlich, jedoch gibt es aber für Pollen bzw. Bienenbrot wesentlich weniger publizierte Methoden, die sich mit der Detektion von Rückständen, insbesondere Neonicotinoiden, beschäftigen (GIROUD et al. (2013), POHORECKA et al. (2012), CHEN et al. (2013), STONER UND EITZER (2013), LAMBERT et al. (2013)). RIAL – OTERO (2007) zeigt eine Übersicht über die Möglichkeiten der Extraktion von Pestiziden in Honigprodukten.

In sämtlichen Analysen und der Validierung dieser Arbeit hielt man sich an SANCO (2013) und EURACHEM (2014).

3.2. Experiment

3.2.1. Chemikalien

Die verwendeten analytischen Standards und Substanzen sind in Tabelle 4 gelistet. Acetamiprid, Clothianidin, Imidacloprid, Thiacloprid und Thiamethoxam wurden von Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Deutschland) bezogen. Die internen Standards Acetamiprid – d3 und Thiamethoxam – d3 sind von Sigma – Aldrich Co. LLC (St. Louis, MO). Alle Standards hatten eine Reinheit von $\geq 98\%$. Wasser und Acetonitril (ACN) waren von Sigma - Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, Magnesiumsulfat ($\geq 99,5\%$) und di-Natrium citrat sesquihydrat ($\geq 99,0\%$) von Sigma – Aldrich. Natriumchlorid ($\geq 99,5\%$) von Merck KGaA (Darmstadt) und tri-Natrium citrate dihydrat ($\geq 99,0\%$) von Sigma – Aldrich co. LLC. PSA SPE Bulk Sorbent und C18 Endcapped SPEBulk Sorbent von Agilent Technologies, Santa Clara, CA.

Tabelle 4: Herkunft und Reinheit der verwendeten Standards und Substanzen.

Substanz	Lieferant	Reinheit
Acetamidrid	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Deutschland	99,0%
Clothianidin	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Deutschland	99,5%
Imidacloprid	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Deutschland	99,5%
Thiacloprid	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Deutschland	99,2%
Thiamethoxam	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Deutschland	99,0%
Acetamidrid - d3	Sigma - Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO	≥ 98,0%
Thiamethoxam - d3	Sigma - Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO	≥ 98,0%
Magnesium sulfate	Sigma - Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO	≥ 99,5%
Sodium chloride	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	≥ 99,5%
Tri-Natrium citrat dihydrat	Sigma - Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO	≥ 99,0%
Di-Natrium citrat sesquihydrat	Sigma - Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO	≥ 99,0%
PSA SPE Bulk Sorbent	Agilent Technologies, Santa Clara, CA	
C18 Endcapped SPE Bulk Sorbent	Agilent Technologies, Santa Clara, CA	

3.2.2. Standardlösungen

3.2.2.1. Stammlösungen

Stammlösungen der fünf Substanzen und der beiden deuterierten internen Standards wurden mit einer Konzentration von 10000 µM in Acetonitril hergestellt. Die Reinheit der Substanzen wurde bei der Berechnung der Konzentration berücksichtigt. Dabei wurde jeweils 1 mg Substanz in eine gläserne 1,5 mL Kurzgewindeflasche (Markus Bruckner Analysentechnik) gewogen, der entsprechende Anteil an Acetonitril hinzugefügt und die Substanzen gelöst. Diese Stammlösung wurde gleich anschließend für die Herstellung der Verdünnungen zur Anreicherung und für die Kalibration verwendet. Für jede Messung bzw. Validierung wurde eine neue Stammlösung hergestellt. Die Stammlösungen wurden nach Verwendung bei -80 °C eingefroren und aufgehoben.

3.2.2.2. Standardlösungen

Aus den Stammlösungen wurden Standardlösungen hergestellt. Für die Kalibration wurde eine 200 µM, 10 µM und 1 µM Mischung der Standards hergestellt, wodurch die Kalibration mit den sieben Punkten 0,01 µM, 0,05 µM, 0,1 µM, 0,25 µM, 0,5 µM, 1 µM und 2,5 µM hergestellt wurde, welcher auch die Internen Standards beigemischt wurden. Aus der Standardlösung wurden auch die drei unterschiedlichen Konzentrationslevel für die Anreicherung hergestellt. Die Kalibrationsstandards wurden in 30% Acetonitril gelöst, um die Kalibration und Extraktion in demselben Acetonitrilverhältnis zu gewährleisten. Dafür wurden zuerst fünf unterschiedliche Acetonitrilverhältnisse für die fünf Standards getestet, wobei 30% Acetonitril die besten Ergebnisse ergab, weil es die höchste Peakfläche aufwies. Dies ist in Abbildung 3 ersichtlich.

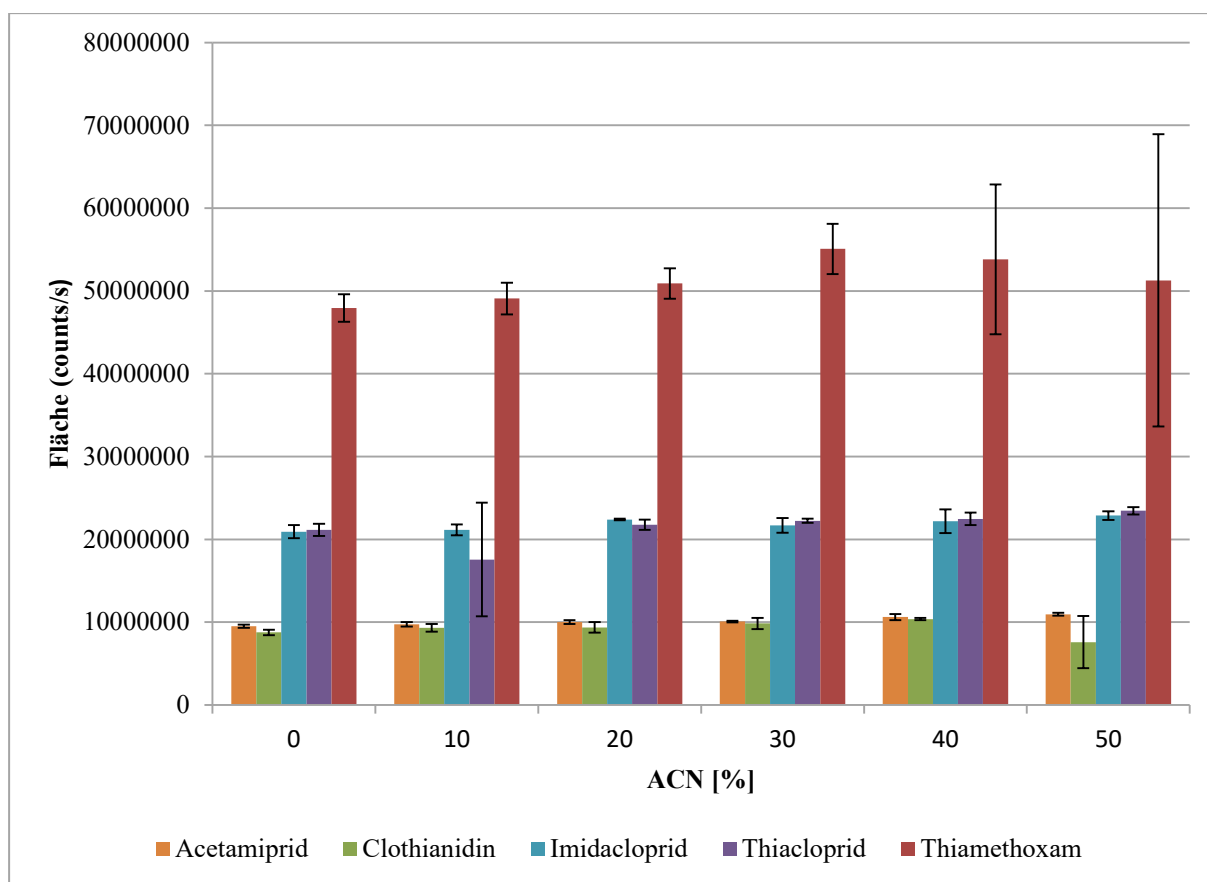


Abbildung 3: Unterschiedliche ACN - Gehalte [%] für die Substanzen Acetamiprid, Clothianidin, Imidacloprid, Thiacloprid und Thiamethoxam.

3.2.2.3. Internen Standardlösungen

Aus den Stammlösungen der deuterierten internen Standards Acetamiprid – d₃ und Thiamethoxam – d₃ wurde zuerst eine 250 µM und anschließend eine 10 µM Lösung hergestellt, womit die Kalibrations- und Anreicherungslösung so vermengt wurde, dass der Interne Standard immer eine Endkonzentration von 1 µM hatte.

3.2.3. Standardaddition

Zur Anreicherung der Neonicotinoide in den Bienenbrotproben wurde auch die Standardlösung verwendet. Dabei wurden Proben verwendet, in denen aufgrund des Standortes und der Auswinterung der Bienenvölker vermutet wurde, dass darin keine Rückstände der Pestizide zu finden sind. Die Standardaddition erfolgte durch Hinzufügen der Arbeitslösung zu den Bienenbrotproben, welche in drei Konzentrationslevel hergestellt wurde: Level 1, 2 und 3. Die genauen Konzentrationen der drei Levels sind in Tabelle 5 ersichtlich.

Tabelle 5: Konzentrationen der Level 1, 2 und 3 der Substanzen Thiacloprid, Acetamiprid, Imidacloprid, Clothianidin und Thiamethoxam.

Substanz	Level 1 (μM)	Level 2 (μM)	Level 3 (μM)
Thiacloprid	0.21	0.75	1.50
Acetamiprid	0.75	1.00	1.50
Imidacloprid	0.20	0.39	0.78
Clothianidin	0.08	0.41	0.83
Thiamethoxam	0.17	0.34	0.68

3.2.4. Proben

Alle untersuchten Bienenbrotproben kamen aus österreichischen Bienenvölkern des Imkers Dr. Stefan Mandl. Bei allen Proben handelte es sich wahrscheinlich um Pollen, den die Bienen noch vor dem Winter wegen des milden Herbstes eingelagert hatten. Eine Analyse des Bienenbrot, um welche Pflanzen es sich genau handelt, wurde nicht durchgeführt. Im Februar 2014 wurde das Bienenbrot aus den Bienenwaben geschnitten und zuerst bei $+4^{\circ}\text{C}$ gekühlt gelagert und anschließend bei -80°C eingefroren.

