



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft



Schlussbericht zum Thema

Interaktion von abiotischen Stressoren und Nahrungslimitierung auf
Bienengesundheit und Entwicklung von Jungvölkern im Freiland –
NutriBee

FKZ: 2819NA066, 2819NA101, 2819NA102, 2819NA103, 2819NA104,
2819NA105, 2819NA106, 2819NA107

Projektnehmer/Projektnehmerin:

Julius Kühn-Institut

Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und
Lebensmittelsicherheit

Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung

Bayerische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau

Ruhr-Universität Bochum

Freie Universität Berlin

Technische Universität Ilmenau

Universität Hohenheim

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft auf Grund eines Beschlusses des deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau.

Das Bundesprogramm Ökologischer Landbau (BÖL) hat sich zum Ziel gesetzt, die Rahmenbedingungen für die ökologische Landwirtschaft in Deutschland zu verbessern. Es wird vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) finanziert und in der BÖL-Geschäftsstelle in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) in die Praxis umgesetzt. Das Programm gliedert sich in zwei ineinandergreifende Aktionsfelder - das Forschungs- und das Informationsmanagement.

Detaillierte Informationen und aktuelle Entwicklungen finden Sie unter:

www.bundesprogramm.de
www.oekolandbau.de/forschung

Wenn Sie weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte an:

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
Bundesprogramm Ökologischer Landbau
Deichmanns Aue 29
53179 Bonn
Tel.: 0228-6845-3280
E-Mail: boel-forschung@ble.de

Abschlussbericht

des Verbundvorhabens

Zuwendungsempfänger:

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Bienenschutz;
sowie 7 weitere Verbundprojektpartner (siehe FKZ)

Förderkennzeichen:

2819NA066 (Julius Kühn-Institut-JKI), 2819NA101 (Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit-LAVES-CE), 2819NA102 (Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH-UFZ), 2819NA103 (Bayerische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau-LWG-IBI), 2819NA104 (Ruhr-Universität Bochum-RUB), 2819NA105 (Freie Universität Berlin-FUB), 2819NA106 (Technische Universität Ilmenau-TUI), 2819NA107 (Universität Hohenheim-UHOH)

Vorhabenbezeichnung:

Interaktion von abiotischen Stressoren und Nahrungslimitierung auf Bienengesundheit und Entwicklung von Jungvölkern im Freiland - NutriBee

Laufzeit des Vorhabens:

05/2021 – 12/2024

Gefördert durch



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	4
1.1 Gegenstand des Vorhabens	4
1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts, Bezug des Vorhabens zu den einschlägigen Zielen des BÖL oder zu konkreten Bekanntmachungen und Ausschreibungen	5
MODUL 1: Vergleichende Stressorenwirkung auf Jung- und Wirtschaftsvölker	5
MODUL 2: Entwicklung eines pollenanalytischen Verfahrens zur Bestimmung von Nahrungspflanzen	6
1.3 Planung und Ablauf des Projektes	7
MODUL 1: Vergleichende Stressorenwirkung auf Jung- und Wirtschaftsvölker	7
MODUL 2: Entwicklung eines pollenanalytischen Verfahrens zur Bestimmung von Nahrungspflanzen	9
Modulübergreifendes Ziel: Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses	11
2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	12
MODUL 1: Vergleichende Stressorenwirkung auf Jung- und Wirtschaftsvölker	12
MODUL 2: Entwicklung eines pollenanalytischen Verfahrens zur Bestimmung von Nahrungspflanzen ...	15
3. Material und Methoden	18
MODUL 1: Vergleichende Stressorenwirkung auf Jung- und Wirtschaftsvölker	18
MODUL 2: Entwicklung eines pollenanalytischen Verfahrens zur Bestimmung von Nahrungspflanzen ...	22
4. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	26
MODUL 1: Vergleichende Stressorenwirkung auf Jung- und Wirtschaftsvölker	26
Arbeitspaket 1.1: Kunstschwarmbildung und Voranalyse der Darm-Mikroflora [abgeschlossen, publiziert]	26
Arbeitspaket 1.2: Populations- und Brutentwicklung [abgeschlossen, publiziert]	27
Arbeitspaket 1.3: Wirkstoffverteilung in relevanten Matrices [abgeschlossen, publiziert]	29
Arbeitspaket 1.4: Entwicklung des Mikrobioms unter Stressoreinfluss [abgeschlossen, publiziert]	31
Arbeitspaket 1.5: Stressoren-Einflüsse anhand spezifischer Biomarker [abgeschlossen, in Bearbeitung] ...	32
Arbeitspaket 1.6: Überwinterungserfolg und Verarbeitung der Daten [abgeschlossen, publiziert]	33
MODUL 2: Entwicklung eines pollenanalytischen Verfahrens zur Bestimmung von Nahrungspflanzen	34
Arbeitspaket 2.1: Sammeln, Verifizieren, Validieren von Pollenproben für Aufbau einer Pollenbilddatenbank [abgeschlossen, Publikation – aktueller Status <i>provisionally accepted/minor revision</i>]	34
Arbeitspaket 2.2: Aufbau einer bundesweiten Pollenbilddatenbank basierend auf Pollenhörschen-Proben [abgeschlossen, Publikation in Bearbeitung]	38
Arbeitspaket 2.3: Erweiterung der Pollenbilddatenbank basierend auf verschiedenen Matrices [abgeschlossen, Publikation in Bearbeitung]	39
Arbeitspaket 2.4: Evaluierung von Maßnahmen für bestäuberfreundlichen Pflanzenschutz und Pflanzenbau [in Bearbeitung]	42
Modulübergreifendes Ziel: Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses	43
5. Diskussion der Ergebnisse	44
MODUL 1: Vergleichende Stressorenwirkung auf Jung- und Wirtschaftsvölker	44
Arbeitspaket 1.1: Kunstschwarmbildung und Voranalyse der Darm-Mikroflora	44
Arbeitspaket 1.2: Populations- und Brutentwicklung	44
Arbeitspaket 1.3: Wirkstoffverteilung in relevanten Matrices	44
Arbeitspaket 1.4: Entwicklung des Mikrobioms unter Stressoreinfluss	44

Arbeitspaket 1.5: Stressoren-Einflüsse anhand spezifischer Biomarker	46
MODUL 2: Entwicklung eines pollenanalytischen Verfahrens zur Bestimmung von Nahrungspflanzen	47
Arbeitspaket 2.1: Sammeln, Verifizieren, Validieren von Pollenproben für Aufbau einer Pollenbilddatenbank	47
Arbeitspaket 2.2: Aufbau einer bundesweiten Pollenbilddatenbank basierend auf Pollenhöschen-Proben .	48
Arbeitspaket 2.3: Erweiterung der Pollenbilddatenbank basierend auf verschiedenen Matrices	48
Arbeitspaket 2.4: Evaluierung von Maßnahmen für bestäuberfreundlichen Pflanzenschutz und Pflanzenbau	48
6. Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse	49
7. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; Hinweise auf weiterführende Fragestellungen	49
8. Zusammenfassung.....	50
9. Literaturverzeichnis.....	51
10. Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt..	53
Publikationen (<i>peer-reviewed</i>):	53
Vorstellung des Projektes in Form eines Berichtes:	53
Vorstellung des Projektes im Rahmen eines Vortrages:.....	54
Tagungsbeiträge:	55
Abschlussarbeiten:.....	58
Online Medien:.....	59

1. Einführung

1.1 Gegenstand des Vorhabens

Im Rahmen des Projekts wollten wir junge Honigbienenstöcke gezielt in ihrer sensiblen Wachstumsphase diversen Stressoren aussetzen, mit denen sie auch unter guter imkerlicher Praxis konfrontiert werden. Jungstöcke bilden das Rückgrat einer jeden Imkerei und eine gesunde Entwicklung ist entscheidend für ihre Bestäubungsleistung und die Volksvitalität. In einem bundesweit angelegten Feldversuch sollte sowohl auf individueller als auch auf Volksebene ermittelt werden, wie sich Jungstöcke im Vergleich zu Wirtschaftsvölkern unter Stress (Nahrungsmangel, Pflanzenschutzmittel und deren Kombination) entwickeln und welche Faktoren maßgeblichen Einfluss auf die Bienengesundheit haben könnten. Der Erkenntnisgewinn aus dem Projekt lässt sich dazu nutzen, Maßnahmen zu entwickeln, um die Rückstandsbelastung von Bienenstöcken sowie deren Bienenprodukten, vor allem in Trachten mit einem hohen Grad an Kultivierung (z.B. Obstbau, Raps), zu verringern. Damit einher geht nicht nur die Gesunderhaltung der Bienen, sondern auch die Aufrechterhaltung der Imkerei als Grundpfeiler der Landwirtschaft in Deutschland. Um sowohl die Nahrungssituation der Bienenstöcke, Maßnahmen des bestäuberfreundlichen Pflanzenschutzes, als auch einen möglichen Pestizideintrag über Pollen erfassen und untersuchen zu können, sollte die Entwicklung eines automatisierten, zuverlässigen Hochdurchsatzverfahrens für die Pollenanalytik vorangetrieben werden, um dieses im größeren Umfang einsetzen zu können.

1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts, Bezug des Vorhabens zu den einschlägigen Zielen des BÖL oder zu konkreten Bekanntmachungen und Ausschreibungen

Die Ziele und Aufgabenstellungen des Projekts richteten sich nach den Zielen und Ausrichtungen der „Bekanntmachung über die Förderung von Forschungsvorhaben zum Schutz von Bienen und weiteren Bestäuberinsekten in der Agrarlandschaft“ vom 18. Juli 2019. Aus der Bekanntmachung gehen folgende Ziele hervor, die in diesem Projekt Anwendung finden:

- Erforschung der Wirkmechanismen und Einflüsse von Pflanzenschutzmitteln auf die Gesundheit von Bienen
- Entwicklung von Anwendungen/Methoden/Techniken zur Feststellung akuter, subletaler und chronischer Schäden, hervorgerufen durch Pflanzenschutzmittel, sowie deren mögliche Interaktionen
- innovative, praxistaugliche Lösungen für insektenschonende Pflanzenschutzmaßnahmen, z. B. zur Minderung von Risiken bis Vermeidung der Anwendung bestimmter Pflanzenschutzmittel, vornehmlich mit der Zielstellung Beeinträchtigungen der Gesundheit von Bienen und anderen Bestäuberinsekten zu vermeiden, sowie Pflanzenschutzmittelrückstände in Bienenprodukten zu reduzieren
- Untersuchung der Auswirkungen von durch Trachtlücken verursachtes unzureichendes Nahrungsangebot für Honigbienen
- Verbesserung des Nahrungsangebots für Honigbienen und die Stärkung ihrer Widerstandskraft
- Wissenstransfer von Forschungsergebnissen in Imkerei- und landwirtschaftliche Betriebe, Beratung, Praxis, Bevölkerung und Politik

Aus den Zielen der Bekanntmachung wurden folgende konkrete Ziele für unser Projekt definiert:

MODUL 1: Vergleichende Stressorenwirkung auf Jung- und Wirtschaftsvölker

Modulleitung: JKI, Kooperationspartner: CE, IBI, RUB, UHOH, FUB

- Ermittlung der Anpassungsfähigkeit von Jungvölkern im Vergleich zu etablierten Wirtschaftsvölkern in Bezug auf regionale Standortunterschiede und deren Ressourcenverfügbarkeit in Deutschland (Nahrungsangebot, Krankheitsanfälligkeit, Exposition zu Pflanzenschutzmitteln - PSM).
- Gezielte manipulative Untersuchungen der Auswirkungen einer Kombination von Stressfaktoren auf die Gesundheit und Überwinterungsfähigkeit von Jungvölkern (z.B. PSM - Fungizide, Mangelernährung - Pollenunterversorgung), für die Strategieentwicklung zur Verbesserung der Bienengesundheit.
- Bestimmung der Verteilung von PSM im Bienenvolk, vor allem im Larvenfutter zukünftiger Arbeiterinnen, Drohnen und Königinnen, im Vergleich zum direkten Eintrag über Pollen und Nektar.
- Entwicklung eines neuen standardisierten Testverfahrens zur Bestimmung der Kernmikroflora im Pollen und Bienenbrot (Nahrungsqualität), sowie in den Bienen selbst (Vitalität). Dies erfolgte unter Berücksichtigung des Einflusses von praxisrelevanten Fungizidmischungen, um daraus Konsequenzen für die Bienengesundheit zu diagnostizieren.
- Vergleich von Jung- und Wirtschaftsvölkern vor, während und nach Interaktion mit den bereits genannten Stressoren, mittels bestimmter molekularer Biomarker (BeePCRArray; mRNA von Kandidatengenen), für die Bestimmung des Bienengesundheitsstatus.

MODUL 2: Entwicklung eines pollenanalytischen Verfahrens zur Bestimmung von Nahrungspflanzen

Modulleitung: UFZ, Kooperationspartner: CE, TUI, UHOH, JKI

- Entwicklung eines automatisierten, zuverlässigen Hochdurchsatz-Verfahrens für die Pollenanalytik, mit dem Nährpflanzen umfangreich identifiziert und bestäuberfreundlicher Pflanzenschutz und Pflanzenbau grundlegend und sehr viel effizienter evaluiert werden kann.
- Vergleich und Evaluierung von Pollenproben, die durch das Netzwerk von Praxispartnern gesammelt werden, und die Pollenbestimmung mittels klassischer Lichtmikroskopie und bildbasierter Durchflusszytometrie.
- Weiterentwicklung der bildbasierten Durchflusszytometrie zur Identifizierung von Pollen aus verschiedenen für Honigbienen relevanten Matrices (z.B. frischer Pollen – aus dem Haarkleid oder Pollenhöschen, Honig, Gelée Royal, Futtersaft, Bienenbrot) und ggf. von anderen Bestäubern (z.B. Hummeln, Solitärbiene - *Osmia*).

1.3 Planung und Ablauf des Projektes

Die Ziele des Projektes wurden in verschiedene Arbeitspakete unterteilt und entsprechende Zeitpläne und Abläufe zur Erfüllung erarbeitet (Abbildung 1.1).



