

Biomarker für chronische Exposition und Wirkungen von Pestiziden bei Bienen

Karl Fent & Verena Christen

Fachhochschule Nordwestschweiz, Hochschule für Life Sciences, Muttenz

1. Zusammenfassung

Für die Registrierung von Pestiziden wird die akute Toxizität bei Bienen bestimmt. Trotz der Tatsache, dass die chronische Exposition an tiefe Dosen ebenfalls Wirkungen auf Bienen haben könnte, wird diese eher ungenügend untersucht. Ziel dieses Projektes ist es, empfindliche molekulare Biomarker für die Exposition von Bienen an tiefe Konzentrationen von Pflanzenschutzmitteln zu entwickeln. Diese sollen eine Exposition und chronische Wirkung gegenüber Pflanzenschutzmitteln inklusive Neonicotinoide und der damit einhergehenden Toxizität vergleichend zu anderen Insektiziden (Pyrethroide, Organophosphate) anzeigen. Vorteile solcher Biomarker sind ihre hohe Empfindlichkeit, ihre relativ schnelle Bestimmung in wenig Probenmaterial und die relativ tiefen Kosten. Es soll evaluiert werden, ob solche sensitiven Biomarker entwickelt werden können. Diese wären geeignet, chronisch-toxische Wirkungen von Neonicotinoiden sowie anderer häufiger Insektizide/Akarizide bei Bienen im Tiefdosis-Bereich aufzuzeigen. Die primäre akute Wirkung von Neonicotinoiden beruht auf der Bindung an den AchR. Daher wird der Einfluss verschiedener Konzentrationen von Neonicotinoiden unterschiedlicher Wirksamkeit auf die Expression des Schlüsselgens wie dem Acetylcholinrezeptor (AchR) auf der Ebene der mRNA analysiert. Dabei prüfen wir, ob sich die mRNA-Menge bei chronischer Exposition im Niedrigdosen-Bereich ändert. Wir erwarten, dass im Sinne einer Kompensationsreaktion, der AchR verstärkt exprimiert wird (erhöhte mRNA-Menge). Ausserdem wird die enzymatische Aktivität der Acetylcholinesterase (Wirkungsweise von Organophosphaten) auf der Proteinebene sowie der mRNA-Ebene analysiert.

In einem zweiten Schritt sollen Biomarker für chronische Exposition im Tiefdosis-Bereich evaluiert werden. Im Zentrum stehen solche, bei vielen Organismen etablierte, Biomarker wie die Expression und Aktivität von Metabolismus-Enzymen (Cyp, ABC-Transporter). Zudem werden Bienen-spezifische Gene auf der mRNA-Ebene analysiert. Diese stehen im Zusammenhang mit der Immunreaktion und Reproduktion der Bienen. Weiter werden auch allgemeine Stressgene auf der mRNA-Ebene untersucht. Sollten sich bestimmte Biomarker als sensitiv erweisen, werden sie auch für Mischungen von Pflanzenschutzmitteln analysiert. Die erfolgreich entwickelten Biomarker werden schliesslich auf ihre Praxistauglichkeit in Bezug auf ihre Veränderung durch Varroamilben-Befall und in einem Feldversuch mit verschiedenen Belastungssituationen erprobt.

Ziel ist damit die Entwicklung und Validierung von sensitiven molekularen Biomarkern, die auf eine Belastung mit Neonicotinoiden und anderen Insektiziden im Niedrigdosis-Bereich schiessen lassen. Damit sollen robuste und einfach zu testende Biomarker in wenigen Bienenproben evaluiert werden, die allgemeinere Bedeutung auch im Rahmen von OECD-Richtlinien haben können. Bei erfolgreicher Entwicklung würde ein grosser Fortschritt in der Expositions- und Wirkungsanalyse erzielt. Für die Zulassung/Registrierung von Pestiziden und dem Monitoring nach deren Anwendung wäre dies im Hinblick auf die Gesundheit der Bienen ein grosser Gewinn.

2. Forschungsplan

2.1 Hintergrund

Seit einigen Jahren sind Bienenvölker von erhöhter Mortalität im Winter und Frühjahr betroffen. Ursache ist einerseits die Varroamilbe, andererseits stehen neue Insektizide wie die Neonicotinoide als Verursacher im Verdacht. Die Schweiz hat wie die EU die Bewilligung von drei Neonicotinoiden zur Behandlung von Mais und Rapssaatgut ab Dezember 2013 für zwei Jahre aufgehoben, da sie als bienengefährlich gelten. Die EU-Kommission hat zudem die Verwendung von Fipronil (Phenylpyrazol, Kontaktgift) ab 2014 eingeschränkt. Eine weitere Motion, die das Verbot von weiteren Neonicotinoiden forderte, wurde vom Schweizer Parlament abgelehnt. Bis Ende 2015 sollen jedoch die Ursachen des Bienensterbens wissenschaftlich genauer untersucht werden. Ausserdem soll ein Massnahmenpaket zur nachhaltigen Anwendung von Pflanzenschutzmitteln, das bis in zehn Jahren die Risiken reduziert, entwickelt werden. Auch der Schweizerische Bauernverband fordert eine Verstärkung der Bienenforschung. Eine genauere Erforschung des Bienensterbens zur Identifikation der Verursacher ist nötig, um Massnahmen zur Verbesserung der Bienengesundheit ergreifen zu können.