3.2.5. Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung basierte auf einer abgeänderten Methode für die Analyse von Pestizidrückständen. Diese wird QuEChERS genannt und steht für schnell, einfach, billig, effektiv, robust und sicher (englisch „quick, easy, cheap, effective, rugged and safe“) (ANASTASSIADES et al. 2003, ANASTASSIADES). Wir orientierten uns an der Methodik von POHORECKA et al. (2012), PARADIS et al. (2014) und GIROUD et al. (2013).

3.2.6. Analyse durch LC-MS Ionenfalle

Die Analyse des Bienenbrot wurde auf einem Agilent 6340 LC-MS System durchgeführt. Entscheidend bei einer Ionenfalle ist die Massenansammlung, die selektive Massenisolierung, die Anregung zur Kollision und der Detektion der selektierten Fragmentmassen, um ein Massenspektrum zu produzieren.

Prinzipiell besteht eine Ion Trap aus einer Ringelektrode und zwei Endkappen zum Einlass und Auswurf der Ionen. An die Ringelektrode wird Wechselspannung angelegt und es entsteht ein Quadrupol- Feld, welches Ionen speichert. Durch Änderung der elektrischen Potenziale werden keine weiteren Ionen eingelassen und unerwünschte Ionen ausgeschlossen. Durch Helium als Kollisionsgas werden die angesammelten Ionen gebremst und die Ionenwolke im Zentrum positioniert. Die akkumulierten Ionen werden für unterschiedliche Zeiten in der Falle aufbewahrt, dann nach ihrer

Masse analysiert und mit steigendem Molekulargewicht ausgestoßen. Weiters kann ein Vorläuferion isoliert und die anderen Ionen ausgestoßen werden, damit nur das Vorläuferion durch Kollision mit Helium als Kollisionsgas fragmentiert wird. Dadurch hat die Ion Trap gewisse Vorteile. So kollidiert nur das Vorläuferion mit Helium und die Produktionen werden nicht angeregt. Dabei kann das Hintergrundrauschen stark reduziert und das Signal – Rauschverhältnis verbessert werden, was eine bessere Nachweisstärke bedeutet. Durch die Fragmentierung mit Helium als Kollisionsgas wird auch eine höhere Selektivität erreicht (AGILENT 2006, LOTTSPREICH UND ENGELS 2006).

Die Ionenfalle war mit einer Electrospray Ionisierung (ESI) ausgestattet und die Ionisierung wurde im positiven Modus durchgeführt. Verwendet wurde „Multiple Reaction Monitoring“(MRM) mit zwei Übergängen pro Substanz, wobei ein Übergang als Quantifizierung (engl. „quantifier“) und der andere als Qualifizierung (engl. „qualifier“) verwendet wurde, um eine möglichst hohe Sensitivität und Selektivität zu erreichen.

Abbildung 4 zeigt die verwendete Agilent 3D-Ionenfalle.



Abbildung 4: Für die Analyse verwendete Ionenfalle Agilent 6340 mit HPLC.

Die Ionenfalle wurde mit der ChemStation 6300 Series Trap LC/MS Software 6.1 von Agilent Technologies bedient. Zur Integrierung wurde QuantAnalysis (Version 1.8, 6300 Series Ion Trap

LC/MS) und DataAnalysis (Version 3.4, 6300 Series Ion Trap LC/MS) von Bruker Daltonik GmbH verwendet. Ausgewertet wurde mit Microsoft Excel (Version Office 2007).

Die Retentionszeiten und Ionenverhältnisse der Standards wurden mit den Proben zur Identifizierung verglichen. Die Ionen Verhältnisse wurden dabei mithilfe der Flächeninhalte der Peaks der einzelnen Substanzen errechnet. Außerdem wurde die relative Differenz der Proben und der Ionenverhältnisse der angereicherten Standards berechnet.

Die Quantifizierung der Substanzen erfolgte mittels 5 – Punktkalibrationen (0,01 μM bis 0,5 μM). Die Kalibrationsgeraden wurden durch lineare Regression und gewichteter linearer Regression ($1/x$) erstellt. Acetamiprid – d3 und Thiamethoxam – d3 wurden als interne Standards eingesetzt, wobei Thiamethoxam – d3 für alle Standards (Acetamiprid, Clothianidin, Imidacloprid, Thiacloprid und Thiamethoxam) verwendet wurde. Diese wurden eingesetzt, um Analytverluste während der Probenvorbereitung und Matrixeffekte zu kompensieren.

4. Ergebnisse

Hauptziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur Ermittlung der derzeit in Österreich eingesetzten und zugelassenen fünf Neonicotinoide Acetamiprid, Clothianidin, Imidacloprid, Thiacloprid und Thiamethoxam. Für die Entwicklung und Validierung der analytischen Methode wurde Bienenbrot in drei Levels (Level 1, 2 und 3) angereichert. Diese drei Levels wurden an die Rückstandshöchstgrenzen angelehnt, weil dies laut SANCO (2013) empfohlen wird.

4.1. Methodenentwicklung

4.1.1. Probenvorbereitung

Bei der QuEChERS Probenvorbereitung orientierten wir uns an POHORECKA et al. (2012), PARADIS et al. (2014) und GIROUD et al. (2013). Die QuEChERS Extraktionsmethode wurde für unsere Bedingungen wie folgt abgeändert und angepasst:

Bei der Extraktion wurde in einem 15 mL Falcon Tube 1 g Probe mit 100 μ L internem Standard angereichert und vermischt. Anschließend wurden 6 mL ACN und 5 mL H₂O hinzugefügt und für eine Minute gemischt. 2 g Magnesiumsulfat, 0,5 g Natriumchlorid, 0,5 g Tri-Natriumcitrat Dihydrat und 0,25 g Natriumcitrat dibasisch Sesquihydrat wurden hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben händisch für eine Minute geschüttelt und fünf Minuten zentrifugiert, bevor diese für ca. eine Stunde bei -20° C eingefroren wurden. 2,5 mL des ACN Überstandes wurden dann in einem 5 mL Eppendorf Tube mit 600 mg Magnesiumsulfat, 125 mg PSA SPE Bulk Sorbent und 125 mg C18 Endcapped SPE Bulk Sorbent hinzugegeben, eine Minute vermischt und eine Minute zentrifugiert. Davon wurden 1,5 mL des Überstandes in einen 2,5 mL Eppendorf Tube überführt und eingedampft. Die Rückstände wurden in 200 μ L ACN aufgelöst und 30 μ L davon mit 70 μ L H₂O in einer 1,5 mL Kurzgewindeflasche verdünnt und dann gemessen. Die restlichen 170 μ L wurden in eine andere Kurzgewindeflasche pipettiert und bei -80 °C gelagert.

4.1.2. LC Optimierung

Für die chromatographische Trennung wurde eine Agilent Zorbax SB – C18 Säule (2,1 x 50 mm; 1,8 μ m) mit einer Agilent Zorbax SB – C8 Vorsäule (2,1 x 30 mm; 3,5 μ m) verwendet. Die Temperatur des Säulenofens betrug 40 °C. Die Mobile Phase A bestand aus 98,9% H₂O, 1% ACN und 0,1% Ameisensäure (HCOOH) und die Mobile Phase B aus 98,9% ACN, 1% H₂O und 0,1% HCOOH. Die Flussrate war 250 μ L min⁻¹ mit einem Injektionsvolumen von 5 μ L. Der finale Gradient ist in Tabelle 6 gezeigt und wurde nach der Optimierung immer angewendet.

Tabelle 6: Chromatographischer Gradient der LC-MS/MS Methode mit Mobiler Phase A (98,9% H₂O; 1% ACN; 0,1% HCOOH) und Mobiler Phase B (98,9% ACN; 1% H₂O; 0,1% HCOOH).

Zeit [min]	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]
0,0	95	5
15,0	80	20
15,1	20	80
16,0	20	80
16,1	95	5
20,0	95	5

4.1.3. Optimierung der MS Bedingungen

Bei der Methodenentwicklung mussten die Substanzen Acetamiprid, Clothianidin, Imidacloprid, Thiacloprid, Thiamethoxam, Acetamiprid – d₃ und Thiamethoxam – d₃ optimiert werden. Dabei wurden Lösungen von 10 µM hergestellt und einzeln mittels einer Spritze über eine Spritzenpumpe mit T-Stück in einem Fluss von 250mL/min und 50%/50% Gradient A/B eingeführt. Die MS Parameter Kapillare, Endplatte Offset, Vernebler, Trockengas, Trockentemperatur, Skimmer, Cap Exit, Octopol 1 und 2 DC, Octopol RF, Linse 1 und 2 und Trap Drive wurden dabei automatisch für jede Substanz einzeln optimiert. Ziel dieser Optimierung war das Erreichen von Signalen mit möglichst hoher Intensität.

In einem zweiten Schritt wurde für alle Substanzen auch das Masse – zu – Ladung – Verhältnis (m/z) der Vorläuferionen und der Produktionen, also die Übergänge, und die Retentionszeiten ermittelt. Es wurden für jede Substanz zwei Produktionen gewählt. Diese sind neben den Vorläuferionen und der Retentionszeit in Tabelle 7 ersichtlich. Dabei entsprachen die Peaks der analysierten Proben immer den Kalibrationsstandards, im Sinne der von SANCO (2013) vorgegebenen Retentionszeit ± 0,2 min, der Peakform und dem Verhältnis der Intensitäten der Produkt- bzw. Fragmentionen.

Tabelle 7: Optimierte MS Parameter für beide MRM Übergänge der Substanzen Acetamiprid, Clothianidin, Imidacloprid, Thiacloprid, Thiamethoxam, Acetamiprid – d3 und Thiamethoxam – d3, wobei der Quantifier jeweils fett gedruckt ist.

Substanz	m/z des Vorläuferion $[M+H]^+$	m/z des Produktion	Retentionszeit t_R [min]
Acetamiprid	222,9	125,9	14,8
	222,9	195,9	14,8
Clothianidin	249,8	131,8	11,2
	249,8	168,9	11,2
Imidacloprid	255,9	175,0	12,2
	255,9	208,9	12,2
Thiacloprid	252,9	125,8	16,5
	252,9	185,8	16,5
Thiamethoxam	291,9	210,9	8,7
	291,9	245,9	8,7
Acetamiprid - d3	225,9	183,9	14,8
	225,9	198,9	14,8
Thiamethoxam - d3	294,9	213,9	8,7
	294,9	248,9	8,7

Während der Methodenentwicklung wurde auch das Ionenfallen - System mit einem Thermo TSQ Vantage Triple-Quadrupolmassenspektrometer System verglichen. Dabei wurden die Bestimmung- und Nachweisgrenzen der Kalibration beider Systeme gegenübergestellt. Jedoch war die Ionenfalle sensitiver und so wurden alle Messungen der Proben mit der Ionenfalle durchgeführt. Der Datenvergleich zwischen Ionenfalle und TSQ Vantage ist in Tabelle 8 abgebildet.