Abbildung 1.1: Gantt-Diagramm des Gesamtprojektverlaufs mit Darstellung der Module (1 und 2), Arbeitspakete, sowie Verschiebungen im Rahmen der Projektverlängerung.

MODUL 1: Vergleichende Stressorenwirkung auf Jung- und Wirtschaftsvölker

Arbeitspaket 1.1: Kunstschwarmbildung und Voranalyse der Darm-Mikroflora

Beteiligte Partner: JKI, CE, RUB, UHOH und IBI

Im ersten Projektjahr (2021) wurden an den Standorten der Partner JKI, CE, RUB, UHOH und IBI jeweils 24 Jungvölker im Kunstschwarmverfahren aus vorhandenen eigenen Völkern gebildet und nach guter imkerlicher Praxis bis zur Überwinterungsfähigkeit (mind. 5.000 Bienen stark) herangepflegt. Die Nachzucht geschah aus dem regionalen Genpool mit standbegatteten Geschwisterköniginnen. Die Jungvölker wurden nach dem Schlupf der ersten Brut beprobt (Larven, Bienen, Pollen) und CE ermittelte nach der Bienenaison die Mikroflora in den Proben. Dafür wurden die Bienen homogenisiert und die Mikroflora-DNA extrahiert. Einzelne mikrobielle Biomarker (Kernmikrobiomvertreter: *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola*, *Lactobacillus* Firm-4/-5, *Bifidobacterium asteroides*, *Frischella perrara*) wurden anschließend mittels sehr sensibler Hochdurchsatzprotokolle quantifiziert. In Kooperation mit örtlichen Landwirten, wurden zwei geeignete Felder im Abstand von ca. 2 km Luftlinie von einander je Partner (JKI, CE, RUB, UHOH, IBI) gesucht und im August/September ca. 2-5 ha Winterraps (*Brassica napus*) ausgesät.

Arbeitspaket 1.2: Populations- und Brutentwicklung

Beteiligte Partner: JKI, CE, RUB, UHOH und IBI

Für das zweite Projektjahr wurden Jungvölker gebildet, sodass für die Rapsblüte im zweiten Projektjahr (2022) Wirtschaftsvölker und Jungvölker zur Verfügung standen. Die insgesamt 24 Völker pro Standort (12 Jungvölker, 12 Wirtschaftsvölker, JKI, CE, RUB, IBI, UHOH) wurden Ende April/Anfang Mai auf je zwei Feldflächen Winterraps aufgeteilt (Kontrolle - C, Fungizid - T). Die bestellten C-Felder blieben unbehandelt, die T-Felder wurden mit einem Produkt (Pictor® Active) mit zwei repräsentativen Fungiziden – (Boscalid + Pyraclostrobin (Klasse Strobilurin) – B4)) entsprechend guter landwirtschaftlicher Praxis einmal bei voller Blüte gespritzt (BBCH 65), um eine maximale Kontamination von Bienen und Blüten zu gewährleisten. Die Auswahl der Fungizide

beruhte dabei auf Daten des Deutschen Bienen Monitorings (DeBiMo), in dem in jährlichen Rückstandswerten aus im Raps gesammeltem Pollen (sog. Bienenbrot) - über einen Zeitraum von über 10 Jahren - Boscalid als das am häufigsten gefundene Fungizid identifiziert wurde. Eine Hälfte der Völker (C, T) wurde zusätzlich dauerhaft mit Pollenfallen versehen, um künstlich Nahrungsstress durch Limitierung der Proteinversorgung zu erzeugen. Mittels Pollenanalyse des Inhalts der Pollenfallen (CE) aller Standorte konnte der Nahrungsstress qualitativ und quantitativ bestimmt und verglichen werden. Die Volksentwicklung sowie die Brutabbruchrate (BTR) wurde für die Dauer der Exposition im Raps (Blühdauer) im Abstand von 21 (+/- 1) Tagen überwacht. Für die Zeit danach (Monitoringphase), inkl. Überwinterung, wurden regelmäßige Populationsschätzungen an 3-4 Terminen durchgeführt, um die Volksentwicklung mit den Eingriffen nicht zu sehr zu beeinflussen. Die Populationsentwicklung wurde mittels der Liebefelder-Schätzmethode erfasst (Imdorf et al. 1987), die BTR wurde an ausgewählten Standorten (z.B. JKI, CE, HOH) nach der OECD Richtlinie Nr. 75 (OECD 2007) ermittelt.

Arbeitspaket 1.3: Wirkstoffverteilung in relevanten Matrices

Beteiligte Partner: JKI, CE, RUB, UHOH und IBI

Um die Unterschiede in der Wirkstoffverteilung in relevanten Matrices (Pollen, Nektar, Bienenbrot, Honig, Futtersäfte) zu untersuchen, wurde die Probennahme im Feld um diesen Aspekt erweitert. D.h. es wurden Blütenstände, Pollen- u. Nektarsammlerinnen, eingelagerter Honig und Bienenbrot, Königinnen-, Arbeiterinnen- und Drohnenfuttersäfte in regelmäßigen Abständen vor, während und nach der Fungizidexposition entnommen (JKI, CE, RUB, UHOH, IBI). Hierzu war es nötig, eine ausreichende Zahl an Bienenvölkern für die Rückstandsverteilung zusätzlich als Beprobungsvölker vorzubereiten (ca. 2-3 10-15.000 Bienen starke Beprobungsvölker pro Rapsfeld, inkl. Königinnenzucht für Weiselfuttersaft/Geleé Royal-Gewinnung). Die komplexe Rückstandsanalytik in den unterschiedlichen Matrices erfolgte beim Projektpartner JKI (G. Bischoff / J. Kehmstedt), wobei die Methodik aus vorangegangenen Versuchen zum Einsatz kam (Böhme et al. 2017, 2018, 2019).

Arbeitspaket 1.4: Entwicklung des Mikrobioms unter Stressoreneinfluss

Beteiligte Partner: JKI, CE, RUB, UHOH und IBI

Im zweiten Projektjahr (2022) wurden außerdem Bienen aus den Jung- und Wirtschaftsvölkern (C und T) bezüglich der Entwicklung des Mikrobioms untersucht (CE) und miteinander verglichen. Hierzu wurden die Völker vor, während und nach der Applikation beprobt (JKI, CE, RUB, UHOH, IBI) und dem Projektpartner (CE) zugearbeitet.

Arbeitspaket 1.5: Stressoren-Einflüsse anhand spezifischer Biomarker

Beteiligte Partner: JKI, CE, RUB, UHOH und FUB

In Zusammenarbeit mit ausgewählten Projektpartnern (JKI, CE, RUB, UHOH) wurden im zweiten Projektjahr (2022) relevante Proben (Einzelindividuen für adulte Bienen und Larven) ausgewählter Entwicklungsstadien der Bienen für die Analyse der Genexpression unter den angegebenen Feldversuchs-Szenarien entnommen und an den Projektpartner (FUB) bei <-80 °C übersandt. Der Partner FUB ermittelte, in Zusammenarbeit mit dem JKI, die Stressoren-Einflüsse anhand spezifischer Biomarker, mittels Quantifizierung der mRNA Expression (RT-qPCR; BeePCRArray), und die verschiedenen Szenarien wurden miteinander verglichen.

Arbeitspaket 1.6: Überwinterungserfolg und Verarbeitung der Daten

Beteiligte Partner: JKI, CE, RUB, UHOH, IBI und FUB

Im dritten Projektjahr (2023) wurden alle eingewinterten Völker ausgewintert und einer letzten Bonitur unterzogen. Dabei wurden letztmalig Proben in vollem Umfang gesammelt, um eine mögliche Metabolisierung der Fungizide zu dokumentieren und die Auswinterung zu beurteilen. Zudem wurden die umfangreich gesammelten Proben und Projektdaten eingehend analysiert und die wichtigsten Erkenntnisse in einschlägigen Fachjournalen, aber auch in überregionalen Imkerzeitschriften, publiziert bzw. befinden sie sich dafür in Vorbereitung.

MODUL 2: Entwicklung eines pollenanalytischen Verfahrens zur Bestimmung von Nahrungspflanzen

Arbeitspaket 2.1: Sammeln, Verifizieren, Validieren von Pollenproben für den Aufbau einer Pollenbilddatenbank

Beteiligte Partner: UFZ, TUI, CE, UHOH und JKI

Der Projektpartner UHOH verfügt mit den „Hohenheimer Gärten“ über eine große Vielfalt an Pflanzen (Pollenproben können über das ganze Jahr gesammelt werden), die als authentische Quellen für die Etablierung der Hochdurchsatzmethode zur Pollenanalytik genutzt werden konnten. Im ersten und zweiten Projektjahr wurde auf Pollenproben aus den „Hohenheimer Gärten“ (UHOH) zurückgegriffen, um diese aufzubereiten (UFZ) und den Datensatz anzulegen und zu trainieren (TUI). Im selben Rahmen wurden die Auswertungen vom Partner CE lichtmikroskopisch validiert, um eine Feintuning der KI zu erreichen.

Arbeitspaket 2.2: Aufbau einer bundesweiten Pollenbilddatenbank basierend auf Pollenhörschen-Proben

Beteiligte Partner: UFZ, TUI und UHOH

Im Rahmen eines vom Land Baden-Württemberg finanzierten Projekts ('Pollensammeln in Baden-Württemberg', gefördert durch das Ministerium für Ernährung, Ländlichen Raum und Verbraucherschutz) wurde in den Jahren 2018-2019 bereits ein flächendeckendes Netzwerk aus Pollensammlern in Baden-Württemberg etabliert. Dieses bestehende Netzwerk könnte für den Weiterausbau eines bundesweiten Netzwerks genutzt werden. Ausgewählte Proben wurden durchflusszytometrisch untersucht und mit den jeweiligen mikroskopischen Untersuchungen verglichen.

Arbeitspaket 2.3: Erweiterung der Pollenbilddatenbank basierend auf verschiedenen Matrices

Beteiligte Partner: UFZ, TUI, CE, UHOH und JKI

Sowohl im zweiten als auch im dritten Jahr wurden durch die Messung verschiedener Pollenmischproben aus unterschiedlichen Matrices (frischer Pollen, Bienenbrot, Honig, Futtersäfte, Honigblaseninhalte etc.) aus Modul 1 die praktischen Anwendungsfelder erweitert. So sollte die Methode für die Anwendung auf alle relevanten Probenmatrices modifiziert werden, die für die Praxis und Forschung relevante Fragestellungen beantworten können.

Arbeitspaket 2.4: Evaluierung von Maßnahmen für bestäuberfreundlichen Pflanzenschutz und Pflanzenbau

Beteiligte Partner: UFZ, TUI, CE und JKI

Im Austausch mit zwei Verbundprojekten, die sich im Zusammenhang mit bestäuberfreundlichem Pflanzenschutz sowie der Nahrungsvielfalt in Agrarräumen beschäftigen (namentlich dem Verbundprojekt „ComBee“, sowie dem „MonViA“-Projekt) wurden Pollenproben aufbereitet und vermessen.

Modulübergreifendes Ziel: Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses

Da die Ergebnisse in einer Synergie entstanden sind, sollten sie zusammenhängend in einschlägigen wissenschaftlichen *peer-reviewed* Fachjournals publiziert werden (dies ist teilweise abgeschlossen), sodass die am Projekt beteiligten Doktoranden in der Lage sind, kumulativ zu promovieren. Auch die Vorstellung auf nationalen (AG Bientagung) sowie internationalen (bspw. EurBee, ICPPR, IPC-IOPC, IUSSI) Tagungen war integrativer Bestandteil der Dissemination für alle beteiligten Partner. Besonders die Förderung des an Modul 1 und 2 beteiligten wissenschaftlichen Nachwuchses stand hierbei im Vordergrund, damit dieser mit umfangreichen Möglichkeiten für die Netzwerkbildung und einem breiten Methodenspektrum im Fachgebiet Fuß fassen kann. Dies wurde ebenfalls realisiert durch die Teilnahme der Doktoranden an projektinternen Workshops zur Weiterbildung bzw. Demonstration projektspezifischer Methoden. Zudem wurde auch die nationale Reichweite und Sichtbarkeit des Instituts für Bienenschutz und dessen Partner (CE, FUB, IBI, RUB, UHOH, TUI, UFZ) über Beiträge in deutschen Imkerzeitschriften abgedeckt und erhöht. Praxistipps für Imker in Bezug auf die Projektergebnisse runden die Dissemination ab (siehe auch Punkt 6).

2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

MODUL 1: Vergleichende Stressorenwirkung auf Jung- und Wirtschaftsvölker

Repräsentative Forschungsarbeiten, die auf Volksebene durchgeführt werden sind mit einem großen technischen und personellen Aufwand verbunden. Das Gelingen sogenannter „Feld- oder Freilandstudien“ mit Honigbienen ist nicht zuletzt durch variable Umweltfaktoren (Trockenheit, Nässe, Temperaturschwankungen, Nahrungsangebot, Bienengesundheitsstatus, etc.) stets einem gewissen Restrisiko ausgesetzt und die Versuchsdauer beträgt unter Umständen mehrere Jahre. Folglich finden sich in der aktuellen wissenschaftlichen Literatur nur wenige wirklich aussagekräftige Versuche, die die Komplexität des gesamten Bienenvolkes als „Superorganismus“ mitberücksichtigen (Straub et al. 2015, Sponsler & Johnson 2017). Zumeist wurden in solchen Studien Bienenvölker eingesetzt, die mit einer gewissen Volksstärke (5.000-10.000 Bienen) bereits etablierte Einheiten darstellen. Diese Völker weisen meist schon eine gewisse Resilienz gegenüber Stressoren auf. Wenig untersucht sind bisher Jungvölker (ugs. Ableger), die sich nach ihrer Bildung mit zum Teil nur wenigen Hundert Bienen komplett neu aufbauen. Kaum etabliert, müssen sie sich somit denselben abiotischen und biotischen Stressoren ihrer Umwelt stellen wie weitaus größere Völker.