Bisherige Untersuchungen zur Gefährlichkeit von Pflanzenschutzmitteln stützen sich ausschliesslich auf die akute Toxizität bei Bienen nach den OECD Richtlinien 213 und 214 (orale akute und Kontakt-Toxizität) ab (Fent 2013). Chronische Wirkungen bei geringen Dosen werden bisher kaum geprüft. Dies trotz der Tatsache, dass chronische Wirkungen bei tieferen Pestizidkonzentrationen auftreten können, welche die Gesundheit der Bienenvölker beeinträchtigen. Auch gibt es wenig molekulare und biochemisch orientierte Wirkungsforschung bei Bienen. So werden bisher kaum Mechanismus-basierte Toxizitätsstudien durchgeführt, um die Wirkungsweise chronischer Tiefdosis-Belastungen zu bestimmen. Sensitive Biomarker für die Belastung an tiefe Pestizidkonzentrationen und chronische Wirkungen sind bei Bienen nicht bekannt. Solche Biomarker sind jedoch sehr sensitiv und können Wirkungen anzeigen, bevor eine akute Toxizität auftritt. Sie stellen schnelle Reaktionen auf die Exposition und Gesamtbelastung mit Pestiziden dar und können mit wenig Probenmaterial relativ schnell gemessen werden. Schliesslich gibt es keine Studien über die Aktivität von Mischungen von Pestiziden, was jedoch der normalen Belastungssituation entspricht.

Vor diesem Hintergrund ist es das zentrale Ziel dieses Projektes, Biomarker für chronische Belastungen von Bienen, insbesondere im Tiefdosis-Bereich, zu entwickeln. Das ist neu. Zudem soll ihre Tauglichkeit in Dosis-Wirkungsbeziehung bei Einzelsubstanzen und Mischungen ermittelt werden. Diese Biomarker wären wesentlich sensitiver und aussagekräftiger als die Letalität, die gegenwärtig in akuten Toxizitätsversuchen bestimmt wird. Bei erfolgreicher Validierung können sie nicht nur bei der Expositionsanalyse, sondern auch bei der Toxizitätsbestimmung im Zulassungsverfahren für Pestizide und im Pestizidmonitoring Verwendung finden.

2.2 Gegenwärtiger Wissensstand

Neonicotinoide sind nicht nur gegenüber Schädlingen, sondern auch gegenüber der Honigbiene, Wildbienen und Hummeln wirksam, weil sie spezifisch an den evolutiv konservierten nikotinischen Acetylcholinrezeptor (AChR) von Insekten binden (Henry et al. 2012, White et al. 2012). Die orale Toxizität von Neonicotinoiden ist höher als die Kontakttoxizität. Die LD₅₀-Werte liegen im Bereich

ng/Biene (Tabelle 1), wobei Neonicotinoide mit einer Nitro-Gruppe toxischer sind als solche mit einer Cyano-Gruppe (Iwasa et al. 2004). Die letale Toxizität von Neonicotinoiden wurde in Labor- und Feldstudien ermittelt. In Laborversuchen zeigte Imidacloprid eine Erhöhung des Verlustes von Arbeiterinnen, wenn diese Pollen aufnahmen, die mit 40 mg/kg (Decourtye et al. 2001, 2003) oder Zuckerwasser, das mit 10 µg/L Imidacloprid kontaminiert war, konsumierten (Suchail et al. 2001). Keine erhöhte Mortalität ergab sich jedoch in einem Feldversuch, bei dem der Bienenstock für 39 Tage mit kontaminiertem Sonnenblumennektar (2-20 µg/kg) exponiert war (Schmuck et al. 2001). Neonicotinoide können auch zur Verzögerung in der Entwicklung (Decourtye et al. 2005), Induktion der Acetylcholinesterase (Boily et al. 2013) und neurotoxischen Verhaltensänderungen führen (Lambin et al. 2001, Nauen et al. 2001, Colin et al. 2004). Des Weiteren wird der Orientierungssinn (Decourtye und Devillers 2010), das Geruchsverhalten (Yang et al. 2012) und das Lernen (Guez et al. 2001, 2003) negativ beeinflusst. Bei Hummeln wurde zudem eine Reduktion des Populationswachstums und der Bildung von Königinnen nachgewiesen (Whitehorn et al. 2012 Science). Zudem wurde gezeigt, dass eine Kombination mit Fungiziden die Toxizität von Neonicotinoiden erhöhen kann (Iwasa et al. 2004).

2.3 Fragestellung und Ziele

A. Biomarker für die Exposition und Primärwirkung von Insektiziden

In der Bienenforschung besteht zurzeit ein Mangel an Wirkungsmechanismus-orientierten, molekularen Untersuchungen. In der Toxikologie - und seit kurzem auch in der Ökotoxikologie - hat sich eine Analyse, die auf den spezifischen Wirkungsmechanismen zielt, als Erfolg versprechend erwiesen (Fent 2013). Denn so können gezielt Wirkungen erfasst werden, die Aussagen über eine chronische Tiefdosis-Wirkung zulassen, die wesentlich empfindlicher und aussagekräftiger sind als die generellen akuten Toxizitätsversuche, die grösstenteils auf Beobachtungen beruhen (Fent et al. 2006; Christen und Fent 2009). Wenn die Wirkungsmechanismen bekannt sind, lassen sich auch gezielt sensitive molekulare Biomarker heranziehen, die mit einer unerwünschten Wirkung resp. Toxizität einhergehen.

Dies soll anhand von Insektiziden verschiedener Wirkungsweise untersucht werden. Neonicotinoide binden selektiv an den nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAChR) von Insekten, Pyrethroide hemmen die Nervenweiterleitung über die irreversible Bindung an spannungsabhängige Natriumkanäle. Organophosphate wiederum hemmen die Acetylcholinesterase. Damit lassen sich theoretisch je verschiedene Biomarker für die Insektizidwirkung heranziehen: bei Neonicotinoiden den Acetylcholinrezeptor (AChR) auf der mRNA-Ebene und bei Organophosphaten auf Proteinebene die Acetylcholinesterase-Aktivität (sowie eventuell zusätzlich auch auf der mRNA-Ebene). Das Projektziel ist damit die Evaluation dieser und weiterer Biomarker in Larven und adulten Bienen.