Tabelle 8: Vergleich der instrumentellen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in nM von Agilent 3D-Ionenfalle und TSQ Vantage Triple-Quadrupolmassenspektrometer.

Analyt	Produktion	Ion Trap [nM]		TSQ Vantage [nM]	
		LOD	LOQ	LOD	LOQ
Thiacloprid	252,9 > 125,8	33,8	112,7	5,8	19,2
	252,9 > 185,8	2,0	6,7		
Thiamethoxam	291,9 > 210,9	2,3	7,8	8,4	28,0
	291,9 > 245,9	8,0	26,7		
Clothianidin	249,8 > 131,8	1,7	5,6	0,4	1,4
	249,8 > 168,9	3,3	10,9		
Imidacloprid	255,9 > 175,0	1,8	6,2	8,6	28,8
	255,9 > 208,9	2,2	7,2		
Acetamiprid	222,9 > 125,8	7,6	25,2	4,0	13,2
	222,9 > 195,9	5,2	17,2		

4.2. Validierung

Die Validierung einer Methode ist der Prozess analytische Voraussetzungen zu definieren und zu bestätigen, ob eine Methode die Fähigkeit hat, die Fragestellung zu erreichen. Laut SANCO (2013) und EURACHEM (2014) muss eine Validierung die Ermittlung der analytische Sensitivität, Wiederfindung, Präzision und Methoden – Bestimmungsgrenze beinhalten. In dieser Arbeit wurde außerdem noch Nachweisgrenze, Linearität, Retentionszeit, Blanks, Arbeitsbereich und Qualitätskontrolle behandelt. Sämtliche Daten aller Parameter der Validierung sind in Anhang 2 dargestellt. Die folgenden Abbildungen und Tabellen sind nur auf den internen Standard Thiamethoxam – d3 294,9 > 213,9 bezogen.

4.2.1. Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze

Nachweis- und Bestimmungsgrenze sind wichtige Punkte in Validierungen von Methoden. Nachweisgrenze, englisch „limit of detection“ (LOD), ist der Level, bei der die Detektion eines Analyts noch zuverlässig nachgewiesen werden kann. Bestimmungsgrenze, englisch „limit of quantification“ (LOQ), ist die niedrigste Level eines Analyts, das bestimmt werden kann. Daher ist die Nachweisgrenze niedriger als die Bestimmungsgrenze. Üblicherweise wird Bestimmungs- und Nachweisgrenze mit der Standardabweichung s'_0 berechnet, die aus der Standardabweichung s_0 hervorgeht. Je nachdem ob die Ergebnisse durch einen Blank korrigiert wurden, wird ohne Blank die Formel (a) und mit Blank die Formel (b) angewendet. Damit wird dann für die Nachweisgrenze (c) und Bestimmungsgrenze (d) weitergerechnet. Dabei wurde die Nachweisgrenze mit der dreifachen und die Bestimmungsgrenze mit der zehnfachen Standardabweichung berechnet, wobei s_0 die Standardabweichung der Ergebnisse ist, s'_0 die Standardabweichung zur Berechnung von Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze, n die Anzahl der wiederholten Beobachtungen und n_b die Anzahl der Blank Beobachtungen ist (EURACHEM 2014).

$$(a) s'_0 = \frac{s_0}{\sqrt{n}}$$

$$(b) s'_0 = s_0 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}}$$

$$(c) LOD = 3 * s'_0$$

$$(d) LOQ = 10 * s'_0$$

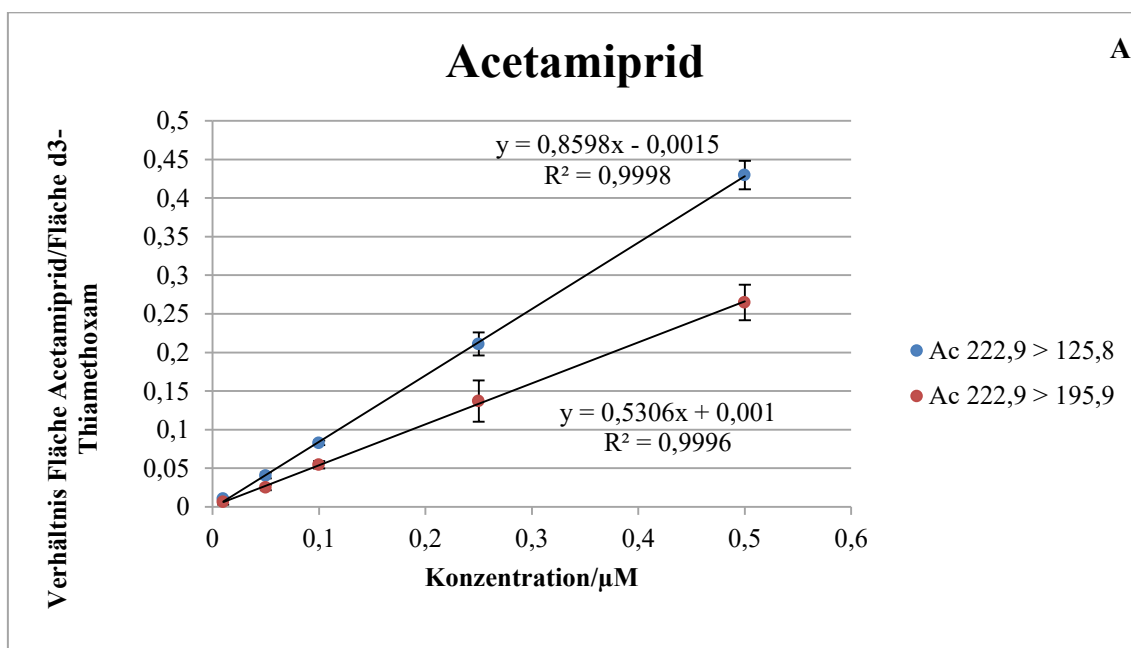
Tabelle 9 zeigt die Bestimmungs- und Nachweisgrenzen der Analyten der Methode.

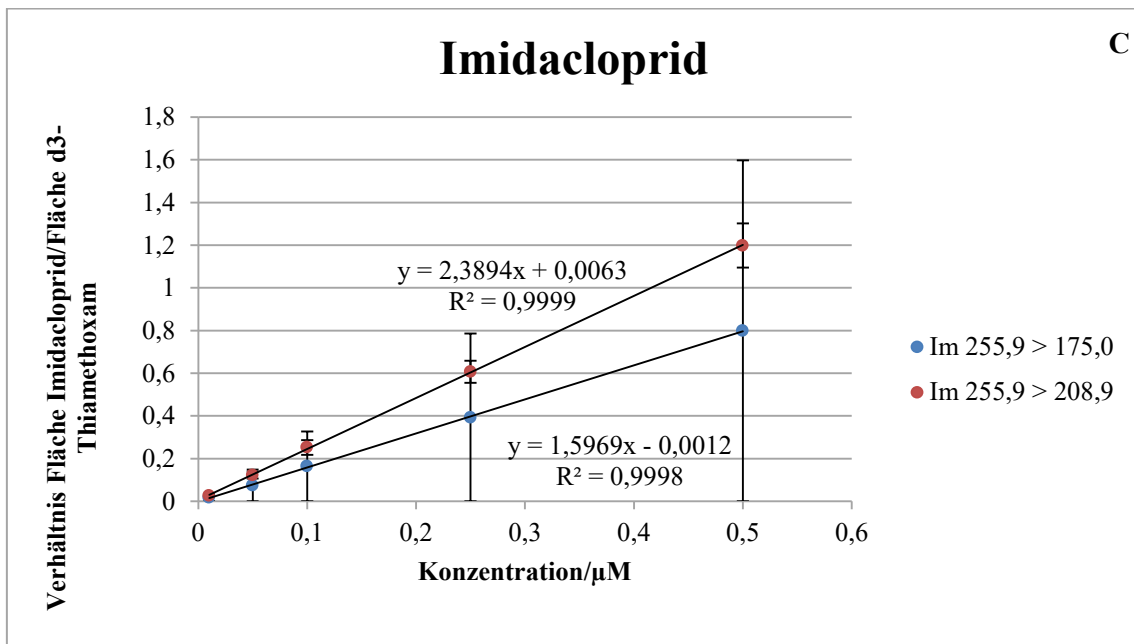
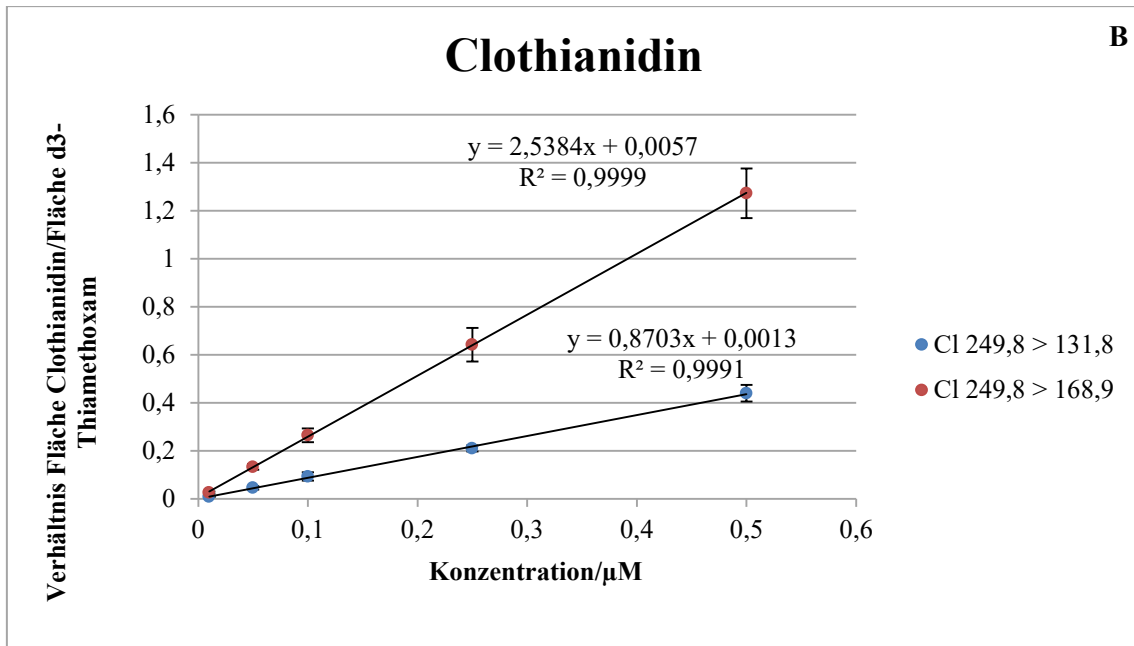
Tabelle 9: Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen der Methode in mg kg^{-1} für beide Übergänge von Acetamiprid, Clothianidin, Imidacloprid, Thiacloprid und Thiamethoxam auf den internen Standard 294,9 > 213,9 bezogen.