Innerhalb des letzten Jahrzehnts war in Deutschland ein kontinuierlicher Rückgang der Anbaufläche für Winterraps von etwa 1,40 Mio. auf 0,89 Mio. ha zu verzeichnen (Union zur Förderung von Öl und Proteinpflanzen - UFOP). Dies könnte einen Einfluss auf die Honigproduktion in Deutschland haben und auch auf die Nahrungsversorgung vieler Bienenvölker. Ein weiter Rückgang bienenrelevanter Trachtpflanzen, insbesondere im Frühling, würde eine ausreichende Nahrungsversorgung an diversen deutschen Standorten möglicherweise in Gefahr bringen. Wie Dolezal et al. (2019) jüngst zeigen konnten, ist die Art der Ernährung ein maßgeblicher Faktor für die Bienengesundheit und ein Mangel oder eine Einseitigkeit kann drastische Konsequenzen für die Anfälligkeit gegenüber anderer Stressoren haben. Aus unserer eigenen Forschung ist bekannt, dass beispielsweise als B4 (bienenungefährlich) eingestufte PSM, wenn in einer Tankmischung kombiniert, einen synergistischen bzw. additiven Effekt erreichen können und unter diesen Umständen als bienengefährlich einzustufen sind (Wernecke et al. 2019). Dieser Umstand wurde aktuell in einer Meta-Analyse mittels Dosis-Wirkungs-Analyse eindrücklich veranschaulicht. In 218 PSM-Mischungen stellte man 72 % Synergien und 17 % additive Wirkverstärkungen fest (Carnesecchi et al. 2019). In über der Hälfte der Synergien ist die Störung der Detoxifikation für diese Wirkverstärkungen verantwortlich (55 % Cytochrom P450s Inhibition). Hieran haben wir angeknüpft und uns auf die Auswirkungen von Fungizidmischungen fokussiert, mit denen Bienenvölker im Freiland regelmäßig in Kontakt kommen.

Überdies müssen neue Messparameter (sog. Biomarker) für eine möglichst breite Abbildung der Gesundheit und Fitness von Einzelbienen, als auch des gesamten Bienenvolkes, für solche Experimente getestet werden. Zukünftig stehen dann jene Biomarker für alle Forschungsprojekte mit Bezug auf die Bienengesundheit zur Verfügung. Neben Bienen-spezifischen Markern wurden in den letzten Jahren auch vermehrt die Mikroorganismen des Verdauungstraktes (insbesondere Mittel- und Enddarm) der Honigbiene als bakterielle Biomarker thematisiert, beispielsweise im Zusammenhang mit den Auswirkungen von PSM (bisher meist Glyphosat: Blot et al. 2019, Dai et al. 2018, Motta et al. 2018). Wechselwirkungen zwischen dem bakteriellen Besatz im Darm der Biene und dessen Einfluss auf deren Gesundheit, auf individueller sowie auf Volksebene, könnten wichtige Indikatoren für die Vitalität und folglich für Schadeinwirkungen auf ganze Bienenvölker darstellen. Bisher wurden jedoch kaum detaillierte Zusammenhänge beschrieben. Nicht zuletzt, weil sich der größte Teil der wissenschaftlichen Literatur

auf Ergebnisse aus Laborversuchen, also auf individueller und meist nicht auf Volksebene, stützten (Romero et al. 2019). Die Frage ist somit, lassen sich Auswirkungen auf die Bienengesundheit durch Beeinflussung des Mikrobioms ablesen. Um dies zu beantworten, wurde hier bewusst ein feldrealistischer Freilandansatz gewählt. Eine Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Laborversuchen ins Freiland ist erfahrungsgemäß nicht immer gegeben, zumal sich Honigbienen als komplexe soziale Insekten nicht auf einzelne Individuen reduzieren lassen (Straub et al. 2015). Es besteht folglich ein großer Forschungsbedarf, sich Ebenen übergreifend mit der Entwicklung und Beeinflussung des Mikrobioms in der Biene und im Bienenvolk auseinander zu setzen, um Stressoren und Umwelteinflüsse aus diesem Blickwinkel betrachten und einschätzen zu können.

Wie bereits erwähnt besteht das Kernmikrobiom des Bienendarms hauptsächlich aus fünf verschiedenen Bakterienstämmen/Stammgruppen (*Lactobacillus* Firm-4, Firm-5, *B. asteroides*, *G. apicola* und *S. alvi*). Andere Vertreter wurden ebenfalls beschrieben, sind jedoch mit sehr großer Varianz anzutreffen (*A. adventoris*, *B. apis*, *F. perrara*, und *P. apium*) (Kwong & Moran et al. 2018). Dieses Kernmikrobiom bzw. dessen Vertreter stellen die Grundlage für mikrobielle Biomarker der Honigbiene dar, d.h. es werden gezielt nur einige Vertreter analysiert (Qualität und Quantität). Die zunehmende Anzahl an Publikationen zeigt eindeutig die thematische Relevanz in diesem Bereich (Romero et al. 2019).

Die verhältnismäßig simple Zusammensetzung des Kernmikrobioms und die gut studierten und einfach umzusetzenden standardisierten Haltungsbedingungen für Honigbienen, stellen ein ideales Modellsystem für den nächsten Schritt zur Erforschung von Effekten externer Stressoren auf das Honigbienenvolk dar. Aufgrund ihrer kurzen Entwicklungsdauer, der Existenz nahezu „bakterienfreier“ adulter Bienen nach dem Schlupf, sowie die mögliche *in vitro* Aufzucht von Larven, unterstreichen zusätzlich die Eignung der Honigbiene als exemplarisches Modellsystem zur Untersuchung dieser Mikrobiom-Wirt-Beziehungen. Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen (Modul 1) könnten eine breitere Abdeckung insbesondere von subletalen Effekten auf die Bienengesundheit darstellen. Überdies hinaus ist es heute mittels moderner Sequenzierungstechniken möglich, Einsicht in molekulare Funktionen der Mikrobiota selbst, aber auch die des Wirts, zu erlangen (Zheng et al. 2018). Eine Ableitung des „Mode-of-Action“, also der Wirkungsweise eines PSM, wäre denkbar und könnte wichtige Erkenntnisse zu entstehenden Schädigungen am Organismus liefern - wäre damit also konkret auch außerhalb des Projektes in den Bereichen Diagnostik und Gefahrenabschätzung einsetzbar.

Eine weitere existente Wissenslücke betrifft die Wirkstoffverteilung spezifischer Gruppen von PSM im Bienenvolk. Eine hypothetische Beschreibung erfolgte im Jahr 2017 von Sponsler & Johnson, die jedoch in der Praxis bisher noch nicht bestätigt wurde – zumal individuelle chemische Eigenschaften der Wirkstoffe in jener Arbeit keine konkrete Berücksichtigung fanden. Bisherige praktische Untersuchungen haben gezeigt, dass sich PSM in Pollen eher anreichern und in Nektar leichter verdünnt vorkommen, dadurch können unterschiedliche Expositionswege im Bienenvolk selbst entstehen. Umweltgifte, inklusive PSM, werden von Honigbienen über die Nahrung (Nektar und Pollen) aufgenommen, darüber in das Bienenvolk eingebracht, eingelagert und vermutlich auch verteilt. Jedoch liegen hierfür zu wenige Daten vor, welche unter feldrealistischen Bedingungen erhoben wurden. Die Masse der bisherigen Arbeiten zu chemischen Substanzen und Bienenlarvenfutter basieren auf der Analyse von kommerziellen Gelée Royal-Proben. Derzeit konnten Antibiotika (Verboden in der EU), Akarizide, Fungizide und ein Insektizid nachgewiesen werden (Wueppenhorst et al. 2022). Nur wenige Arbeiten untersuchten den PSM-Transfer unter feldrealistischen Bedingungen. Zwei Halbfreilandstudien gelang der Nachweis von Fungiziden und ihrer Metabolite in Gelée Royal, von Bienenvölkern welche behandelten Kulturen ausgesetzt

waren (Li et al. 2017a, b). Häufiger wird jedoch kontaminierter Pollen an die Bienenvölker verfüttert. Dabei wurden bisher im Halbfreilandversuch entweder keine PSM gefunden (DeGrandi-Hoffman et al. 2013, Pilling et al. 2013) oder Mengen, welche wesentlich geringer waren als die applizierte Konzentration (Böhme et al. 2018). Nur eine Studie hat sich bisher nicht nur mit dem Futter von Königinnenlarven beschäftigt, sondern auch mit dem der Arbeiterinnen. Böhme und Kollegen (2019) konnten zeigen, dass die ermittelten PSM-Konzentrationen im Arbeiterinnenfutter erheblich höher waren als im Königinnenfutter. Dies könnte mit der erhöhten Beimengung von Pollen in Zusammenhang stehen (Böhme et al. 2019). Jedoch ist immer noch unklar wie PSM im Bienenvolk verteilt werden und welche Auswirkungen sie auf Königinnen, Arbeiterinnen und Drohnen unter feldrealistischen Bedingungen haben. Die Pollenzusammensetzung liefert wichtige Hinweise auf mögliche Eintragspfade der PSM und könnte durch die methodische Weiterentwicklung (Modul 2) detailliert für verschiedene Proben innerhalb des Bienenvolks (Pollenhöschen, Honig, Futtersaft, etc.) analysiert werden.

Sogenannte Biomarker (Metabolit-basierte und/oder molekulare DNA-, RNA-, Protein-Marker) haben sich in den letzten Jahren als Werkzeug etabliert, um gezielt den physiologischen Zustand von Bienen (z.B. nach Pathogeninfektion oder Intoxikation mit PSM oder anderen Umweltgiften) zu charakterisieren. Dabei werden Biomarker Ebenen übergreifend angewandt, vom Individuum, über die Volksebene, bis hin zu lokalen Honigbienenpopulationen (López-Urbe et al. 2020). Derzeit werden verschiedene Markersysteme bzw. Methoden genutzt, z.B. die Erfassung von Enzymaktivitäten, die veränderte Genexpression von Markergenen, Proteomanalysen etc. (Badiou- Bénéteau et al. 2012, Carvalho et al. 2013, Erban et al. 2019, Tauber et al. 2019). Einige wenige Studien kombinierten verschiedene Metabolitgruppen (Aminosäuren, Zucker, Carbonsäuren usw.) mit komplexen Analyse- und Auswertungsmethoden (verschiedene Algorithmen für maschinelles Lernen) (Wang et al. 2019). Jedoch sind Kosten und Arbeitszeit zur Erstellung solcher „metabolischen Fingerabdruckprofile“ derzeit noch sehr hoch, was eine routinemäßige Anwendung stark einschränkt. Um einen ausreichend großen Probenumfang analysieren und auswerten zu können, konzentrierten wir uns hier auf einen Hochdurchsatz-Kandidaten-Markeransatz (BeePCRArray). Das heißt, es wurde eine vorher ausgewählte Gruppe von Kandidatengen (in unserem Projekt u.a. Immungene, antioxidative Enzyme, Entgiftungstoffwechsel, Kablau et al. 2020) identifiziert, dann Proben aller Gruppen diesbezüglich analysiert. Valide molekulare Vitalitäts-Erfassungssysteme sind für die Honigbiene bislang noch nicht routinemäßig im Einsatz - ein von uns aktuell entwickelter Honigbienen-Vitalitäts-Array (BeePCRArray ca. 100 Einzelparameter qPCR Array) wurde bereits bzgl. der Toxizitätsbestimmung von PSM evaluiert (Kablau et al. 2020). Von besonderem Interesse sind hierbei Korrelationen zwischen den biologischen Variationen von Einzelindividuen in verschiedenen Entwicklungsstadien (meist *in vitro*) im Vergleich zur beobachteten Vitalität des Gesamtbienenvolks in der natürlichen Umgebung (*in vivo*).

MODUL 2: Entwicklung eines pollenanalytischen Verfahrens zur Bestimmung von Nahrungspflanzen

Derzeit wird der Pollenursprung, die botanische Herkunft von Pollen in verschiedenen Matrices (z.B. Haarkleid von Bienen, Pollenhöschchen, Bienenbrot, Honig), bzw. die Pollenzusammensetzung, durch wenige Spezialisten in Deutschland lichtmikroskopisch differenziert. Eine Unterscheidung auf Gattungs-, Familien- oder Artebene ist durch den Vergleich mit einer Pollenvergleichssammlung möglich (Horn & Lüllmann 2017, von der Ohe 2000) und für manche Familien und Gattungen mit lichtmikroskopischen Verfahren sehr anspruchsvoll oder gar nicht möglich. Die Differenzierung basiert auf verschiedenen morphologischen Eigenschaften der unterschiedlichen Pflanzenpollen, wie beispielsweise Größe ($<10\text{-}200\text{ }\mu\text{m}$), Form, Symmetrie, Details der Aperturen (Keimungsöffnungen) und der Exine (äußere Sporopolleninwand) (Horn & Lüllmann 2017, Louveaux et al. 1978, von der Ohe 2000). Die qualitative und die quantitative Auswertung sind dabei sehr zeitaufwändig; die Analyse eines einzelnen Probenpräparates kann je nach Komplexität des Pollenspektrums zwischen mehreren Minuten und mehreren Stunden in Anspruch nehmen. Durch den damit verbundenen Personalaufwand betragen die Analysekosten für beispielsweise eine Honiganalyse etwa 40-80 €. Für die Ausbildung von Pollenexperten werden nur wenige Fachseminare angeboten (Pollenseminar, LAVES Institut für Bienenkunde Celle), die Ausbildung erfolgt oft über Jahre anhand der Untersuchung von Feldproben. Auch wenn die lichtmikroskopische Pollenanalyse nach standardisierten Analyseprotokollen erfolgt (DIN 10760: 2002-05, von der Ohe et al. 2004), ist die Qualität des Ergebnisses durch die Expertise des Pollenexperten bestimmt (Behm et al. 1996). Aufgrund der zeitaufwändigen Analysetechnik und der begrenzten Zahl an Pollenanalytikexperten ist der Umfang der Probenzahlen, die analysiert werden können, stark limitiert. Für viele Fragestellungen aus Forschung und Praxis liefert die Pollenanalyse allerdings wertvolle Informationen in Hinblick auf die von Bestäubern aufgesuchten Nahrungspflanzen und deren Relevanz. Abgesicherte Ergebnisse liefern zudem auch in der Regel nur die Analysen großer Probenzahlen. Als Beispiele seien Fragestellungen in Bezug auf bestäuberfreundlichen Pflanzenschutz und Pflanzenbau, sowie in Bezug auf praktisch imkerliche Anwendungen, insbesondere für die Abschätzung der Trachtauswahl und Gesundheit der Bienenstöcke mit Fokus auf nachhaltigen Landbau, genannt. Für viele Nicht-Experten ist diese Art der Pollenanalyse jedoch ein limitierender Faktor mit Hinsicht auf Machbarkeit und Kosten.