Solche molekularen Biomarker haben entscheidende Vorteile gegenüber den heutigen akuten Toxizitätsversuchen wie:

- Hohe Empfindlichkeit
- Schnelle Analyse einer möglichen Exposition mit wenig Probenmaterial
- Kostengünstiger als die chemische Rückstandsanalytik
- Bilden die Gesamtheit der Exposition ab

A1. Biomarker für akute und chronische Exposition gegenüber Pestiziden

Heute ist nicht bekannt, inwieweit die Expression des AchR ein Biomarker für Tiefdosis-Belastungen darstellt. Bisher sind bei der Biene 11 verschiedene Isoformen des AchR identifiziert (Jones et al. 2013). Die Bindung von Neonicotinoiden an die nikotinischen AchR mit dessen Inaktivierung kann dazu führen, dass er in der Folge vermehrt exprimiert werden (Kompensationsreaktion). Da entsprechende Studien fehlen, wird als Erstes die basale Expression der AchR (Apis- α 2, Apis- α 3, Apis- α 7-1 und Apis- α 7-2) über die mRNA-Menge mittels RT-qPCR bestimmt. Diese 4 Isotypen des AchR werden im Gehirn exprimiert und spielen eine wichtige Rolle bei Lernprozessen, Gedächtnis, Übertragung von Geruchsreizen und visuellen Reizen (Thany et al. 2003, 2005).

A1.1 Einzelsubstanzen

In unserem Projekt sollen verschiedene Entwicklungsstadien (Larven und adulte Bienen) analysiert werden, indem sie an verschiedene wirksame Neonicotinoide (Tabelle 1) und andere Pestizide (Pyrethroide und eventuell Organophosphate) exponiert werden. Dabei werden Dosis-Wirkungsbeziehungen ermittelt, besonders im Tiefdosisbereich. Nach der Exposition werden Veränderungen des Transkriptionslevels der AChR bestimmt. Parallel dazu wird die enzymatische Aktivität der Acetylcholinesterase (AChE) mit und ohne Insektizidbelastung untersucht. Auch hier werden Dosis-Wirkungsbeziehungen ermittelt. Es gibt Hinweise für eine erhöhte Enzymaktivität durch Neonicotinoide (Boily et al. 2013), wohingegen Organophosphate inhibierend wirken.

Tabelle 1: Liste der für die Studie ausgewählten Neonicotinoide. Die Auswahl wurde basierend auf LD₅₀-Werten vorgenommen. Es wurden zum Vergleich 4 sehr toxische und ein weniger toxisches Neonicotinoid ausgewählt.

Neonicotinoid	Kontakttoxizität (LD ₅₀)	Orale Toxizität (LD ₅₀)	Referenz
Clothianidin	0.022- 0.044 µg/Biene	0.00379 µg/Biene	Iwasa et al. 2004, EPA 2003, EC 2005
Dinotefuran	0.024- 0.061 µg/Biene	0.0076- 0.023 µg/Biene	Iwasa et al. 2004, EPA 2004
Imidacloprid	0.0179- 0.243 µg/Biene	0.0037- 0.081 µg/Biene	EPA 2003, Schmuck et al. 2001, Nauen et al. 2001
Thiamethoxam	0.024- 0.029 µg/Biene	0.005 µg/Biene	Iwasa et al. 2004, Syngenta Group 2005
Acetamiprid	7.1- 8.09 µg/Biene	8.85-14.52 µg/Biene	Iwasa et al. 2004

A1.2 Pestizidmischungen

Die Exposition der Bienen im landwirtschaftlich genutzten Gebiet erfolgt in der Regel nicht an eine Einzelsubstanz, sondern an Mischungen verschiedener Pestizide. Ziel ist es, die Aktivität von Mischungen im Vergleich zu Einzelsubstanzen zu prüfen, da Mischungen der realen Umweltsituation entsprechen. Larven oder adulte Bienen (abhängig von den oben erzielten Resultaten, aber bevorzugt Larven) werden experimentell im Labor an Mischungen verschiedener Neonicotinoide

exponiert und die Biomarker auf mRNA-Ebene (AChR) und Proteinebene (AChE-Aktivität) bestimmt. Dabei werden wie bei Einzelsubstanzen Dosis-Wirkungs-Beziehungen ermittelt. Diese Analysen erlauben Schlüsse auf die Interaktion in Mischungen im Vergleich zu Einzelsubstanzen. Dabei lassen sich analog zu unseren bisherigen Arbeiten additive, synergistische oder antagonistische Interaktionen ermitteln (Kunz und Fent, 2008, 2009; Christen et al. 2010).

Damit ist es das Ziel, Dosis-Wirkungsbeziehungen bei den verschiedenen aktiven Neonicotinoiden als Einzelsubstanzen und als Mischungen zu ermitteln. Daraus ergibt sich eine Gefährlichkeitsabschätzung. Die Biomarker AChR und AChE dienen sowohl für akute wie chronische Wirkungsanalysen. Unser Augenmerk gilt aber vor allem der Wirkung von tiefen Dosen und Substanzmischungen, wie sie in der Feldsituation auftritt. Des Weiteren soll geprüft werden, ob der Befall mit Varroa-Milben diese Biomarker beeinflussen (siehe unten). Falls sich diese beiden Biomarker (Veränderung der mRNA von AChR und Aktivität der AChE) in Laborversuchen als sensitiv erweisen, sollen sie in Feldversuchen (siehe unten) auf ihre Praxistauglichkeit geprüft werden.