Analyt	Übergang	Methode [mg kg^{-1}]	
		LOD	LOQ
Thiacloprid	252,9 > 185,8	0,02	0,05
	252,9 > 125,8	0,59	1,96
Thiamethoxam	291,9 > 210,9	0,11	0,35
	291,9 > 245,9	0,02	0,07
Clothianidin	249,8 > 131,8	0,02	0,06
	249,8 > 168,9	0,01	0,03
Imidacloprid	255,9 > 208,9	0,10	0,33
	255,9 > 175,0	0,03	0,10
Acetamiprid	222,9 > 195,9	0,05	0,15
	222,9 > 125,8	0,02	0,08

4.2.2. Linearität

Für die Kalibration wurde bei allen Substanzen 5 Punkte von $0,01 \mu\text{M}$ bis $0,5 \mu\text{M}$ verwendet. Die Kalibrationsstandardlösung wurde mindestens am Beginn und am Ende der Probensequenz gemessen. In Abbildung 5 (A bis E) sind die Kalibrationsgeraden mit Standardabweichung für alle verwendeten fünf Substanzen Acetamiprid (A), Clothianidin (B), Imidacloprid (C), Thiacloprid (D) und Thiamethoxam (E) dargestellt. Diese sind auf den internen Standard Thiamethoxam – d3 294,9 > 213,9 bezogen, wobei jeweils beide Übergänge (1 und 2) dargestellt sind.





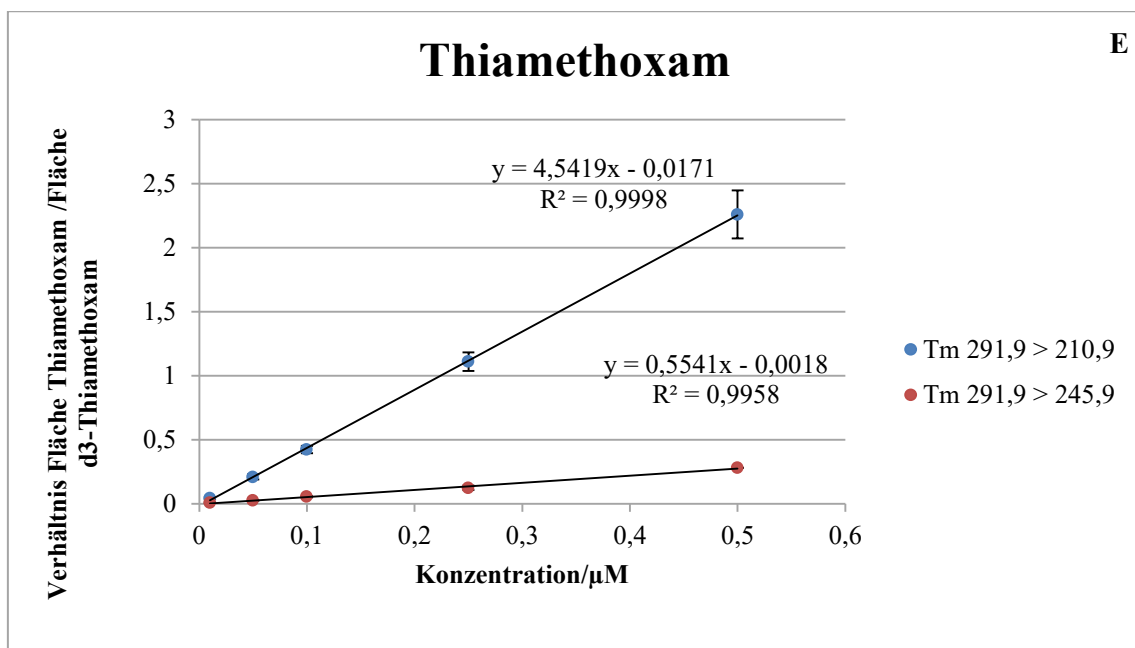
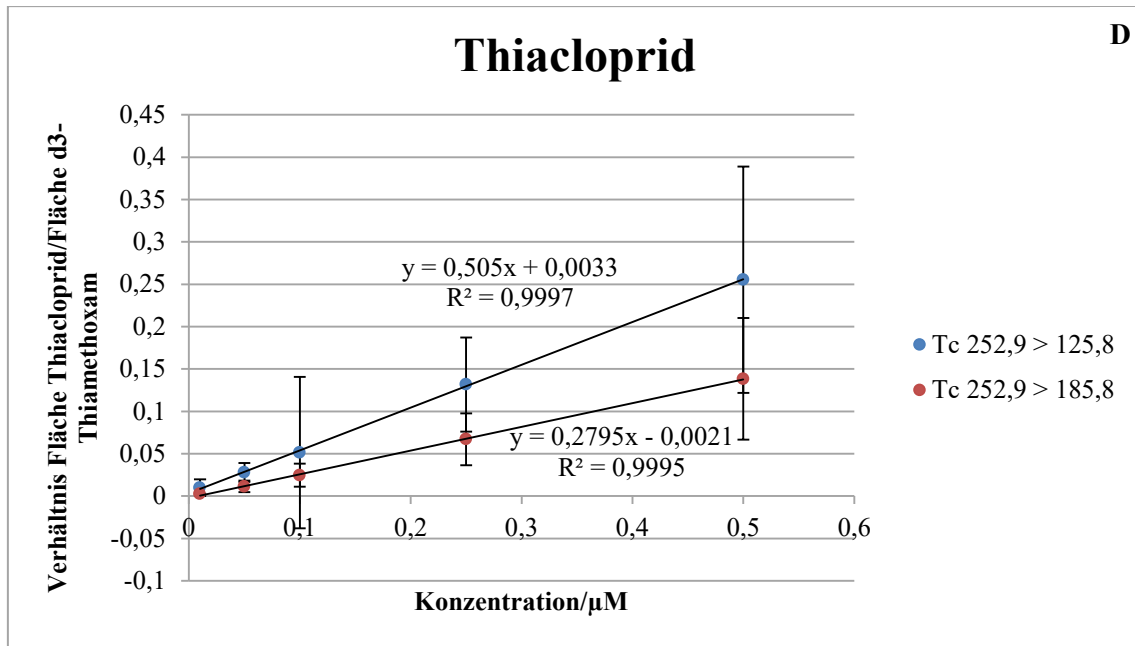


Abbildung 5: Kalibrationsgeraden mit Standardabweichungen für die Substanzen Acetamiprid (A), Clothianidin (B), Imidacloprid (C), Thiacloprid (D) und Thiamethoxam (E) auf den internen Standard Thiamethoxam – d3 294,9 > 213,9 bezogen.

Tabelle 10 zeigt die Regressionskoeffizienten aller Substanzen auf den internen Standard Thiamethoxam – d3 294,9 > 213,9 bezogen. Alle Übergänge betragen > 0,9991 und weisen eine sehr gute Linearität auf.

Tabelle 10: Regressionskoeffizienten der Analyten bezogen auf den internen Standard Thiamethoxam – d3 294,9 > 213,9, wobei der Quantifier jeweils fett gedruckt ist.

Analyt	Produktion	Regressionskoeffizient (R ²)
Acetamiprid	222,9 > 125,8	0,9998
	222,9 > 195,9	0,9996
Clothianidin	249,8 > 131,8	0,9991
	249,8 > 168,9	0,9999
Imidacloprid	255,9 > 175,0	0,9998
	255,9 > 208,9	0,9999
Thiacloprid	252,9 > 125,8	0,9997
	252,9 > 185,8	0,9995
Thiamethoxam	291,9 > 210,9	0,9998
	291,9 > 245,9	0,9958

4.2.3. Wiederfindung und Präzision

Die Wiederfindung (englisch „recovery“) ist das „Verhältnis des unter Wiederholbedingungen gemessenen Mittelwertes zum richtigen Wert des Analyten in der Probe“ (KROMIDAS 2001). Laut SANCO (2013) sollten akzeptable durchschnittliche Wiederfindungen zwischen 70 – 120% betragen und eine Präzision, der relativen Standardabweichung (RSD), von $\leq 20\%$ haben. Für die Wiederfindung wurde Honig in drei Konzentrationslevel (Level 1, 2 und 3) angereichert (siehe Punkt 3.2.3.) und jedes Level wurde fünf Mal analysiert.

Die Wiederfindung (R) wurde mit folgender Formel berechnet:

$$R'(\%) = \bar{x} - \bar{x}_0 / x^{\text{ref}} * 100$$

wobei \bar{x} der Mittelwert der Ergebnisse der Methode ist, \bar{x}_0 der Blank und x_{ref} der Referenzwert.

Die Ergebnisse der Wiederfindung und Präzision der Validierung sind auf den internen Standard Thiamethoxam – d3 294,9 > 213,9 bezogen und sind in Tabelle 11 und Abbildung 6 gezeigt.

Tabelle 11: Ergebnisse der Validierung von Wiederfindung (R) und Präzision (RSD) für alle Analyten der Level 1, 2 und 3, wobei der Quantifier jeweils fett gedruckt ist.

Substanz	Produktion	Level 1		Level 2		Level 3	
		R [%]	RSD %	R [%]	RSD %	R [%]	RSD %
Thiacloprid	252,9 > 125,8	62,6	52,5	64,6	27,1	56,3	25,5
	252,9 > 185,8	39,1	35,6	31,9	28,0	28,3	39,1
Thiamethoxam	291,9 > 210,9	100,6	12,2	89,2	6,0	100,8	16,1
	291,9 > 245,9	139,4	67,3	112,5	29,9	107,4	27,8
Clothianidin	249,8 > 131,8	73,7	10,3	84,9	19,2	98,7	15,1
	249,8 > 168,9	93,3	19,9	86,3	23,2	102,1	8,1
Imidacloprid	255,9 > 175,0	99,3	15,6	90,5	12,3	102,5	12,9
	255,9 > 208,9	104,4	11,5	98,8	12,8	112,8	17,5
Acetamiprid	222,9 > 125,8	98,8	13,7	83,6	11,0	81,9	27,1
	222,9 > 195,9	91,7	10,8	81,1	12,1	81,7	18,3

Die relative Standardabweichung (RSD) der Quantifier war, außer bei der Substanz Thiacloprid, kleiner als 20% und zeigte so die gute Präzision der Methode. Diese erfüllte dadurch auch die Anforderungen von SANCO (2013). Insgesamt war die relative Standardabweichung bei Level 2 am besten. Die verminderte Wiederfindung geht dabei auf die Probenaufarbeitung zurück und konnte durch die verwendeten internen Standards nicht ausgeglichen werden. Hierfür hätte die Aufarbeitung Schritt für Schritt analysiert werden oder die gelabelte Substanz Thiacloprid verwendet werden müssen, um den genauen Punkt des Verlustes festzustellen.