Derzeit dringend benötigt wird ein innovatives, automatisiertes und standardisiertes Verfahren um die Identität von Pollen qualitativ und quantitativ im Hochdurchsatzverfahren zuverlässig analysieren zu können. Um dies zu realisieren wurden zwei der modernsten Techniken verknüpft - bild-basierte Durchflusszytometrie und künstliche Intelligenz (KI) (Dunker et al. 2021). Das bild-basierte Durchflusszytometer erlaubt die mikroskopische Vermessung von bis zu 1.000 Partikeln pro Sekunde (Abbildung 2.1). Hierfür wird eine Vereinzelung von Partikeln durch hydrodynamische Flüsse hervorgerufen. Durch die Vereinzelung der Partikel können im Anschluss für jedes einzelne Partikel nicht nur Hellfeld-mikroskopische Aufnahmen, sondern auch Fluoreszenzaufnahmen für unterschiedliche Spektralbereiche erfasst werden (Abbildung 2.1).

Multispektrale bild-basierte Durchflusszytometrie & Deep learning

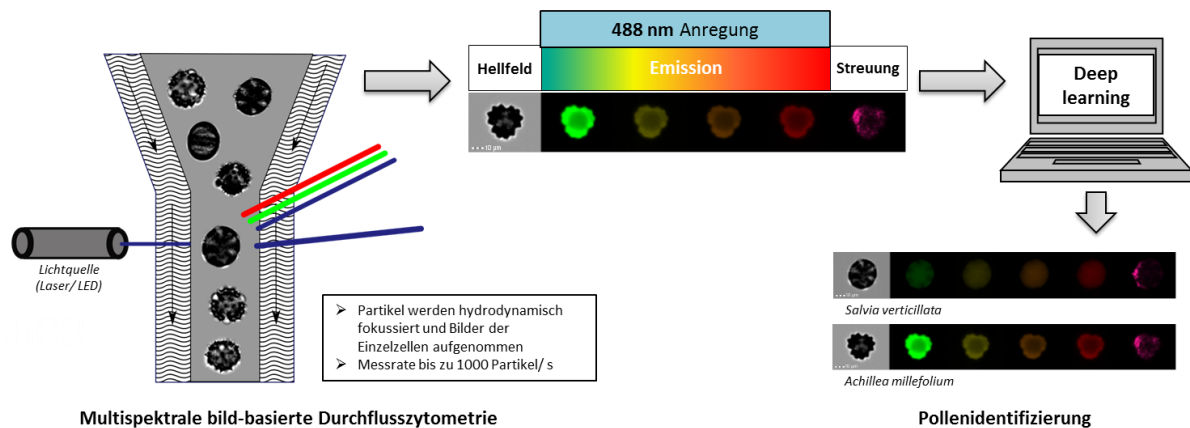


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des kombinierten Messsystems.

Die Methode findet ursprünglich in der Medizin für die Blutzellanalyse ihre Anwendung und wurde dementsprechend auch mit hohen Maßstäben für standardisierte Messungen entwickelt. Die Nutzung dieses Bild-basierten Durchflusszytometers für Pollen wurde erstmalig von Frau Dr. Dunker untersucht und die dafür benötigte spezifische Gerätekonfiguration zum Patent angemeldet (Dunker 2017). Für die Erkennung und Quantifizierung verschiedener Pflanzenpollen wird eine Datenbank benötigt, für die von möglichst allen relevanten entomophilen Blühpflanzen (ca. 500) in Deutschland Pollenmessungen durchgeführt werden sollen. Diese Datenbank wird mit KI trainiert und soll später, ähnlich wie die App „Flora Incognita“, verschiedene Pollen aus Feldproben mit vielfältig zusammengesetzten Pollenspektren identifizieren (Abbildung 2.1). Mit der App „Flora Incognita“ können mit dem Smartphone aufgenommene Pflanzenarten bestimmt werden (<https://floraincognita.com/de/>) (Wäldchen & Mäder 2019). Im Vergleich zu der bereits vielfältig genutzten App, besteht bei den standardisierten Messungen mit dem Bild-basierten Durchflusszytometer nicht die Schwierigkeit einen komplexen Hintergrund zu berücksichtigen.

Erste vorläufige Ergebnisse von trainierten Pollen zeigen, dass 35 Arten mit einer Genauigkeit von 96 % unterschieden werden können (Dunker et al. 2021). Diese Vorarbeiten zeigen die prinzipielle Machbarkeit des innovativen Ansatzes auf. Im Modul 2 ging es spezifisch darum, am Projektende eine matrix-spezifische Pollenerkennung (frisch gesammelter Pollen, Bienenbrot, Honig, Futtersäfte, Honigblaseninhalte, etc.) für Honigbienen durchführen zu können. Hierfür wurde ein matrix-spezifisches Probenvorbereitungs- und Analyseprotokoll entwickelt, welches für die zytometrische Messung geeignet ist. Durch die matrix-spezifische Analyse und den Fokus auf die „Honigbiene“ ergibt sich bereits eine deutliche Abgrenzung zum aktuellen Stand des Pollenanalyseverfahrens. Die Arbeitsgruppe von Frau Dr. Dunker arbeitet in anderen aktuellen Projekten an einem Pollenanalyseverfahren für wind-bestäubte Pollen, die in der Luft verbreitet werden und eine medizinische Relevanz haben, sowie an einer Datenbank für wilde Bestäuber, bei denen Matrices wie Honig und Futtersäfte keine Rolle spielen. Im Artikel „Pollen analysis using multispectral imaging flow cytometry and deep learning“ (Dunker et al. 2021) wurden Pflanzenpollen von rumänischen Flächen gesammelt, vermessen, klassifiziert und vorhergesagt. Als geeignete Referenzdatenbank sind diese Proben jedoch nicht geeignet, da die geographische Komponente einen entscheidenden Einfluss auf die Pollenmorphologie, hauptsächlich auf die Pollengröße und damit einhergehend auf die Genauigkeit der Klassenvorhersage haben kann. Die Ploidie von Pflanzen und damit

einhergehend auch die Pollengröße unterscheidet sich teilweise erheblich in unterschiedlichen Regionen Deutschlands, gerade im Osten und Südwesten Deutschlands sind starke Unterschiede in der Ploidie zu erwarten (<http://chromosomes.senckenberg.de/index.php>). Es war deshalb zu erwarten, dass die in der AG von Frau Dr. Dunker bisher erhobenen Referenzdaten nicht für Honig-spezifische und nur sehr eingeschränkt für deutschlandweite Analysen verwendbar sind. Zur Vorhersage der Pollenzusammensetzung lokaler Proben wurde demzufolge im Projekt der Aufbau einer Honigbienen-spezifischen Referenzdatenbank vorangetrieben, also deren wichtigste Trachtpflanzen-Pollen vermessen. Basierend auf dieser Referenzdatenbank wurden dann Analysen unterschiedlicher Matrices vorgenommen, wobei auch hier zunächst geprüft wurde, inwieweit die Qualität der Klassifizierung von abweichender Pollenmorphologie der Pollen direkt von der Blüte gesammelt und im Honig beeinflusst war. Es war bereits aus vorherigen Testversuchen bekannt das Pollen in Honigproben beispielsweise ein sehr starkes Fluoreszenzsignal aufweisen, welches ebenfalls Einfluss auf die korrekte Artbestimmung durch das *Deep Learning* verursachen würde. Dies war ebenfalls ein zentraler Punkt der Arbeitspakete und erforderte eine zusätzliche aufwendigere Referenz-Annotation der Honigproben.

Neben der reinen Bestimmung der Pflanzenart, können die Messungen in sehr viel kürzerer Zeit durchgeführt werden. Hier zeigte sich bereits, dass bei einer recht einfachen Probenmatrix von 1-6 unterschiedlichen Partikeln die Messungen mindestens 12× schneller als lichtmikroskopische Auswertungen prozessiert werden konnten (Dunker et al. *in prep.*). Es ist zu erwarten, dass bei komplexeren Proben die Zeitunterschiede noch stärker sind. Im Vergleich zur Lichtmikroskopie, kann mittels des Bild-basierten Durchflusszytometers deshalb ein sehr viel höherer Probenumfang mit einem Preis von etwa 5-20 €/Probe prozessiert werden. Ein qualitativer und quantitativer Vergleich der Untersuchung von Feldproben aus unterschiedlichen geographischen Regionen, komplex zusammengesetzter Pollenspektren, und der Vergleich verschiedener Ursprungsmatrizes der Pollenproben wurden im Rahmen des Projektes evaluiert.

3. Material und Methoden

MODUL 1: Vergleichende Stressorenwirkung auf Jung- und Wirtschaftsvölker

Arbeitspaket 1.1: Kunstschwarmbildung und Voranalyse der Darm-Mikroflora

Die Kunstschwärme wurden im Juni 2021 nach dem Protokoll der Bayerischen Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau (IBI) erstellt. In Abweichung dessen wurden alle Völker mit 3,5 %-iger Oxalsäure gegen *Varroa* behandelt, entweder sobald erste Brutzellen vor der Verdeckelung standen, oder direkt bei der Bildung der Kunstschwärme besprüht. Pro Standort wurden 30 Kunstschwärme erstellt, sodass nach Überwinterung die Mindestanzahl von 24 Völkern für den Versuch 2022 gewährleistet werden konnte.

Zur Voranalyse der Darm-Mikroflora wurden weiterhin vier Wochen nach der Bildung der Kunstschwärme an allen Standorten Proben der Arbeiterinnen, Larven, und des Bienenbrots genommen. Dabei wurden je 30-40 Arbeiterinnen, je 10 Rundmaden des Stadiums L4 in Einzelgefäßen, und mindestens 1 g Bienenbrot pro Volk gesammelt. Die Proben wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert. Die Analyse des Darmmikrobioms erfolgte aus Poolproben der Honigbienenendärme der gesammelten Arbeiterinnen zu je 5 Individuen pro Volk.

Die Quantifizierung der Kernmikrobiomvertreter erfolgte nach dem in Steinigeweg et al. (2023) und Wueppenhorst et al. (2024a) beschriebenen Protokoll. In Kürze, die genomische DNA wurde mithilfe des NucleoMag® VET Kits extrahiert und anschließend unter Verwendung spezifischer Primerpaare mittels quantitativer PCR (qPCR) quantifiziert. Als Referenzgen wurde β -Actin verwendet. Alle Messungen erfolgten in technischen Triplikaten.

Arbeitspaket 1.2: Populations- und Brutentwicklung

Eine detaillierte Versuchsbeschreibung findet sich in der zugehörigen Publikation Wueppenhorst et al. (2024a).

Zusammenfassend, wurden die im Jahr 2021 gebildeten Kunstschwärme im Frühjahr 2022 erfolgreich ausgwintert. Um die Entwicklung unterschiedlich starker Bienenvölker vergleichen zu können, wurden aus der Hälfte der Kunstschwärme sogenannte Ableger (im Weiteren: Jungvölker) gebildet. Im Versuch wurden damit 12 Jungvölker und 12 Wirtschaftsvölker untersucht. Die Jungvölker wurden durch Schröpfen auf 5.000 (+/- 1.000) Bienen mit alter Königin gebildet. Das Brutverhältnis wurde weiterhin auf 1 offene Brutzelle/Biene (dementsprechend ca. 5.000 Zellen) reduziert. Verdeckelte Brut wurde bei maximal 12,5 Einheiten (5.000 Zellen) belassen. Zeitpunkt der Bildung war Tag -14 (+/- 2 Tage) in Bezug auf den Tag der Pflanzenschutzmittelapplikation. Die übrigen 12 Völker wurden fortan als Wirtschaftsvölker geführt. Die Wirtschaftsvölker hatten eine Stärke von 12.000 (+/- 3.000) Bienen. In die Wirtschaftsvölker wurde nicht zusätzlich eingegriffen. Weiterhin wurden alle Pollenwaben entnommen und den Völkern nur der Pollenkranz über der Brut belassen.

Nach der Populationsschätzung und Ablegerbildung am Tag -14 wurden die Völker entsprechend ihrer Volksstärke (Jung- vs. Wirtschaftsvolk) in die Kontroll- und Treatmentgruppe (C und T) eingeteilt. Die Völker wurden ca. 10 Tage vor Pflanzenschutzmittelapplikation an die Felder angewandert. Der genaue Zeitpunkt der Anwanderung war das BBCH-Stadium 59-60 (Beginn der Rapsblüte). Die Völker wurden in zwei Gruppen jeweils in einer Reihe mit mindestens einem Meter Abstand zwischen den Völkern randomisiert aufgestellt. Die zwei

Gruppen ergaben sich aus den Wirtschaft- und Jungvölkern, zwischen denen ein größerer Abstand von ca. 10 Metern gewählt wurde (siehe Abbildung 3.1).