A2. Biomarker für chronische Belastungen

A2.1 Reproduktion und Immunsystem

In diesem Projektteil sollen weitere Biomarker untersucht werden, die eine chronische Belastung für verschiedene Wirkstoffklassen bei tiefen Dosen oder anderen Stressfaktoren (z.B. Varroamilbe) anzeigen. Das Protein **Vitellogenin hat verschiedene Funktionen in der Reproduktion sowie in der Regulation des Immunsystems und der Lebensspanne**. Infektionen mit *N. ceranae* hemmen die Expression von Vitellogenin (Chaimanee et al. 2012). Analog zum AChR und der AChE wird zuerst die basale Expression von Vitellogenin (vtg) in unbelasteten Larven und adulten Bienen sowie anschliessend in Insektizid-belasteten Larven und adulten Bienen untersucht. Dabei werden bei diesem und weiteren Biomarkern Dosis-Wirkungsbeziehungen untersucht. Weitere mögliche Biomarker für Insektizide und andere Belastungen (z.B. Varroamilbe) könnten Gene darstellen, die das **Immunsystem bei Bienen** steuern. Darunter fallen die Prophenol Oxidase (*proPO*), Defensin-1 (*def-1*) und Glukose Dehydrogenase (*GLD*), die auch als Marker für den Gesundheitszustand der Biene dienen (Garrido et al. 2012) (Tabelle 2).

A2.2 Enzyme des Metabolismus, ABC-Transporter und Stressgene

Neonicotinoide werden von Bienen mittels Phase I Enzymen (Cytochrome P450 Enzyme (Cyp) und Aldehydoxidasen) metabolisiert (Suchail. et al 2004). Pyrethroide induzieren Cyp (Mao et al. 2011). Nicht bekannt ist aber, ob Cyp auch durch Neonicotinoide induziert werden. Dies wäre ein weiterer sehr sensibler Biomarker. Analog zu den Projektteilen 1.1 und 2.1 werden die Transkripte von Phase I- (Cyp) und Phase II-Enzymen (Glutathion-S-Transferase) nach der Exposition an die verschiedenen Insektizide ermittelt. Wiederum werden Dosis-Wirkungsbeziehungen ermittelt. Schliesslich wird auch die Expression von ABC-Transportern untersucht. ABC-Transporter gehören zum Entgiftungssystem der Zelle und sind somit wichtig für den Abtransport schädlicher Stoffe aus der Zelle. Die Behandlung von Bienen mit Antibiotika führt zu einer verminderten Aktivität der ABC-Transporter und damit zu einer Erhöhung der Toxizität (Hawthorne und Dively, 2011).

Des Weiteren wird die Katalase-Expression (*Cat*) als Marker für **oxidativen Stress** in Larven und adulten Bienen analysiert.

Tabelle 2: Für die Studie ausgewählte qPCR Primer für die quantitative Bestimmung der mRNA-Menge mittels RT-qPCR. Die drei ersten Primer (*act*, *rp49* und *rpS5*) sind Referenzgene für die Quantifizierung.

Primer	Referenz
<i>act</i>	Lourenco et al. 2009
<i>rp49</i>	Lourenco et al. 2009
<i>rpS5</i>	Evans 2006
<i>proPO</i>	Lourenco et al. 2009
<i>def-1</i>	Lourenco et al. 2009
<i>vg</i>	Lourenco et al. 2009
<i>GLD</i>	Yang and Cox-Foster (2005)
<i>Cat</i>	Collins et al. 2004
<i>Apis-α2</i>	Thany et al. 2005
<i>Apis-α3</i>	Thany et al. 2003
<i>Apis-α7-1</i>	Thany et al. 2005
<i>Apis-α7-2</i>	Thany et al. 2005
<i>Cyp9Q1</i>	Mao et al. 2011
<i>Cyp9Q2</i>	Mao et al. 2011
<i>Cyp9Q3</i>	Mao et al. 2011
ABC Transporter	noch keine Primer publiziert Eigenes Primerdesign

A2.3 Mischungen von Pflanzenschutzmitteln

Erfolgreiche Biomarker für chronische Exposition aus den Teilen A2.1 und A2.2 werden analog zu Neonicotinoid-Mischungen (Teil A1.3) ebenso an verschiedene Pyrethroide einerseits, und an Mischungen aus Neonicotinoiden und Pyrethroiden andererseits, exponiert. Es sollen ebenfalls Dosis-Wirkungsbeziehungen hergestellt und den Einfluss der Mischungen auf die Gesamtaktivität der Biomarker ermittelt werden. Messparameter sind die Biomarker AchR (mRNA-Menge) und AchE-Aktivität (Proteinebene) sowie die als aussagekräftig ermittelten Biomarker für chronische Wirkungen auf der mRNA- respektive Protein-Ebene. Ziel ist es zu untersuchen, ob die sich die Einzelsubstanzen addieren oder ob sie sich synergistisch oder antagonistisch verhalten. Diese Informationen sind wichtig für die Expositions- und Risikoanalyse von Pflanzenschutzmitteln in Bezug auf die Bienengesundheit.

B. Identifikation chronischer Wirkungsparameter auf physiologischer Ebene: verzögerte Entwicklung von Larven bei der Exposition an Neonicotinoide und andere Insektizide

Neben den molekularen Wirkungen werden auch physiologische Parameter mit hoher Aussagekraft für die Bienengesundheit untersucht. Ein wichtiger Parameter ist die Bienenentwicklung, die für die Populationsentwicklung eine ausschlaggebende Bedeutung hat. Inwieweit dieser Parameter für

chronische Wirkungen bei Bienen bestimmt werden kann und worin seine Aussagekraft besteht, wird in diesem Projektteil untersucht.

In Zusammenarbeit mit dem Bundesamt für Landwirtschaft werden entsprechende Daten gesichtet. Bei fehlender Datenlage werden dazu Experimente mit der Exposition von Eiern mit Neonicotinoiden und anderen Insektiziden (Pyrethroiden und eventuell Organophosphaten) durchgeführt und ihre Entwicklung im Labor verfolgt. Gemessen wird der Einfluss der Pestizide auf die Entwicklungszeit der Larven sowie eine allfällige letale Wirkung.