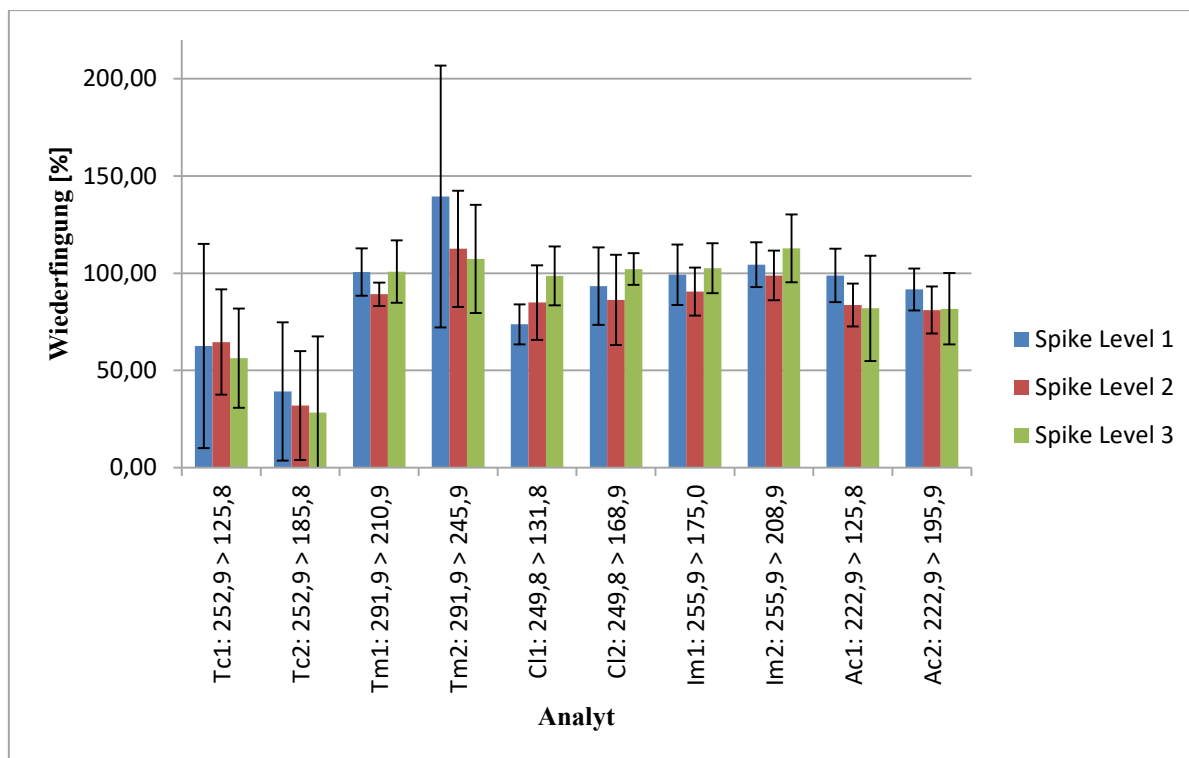


Abbildung 6: Durchschnittliche Wiederfindung in Prozent [%] mit Präzision der Analyten Thiacloprid (Tc), Thiamethoxam (Tm), Clothianidin (Cl), Imidacloprid (Im) und Acetamiprid (Ac) für Übergang 1 und 2 von Level 1, 2 und 3.

Die Retentionszeiten der Analyten der Standards und der Proben sind in Tabelle 7 in Kapitel 4.1.3. dargestellt. Diese entsprechen einander und haben höchstens eine, laut SANCO (2013) erlaubte, Streuung von $\pm 0,2$ Minuten. Die Streuung der Retentionszeit (t_R) zwischen Standards und Proben ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Retentionszeit und RSD der Analyten in Minuten.

Substanz	Retentionszeit [min]		RSD [%]
	Kalibration	Proben	
Thiacloprid 252,9 > 125,8	16,49	16,49	0,002
Thiacloprid 252,9 > 185,8	16,49	16,49	0,003
Thiamethoxam 291,9 > 210,9	8,76	8,72	0,026
Thiamethoxam 291,9 > 245,9	8,75	8,72	0,025
Clothianidin 249,8 > 131,8	11,20	11,15	0,032
Clothianidin 249,8 > 168,9	11,20	11,17	0,021
Imidacloprid 255,9 > 175,0	12,20	12,17	0,023
Imidacloprid 255,9 > 208,9	12,20	12,17	0,021
Acetamiprid 222,9 > 125,8	14,81	14,79	0,015
Acetamiprid 222,9 > 195,9	14,82	14,80	0,014
Acetamiprid - d3 222,9 > 183,9	14,73	15,01	0,196
Acetamiprid - d3 222,9 > 198,9	14,74	14,76	0,019
Thiamethoxam - d3 294,9 > 213,9	8,71	8,67	0,029
Thiamethoxam - d3 294,9 > 248,9	8,72	8,68	0,026

Der Arbeitsbereich ist der Bereich der Konzentration mit einer akzeptablen Präzision, Richtigkeit und Linearität der Methode. Dabei ist die Bestimmungsgrenze das untere Ende des Arbeitsbereichs und das obere Ende ist definiert durch Konzentrationen mit signifikanten Abweichungen (EURACHEM 2014). Diese sind in Anhang 2 ersichtlich.

Als Qualitätskontrolle wurde ein Kalibrationsstandard verwendet, welcher bei jeder Messung fünf Mal mitgemessen wurde. Nur ein akzeptabler Wert der Qualitätskontrolle zeigt, dass die Ergebnisse eines Batches zuverlässig sind. Die guten Werte der Standardabweichungen (RSD) für diese Qualitätskontrolle sind auch in Anhang 2 angeführt und betragen über alle Substanzen hinweg maximal 11%, außer für Analyt Thiacloprid mit rund 50%. Weiters wurden Reagenzien und Methodenblindwerte verwendet, um eventuelle Kontaminationen und Hintergrundsignale zu kontrollieren.

4.3. Analyse der Bienenbrotproben

Insgesamt wurden für diese Arbeit 71 Bienenbrotproben (Anhang 1) unterschiedlicher Regionen Österreichs analysiert. Die Proben, in denen die Analyten detektiert wurden, sind in Tabelle 13 gezeigt. Die Analyse der Proben weist keine positiven Proben auf. Nur Probe 63 war mit dem Neonicotinoid Imidacloprid kontaminiert, wobei die Konzentration an der Nachweisgrenze lag. In allen anderen Proben konnten keine nennenswerten Analyten nachgewiesen werden.

Tabelle 13: Ergebnisse der Analyse (mg kg^{-1}) in Bienenbrotproben der Analyten Thiacloprid, Thiamethoxam, Clothianidin, Imidacloprid und Acetamiprid für den Quantifier.

Probe Nr.	Tc1	Tc2	Tm1	Tm2	Cl1	Cl2	Im1	Im2	Ac1	Ac2
	252,9 > 185,8	252,9 > 125,8	291,9 > 210,9	291,9 > 245,9	249,8 > 131,8	249,8 > 168,9	255,9 > 208,9	255,9 > 175,0	222,9 > 195,9	222,9 > 125,8
1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
6	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
7	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
8	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
9	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
11	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
12	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
13	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
14	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
15	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
16	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
17	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
18	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
19	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
20	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
21	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
22	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
27	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
28	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
29	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
30	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
31	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
32	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
33	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
34	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
35	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
36	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
37	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
38	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
39	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
40	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

5. Diskussion

Hauptmotivation für diese Arbeit war, das Wissen über Neonicotinoide im Kreislauf von Bienenprodukten zu erweitern und eine mögliche Problematik durch Rückstände aufzeigen zu können. Besonderes Augenmerk war, ob und vor allem wie hoch die Konzentrationen solche Rückstände in Bienenpollen unterschiedlicher ländlicher und städtischer Regionen Österreichs sind. Solche Analysen und Auswertungen sind generell sehr zeit- und kostenaufwändig, weil es bei den verwendeten Proben zu starken Matrixeffekten kommt. Dabei wurden 71 Bienenbrotproben auf die Neonicotinoide Acetamiprid, Clothianidin, Imidacloprid, Thiacloprid und Thiamethoxam analysiert, dem ein wichtiger Validierungsschritt vorausging, sodass dafür auch die analytischen Richtlinien von EURACHEM (2014) und SANCO (2013) eingehalten wurden.

Bei der Analyse der Bienenbrotproben auf Neonicotinoide konnten keine Rückstände gefunden werden, da diese kleiner als die Nachweis- und Bestimmungsgrenze waren. Eine Probe (Probe Nr. 63) war mit Imidacloprid kontaminiert, jedoch war die Konzentration an der Nachweisgrenze. Diese Ergebnisse sind auch mit anderen Studien vergleichbar (LOPEZ- FERNANDEZ 2015) und weisen ähnliche Ergebnisse auf. Andere Studien stellen die Rückstände in Bienenpollen, einer für Honigbienen sehr wichtigen Nahrungsquelle, in kleinen und auch großen Mengen dar. Das zeigt, dass Bienen den Pollen von kontaminierten Pflanzen sammeln und zur Ernährung in den Stock eintragen. Diese Pflanzen sind entweder direkt, durch Saatgut- oder Sprühbehandlung, oder indirekt, durch kontaminiertes Substrat, in Berührung mit diesen Stoffen gelangt, haben diese aufgenommen, in der Pflanze verteilt und bis in die Pollen weitergeleitet. Das zeigt eine mögliche Expositionsrouten für Honigbienen und andere Insekten. Es kann aber genauso der Fall sein, dass, wie in dieser Arbeit, die benutzten Neonicotinoide sich abbauen und somit nicht in höheren Rückständen gefunden werden. Das ist natürlich sowohl im Sinne des Konsumenten als auch im Sinne des Produzenten, wodurch eine sichere und rückstandsfreie Lebensmittelproduktion gewährleistet werden kann.