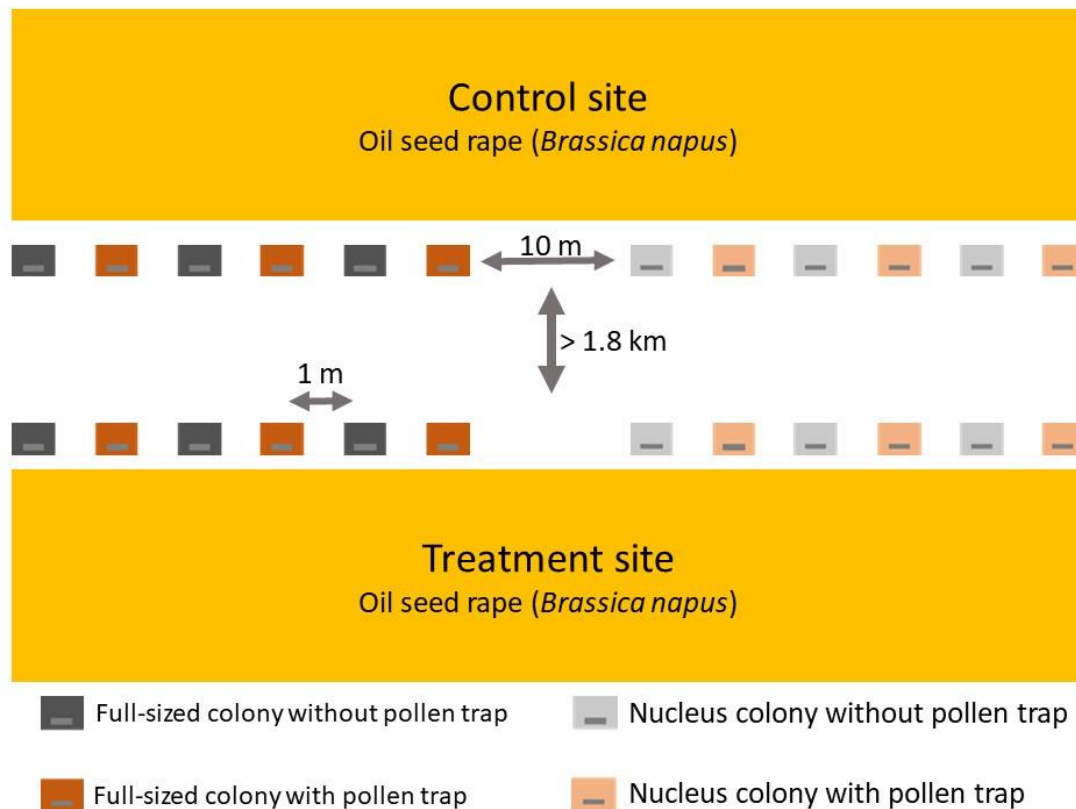


Abbildung 3.1: Aufstellung und Zuteilung der Völker an den Versuchsflächen (Abbildung entnommen aus Wueppenhorst et al. 2024a).

Um die Volksentwicklung während des Versuches bewerten zu können, wurde mit Beginn der Saison in regelmäßigen Abständen eine Populationsschätzung durchgeführt. Die Populationsentwicklung erfolgte nach der Liebfelder-Methode in 0,5-er Einheiten. Die erste Schätzung erfolgte kurz vor der Aufstellung im Feld an Tag -16 (+/- 3 Tage) vor Applikation. Die weiteren Schätzungen fanden im Abstand von jeweils 21 Tagen statt. Die letzte Schätzung wurde vor der Einwinterung im September/ Oktober durchgeführt.

Neben der Populationsschätzung wurde an den Standorten Braunschweig, Celle und Hohenheim noch eine Brutfotographie während der Feldphase durchgeführt. Das Prozedere richtete sich nach der OECD Guideline 75. Gestartet wurde an Tag -3 mit dem BFD (*Brood fixing day*) Termin 0. Die Bezeichnung „BFD 0“ bezieht sich dabei nicht auf den Versuchstag (hier Tag -3), sondern auf das Entwicklungsstadium der Brut. Tag 0 = Tag der Eiablage. Ziel der Brutfotographie ist es, die Erfolgsrate der Brutentwicklung zu dokumentieren, sprich zu ermitteln, wie viele der ursprünglichen bestifteten Zellen nachher auch verdeckelt wurden und aus wie vielen adulte Bienen schlüpften. Die Bezeichnung BFD X bezieht sich also auf den Stand der Brutentwicklung, begonnen mit der Bestiftung (Eiablage). Für jedes der 24 Völker im Versuch wurde eine Brutwabe (keine Randwabe) mit Vorder- und Rückseite fotografiert. Die Brutwabe des ersten Termins wurde so gewählt, dass möglichst überwiegend frisch bestiftete Zellen auf der Wabe zu finden waren. Die ausgewählten Waben wurden über die nächsten Termine weiterverfolgt und die Brutabbruchrate (BTR) mithilfe der Software HiveAnalyzer bestimmt.

Arbeitspaket 1.3: Wirkstoffverteilung in relevanten Matrices

Neben den Versuchsvölkern wurden auch noch mindestens jeweils 2 Beprobungsvölker an den Standorten aufgestellt. Aus diesen wurden die Proben für die anschließende Rückstandsanalytik entnommen. Dafür wurden vor, während und nach Applikation Pflanzen-, Bienen- und Stockproben genommen. Im Detail wurden an jedem Zeitpunkt und Versuchsfeld: 10 Blütenstände, ca. 100 heimkehrende Sammelbienen (Nektar- und Pollensammlerinnen), 100 Stockbienen direkt von den Waben, ca. 1 g frische eingelagerter Pollen sowie Nektar, je ca. 1 g Larvenfuttersaft der Königinnen, Arbeiterinnen und Drohnen, sowie alle dazugehörigen Larven (Königinnen, Arbeiterinnen und Drohnen) gesammelt. Die Rückstandsanalytik erfolgte anschließend am Standort Berlin des JKIs und wurde nach dem Protokoll von Bischoff et al. (2020) durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung findet sich in Wueppenhorst et al. (2024b).

Arbeitspaket 1.4: Entwicklung des Mikrobioms unter Stressoreneinfluss

Zur weiteren Analyse der Veränderungen des Mikrobioms der Honigbienen unter Stressoreneinfluss, wurden wie bereits im Spätsommer 2021 (siehe AP 1.1) erneut Stockbienen, Bienenbrot und Sammlerinnen beprobt. Insgesamt wurde die Beprobung aller Versuchsvölker 3x durchgeführt: vor, während und nach der Applikation. Die Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert. Analog zur Vorgehensweise im Jahr 2021, wurden die Därme der Stock- und Sammelbienen zu je fünf Individuen gepoolt. Die Quantifizierung erfolgte wie oben beschrieben.

Arbeitspaket 1.5: Stressoren-Einflüsse anhand spezifischer Biomarker

Ähnlich der Probenentnahme für die anschließende Mikrobiomanalyse wurden zur Biomarkeranalyse Larven, Stockbienen und Sammlerinnen von den Versuchsvölkern beprobt. Die Beprobungstermine fanden an Tag -4 (+/- 1), an Tag +2 sowieso an Tag +5 und an Tag +9 statt. Da für die Biomarkeranalyse Larven der Stadien L2 und L5 beprobt werden sollten, erfolgte in diesem Fall während der Exposition eine geteilte Beprobung an Tag +2 (L2) und Tag +5 (L5). Die gesammelten Proben wurden bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert. Ein Array aus 24 Genen wurde in Anlehnung an Kablau et al. (2020) erstellt und erweitert. Die Kandidatengene wurden entsprechend ihrer Funktion ausgewählt, um als potentielle Biomarker zur Bestimmung von Stressreaktionen der im Projekt untersuchten Stressoren (Fungizidbehandlung und Nahrungslimitierung) zu agieren. Eine Übersicht der Gene samt der Primersequenzen findet sich in Tabelle 3.1. Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte nach Kablau et al. (2020).

Tabelle 3.1: Übersicht der genutzten Kandidatengene, mit Zielgen, Primerbezeichnung und Sequenz.

Zielgen	Primer	Sequenzen (5'-3')
Phenoloxidase activating enzyme	ame PPOact fw ame PPOact rev	GTTTGGTCGACGGAAGAAAA CCGTCGACTCGAAATCGTAT
Hexamerin 110	ame Hex110 fw ame Hex110 rev	CTGCAAGGAGTGCAACAAGTATT CGTTTGACCACCACTCTGCC
Ecdysone receptor	ame Ecr fw ame Ecr rev	AAGGCGCAAAAGGAGAAGGA GGGCTGATCGGTTTCACGTA
Ecdysone-induced protein 75	ame E75 fw ame E75 rev	CAATCGGCCAGGTCTGTTA AGAATCCCCTTGCATCCCCTCG
Peptidoglycan-recognition protein LC	ame PGRP-LC fw ame PGRP-LC rev	GTGTGAGTGCGTTGGTATGG ATGCTGACCGCGCTATCTTT
Defensin 1	ame Def1 fw ame Def1 rev	TGCGCTGCTAACTGTCTCAG AATGGCACTTAACCGAAACG
Cytochrome c oxidase subunit 5b	ame COX5b fw ame COX5b rev	TGTCGACGAACATTCTCTTGC CGTTTTTCCAATCCCGTAGCA
Cytochrome c oxidase subunit 17	ame COX17 fw ame COX17 rev	TAGAGGCGCTGAAACTGGTG TCAGGACAAGCACAACAAGGT
Juvenile hormone acid O-methyltransferase	ame Jhamt fw ame Jhamt rev	CGGGGAATTTCGAGAAGAGA CGATAAGCGTTCTCTCGTCGT
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7	ame NDUFB-7 fw ame NDUFB-7 rev	TAGAGAACGCAATAGGC TGCTCTTTCACAATCTAATC
Insulin-like peptide 1	ame Ilp1 fw ame Ilp1 rev	GCTCAGGCCTGTGCTCGAAAAGT CGTTGTATCCACGACCCTTGC
Alpha-glucosidase	ame HBG3 fw ame HBG3 rev	TACCTGGCTTCGTGTCAAC ATCTTCGGTTTCCCTAGAGAATG
Major royal jelly protein 1	ame Mrjp 1 fw ame Mrjp 1 rev	CACAGCCCCAAGATGGAATTT AAGAAGACGCCACTCTTTGA
Major royal jelly protein 2	ame Mrjp 2 fw ame Mrjp 2 rev	GGAAAGGGAGGGCTAGTCTC TCGATCGTCAATTTTGGCATA
Cytochrome P450 9e2	ame CYP 9Q1 fw ame CYP 9Q1 rev	TCGAGAAGTTTTTCCACCG CTCTTCTCCTCGATTG
Cytochrome P450 9e2	ame CYP 9Q2 fw ame CYP 9Q2 rev	GATTATCGCCTATTATTACTG GTTCTCCTTCCCTCTGAT
Catalase	ame Catalase fw ame Catalase rev	GGCGGGTGAATTAAGTGCTA TTGCGTTGTGTTGGAGTCAT
Gluthatione s-transferase-detoxification	ame GST-D1 fw ame GST-D1 rev	GCCGCTTCAAAGAAGTACG GTGGCGAAAACAAGGATGAT
cAMP - dependent kinase type 1	ame PKA-C1 fw ame PKA-C1 rev	TCCATTTTTGGTCTCCTTGC GTAAAAGCGGAATGTGGTT
Cytochrome P450 9s1	ame CYP9S1 fw ame CYP9S1 rev	GGACATTCACAGCACTCCGA GCTTCCTTGCTCACCAGACT
Enolase	ame Enolase fw ame Enolase rev	GGTGATGAAGGTGGTTTTTG GATGCAGCAACATCCATAACC
40S ribosomal protein S1	ame RPS18 fw ame RPS18 rev	GATTCCCGATTGGTTTTTG CCCAATAATGACGCAAACCT

MODUL 2: Entwicklung eines pollenanalytischen Verfahrens zur Bestimmung von Nahrungspflanzen

Arbeitspaket 2.1: Sammeln, Verifizieren, Validieren von Pollenproben für Aufbau einer Pollenbilddatenbank

Die Sammlung von frischen Antheren-Proben für den Aufbau einer Pollenbilddatenbank (Referenzdatenbank) erfolgte im Rahmen des NutriBee-Projektes im Zeitraum von 2021-2023 in Leipzig-UFZ (im Botanischen Garten und Umgebung), Hohenheim-UHOH (im Botanischen Garten) und in Braunschweig-JKI (im Botanischen Garten, Arzneipflanzengarten, JKI Gelände und Umgebung). An allen Standorten erfolgte die Sammlung nach einem speziell dafür entwickelten Sammelprotokoll. Die relevantesten Punkte beinhalteten: 1) die Abschätzung des richtigen Reifezeitpunktes (möglichst nur reife, sichtbar an deutlichem Blütenstaub, Antheren beproben); 2) Antheren möglichst direkt in Eppendorf-Tubes mit Pinzette sammeln oder in Papiertüten und später in Eppendorf-Tubes überführen; 3) es werden mindestens 3 Eppendorf-Tubes bzw. minimal 20 Blüten pro Art benötigt; 4) Proben möglichst zeitnah bei -20°C einfrieren; 5) Sammeldaten in der Metadatentabelle dokumentieren (Beantwortung der W-Fragen); 6) Artbestimmung über die App „Flora Incognita“ oder mithilfe eines Pflanzenbestimmungsbuch. Bei der Sammlung dieser Antheren-Proben sollte der Fokus auf die 500 Bienen-relevantesten Arten gelegt werden. Es wurde aus diesem Grund eine Sammeliste erstellt, die auf den 500 häufigsten gefundenen Arten im Honig im LAVES-Celle basiert. Alle gesammelten Proben wurden anschließend nach Leipzig-UFZ geschickt, wo sie im Labor aufbereitet wurden.

Die Probenaufbereitung erfolgte nach dem in Dunker et al. (2021) beschriebenen Extraktionsprotokoll. Zusammenfassend wurde zu den Proben Pollenisolationspuffer gegeben, anschließend wurden die Proben gevortext und ins Ultraschallbad gelegt. Daraufhin wurden die Proben filtriert, wobei ein Filter entsprechend der Pollengröße gewählt wurde. Die Pollengröße wurde durch verschiedenen Pollendatenbanken ermittelt (Beug 2015, Pollenwiki, PalDat). Die letzten Schritte beinhalten das Zentrifugieren der Proben, den Überstand abzunehmen und das Hinzufügen eines weiteren Puffers (PBS).