C. Ausblick: Relevanz für die Praxis

C1. Einfluss der Varroamilbe und Varroa-Bekämpfungsmittel

Inwiefern der Befall mit Varroamilben, diese Biomarker verändert, oder ob gar einer der Biomarker, einen Befall mit Varroamilben anzeigt, soll hier untersucht werden. Zudem können Varroa-Bekämpfungsmittel die Wirkung von Pestiziden verstärken, indem sie die ABC-Transporter (Hawthorne & Dively 2011), und hypothetisch, die Entgiftungskapazität von Bienen hemmen. Auch diese Behandlungsmittel selbst stellen für Bienen einen starken Stressfaktor dar. Ziel dieses Projektteils ist die Analyse des Einflusses von Varroamilben auf die Biomarker sowie der Einfluss von Varroa-Bekämpfungsmitteln auf die Entgiftungsprozesse der Bienen und die entwickelten molekularen Biomarker. Auch soll die Frage geklärt werden, ob diese Mittel die Pestizidwirkung verstärken.

Als erstes wird die basale Aktivität und Expression von ABC-Transportern in Larven und adulten Bienen bestimmt. Anschliessend analysieren wir den möglichen Einfluss von (1) Varroamilbenbefall und (2) verschiedener Dosen von Behandlungsmitteln auf die Aktivität und Expression der Biomarker AchR, AchE, Katalase, Vitellogenin, ABC-Transportern, Cyp1a und Cyp3a (Phase I-Enzyme). Die Aktivität von ABC-Transportern könnte durch gängige Varroa-Behandlungsmittel inhibiert werden, wodurch die Wirkung von Pestiziden verstärkt wird. Wir testen diese Hypothese, indem wir Larven und Bienen an gängige Behandlungsmittel (Perizin (Wirkstoff: Coumafos), Flumethrin, Amitraz, Thymol, Oxalsäure, Ameisensäure und Milchsäure) exponieren und danach die Aktivität und Expression der Biomarker (inkl. ABC-Transportern) bestimmen. Des Weiteren werden Mischungsexperimente mit Varroa-Behandlungsmitteln und Neonicotinoiden und Pyrethroiden durchgeführt um zu testen, ob die Pestizidwirkung durch die Behandlungsmittel verstärkt wird.

C2. Feldversuch

In Feldversuchen soll der Zusammenhang zwischen Standort des Bienenvolkes (Expositionsgrad an Pestizide) und der Expression bzw. Aktivität der oben identifizierten Biomarker untersucht werden. Es soll geklärt werden, welchen Einfluss Insektizide auf diese Parameter im Feldversuche auf Bienen haben. Ziel ist eine Validierung der erfolgreich ermittelten Biomarker in der Praxis bei einer Belastung mit Neonicotinoiden respektive anderen Pflanzenschutzmitteln.

Hierfür sammeln wir Bienen und Larven von Bienenvölkern von verschiedenen belasteten Standorten. Der Vergleich von unbelasteten mit belasteten Standorten erlaubt es, den Einfluss von

Pestizidbelastung auf die Genexpression bzw. enzymatische Aktivität zu bestimmen. Folgende Standorte werden verglichen:

- Bienenvölker, die in der Nähe von Maismonokulturen stehen: starke Belastung mit Pestiziden
- Bienenvölker, die abgelegen im Schwarzwald stehen: keine nennenswerte Belastung mit Pestiziden

Dazu werden Bienen zu verschiedenen Zeitpunkten gesammelt:

1. Im Frühjahr vor der Aussaat des Mais und am Anfang des Bienenjahres.
2. Ende April/Anfang Mai kurz nach der Aussaat des gebeizten Mais. Die bei der Maisaussaat entstehenden Stäube können zu einer sehr starken Belastung der Bienen führen.
3. Anfang Juni, wenn das Bienenvolkentwicklungsmässig auf seinem Höhepunkt ist.
4. Ende Sommer, wenn der Mais geerntet wird, der Honig geschleudert und das Bienenjahr zu Ende geht.

2.4 Eigene Forschung auf diesem Gebiet und Kompetenzen

Die am Projekt beteiligten Forscher sind selbst Imker und daher erfahren im Umgang und der Pflege von Bienenvölkern. Ausserdem haben wir langjährige Erfahrung im Bereich der Wirkungsforschung (Toxikologie und Ökotoxikologie) auf den folgenden, für das Projekt relevanten Gebieten:

Entwicklung und Anwendung von Enzymassays und ABC-Transportassays: Wir haben Enzymassays und Transportassays, welche für menschliche Zellen bzw. menschliches Gewebe entwickelt wurden, auf Fischzellen und Fischgewebe übertragen und optimiert (Caminada et al. 2008; Zaja et al. 2008; Christen et al. 2009). Deshalb sehen wir uns auch in der Lage, die gängigen Enzym- und Transportassays auf Bienengewebe zu übertragen und zu optimieren.

Molekularbiologie und Genexpressionsanalysen: Wir arbeiten mit quantitativen Methoden zur Analyse der Expression von Genen in menschlichen Zellen, Fischzellen und Fischgewebe (Christen et al. 2011; Oggier et al. 2011; Blüthgen et al. 2012; Zucchi et al. 2012). Die Untersuchung der Genexpression in Bienengewebe ist problemlos möglich. Alle gebräuchlichen Methoden wie RNA-Isolation, cDNA-Synthese und quantitative PCR sind bei uns im Labor etabliert.

Expositionsversuche: Wir führen regelmässig Expositionsversuche mit Zellkulturen, adulten Fischen und Fischeiern sowie Daphnien durch. Wir haben langjährige Erfahrung in der Planung und Durchführung von Expositionsexperimenten zur Wirkungsanalyse. Ausserdem analysieren wir unsere Proben bezüglich Konzentration der Expositionssubstanz. Wir haben die apparativen und technischen Möglichkeiten, mit Bienenvölkern und Bienenlarven zu arbeiten.