Für eine aussagekräftigere Analyse hätte mit dem untersuchten Bienenbrot auch noch eine Pollenanalyse gemacht werden müssen. Dadurch hätte man sichergehen können, ob es sich um Pflanzen handelt, an denen die untersuchten Neonicotinoide auch angewendet werden. Thiacloprid ist in vielen Studien das am häufigsten gefundene Neonicotinoid, konnte aber nicht als positiv nachgewiesen werden. Grund dafür ist vermutlich, weil es die geringste Kontakt- und orale Toxizität für Bienen hat. Dies begründet auch die höheren Rückstandshöchstgrenzen in Bienenprodukten für diese Substanz (EU PESTICIDEDATABASE). Aufgrund der geringeren Toxizität kommt es viel eher zu einem Transport der Substanz in das Bienenvolk, weil Bienen höhere Mengen tolerieren und nicht sofort sterben. Außerdem ist Thiacloprid ein weit verbreitetes und vielfältig genutztes Neonicotinoid und wird in vielen Kulturen, aber besonders bei Raps und Mais, appliziert (Tabelle 1).

Das Ergebnis von nur einer positiven aus 71 untersuchten Proben, die jedoch an der Nachweisgrenze war, ist als erfreulich zu bewerten, vor allem weil somit alle Rückstände auch unter der Rückstandshöchstgrenze sind. Für Konsumenten kann bereits das Vorkommen von minimalen Rückständen, auch unterhalb der Rückstandshöchstgrenze, eine Verunsicherung und Gefährdung darstellen, besonders aber das gute Image der von Bienen erzeugten Produkte beeinflussen. Ein wesentlich größeres Problem aber stellen solche Rückstände für Honigbienen und andere bestäubende Insekten dar, die auf solche Wirkstoffe aufgrund der speziellen Selektivität viel stärker reagieren.

Der Einfluss der Rückstände von Neonicotinoiden auf die betroffenen Bienenvölker fehlt jedoch gänzlich, weil dies schwer zu evaluieren ist. In der vorliegenden Studie war nicht bekannt, ob es bei den Bienenvölkern auch letale Folgen für das ganze Volk gab. Dabei spielen nämlich Umweltfaktoren, Krankheiten, Schädlinge und andere Stressfaktoren, die in Kapitel 2.1.2. erwähnt werden, auch eine wichtige Rolle und verkomplizieren die Thematik um einiges. Deshalb wäre eine vielfältigere Analyse mit mehr und regional unterschiedlicheren Proben und dem Zusammenhang mit der Bienenmortalität der nächste Schritt für eine genauere Untersuchung dieses schwierigen Problems. Ein weiterer Schritt in diese Richtung wird vielleicht mit einer späteren „non-targeted“ Analyse generell auf Schadstoffe mittels GC-qTOF-MS gemacht werden. Außerdem sind laut EASAC (2015) Honigbienen eventuell nicht eine geeignete Spezies, um den Einfluss von Neonicotinoiden nachzuweisen.

Spätestens mit der Entscheidung der Europäischen Kommission über diese Thematik, muss festgelegt werden, ob man Neonicotinoide in der Landwirtschaft weiterhin erlaubt oder verbietet. Es muss geregelt werden, ob die Nutzung als Pflanzenschutzmittel oder die Gesundheit und der Bestand von Bestäubern wichtiger ist, oder ob es andere Möglichkeiten gibt. Dabei ist eine gute Zusammenarbeit zwischen Politik, Landwirtschaft, chemischer Industrie, Wissenschaft und den Imkern gefragt, um den Fortbestand von Bestäubern und die Produktion von landwirtschaftlich einwandfreien Produkten ohne Rückstände von Pestiziden zu gewährleisten.

6. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Derzeit in Österreich zugelassene Neonicotinoide mit deren Zulassungsjahr in der Europäischen Union, die jeweilige Handelsbezeichnung sowie Beispiele für Kulturen und Applikation (Pflanzenschutzmittelregister: Verzeichnis der in Österreich zugelassenen / genehmigten Pflanzenschutzmittel - Stand: 23.11.2014, EU PESTICIDE DATABASE).	15
Tabelle 2:	Akute orale Toxizität und Kontakttoxizität LD ₅₀ in µg/ Biene für die wichtigsten Neonicotinoidwirkstoffe Acetamiprid, Clothianidin, Imidacoprid, Thiacloprid und Thiamethoxam (EFSA 2012).	22
Tabelle 3:	Rückstandshöchstgrenzen für Honig (Gelee Royal, Pollen) in mg kg ⁻¹ für die wichtigsten Neonicotinoidwirkstoffe Acetamiprid, Clothianidin, Imidacoprid, Thiacloprid und Thiamethoxam in der EU (EU PESTICIDE DATABASE).....	27
Tabelle 4:	Herkunft und Reinheit der verwendeten Standards und Substanzen.....	29
Tabelle 5:	Konzentrationen der Level 1, 2 und 3 der Substanzen Thiacloprid, Acetamiprid, Imidacoprid, Clothianidin und Thiamethoxam.	31
Tabelle 6:	Chromatographischer Gradient der LC-MS/MS Methode mit Mobiler Phase A (98,9% H ₂ O; 1% ACN; 0,1% HCOOH) und Mobiler Phase B (98,9% ACN; 1% H ₂ O; 0,1% HCOOH).....	35
Tabelle 7:	Optimierte MS Parameter für beide MRM Übergänge der Substanzen Acetamiprid, Clothianidin, Imidacloprid, Thiacloprid, Thiamethoxam, Acetamiprid – d3 und Thiamethoxam – d3, wobei der Quantifier jeweils fett gedruckt ist.	36
Tabelle 8:	Vergleich der instrumentellen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in nM von Agilent 3D- Ionenfalle und TSQ Vantage Triple-Quadrupolmassenspektrometer.	36
Tabelle 9:	Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen der Methode in mg kg ⁻¹ für beide Übergänge von Acetamiprid, Clothianidin, Imidacloprid, Thiacloprid und Thiamethoxam auf den internen Standard 294,9 > 213,9 bezogen.	38
Tabelle 10:	Regressionskoeffizienten der Analyten bezogen auf den internen Standard Thiamethoxam – d3 294,9 > 213,9, wobei der Quantifier jeweils fett gedruckt ist.	41
Tabelle 11:	Ergebnisse der Validierung von Wiederfindung (R) und Präzision (RSD) für alle Analyten der Level 1, 2 und 3, wobei der Quantifier jeweils fett gedruckt ist.	42
Tabelle 12:	Retentionszeit und RSD der Analyten in Minuten.	44
Tabelle 13:	Ergebnisse der Analyse (mg kg ⁻¹) in Bienenbrotproben der Analyten Thiacloprid, Thiamethoxam, Clothianidin, Imidacloprid und Acetamiprid für den Quantifier.	45

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur der kommerziellen Neonicotinoide mit Ringsystemen und nicht- zyklischen Strukturen (JESCHKE et al. 2013).	11
Abbildung 2: Übersicht der Anzahl (%) verwendeter autorisierter Wirkstoffe Thiamethoxam, Imidacloprid, Clothianidin, Acetamiprid und Thiacloprid für die Applikationsmethoden „spray“ (Sprühapplikation), „seed treatment“ (Beizung) und „others“ (andere) (EFSA 2012).	16
Abbildung 3: Unterschiedliche ACN - Gehalte [%] für die Substanzen Acetamiprid, Clothianidin, Imidacloprid, Thiacloprid und Thiamethoxam.	30
Abbildung 4: Für die Analyse verwendete Ionenfalle Agilent 6340 mit HPLC.....	32
Abbildung 5: Kalibrationsgeraden mit Standardabweichungen für die Substanzen Acetamiprid (A), Clothianidin (B), Imidacloprid (C), Thiacloprid (D) und Thiamethoxam (E) auf den internen Standard Thiamethoxam – d3 294,9 > 213,9 bezogen.....	40
Abbildung 6: Durchschnittliche Wiederfindung in Prozent [%] mit Präzision der Analyten Thiacloprid (Tc), Thiamethoxam (Tm), Clothianidin (Cl), Imidacloprid (Im) und Acetamiprid (Ac) für Übergang 1 und 2 von Level 1, 2 und 3.....	43

8. Quellenverzeichnis

- ACA (2015) Austrian Carnica Association. Verein zur Förderung der Zucht von bodenständigen Bienenrassen in Österreich. www.aca.at. Zugriff am 19.1.2015.
- AFSSA (2009) Bee Mortality and Bee Surveillance in Europe. Scientific Report submitted to EFSA. CFP/EFSA/AMU/2008/02.
- AGILENT (2006) Agilent 6300 Ion Trap LC/MS Systems. Concepts Guide. Agilent Technologies. Third Edition.
- ANASTASSIADES M, LEHOTAY SJ, STAJNBAHER D, SCHENCK FJ (2003) Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and „dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residue in produce. *Journal of AOAC International*, Volume 86, Issue 2, Pages 412-431.
- ANASTASSIADES M, Quechers. A Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticide Residues in Low-Fat Products. *Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart*. <http://quechers.cvua-stuttgart.de/pdf/reality.pdf>.
- BARMAZS, POTTS SG UND VIGHI M (2010) A novel method for assessing risks to pollinators from plant protection products using honeybees as a model species. *Ecotoxicology*, Volume 19, Issue 7, pp 1347-1359.
- BAYER CROP SCIENCES (2004) Bayer – 90 Jahre Kompetenz in Weizen. *Kurier* 2/04: 4-7.
- BECHER MA, OSBORNE JL, THORBEC P, KENNEDY PJ UND GRIMM V (2013) Towards a system approach for understanding honeybee decline: a stocktaking and synthesis of existing models. *Journal of Applied Ecology* 50, 868-880.
- BLACQUIERE T, SMAGGHE G, VAN GESTEL CAM UND MOMMAERTS V (2012) Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21: 973-992.
- BOGDANOV S (2006) Contaminants of bee products. *Apidologie* 37, 1-18.
- BONMATIN JM, MOINEAU I, CHARVET R, COLIN ME, FLECHE C UND BENGSCHE ER (2005) Behaviour of Imidacloprid Fields. Toxicity for Honey Bees. *Environmental Chemistry*, pp 483-494.
- BONMATIN JM, GIORIO C, GIROLAMI V, GOULSON D, KREUTZWIESER DP, KRUPKE C, LIESS M, LONG E, MARZARO M, MITCHELL EAD, NOOME DA, SIMON-DELSON N UND TAPPARO A (2015) Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ Sci Pollut Res* 22:35-67.
- BORT R (2010) Honig, Pollen, Propolis. Sanfte Heilkraft aus dem Bienenstock. Franckh-Kosmos Verlags-GmbH, Stuttgart.