Die so aufbereiteten Proben wurden anschließend mit einem ImageStream X Mk II bildbasierten multispektralen Durchflusszytometer vermessen. Die dazugehörigen Parameter/Einstellungen sind in Dunker et al. (2021) beschrieben. Eine zytometrische Messung läuft wie folgt ab. Zunächst wird die Probe mittels eines Eppendorf-Tubes in das Gerät gegeben und die Partikel bzw. Pollen werden aufgrund der hydrodynamischer Strömung vereinzelt. Zwei Kameras nehmen dann von den vereinzelt Pollen zwei zytometrische Hellfeldbilder pro Pollen auf. Zusätzlich trifft ein 488 nm Laser auf die Pollen, wobei das Laserlicht von den Pollen absorbiert und Fluoreszenz emittiert wird und so neun zytometrische Fluoreszenzbilder unterschiedlicher spektraler Emission sowie ein Streubild pro Pollen aufgenommen werden. Somit erhält man pro Pollen insgesamt 12 Bilder. Eine zytometrische Messung dauert abhängig von der Probenkonzentration maximal 10 min und wird beendet, wenn 5.000 Partikel gemessen wurden. Die so entstandenen Pollenbilder wurden für die Pollenbilddatenbank in der gerätespezifischen Software durchgeschaut und manuell Fremdpollen und Schmutz herausortiert. Insbesondere dieser Arbeitsschritt der Qualitätssicherung war bei der hohen Anzahl der Messungen und Bilder pro Messung sehr umfangreich.

Für einen Teil der Proben erfolgte zusätzlich noch ein Probensplit. Dies bedeutet, dass bei Proben mit viel Probenmaterial die Probe während der Vorbereitung in zwei gleich große Teile aufgeteilt wurde. Der eine Teil der Probe wurde wie bereits beschrieben für die zytometrische Messung aufbereitet. Der andere Teil der Probe hingegen wurde für die mikroskopische Verifizierung verwendet. Diese Aufbereitung glich der zytometrischen

Aufbereitung bis zum letzten Schritt, nur, dass anstatt des PBS Puffers 96 % Ethanol hinzugegeben wurde. Diese Präparatanfertigung und Verifizierung erfolgte am LAVES-CE.

An der TU Ilmenau erfolgte die Validierung der KI basierend auf den gesammelten Proben. Die Bildverarbeitung beinhaltete mehrere Vorverarbeitungsschritte einschließlich Histogramm-Normalisierung, Hintergrundentfernung und kanalweise Skalierung. Das Open Microscopy Environment (OME)-Format, in dem die Bilder gespeichert werden, bewahrt dabei wichtige Metadaten über Bildgebungsbedingungen sowie experimentelle Parameter und erhält gleichzeitig die relativen Intensitätsunterschiede zwischen den Bildgebungskanälen.

Erprobt wurden außerdem ein neuartiger Entzerrungsprozess der auf einer GAN (*Generative Adversarial Network*)-basierte Architektur mit einem Encoder-Decoder-Framework mit spezialisierten Anti-Bias-Komponenten basiert, sowie ein neuartiger Ansatz zur spektralen Mischung um Zugang zu RGB-Bildaufbereitungstechniken zu erhalten. Dies wurde durch verschiedene von biologischen Systemen inspirierte Regularisierungstechniken ergänzt, einschließlich synaptischer Skalierung und spontaner Spine-Remodellierung, die eigens dafür entwickelt wurden (Hofmann and Mader 2022, sowie <https://openreview.net/pdf?id=6vSDzn-4FIW> (preprint link - under review in *Nature Communications*)). Die neuronale Netzwerkarchitektur wurde unter Verwendung von drei Hauptframeworks implementiert: ResNext50_32x4d, ResNet50 und VGG, wobei die ResNext50_32x4d-Konfiguration die beste Leistung zeigte.

Für die Variationsstudie der Pollenmerkmale im Hinblick auf räumlich-zeitliche Variabilität wurden im Rahmen der Auswertung mittels maschineller Datenverarbeitungstechniken insgesamt 61.250 Pollenbilder von vier verschiedenen Arten (*Achillea millefolium*, *Lamium album*, *Lathyrus vernus* und *Lotus corniculatus*) an vier Standorten in Deutschland (Berlin, Halle (S.), Leipzig und Jena) über einen Zeitraum von vier Jahren (2019-2022) gesammelt (u.a. aus verschiedenen studentischen Projekten im Rahmen des Phenobs_Netzwerkes (PhenObs), sowie des NutriBee-Projektes). Für die Charakterisierung der Pollen wurden mehrere morphologische Merkmale wie Kompaktheit, Länge, Länglichkeit und Rundheit sowie die Fluoreszenzintensität in verschiedenen Spektralbereichen erfasst. Die Datenverarbeitung beinhaltete RGB-Transformationen der multispektralen Daten, wobei die Bilder nach ihrer Erkennungswahrscheinlichkeit in verschiedene Qualitätskategorien (leicht, mittel, schwierig) eingestuft wurden. Zur Validierung der Proben wurden die Bilder sowohl zytometrisch als auch mikroskopisch untersucht, wobei insgesamt 101 Beobachtungen durchgeführt wurden. Die größten Bildermengen stammten aus Leipzig (29.730 Bilder) und Jena (25.172 Proben), während in Berlin (595 Bilder) und Halle (5.750 Bilder) weniger Bilder aus den Messungen vorlagen. Die Analyse wurde durch ein vielschichtiges neuronales Faltungsnetzwerk-basiertes Klassifizierungssystem durchgeführt, das für das Sammeln, Verifizieren und Validieren von Pollenproben entwickelt wurde, um die verschiedenen Pollentypen automatisch zu identifizieren und zu kategorisieren.

Arbeitspaket 2.2: Aufbau einer bundesweiten Pollenbilddatenbank basierend auf Pollenhörschen-Proben

Im Rahmen eines vom Land Baden-Württemberg finanzierten Projekts wurden bereits Pollenhörschen-Proben gesammelt. Ein Teil dieser Proben wurden nach Leipzig-UFZ zur zytometrischen Messungen und Auswertung geschickt. Die Aufbereitung dieser Proben erfolgte nach dem leicht angepassten Extraktionsprotoll der Antheren-Proben. Dabei wurden die Pollenhörschen gemörsert und die Filtration erfolgte immer mit einem 100 µm Filter. Die anschließende Messung mit dem Zytometer wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Für einige Proben

war eine Verdünnung mit PBS aufgrund der hohen Pollenkonzentration notwendig. Für den anderen Teil der Pollenhöschen-Proben erfolgte an der UHOH die mikroskopische Aufbereitung und Auswertung.

Die Pollenhöschen-Proben wurden einer umfassenden Datenbereinigungspipeline unterzogen, um beschädigte oder fehlerhafte Bilddaten zu entfernen, die beim automatisiertem Bildexport vereinzelt entstehen und die die Eingangsstatistik verfälschen könnten. Dies umfasste die automatische Erkennung und Entfernung unvollständiger Kanaldaten, die Korrektur von Metadaten-Inkonsistenzen und die Validierung der Kanalausrichtung über den gesamten Spektralbereich. Pollenbilder mit signifikanten Artefakten oder fehlenden Kanalinformationen wurden aus dem Datensatz ausgeschlossen, um die statistische Integrität zu wahren. Die Datenbank umfasst insgesamt 1.076.566 Pollenbilder von 120 verschiedenen Taxa mit jeweils 8 Qualitätsstufen aus 352 Proben. Die initiale Testdatenbank umfasste 10.000 Pollenbilder mit je einer Probe pro Taxon.

Arbeitspaket 2.3: Erweiterung der Pollenbilddatenbank basierend auf verschiedenen Matrices

Für die Erweiterung der Pollenbilddatenbank wurden neben den Pollenhöschen-Proben noch Honigproben verwendet. Von den Projektpartnern (UHOH, LAVES-CE, JKI) oder von lokalen Imkern erhielt das UFZ verschiedene Sorten- und Mischhonige. Die Aufbereitung der Honigproben erfolgte nach der angepassten DIN 10760. Die einzelnen sich wiederholenden Schritte sind dabei das Einwiegen der Probe, das Hinzufügen von destilliertem Wasser oder PBS, das Dekantieren und Filtrieren mit 100 µm Filtern. Bei der Messung mit dem Durchflusszytometer gibt es keine Unterschiede zu den vorherigen Proben. Für alle Honigproben liegen ebenfalls mikroskopischen Auszählungen vor, welche an der UHOH oder am LAVES-CE durchgeführt wurden.

Die Honigproben wurden derselben Datenbereinigungspipeline wie die der Pollenhöschen-Proben unterzogen, konnten aber noch nicht final für die Pollenklassifikation der Honigproben getestet werden.

Zusätzlich führten das UFZ, die UHOH und das LAVES-CE einen Ringversuch durch, um den aktuellen Stand der Vergleichbarkeit zwischen der mikroskopischen und der zytometrischen Pollenanalyse zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurden fünf Masterpollenmischungen angefertigt, bestehend aus drei Antherenpollenmischungen mit verschiedenen Anteilen von *Acer*, *Brassica*, *Prunus*, *Taraxacum* und *Robinia* und zwei Pollenhöschenmischungen mit verschiedenen Anteilen von *Acer*, *Aesculus*, *Pyrus*, *Taraxacum* und *Salix*. Die Sammlung und Aufbereitung dieser Proben erfolgte nach dem Sammel- und Extraktionsprotokoll des Probensplits. Die Mastermischungen wurden dadurch gleichmäßig aufgeteilt und für die jeweilige Analysemethode entsprechend vorbereitet. Der eine Teil der Proben wurde verwendet, um gemeinsam mit einer Mitarbeiterin des LAVES-CE für sieben Ringversuchsteilnehmer ein mikroskopisches Präparat pro Mischung herzustellen. Die sieben Ringversuchsteilnehmer (fünf Personen am LAVES-CE und zwei Personen an der UHOH) wurden gebeten, bei der mikroskopischen Pollenanalyse jeweils 500 Pollenkörner auszuzählen und einem Pollentyp/Art zuzuordnen. Die auszuzählenden 500 Pollenkörner entsprechen den Vorgaben der DIN 10760 (Bestimmung der relativen Pollenhäufigkeiten). Bei der Auszählung hatten die Teilnehmer zumindest davon Kenntnis, dass es sich bei der Pollenmischung um insgesamt fünf Pollentypen pro Mischung handelt. Mit dem anderen Teil der Proben wurden pro Mischung sieben durchflusszytometrische Messungen durchgeführt. Nach der Annotation der Pollen, wurde mit dem KI-Modul die Identifizierungsgenauigkeit eines Classifiers getestet, welcher die jeweiligen und eine zusätzliche Art enthielt.

Arbeitspaket 2.4: Evaluierung von Maßnahmen für bestäuberfreundlichen Pflanzenschutz und Pflanzenbau

Für andere Projekte wie „ComBee“, „MonViA“ oder „PhenObs“ wurden bereits Antheren-Proben nach dem beschriebenen Sammelprotokoll und Extraktionsprotokoll während der Projektlaufzeit gesammelt, aufbereitet und zytometrisch am UFZ gemessen. Diese Proben konnten noch nicht weitergehend auf die Pollenzusammensetzung untersucht werden. Zudem hat das UFZ Pollenhöschen-Proben aus dem Pflanzenschutzmittelversuch aus Modul 1 erhalten. Diese Proben sollen verwendet werden, um mögliche Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Pollenmerkmale zu untersuchen und ggf. die Pollenbilddatenbank mit diesen Proben zu erweitern. Aus diesem Grund wurden diese Pollenhöschen wie die bereits genannten anderen Pollenhöschen aufbereitet und gemessen.

4. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt geordnet nach den im Projekt definierten Arbeitspaketen und ihren entsprechenden Zielen und Abläufen. Abweichungen von den in den Arbeitspaketen definierten Zielen und Abläufen werden weiterführend unter Punkt 5 („Diskussion der Ergebnisse“) diskutiert.

MODUL 1: Vergleichende Stressorenwirkung auf Jung- und Wirtschaftsvölker

Arbeitspaket 1.1: Kunstschwarmbildung und Voranalyse der Darm-Mikroflora [abgeschlossen, publiziert]

Beteiligte Partner: JKI, CE, RUB, UHOH und IBI

In Vorbereitung auf die Versuchsdurchführung im Frühjahr 2022 wurden im Juni/Juli 2021 jeweils 24 Kuntschwärme mit Schwesterköniginnen an den jeweiligen Standorten gebildet. Weiterhin wurden Proben von Stockbienen, Larven (Stadium L5) und Bienenbrot im August 2021 aus jedem der Völker entnommen und die Bestimmung der lokalen bakteriellen Mikroflora am LAVES in Celle durchgeführt. Mithilfe sensitiver Hochdurchsatzprotokolle (qPCR-Analysen) wurde die Abundanz der Kernmikrobiomvertreter bestimmt. Weiterführend wurden die gemessenen Abundanzen je Art auf das zusätzlich gemessene Referenzgen *β-actin* der Honigbiene normalisiert und so die relative Abundanz ermittelt.

Die Ergebnisse der beprobten Stockbienen (aus 2021) zeigen das zu erwartende Bild, dass sich die Abundanzen zwischen den einzelnen Kernmikrobiomvertretern unterscheiden (Abbildung 4.1A). Es finden sich jedoch kaum Unterschiede in der Abundanz der jeweiligen Arten zwischen den einzelnen Standorten. Dies passt zu den Ergebnissen, die bereits durch andere Autoren in der Vergangenheit beschrieben worden sind, dass das Kernmikrobiom der Honigbiene im Hinblick auf die vorkommenden Arten konstant ist, sich die Abundanzen jedoch lokal unterscheiden können (Hroncova et al. 2015).

Die Ergebnisse des Bienenbrotes zeigen, dass das Bienenbrot von Laktobazillen dominiert wird und die übrigen Arten stark unterrepräsentiert sind, wobei *S. alvi* gar nicht detektiert werden konnte (Abbildung 4.1B). Lokale Unterschiede sind wie auch schon bei den adulten Tieren (Stockbienen) zu erkennen, jedoch entsprechen sie dem Erwartungswert. Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass vor allem Laktobazillen für die Prozesse der Fermentierung des Bienenbrotes verantwortlich sind (Smutin et al. 2022). Bisher wurde in anderen Studien das Mikrobiom des Bienenbrotes ausschließlich mithilfe von Breitbandscreenings analysiert und die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich auch Vertreter des Kernmikrobioms der Honigbiene im Bienenbrot finden lassen (Smutin et al. 2022). Eine Einzelanalyse der o.g. Arten wurde nach aktuellem Kenntnisstand im Bienenbrot bisher nicht durchgeführt.