Analyse von Mischungen von Chemikalien und Pestiziden: In einem Projekt des Bundesamts für Gesundheit (BAG) untersuchten wir die anti-androgene Aktivität von Phthalaten und anderen Industriechemikalien als Einzelsubstanzen und Mischungen in einer humanen Zelllinie (MDA-kb2-Zellen) (Christen et al. 2010, 2012). Ziel ist es, die Aktivität von Mischungen zu evaluieren, also ob sie sich additiv, synergistisch und antagonistisch verhalten. Gegenwärtig untersuchen wir die anti-androgene Aktivität von Mischungen von Pyrethroiden und Fungiziden.

3. Detaillierter Forschungsplan

3.1 Fragestellungen und Ziele

Ziel ist die Entwicklung und Validierung von sensitiven molekularen Biomarkern, die auf eine Belastung mit Neonicotinoiden oder anderen Insektiziden schliessen lassen. Diese Biomarker werden in Mischungsexperimenten weiter evaluiert. In einem Feldversuch werden sie auf ihre Praxistauglichkeit hin untersucht. Unser Ziel ist es letztlich, robuste und einfach zu testende Biomarker in wenigen Bienenproben zu entwickeln, die allgemeinere Bedeutung auch im Rahmen von OECD-Richtlinien finden könnten. Denn zurzeit existieren keine OECD-Richtlinien für die Ermittlung chronischer Wirkungen bei Bienen. Wenn es uns gelingt, molekulare Biomarker für die chronische Belastung mit Neonicotinoiden oder anderen Pestiziden zu entwickeln, wäre dies ein grosser Fortschritt in der Bienenforschung und –praxis. Damit sind neue Wirkungsparameter gegeben, die in der Zulassung und im Monitoring von Bedeutung sind. Mit diesen Biomarkern könnten damit mögliche Belastungen früh identifiziert werden.

3.2 Methoden

Neonicotinoide mit verschiedener akuter Bientoxizität werden analysiert und verglichen (Tabelle 1). Die mRNA-Mengen werden mittels RT-qPCR quantifiziert, analog wie in Zebrafischen (Blüthgen et al. 2012; Zucchi et al. 2012) und Zellen (Christen et al. 2011). Hierfür wird mRNA aus Larven und adulten Bienen extrahiert. Bei den Larven wird die mRNA aus dem gesamten Körper isoliert, bei Bienen aus Kopf und dem übrigen Körper (Thorax + Abdomen) getrennt. Nach dem Umschreiben der mRNA in cDNA wird die mRNA-Menge der selektierten Transkripte bestimmt. Primer Sequenzen werden aus der Literatur resp. basierend auf dem sequenzierten Genom der Honigbiene selbst generiert (Tabelle 2).

Die Acetylcholinesterase-Aktivität wird nach Boiley et al. (2013) bestimmt. Um die Cyp1a- und Cyp3a-Aktivitäten und die Transportaktivität der ABC Transporter zu bestimmen, werden die vorhandenen Enzym- bzw. Transportassays von humanen Proben auf Bienenproben übertragen. Die vorhandenen Cyp1a- und Cyp3a-Assays basieren auf der Umwandlung eines nicht-fluoreszierenden Substrates in ein fluoreszierendes Produkt. Als Erstes wird getestet, ob das Substrat für humanes Cyp1a bzw. Cyp3a auch Substrat für das Cytochrom P450 Enzym der Biene ist. Da das humane Cyp3a-Substrat auch Substrat von Zebrafischen (Christen et al. 2009) ist, bestehen gute Chancen einer Übertragung auf Bienen. Dasselbe gilt auch für den in humanen Zellen etablierten ABC-Transport Assay.

Die Expositionsversuche (Einzelsubstanzen und Mischungen) werden im Labor mit Larven und adulten Bienen in einem Inkubator durchgeführt. Für den Feldversuch werden wir Kontakt mit entsprechenden Imkern aufnehmen. Unsere eigenen Bienenvölker stehen abgelegen im Südschwarzwald, sodass wir von dort unbelastete Proben für den Feldversuch entnehmen können.

3.3 Meilensteine

1. Meilenstein: Entwicklung und Optimierung der molekularbiologischen Methoden

Unbelastete Larven und Bienen werden zur Etablierung der molekularbiologischen Methoden verwendet. Die technischen Details für die Bestimmung der mRNA-Menge mittels RT-qPCR wird für die einzelnen Primer optimiert. Bienen werden an die verschiedenen Neonicotinoide exponiert und Dosis-Wirkungs-Beziehungen ermittelt. Des Weiteren werden auf der Proteinebene die *in-vitro* Assays für die Acetylcholinesterase (AChE)-Aktivität in Larven und adulten Bienen etabliert und optimiert. Die Bienen werden dann an verschiedene Pflanzenschutzmittel exponiert und die AChE gemessen.

2. Meilenstein: Expositionsversuche mit Larven und adulten Bienen mit Einzelsubstanzen

Als Erstes werden *in-vitro* Assays (Cyp1a- und Cyp3a-Aktivität und ABC Transportaktivität) in Larven und adulten Bienen etabliert und optimiert. Dann wird die basale Exposition der potentiellen Biomarker, also Grundaktivitäten der mRNAs verschiedener Gene bestimmt und ermittelt, wie sie sich auf Exposition an Pflanzenschutzmitteln verändern. Auf der Proteinebene werden die Enzyme Cyp1a und Cyp3a sowie der ABC-Transporter in Larven und adulten Bienen analysiert und Expositionsversuche mit einzelnen Neonicotinoiden (Tabelle 1) und weiteren Pflanzenschutzmitteln durchgeführt und Dosis-Wirkungsbeziehungen analysiert. Danach wird die Expression der potentiellen Biomarker sowie die Enzymaktivitäten und Transportaktivitäten analysiert.