- BRASSARD D (2012) Estimated incremental increase in clothianidin usage from pending registrations (DP404793). US Environmental Protection Agency memorandum, Washington. in SIMON – DELSON et al. (2014)
- CCME - Canadian Council of Ministers of the Environment (2007) Canadian water quality guidelines for the Protection of Aquatic Life: Imidacloprid. Excerpt from Publication No. 1299; ISBN 1-896997-34-1.
- CHEUNG K, SIRUR G UND ANDERSON J (consultants) (2006) Agrochemical Service, Update of Products Section, Insecticides. Cropnosis, 1- 41. in ELBERT A, HAAS M, SPRINGER B, THIELERT W AND NAUEN R (2008) Applied aspects of neonicotinoids uses in crop protection. *Pest Manag Sci* 64: 1099- 1105.
- CRL DATA POOL: www.eurl-pesticides-datapool.eu (2014)
- CROSTHWAITE AJ, RENDINE S, STENTA M UND SLATER R (2014) Target-site resistance to neonicotinoids. *Journal of Chemical Biology*. Volume 7, Issue 4, pp 125-128.
- CSPNA (2007) Committee on the Status of Pollinators in North America. Status of Pollinators in North America. The National Academies Press.
- CUTLER P, SLATER R, EDMUNDS AJF, MAIENFISCH P, HALL RG, EARLEY FGP, PITTERNA T, PAL S, PAUL V-L, GOODCHILD J, BLACKER M, HAGMANN L UND CROSTHWAITE AJ (2012) Investigating the mode of action of sulfoxaflor: a fourth-generation neonicotinoid. DOI 10.1002/ps.3413.
- DEFRA (2015) <http://www.defra.gov.uk/statistics/foodfarm/food/cereals/cerealsoilseed/>. Benutzungsbericht 14.1. 2015.
- DI PASQUALE G, SALIGNON M, LE CONTE Y, BELZUNCES LP, DECOURTYE A, KRETZSCHMAR , SUCHAIL S, BRUNET J-L UND ALAUX C (2013) Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *PLOS ONE*, Volume 8, Issue 8, e72016.
- EASAC (2015) European Academies Science Advisory: Council Ecosystem services, agriculture and neonicotinoids. EASAC policy report 26. www.easac.eu.
- EC EUROPEAN COMMISSION (2010) Communication from the Commission to the European Parliament and the Council on Honeybee Health. COM 714final.
- EFSA (2012) European Food Safety Authority: Statement on the findings in recent studies investigating sub-lethal effects in bees of some neonicotinoids in consideration of the uses currently authorised in Europe. *EFSA Journal* 2012, 10(6): 2752.
- EFSA (2013a) European Food Safety Authority: Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance clothianidin, thiamethoxam, imidacloprid. European Food Safety Authority. *EFSA Journal* 11:3066- 3068.
- EFSA (2013b) European Food Safety Authority: EFSA PPR Panel (EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues), 2013. Scientific Opinion on the developmental

- neurotoxicity potential of acetamiprid and imidacloprid. *EFSA Journal* 2013, 11(12):3471, 47 pp. doi:10.2903/j.efsa.2013.3471
- EUROPEAN COMMISSION (2004) Commission working document- Review report for the active substance acetamiprid. Health & Consumer Protection Directorate- General.
- EK (Europäische Kommission): Durchführungsverordnung (EU) Nr. 485/2013 der Kommission vom 24. Mai 2013 zur Änderung der Durchführungsverordnung (EU) Nr. 540/2011 hinsichtlich der Bedingungen für die Genehmigung der Wirkstoffe Clothianidin, Thiamethoxam und Imidacloprid sowie des Verbots der Anwendung und des Verkaufs von Saatgut, das mit diesen Wirkstoffen enthaltenden Pflanzenschutzmitteln behandelt wurde. Amtsblatt der Europäischen Union.
- EU PESTICIDE DATABASE: http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/?event=homepage (stand 27. 1. 2015)
- EURACHEM (2014) Magnusson B und Örnemark U (eds.) *The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. 2nd edition. ISBN 978-91-87461-59-0. Available from www.eurachem.org.
- FAIRBROTHER A, PURDY J, ANDERSON T UND FELL R (2014) Risks of Neonicotinoid Insecticides to Honeybees. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 33, No.4.
- FAO (2014) Homepage of the Food and Agriculture Organization of the United Nations
- FAROOQUI T (2013) A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: A unique hypothesis. *Neurochemistry International* 62, 122-136.
- FRANK R, SHINHAN-KUMPFMÜLLER K, PUTTINGER J UND REITINGER A (2007) Wirkung von Honig auf das Immunsystem und die Gesundheit. *Ernährung&Medizin.Honig-Studie*, 22, 1-7.
- GALLAI N, SALLES J-M, SETTELE J, VAISSÈRE BE (2009) Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*. Volume 68, Issue 3, p. 810-821.
- GIROLAMI V, MAZZON L, SQUARTINI A, MORI N, MARZARO M, DI BERNARDO A, GREATTI M, GIORIO C UND TAPPARO A (2009) Translocation of Neonicotinoid Insecticides From Coated Seeds to Seedling Guttation Drops: A Novel Way of Intoxication for Bees. *Journal of Economic Entomology*, Volume 102, Number 5, pp. 1808 – 1815.
- GIROLAMI V, MARZARO M, VIVAN L, MAZZON L, GREATTI M, GIORIO C, MARTON D UND TAPPARA A (2012) Fatal powdering of bees in flight with particulates of neonicotinoids seed coating and humidity implication. doi: 10.1111/j.1439-0418.2011.01648.x.
- GIROUD B, VAUCHEZ A, VULLIET E, WIEST L UND BULETE A (2013) Trace level determination of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in beebread using acetonitrile-based

- extraction followed by analysis with ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1316, 53-61.
- GOULSON D (2013) Neonicotinoids and bees. What's all the buzz? Significance. The Royal Statistical Society.
- GREATTI M, SABATINI AG, BARBATTINI R, ROSSI S UND STRAVISIA (2003) Risk of environmental contamination by the active ingredient imidacloprid used for corn seed dressing. Preliminary results. *Bulletin of Insectology*. Volume 56, Issue 1, p. 69-72.
- HALM M-P, RORTAIS A, ARNOLD G, TASÉI N UND RAULT S (2006) New Risk Assessment Approach for Systemic Insecticides: The Case of Honey Bees and Imidacloprid (Gaucho). *Environ. Sci. Technol.* 40, 2448- 2454.
- HALLMANN J, QUADT – HALLMANN UND VON TIEDEMANN A (2007) *Phytomedizin*. Eugen Ulmer KG. 296ff.
- IRAC - Insecticide Resistance Action Committee (2014) IRAC MoA Classification Scheme. Issued, February 2014. Version 7.3.
- IWASA T, MOTOYAMA N, AMBROSE JT UND ROE MR (2004) Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Prot* 23:371–378
- JESCHKE P, NAUEN R UND BECK ME (2012) Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist: A Milestone for Modern Crop Protection. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 9464- 9485.
- JESCHKE P UND NAUEN R (2008) Review: Neonicotinoids- from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Management Sci* 64: 1084– 1098.
- JONES A, HARRINGTON P AND TURNBULL G (2014) Neonicotinoid concentrations in arable soils after seed treatment applications in preceding years. *Pest Manag Sci* 2014; 70: 1780–1.
- KOCH RL, BURKNESS EC, HUTCHISON WD AND RABAEY TL (2005) Efficacy of systemic insecticide seed treatments for protection of early-growth-stage snap beans from bean leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) foliar feeding. *Crop Protection* Volume 24, Issue 8, Pages 734-742.
- KROMIDAS S (2001) *Handbuch Validierung in der Analytik*. WILEY- VCN Verlag, Weinheim.
- KRUPKE CH, HUNT GJ, EITZER BD, ANDINO F UND GIVEN K (2012) Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living Near Agricultural Fields. *PloS ONE* 7(1): e29268. doi:10.1371/journal.pone.0029268.
- LAMBERT O, PIROUX M, PUYO S, THORIN C, L'HOSTIS M, WIEST L, BULETÉ A, DELBAC F UND POULIQUEN H (2013) Widespread Occurrence of Chemical Residues in Beehive Matrices from Apiaries Located in Different Landscapes of Western France. DOI: 10.1371/journal.pone.0067007.
- LAURINO D, PORPORATO M, PATETTA A UND MANINO A (2011) Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees laboratory tests. *Bull Insectol* 64:107–113.

- LÓPEZ- FERNÁNDEZ O, RIAL-OTERO R und SIMAL- GÁNDARA J (2015) High- throughput HPLC- MS/MS determination of the persistence of neonicotinoid insecticide residues of regulatory interest in dietary bee pollen. *Anal Bioanal Chem* 407: 7101-7110.
- LOTTSPREICH F UND ENGELS JW (2006) *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.2. Auflage.
- MAIENFISCH P, ANGST M, BRANDL F, FISCHER W, HOFER D, KAYSER H, KOBEL W, RINDLISBACHER A, SENN R, STEINEMANN A UND WIDMER H (2001) Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid. *Pest ManagSci* 57: 906- 913.
- MANDL S UND SUKOPP (2011) *Bestäubungshandbuch für Gärtner, Landwirte und Imker*. www.bestaeubungshandbuch.at.
- MLÖ (2014) Ministerium für ein Lebenswertes Österreich. Der österreichische Imkereisektor. <http://www.bmlfuw.gv.at/land/produktion-maerkte/tierische-produktion/andere-tierarten/Imkerei.html>. Zugriff am 15.1.2015.
- OERKE EC (2006) Crop losses to pests. Centenary Review. *Journal of Agricultural Science* 144, 31- 43.
- OKAZAWA A, AKAMATSU M, OHOKA A, NISHIWAKI H, CHO W-J, NAKAGAWA Y, NISHIMURA K UND UENO T (1998) Prediction of the Binding Mode of Imidacloprid and Related Compounds to House- Fly Head Acetylcholine Receptors Using Three- Dimensional QSAR Analysis. *Pestic.Sci.* 54, 134- 144.
- OLDROYD BP (2007) What's Killing American Honey Bees? *PLoS Biology*. Volume 5, Issue 6, e168
- PARADIS D, BÉRAIL G BONMATIN J-M UND BELZUNCES LP (2014) Sensitive analytical methods for 22 relevant insecticides of 3 chemical families in honey by GC-MS/MS and LC- MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 406: 621-633.
- POPP J (2011) Cost- benefit analysis of crop protection measures. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* 6: 105- 112.
- POTTS SG, ROBERTS SPM, DEAN R, MARRIS G, BROWN MA, JONES R, NEUMANN P UND SETTELE J (2010) Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *Journal of Apicultural Research* 49 (1): 15- 22.
- PETTIS JS, LICHTENBERG EM, ANDREE M, STITZINGER J, ROSE R, VAN ENGELSDORP D (2013) Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosemaceranae*. DOI: 10.1371/journal.pone.0070182.
- POHORECKA K, SKUBIDA P, MISZCZAK A, SEMKIW P, SIKORSKI P, ZAGIBAJLO K, TEPPER D, KOLTOWSKI Z, SKUBIDA M, ZDANSKA D UND BOBER A (2012) Residues of Neonicotinoid Insecticides in Bee collected Plant Materials from Oilseed Rape Crops and their effect on bee colonies. *Journal of Apicultural Science*. Vol.56 No.2.
- POHORECKA K, SKUBIDA P, SEMKIW P, MISZCZAK A, TEPPER D, SIKORSKI P, ZAGIBAJLO K, SKUBIDA M, ZDANSKA D UND BOBER A (2013) Effects of exposure of honey bee colonies to