Das Kernmikrobiom der L5-Larven zeichnete sich durch eine übergreifende, sehr geringe Abundanz der einzelnen Vertreter, sowie die Abwesenheit von *S. alvi*, aus (Abbildung 4.1C). Wie bereits bei den Stockbienen und dem Bienenbrot beobachtet, gab es lokale Unterschiede, jedoch entsprechen auch diese dem Erwartungswert.

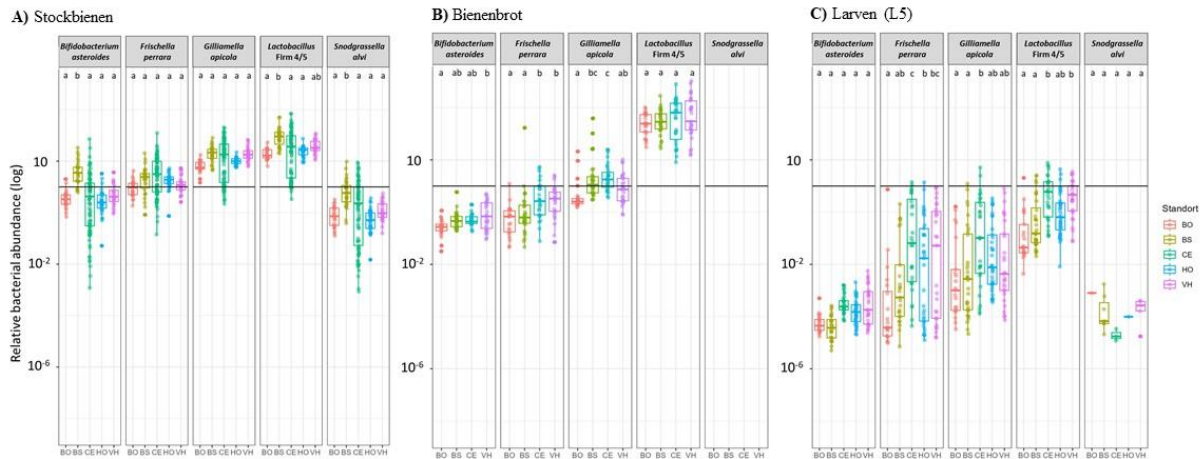


Abbildung 4.1: Relative Abundanzen der Kernmikrobiomvertreter in den einzelnen Proben, die im August 2021 gesammelt wurden. Aus jedem der gebildeten Kunstschwarmvölker ($n = 24$ Völker pro Standort, $N = 5$ Standorte) wurden Proben der Stockbienen (A), des Bienenbrotes (B) und der L5-Larven (C) entnommen. Dargestellt ist die Abundanz der Mikrobiomvertreter relativ zur gemessenen Referenz pro Standort (BO: Bochum, BS: Braunschweig, CE: Celle, HO: Hohenheim, VH: Veitshöchheim). Unterschiedliche Buchstaben entsprechen signifikanten Unterschieden zwischen den Standorten (LMM: $p < 0.05$).

Arbeitspaket 1.2: Populations- und Brutentwicklung [abgeschlossen, publiziert]

Beteiligte Partner: JKI, CE, RUB, UHOH und IBI

Der Versuch fand wie geplant im Frühjahr 2022 statt und die Ergebnisse der Populationsschätzungen (März-September) und der Brutfotographie wurden detailliert ausgewertet. Es hat sich gezeigt, dass der kombinierte Stressoreinfluss aus Fungizidexposition und Nahrungslimitierung einen Effekt auf die Entwicklung von Jungvölkern hatte. Dieser Effekt zeichnete sich durch eine verringerte Bienenmassezunahme (Abbildung 4.2A, B) und einem Peak in der Brutrate der Jungvölker während der Expositionsphase aus (Abbildung 4.2C, D). Jedoch ist hervorzuheben, dass dieser Effekt von den Jungvölkern über die Versuchszeit kompensiert werden konnte. Ein Effekt auf die Brutentwicklung bzw. die Brutabbruchrate (BTR) konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 4.3). Die BTR liegt mit einem Maximum von 19 % in der zu erwartenden Abbruchrate von 15-20 % von Wirtschaftsvölkern unter Feldbedingungen (Lückmann & Tänzler 2020).

Die Ergebnisse und Interpretationen der Daten wurden bereits in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift veröffentlicht und finden sich unter Wueppenhorst et al. (2024a).

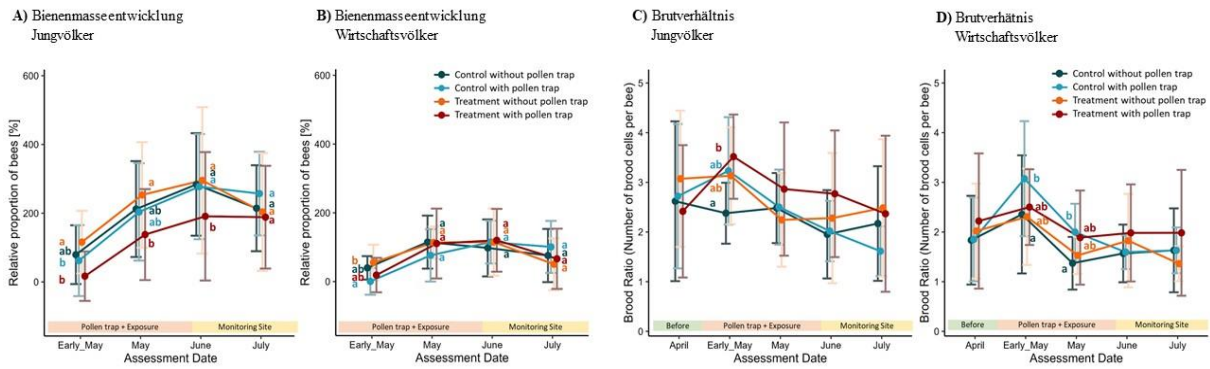


Abbildung 4.2: Entwicklung der Honigbienenvölker unter kombiniertem Stressoreneinfluss, gemessen an der Bienenmasseentwicklung (A, B) und dem Brutverhältnis (C, D). Jung- (A, C) und Wirtschaftsvölker (B, D) wurden im 3-wöchigen Rhythmus geschätzt und ihre Entwicklung dokumentiert. Während der Expositionsphase waren ein Teil der Völker einer Fungizidexposition und/oder einer Nahrungslimitierung (Pollenfalle) ausgesetzt. Unterschiedliche Buchstaben entsprechen signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen (n = 3 Völker pro Gruppe, N = 5 Standorte) (LMM: $p < 0.05$) (Abbildung entnommen aus Wueppenhorst et al. 2024a).

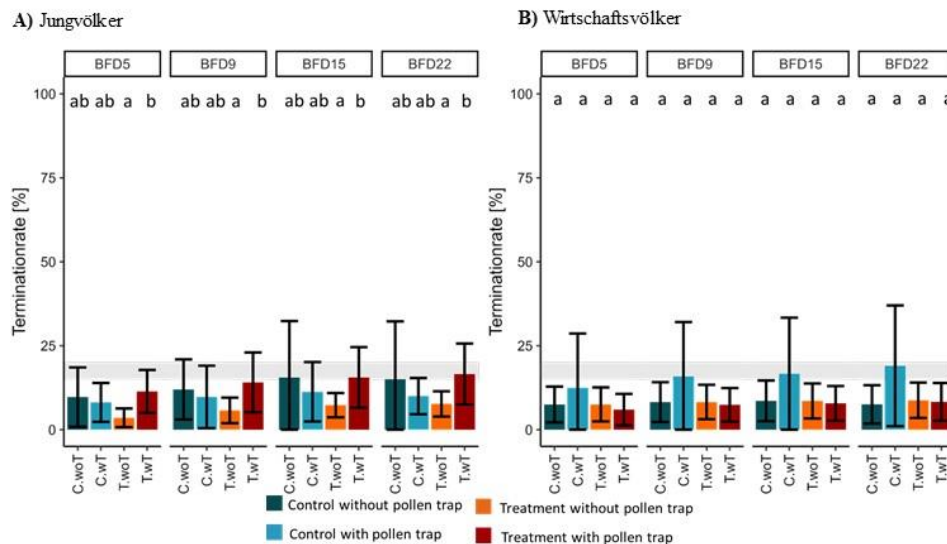


Abbildung 4.3: Brutabbruchrate der Jung- (A) und Wirtschaftsvölker (B) innerhalb des ersten Brutzyklus nach Expositionsstart. Während der Expositionsphase waren ein Teil der Völker einer Fungizidexposition und/oder einer Nahrungslimitierung (Pollenfalle) ausgesetzt. Unterschiedliche Buchstaben entsprechen signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen (n = 3 Völker pro Gruppe, N = 3 Standorte) (LMM: $p < 0.05$) (Abbildung entnommen aus Wueppenhorst et al. 2024a).

Mittels Pollenanalyse wurde der Inhalt der Pollenfallen aller Standorte bestimmt und verglichen. Zwischen den Kontrollfeldern und denen der Pflanzenschutzmittelapplikation waren keine größeren Unterschiede zu beobachten. Vor Applikation lag der Rapspollenanteil bei durchschnittlich 54,2 %, während der Applikation bei 46,9 % und nach Applikation bei 34,7 %. Somit ist zu schlussfolgern, dass die Sammelbienen auch wirklich im Raps Pollen gesammelt haben.

Arbeitspaket 1.3: Wirkstoffverteilung in relevanten Matrices [abgeschlossen, publiziert]

Beteiligte Partner: JKI, CE, RUB, UHOH und IBI

Die Analyse der Rückstände der beiden verwendeten Fungizide (Boscalid und Pyraclostrobin) hat gezeigt, dass die Konzentrationen der beiden Wirkstoffe über die Zeit von acht Tagen in den Blütenständen, den Honigblasen und Pollenhörschen und dem eingelagerten Pollen und Nektar abnehmen (Abbildung 4.4). Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass die Ammenbienen als eine Art Filter im weiteren Transfer fungieren. Sowohl in den Köpfen der Ammenbienen als auch im Gelée Royal wurden nur sehr geringe Konzentrationen der Fungizide gemessen (Abbildung 4.5). Die höheren Rückstände, die im Larvenfuttersaft der Arbeiterinnen und Drohen detektiert wurden, resultieren am wahrscheinlichsten von dem hinzugefügten Pollen, der im Gelée Royal nicht vorkommt (Böhme et al. 2019). Alle detektierten Konzentrationen lagen mindestens um den Faktor 2 unter dem Schwellenwert für akute bzw. chronische Toxizitätslevel. Bei Betrachtung des gesamten Transferwegs von den Blütenständen, über die Sammelbienen, den eingelagerten Pollen und Nektar, hin zu den Ammenbienen, dem produzierten Futtersaft und schließlich den Larven, zeigt sich, dass die Konzentrationen im Median von einem Schritt zum anderen abnehmen. Die Ausnahme dabei bildet die Einlagerung des Pollens und Nektars sowie die Hinzugabe von Pollen zu den Larvenfuttersäften von Arbeiterinnen und Drohen (Abbildung 4.6).

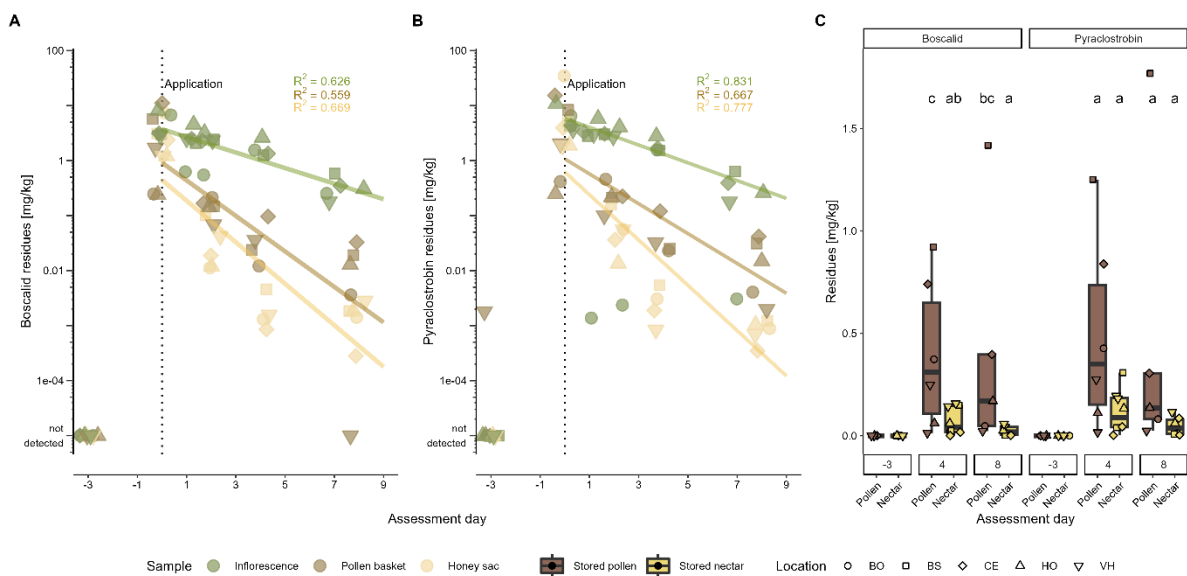


Abbildung 4.4: Fungizidrückstände in Pflanzenmaterial bzw. eingelagertem Pollen und Nektar über den Versuchszeitraum. Gemessene Rückstände von Boscalid (A) und Pyraclostrobin (B) in Blütenständen, Pollenhörschen und Honigblasen (A, B), dargestellt als Regressionsgerade ab dem Zeitpunkt der Applikation. Rückstände beider Substanzen in eingelagertem Pollen bzw. Nektar (C). Unterschiedliche Buchstaben entsprechen signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen (LMM: $p < 0.05$). Die Proben stammen ausschließlich von Völkern an den Felder der Fungizidexposition. (BO, Bochum; BS, Braunschweig; CE, Celle; HO, Hohenheim; VH, Veitshöchheim) (Abbildung entnommen aus Wueppenhorst et al. 2024b)