3. Meilenstein: Exposition von Larven oder adulten Bienen an Mischungen

Mischungsversuche werden mit Larven und eventuell mit adulten Bienen durchgeführt und die Expression der Biomarker (AChR,, weitere Gene) auf der mRNA-Ebene, sowie auf der Proteinebene die enzymatische Aktivität von Acetylcholinesterase, Cyp1a und Cyp3a sowie der ABC-Transporter bestimmt. Auch hier werden Dosis-Wirkungsbeziehungen ermittelt.

4. Meilenstein: Praktische Erprobung bei Varroamilben-Befall und Feldversuch

Ob die Biomarker durch Varroamilben-Befall verändert werden oder diesen anzeigen, wird hier untersucht. Zudem wird der Einfluss von Verroa-Bekämpfungsmitteln ermittelt. Parallel dazu werden Larven und Bienen aus Bienenvölkern von unbelasteten und belasteten Standorten gesammelt, um den Einfluss auf die Biomarker zu untersuchen. Die Proben werden aufgearbeitet und analysiert um die vorab identifizierten Biomarker zu validieren.

4. Zeitplan

Ende August 2013 beginnen wir mit der Analyse der Expression des AchR in Bienen. Dabei möchten wir schon experimentelle Techniken etablieren und die Frage klären, wie mRNA-Mengen des AchR in Bienenproben bestimmt werden können. Zudem arbeiten wir schon experimentelle Details für die molekularbiologische Erfassung der mRNA-Menge von anderen Genen in Bienen vor. Diese Arbeiten machen wir unabhängig von einer allfälligen Finanzierung durch das Bundesamt für Landwirtschaft (Eigenfinanzierung).

Von Oktober 2013 bis Frühjahr 2014 sollen die Methoden etabliert (Meilenstein 1) werden. Im Frühjahr 2014 beginnen Expositionsversuche (Meilenstein 2). Im Frühjahr und Sommer 2015 planen wir die Mischungsversuche (Meilenstein 3) und Versuche über den Einfluss der Varroamilbe auf die Biomarker. Den Feldversuch (Meilenstein 4) planen wir für Frühjahr 2016. Die Resultate der einzelnen Meilensteine sollen in guten internationalen Wissenschaftsjournals publiziert werden. Figur 1 illustriert die zeitlichen Planung des Projekts.

Zeitraum	Oktober 2013 – Mai 2014	Mai 2014 – Mai 2015	Mai 2015 – Mai 2016	Mai 2016 – Oktober 2016
1. Meilenstein				
2. Meilenstein				
3. Meilenstein				
4. Meilenstein				

Figur 1: Grafische Darstellung des zeitlichen Ablaufes des geplanten Projektes.

5. Budget für das dreijährige Projekt (in CHF)

	1. Jahr	2. Jahr	3. Jahr
1. Anteil Salär von Dr. Verena Christen	53 000	53 000	55 000
2. Materialien und Chemikalien (PCR, Assays, Chemikalien)	8 000	8 000	6 000
Total	61 000	61 000	61 000

Gesamttotal CHF 183 000

6. Bedeutung und praktischer Nutzen

Das Hauptziel dieses Projektes ist die Entwicklung und Validierung sensitiver Biomarker für die chronische Exposition von Honigbienen an Pflanzenschutzmittel, im Speziellen an Neonicotinoide. Die identifizierten Biomarker sollen sensitiv, robust und einfach zu analysieren sein. Diese Biomarker könnten letztlich Eingang in eine OECD-Richtlinie zur Bestimmung chronischer Effekte von Pestiziden bei Honigbienen finden. Dies wäre ein grosser Fortschritt in Forschung und Praxis. So könnten die Biomarker für die Zulassung von Pestiziden und im Monitoring von Bedeutung werden. Des Weiteren werden die molekularen Wirkungen von Neonicotinoiden im Vergleich zu anderen Pestiziden sowie deren Mischungen analysiert. Die Analyse der Mischungsaktivität ist wichtig, sind doch Bienen nicht nur einem Insektizid, sondern einer Pestizidmischung ausgesetzt, wie die Rückstände in Nektar, Pollen, Honig und Wachs zeigen. Für ein besseres Verständnis des Einflusses von chronischen Tiefdosis-Wirkungen der Pestizide auf die Bienengesundheit ist es unverzichtbar zu wissen, ob Mischungen additiv, synergistisch oder antagonistisch wirken. Weiter ist der Vergleich der Wirkung von Neonicotinoiden mit anderen Pflanzenschutzmitteln (Pyrethroide und Organophosphate) wichtig um ihre Bedeutung im Zusammenhang mit dem Bienensterben zu verstehen.