- neonicotinoid seed-treated maize crops. *Journal of Apiculture Science*. Band 57, Heft 2.
- REDLICH D (1999) Ein Beitrag zum abiotischen Abbau und zur Rückstandsanalytik des Insektizids Imidacloprid. Dissertation. Herbert Utz Verlag. Wissenschaft. München.
- RIAL- OTERO R, GASPAR EM, MOURA I UND CAPELO JL (2007) Chromatographic- based methods for pesticide determination in honey. An overview. *Talanta* 71, 503-514.
- SANCO (2013) SANCO/12571/2013 Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. European Commission. Health & Consumer Protection Directorate-General. Safety on the food chain. Chemicals, contaminants, pesticides.
- SANCHEZ-BAYO F UND GOKA K (2014) Pesticide Residues and Bees – A Risk Assessment. *PLOS ONE*. Volume 9, Issue 4.
- SCHÄFER B (2008) Die Neonicotinoide. Nicotin und die Neonicotinoide- Teil 2. *Chem. Unserer Zeit* 42, 408- 424.
- SIMON-DELISO N, AMARAL-ROGERS V, BELZUNCES LP, NOMATIN JM, CHAGNON M, DOWNS C, FURLAN L, GIBBONS DW, GIORIO C, GIROLAMI V, GOULSON D, KREUTZWEISER DP, KRUPKE CH, LIESS M, LONG E, MCFIELD M, MINEAU P, MITCHELL EAD, MORRISSEY CA, NOOME, DA, PISA L, SETTLE J, STARK JD, TAPPARO A, VAN DYCK H, VAN PRAAGH J, VAN DER SLUIJS JP, WHITEHORN PR UND WIEMERS M (2014a) Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ Sci Pollut Res* DOI 10.1007/s11356-014-3470-y.
- SIMON-DELISO N, MARTIN GS, BRUNEAU E, MINSART L-A, MOURET C UND HAUTIER L (2014b) Honeybee Colony Disorder in Crop Areas: The Role of Pesticides and Viruses. DOI: 10.1371/journal.pone.0103073.
- SINGH S (2014) Guttation: path, principles and function. *Australian Journal of Botany* 61(7) 497 – 515.
- SINGH S AND SINGH TN (2013) Guttation 1: chemistry, crop husbandry and molecular farming. *Phytochemistry Reviews*, Volume 12, Issue 1, pp 147 – 172.
- SLADAN S, MIROSLAV K, IVAN S, SNEZANA J, PETAR K, GORAN T UND JEVDOVIĆ (2012) Resistance of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to neonicotinoids, pyrethroids and nereistoxins in Serbia. *Romanian Biotechnological Letters*. Volume 17, Issue 5, p. 7599-7609.
- STARNER K UND GOH KS (2012) Detections of the Neonicotinoid Insecticide Imidacloprid in Surface Waters of Three Agricultural Regions of California, USA, 2010-2011. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. March 2012, Volume 88, Issue 3, pp 316-321.

- STONER KA UND EIZER BD (2013) Using a Harard Quotient to Evaluate Pesticide Residues Detected in Pollen Trapped from Honey Bees (*Apismellifera*) in Connecticut. PLOS ONE. Volume 8, Issue 10.
- SZENDREI Z, GRAFIUS E, BYRNE A UND ZIEGLER A (2012) Resistance to neonicotinoid insecticides in field populations of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pest ManagSci*2012; 68:941–9.
- TAPPARO A, MARTON D, GIORIO C, ZANELLA A, SOLDÀ L, MARZARO M, VIVAN L UND GIROLAMI V (2012) Assessment of the Environmental Exposure of Honeybees to Particulate Matter Containing Neonicotinoid Insecticides Coming from Corn Coated Seeds. [dx.doi.org/10.1021/es2035152](https://doi.org/10.1021/es2035152) | *Environ. Sci. Technol.* 2012, 46, 2592– 2599.
- THOMPSON HM (2010) Risk assessment for honey bees and pesticides – recent developments and ‘new issues’.DOI 10.1002/ps.1994.
- TISLER T, JEMEC A, MOZETIC, B UND TREBSE P (2009) Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere* Volume 76, Issue 7, p. 907-914.
- VON DER OHE W UND MARTENS D (2011) Das Deutsche Bienenmonitoring. Pflanzenschutzmittel-Rückstände im Bienenbrot. *Bienengesundheit*. ADIZ/db/IF. 10/2011.
- YAMADA T, TAKAHASHI H UNDHATANO R (1999) A Novel Insecticide, Acetamiprid. IN YAMAMOTO I UNDCASIDA JE (1999) Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor. Springer- Verlag. 149- 176.
- YAMAMOTO I (1999) Nicotine to Nicotinoids: 1962 to 1997. In Yamamoto I and Casida JE (1999) Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor. Springer- Verlag. 3- 27.
- YUANMING Z, LOSO MR, WATSON GB, SPARKS TC, ROGERS RB, HUANG JX, GERWICK BC, BABCOCK JM, KELLEY D, HEGDE VB, NUGENT BM, RENGHA JM, DENHOLM I, GORMAN K, DEBOER GJ, HASLER J, MEADE T UND THOMAS JD(2010) Discovery and Charactization of Sulfoxaflor, a Novel Insecticide Targeting Sap-Feeding Pests. *J. Agric. Food Chem.*2011, 59, 2950-2957.

9. Anhang

Anhang 1: Analysierte Proben mit deren Probennummer, Ort und Standnummer

Anhang 2: Ergebnisse der Validierung für den Quantifier mit analytischer Sensitivität (k), Arbeitsbereich des Instruments (ABI), linearer Bereich des Instruments (LBI), Instrument LOD (ILOD), Instrument LOQ (ILOQ), Arbeitsbereich der Methode (ABM), linearer Bereich der Methode (LBM), Methoden LOD (MLOD), Methoden LOQ (MLOQ), Wiederfindung (R(%)), Qualitätskontrolle-Präzision (QC), Instrument Retentionszeit (IRT) und Methoden Retentionszeit (MRT).

Anhang 1: Analysierte Proben mit deren Probennummer, Ort und Standnummer.

Proben- nummer	Ort, Standnr.	Proben- nummer	Ort, Standnr.
1	Regelsbrunn 3	41	Bruck a. d. Leitha
2	Sommerein 20	42	Magareten 7
3	Schwadorf 1	43	Abistahl 3
4	Regelsbrunn 10	44	Abistahl 6
5	Schwadorf 13	45	Großenzersdorf 12
6	Scharndorf 1	46	Bruck a.d. Leitha 1
7	Schwadorf 14	47	Bruck a.d. Leitha 3
8	Magareten 8	48	Großenzersdorf 2
9	Götzendorf 2	53	Sommerein 24
10	Wildungsmauer	54	Großenzersdorf 4
11	Schwadorf 10	55	Magareten 3
12	Magareten 6	56	Großenzersdorf 3
13	Wildungsmauer	57	Maria Ellend 3
14	Magareten 5	58	Trautmannsdorf 17
15	Schwadorf 12	59	Bruck a. d. Leitha 10
16	Magareten 4	60	Fischamend 1
17	Schwadorf 6	61	Haslau a. d. Donau 2
18	Langenzersdorf 1	62	Großenzersdorf 9
19	Großenzersdorf 1	63	Großenzersdorf 6
20	Götzendorf 3	64	Regelsbrunn 6
21	Schwadorf 15	65	Fischamend 7
22	Schwadorf 4	66	Maria Ellend 4
27	Schwadorf 2	67	Maria Ellend 1
28	Trautmannsdorf 6	68	Haslau a. d. Donau 4
29	Schwadorf 11	69	Abistahl 8
30	Schwadorf 9	70	Großenzersdorf 5
31	Stixneusiedl 6	71	Regelsbrunn 2
32	Stixneusiedl 4	72	Bruck a. d. Leitha 4
33	Stixneusiedl 2	73	Abistahl 1
34	Trautmannsdorf 2	74	Sommerein 21
35	Trautmannsdorf 7	75	Maria Ellend 2
36	Schwadorf 6	76	Großenzersdorf 10
37	Stixneusiedl 1	77	Großenzersdorf 8
38	Schwadorf 3	79	Sommerein 19
39	Stixneusiedl 3	81	Trautmannsdorf 3
40	Trautmannsdorf 5		

Anhang 2: Ergebnisse der Validierung für den Quantifier auf den internen Standard Thiamethoxam – d3 294,9 > 213,9 bezogen.

			252,9 > 125,8	291,9 > 210,9	249,8 > 168,9	255,9 > 208,9	222,9 > 125,8	
		Einheit	Tc1	Tm1	Cl2	Im2	Ac1	
k		k	0,51	4,54	2,54	2,39	0,86	
ABI		µM	0,01-0,5	0,01-0,5	0,01-0,5	0,01-0,5	0,01-0,5	
LBI		µM	0,01-0,5	0,01-0,5	0,01-0,5	0,01-0,5	0,01-0,5	
ILOD		µM	33,8	2,3	3,3	2,2	7,6	
ILOQ		µM	112,7	7,8	10,9	7,2	25,2	
ABM								
LBM								
MLOD		mg kg-1	-0,030	-0,008	-0,005	-0,084	-12,153	
MLOQ		mg kg-1	-0,100	-0,026	-0,016	-0,279	-40,511	
R(%)								
	xref	LOQ	µM	0,21	0,17	0,08	0,20	0,75
	R(%)	LOQ	mg kg-1	62,6	100,6	93,3	104,4	98,8
	xref	MRL	µM	0,75	0,34	0,41	0,39	1,00
	R(%)	MRL	mg kg-1	64,6	89,2	86,3	98,8	83,6
	xref	2*MRL	µM	1,50	0,68	0,83	0,78	1,50
	R(%)	2*MRL	mg kg-1	56,3	100,8	102,1	112,8	81,9
QC		RSD		46	4	5	4	11
IRT		min		16,49	8,76	11,20	12,20	14,81
MRT		min		16,49	8,72	11,17	12,17	14,79