7. Referenzen

- Boily M, Sarrasin B, DeBlois C, Aras P, Madeleine Chagnon M. Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. *Environ Sci Pollut Res*. 2013, [Epub ahead of print].
- Chaimanee V, Chantawannakul P, Chen Y, Evans JD, Pettis JS. Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *J Insect Physiol*. 2012, 58(8):1090-5.
- Colin ME, Bonmatin JM, Moineau I, Gaimon C, Brun S, Vermandere JP. A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2004, 47:387–395.
- Decourtye A, Devillers J. Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. In: Thany SH, editor. *Insect nicotinic acetylcholine receptors*. 1. New York: Springer; 2010. pp. 85–95.
- Decourtye A, Devillers J, Genecque E, Menach K, Budzinski H, Cluzeau S, Pham-Delègue MH. Impairment of olfactory learning performances in the honey bee after long term ingestion of imidacloprid. In: Belzunces LP, Pellissier C, Lewis GB, editors. *Hazard of pesticides to bees*. Paris: INRA; 2001. pp. 113–117.
- Decourtye A, Lacassie E, Pham-Delegue MH. Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L.) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest Manag Sci*. 2003, 59:269–278.
- Decourtye A, Devillers J, Genecque E, Menach K, Budzinski H, Cluzeau S, Pham-Delègue MH. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2005, 48:242–250.
- Evans JD. Beepath: an ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2006, 93: 135–139.
- Garrido PM, Antúnez K, Martín M, Porrini MP, Zunino P, Eguaras MJ. Immune-related gene expression in nurse honey bees (*Apis mellifera*) exposed to synthetic acaricides. *J Insect Physiol*. 2013, 59(1):113-9.
- Gregorc A, Evans JD, Scharf M, Ellis JD. Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and *Varroa* mites (*Varroa destructor*). *J Insect Physiol*. 2012, 58(8):1042-9
- Guez D, Suchail S, Gauthier M, Maleszka R, Belzunces LP. Contrasting effects of imidacloprid on habituation in 7- and 8-day-old honeybees (*Apis mellifera*) *Neurobiol Learn Mem*. 2001, 76:183–191.
- Guez D, Belzunces LP, Maleszka R. Effects of imidacloprid metabolites on habituation in honeybees suggest the existence of two subtypes of nicotinic receptors differentially expressed during adult development. *Pharmacol Biochem Behav*. 2003, 75:217–222.
- Hawthorne DJ, Dively GP. Killing them with kindness? In-hive medications may inhibit xenobiotic efflux transporters and endanger honey bees. *PLoS One*. 2011;6(11):e26796.
- Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, Roe MR. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Prot*. 2004, 23:371–378.
- Johnson RM, Mao W, Pollock HS, Niu G, Schuler MA, Berenbaum MR. Ecologically appropriate xenobiotics induce cytochrome P450s in *Apis mellifera*. *PLoS One*. 2012, 7(2):e31051.
- Jones AK, Raymond-Delpech V, Thany SH. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Res*. 2006, 16:1422-1430.
- Lambin M, Armengaud C, Raymond S, Gauthier M. Imidacloprid-induced facilitation imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2001, 48:129–134.
- Mao W, Schuler MA, Berenbaum MR. CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011, 108(31):12657-62.

Nauen R, Ebbinghaus-Kintscher U, Schmuck R. Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) Pest Manag Sci. 2001, 57:577–586.

Schmuck R, Schoning R, Stork A, Schramel O. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L. Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. Pest Manag Sci. 2001, 57:225–238.

Suchail S, Guez D, Belzunces LP. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. Environ Toxicol Chem. 2001, 20:2482–2486.

Thany SH, Lenaers G, Crozatier M, Armengaud C, Gauthier M. Identification and localization of the nicotinic acetylcholine receptor 3 mRNA in the brain of the honeybee, *Apis mellifera*. Insect Mol. Biol. 2003, 12:255–262.

Thany SH, Crozatier M, Raymond-Delpech V, Gauthier M, Lenaers G. Apis2, Apis7-1 and Apis7-2: Three new neuronal nicotinic acetylcholine receptor -subunits in the honeybee brain. Gene 2005, 344:125–132.

Whitehorn PR, O'Connor S, Wackers FL, Goulson D. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. Science. 2012, 336:351-322.

Yang X, Cox-Foster DL. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005, 21:7470–7475.

8. Referenzen eigener Arbeiten

Blüthgen N, Zucchi S, Fent K. Effects of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in zebrafish (*Danio rerio*). Toxicol Appl Pharmacol. 2012, 263(2):184-94.

Caminada D, Zaja R, Smital T, Fent K. Human pharmaceuticals modulate P-gp1 (ABCB1) transport activity in the fish cell line PLHC-1. Aquat Toxicol. 2008, 90(3):214-22.

Christen V, Oggier DM, Fent K. A microtiter-plate-based cytochrome P450 3A activity assay in fish cell lines. Environ Toxicol Chem. 2009, 12:2632-8.

Christen V, Crettaz P, Oberli-Schrämmli A, Fent K. Some flame retardants and the antimicrobials triclosan and triclocarban enhance the androgenic activity in vitro. Chemosphere. 2010, 81(10):1245-52.

Christen V, Zucchi S, Fent K. Effects of the UV-filter 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate (EHMC) on expression of genes involved in hormonal pathways in fathead minnows (*Pimephales promelas*) and link to vitellogenin induction and histology. Aquat Toxicol. 2011, 102(3-4):167-76.

Christen V, Crettaz P, Oberli-Schrämmli A, Fent K. Antiandrogenic activity of phthalate mixtures: validity of concentration addition. Toxicol Appl Pharmacol. 2012, 259(2):169-76.

Fent K. Ökotoxikologie. 2013. Georg Thieme-Verlag. 4. Auflage

Kunz PY, Fent K. Estrogenic activity of UV filter mixtures. Toxicol Appl Pharmacol. 2006, 217(1):86-99.

Kunz PY, Fent K. Estrogenic activity of ternary UV filter mixtures in fish (*Pimephales promelas*) - an analysis with nonlinear isobolograms. Toxicol Appl Pharmacol. 2009, 234(1):77-88.

Oggier DM, Lenard A, Küry M, Hoeger B, Affolter M, Fent K. Effects of the protein kinase inhibitor PKC412 on gene expression and link to physiological effects in zebrafish *Danio rerio* eleuthero-embryos. Toxicol Sci. 2011, 119(1):104-15.

Zaja R, Caminada D, Loncar J, Fent K, Smital T. Development and characterization of P-glycoprotein 1 (Pgp1, ABCB1)-mediated doxorubicin-resistant PLHC-1 hepatoma fish cell line. Toxicol Appl Pharmacol. 2008, 227(2):207-18.

Zucchi S, Castiglioni S, Fent K. Progestins and antiprogestins affect gene expression in early development in zebrafish (*Danio rerio*) at environmental concentrations. Environ Sci Technol. 2012, 46(9):5183-92.