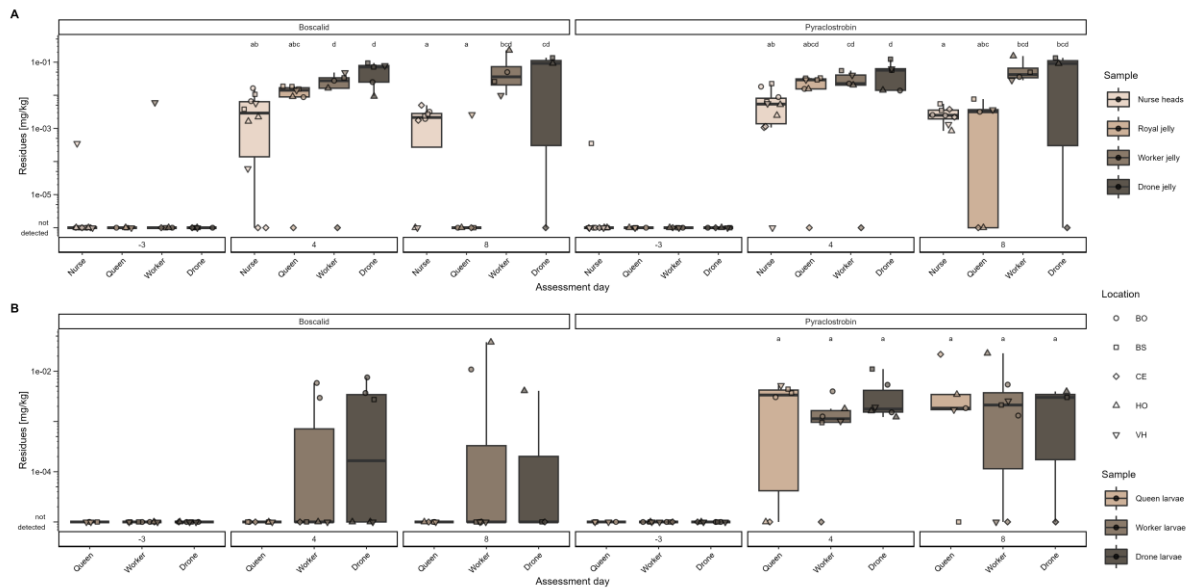


Abbildung 4.5: Fungizidrückstände (Boscalid und Pyraclostrobin) gemessen in Arbeiterinnenköpfen und Larvenfuttersäften (A) und Larven (B) über den Versuchszeitraum. Unterschiedliche Buchstaben entsprechen signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen (LMM: $p < 0.05$). Die Proben stammen ausschließlich von Völkern an den Felder der Fungizidexposition. (BO, Bochum; BS, Braunschweig; CE, Celle; HO, Hohenheim; VH, Veitshöchheim) (Abbildung entnommen aus Wueppenhorst et al. 2024b)

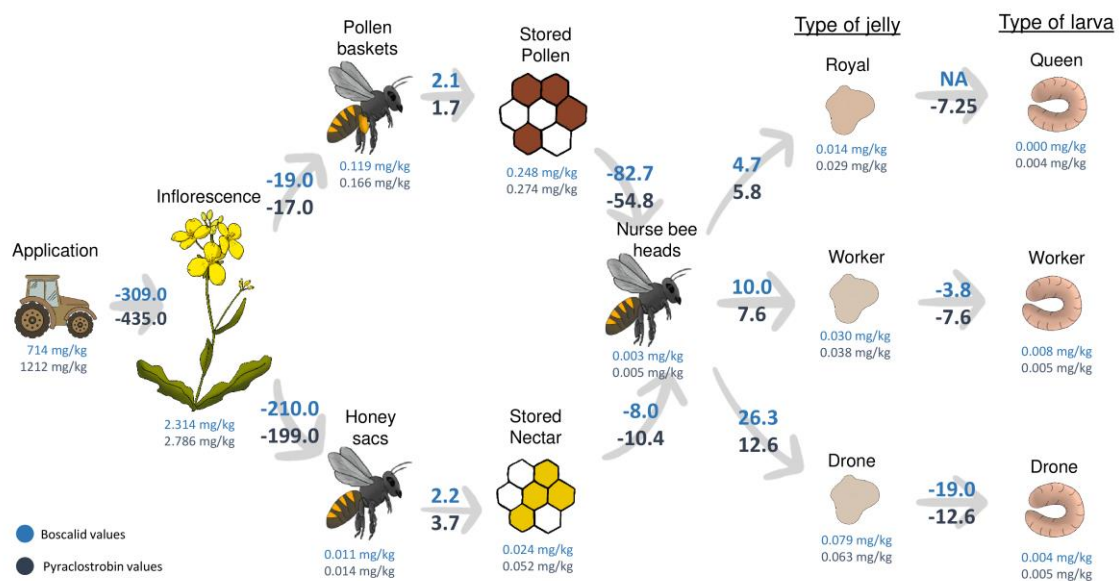


Abbildung 4.6: Transferwege der Fungizidrückstände (Boscalid und Pyraclostrobin) von der Feldapplikation zu den Honigbienenlarven. Gezeigt sind die Transferfaktoren von der jeweiligen Matrix zur nächsten (Werte an den Pfeilen). Zusätzlich sind die gemessenen Konzentrationen (Mediane über alle Zeitpunkte) mit angegeben. (Hellblau: Boscalid; Dunkelblau: Pyraclostrobin) (Abbildung entnommen aus Wueppenhorst et al. 2024b)

Die Ergebnisse und Interpretationen der Daten wurden bereits in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift veröffentlicht und finden sich unter Wueppenhorst et al. (2024b).

Arbeitspaket 1.4: Entwicklung des Mikrobioms unter Stressoreinfluss [**abgeschlossen, publiziert**]

Beteiligte Partner: JKI, CE, RUB, UHOH und IBI

Alle Probenmatrizes (Stock- und Sammelbienen, sowie Bienenbrotproben) wurden 2022 gesammelt, 2023 präpariert und beim Projektpartner LAVES-CE analysiert.

Die Ergebnisse der Stock- und Sammelbienen wurden mithilfe multidimensionaler Skalierungsmethoden (NMDS) auf Grundlage der bakteriellen Zusammensetzungen (Abundanz und relative Häufigkeiten) analysiert (Abbildung 4.7A). Es zeigte sich, dass kein expositionsbedingter Effekt nachgewiesen werden konnte, weder durch die Fungizidbehandlung noch durch die Nahrungslimitierung. Jedoch konnten signifikante Unterschiede zwischen den Standorten und den Probenarten (Stock- und Sammelbienen) beobachtet werden. Diese waren jedoch zu erwarten. Lokale Effekte wurden bereits in mehreren Arbeiten beschrieben und durch die unterschiedlichen Umwelteinflüsse und Nahrungspräferenzen der Honigbienenarbeiterkasten (Stock- und Sammelbienen mit unterschiedlichen Aufgaben, wie der Brutpflege oder das Sammeln von Pollen und Nektar) waren Unterschiede zwischen den Probenarten ebenfalls zu erwarten.

Durch die Kooperation mit dem Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Dr. A. Yurkov) konnten zusätzlich Effekte auf das Umweltmikrobiom untersucht werden. Dazu wurde das Mikrobiom des floralen Nektars der Rapspflanzen analysiert. Auch hier zeigte sich, dass nur ein Standortunterschied festzustellen war und kein Effekt auf die Fungizidexposition zurückzuführen war (Abbildung 4.7B).

Die Ergebnisse und Interpretationen der Daten wurden bereits in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift veröffentlicht und finden sich unter Wueppenhorst et al. (2024a).

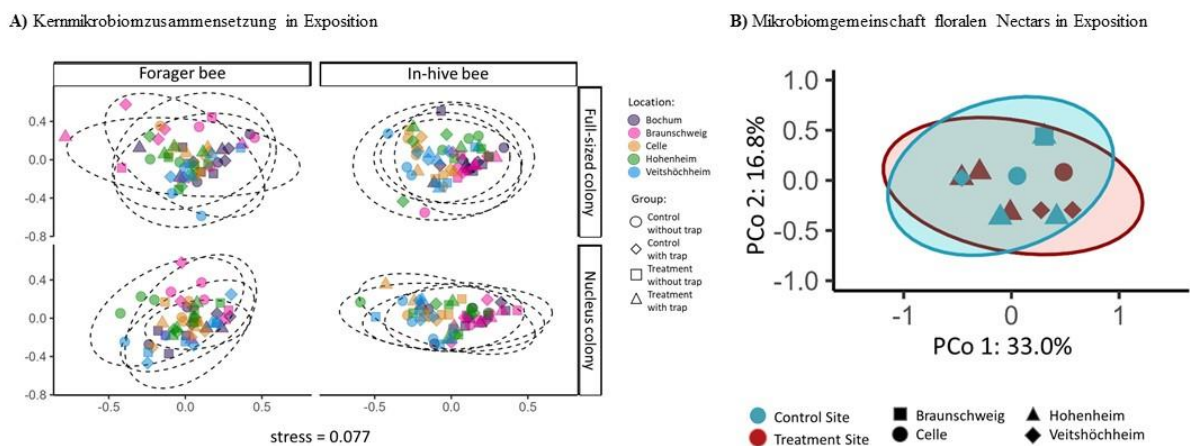


Abbildung 4.7: Mikrobiomanalysen unter kombiniertem Stressoreinfluss im Honigbienenendarm (A) und des floralen Nektars (B). Im Honigbienenendarm wurde eine Kernmikrobiomanalyse durchgeführt und die Gemeinschaft mithilfe einer NMDS Analyse dargestellt. Es konnten keine signifikanten Effekte bezogen auf die Fungizidexposition und/oder die Nahrungslimitierung (Pollenfalle) festgestellt werden (PERMANOVA, $p < 0.05$). Das Mikrobiom des Nektars wurde mithilfe einer PCoA dargestellt und es konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede auf die Fungizidexposition zurückgeführt werden (PERMANOVA, $p > 0.05$). (Abbildungen entnommen aus Wueppenhorst et al. 2024a)

Arbeitspaket 1.5: Stressoren-Einflüsse anhand spezifischer Biomarker [abgeschlossen, in Bearbeitung]

Beteiligte Partner: JKI, CE, RUB, UHOHund FUB

Alle Proben wurden wie geplant im Jahr 2022 gesammelt und zur weiteren Analyse an die FUB versendet. Die Ergebnisse der Genexpressionsmessungen wurden anschließend mithilfe einer NMDS ausgewertet, um ein ganzheitliches Bild zu erlangen und die Qualität der ausgewählten Kandidatengene als Biomarker bewerten zu können.

Die Betrachtung aller Biomarker ergab, dass sowohl die Fungizidexposition als auch die Zeit (vor, während, nach Exposition) keinen signifikanten Effekt auf die Bienen hatten (PERMANOVA, $p > 0.05$) (Abbildung 4.8 A, C). Es zeigte sich lediglich ein zu erwartender Unterschied zwischen den Sammel- und Stockbienen (PERMANOVA, $p = 0.001$) (Abbildung 4.8 B), der sich im speziellen durch die Gene *Hex110*, *MRJP-1*, *MRJP-2*, *Ilp-1*, *PPOact*, *Def1* sowie *Vg* zu ergeben schien. Eine genauere Betrachtung der relativen Expressionen dieser Gene bestätigte den jeweiligen signifikanten Unterschied zwischen Sammel- und Stockbienen (Abbildung 4.9 A, B).

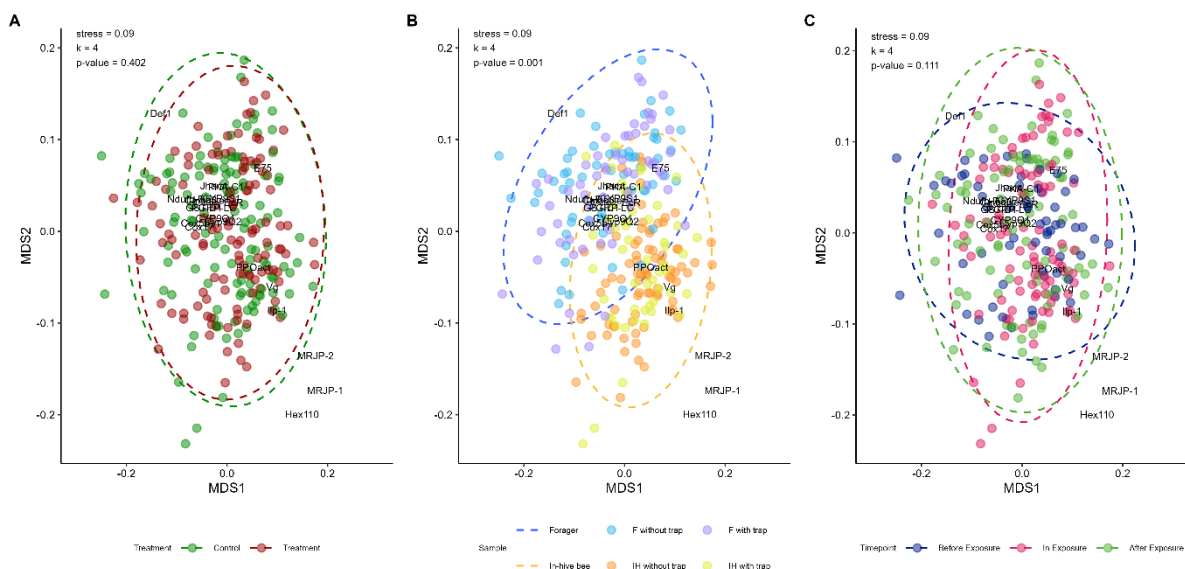


Abbildung 4.8: Ergebnisse der Biomarkeranalyse durch eine NMDS Darstellung mit allen gemessenen Kandidatengenen. Es erfolgte eine Darstellung der verschiedenen Einflussfaktoren: Fungizidexposition (A), Bienenart (B), und Zeit (C). Es handelt sich bei den drei Abbildungen jeweils um dieselbe Analyse, zur besseren Interpretation der Ergebnisse wurden lediglich die Punkte entsprechend des Einflussfaktors eingefärbt. Weiterhin sind der Stress-Faktor (stress), die Anzahl der Dimensionen für die Analyse ($k = 4$) und der Signifikanzwert (p -value) der PERMANOVA angegeben.

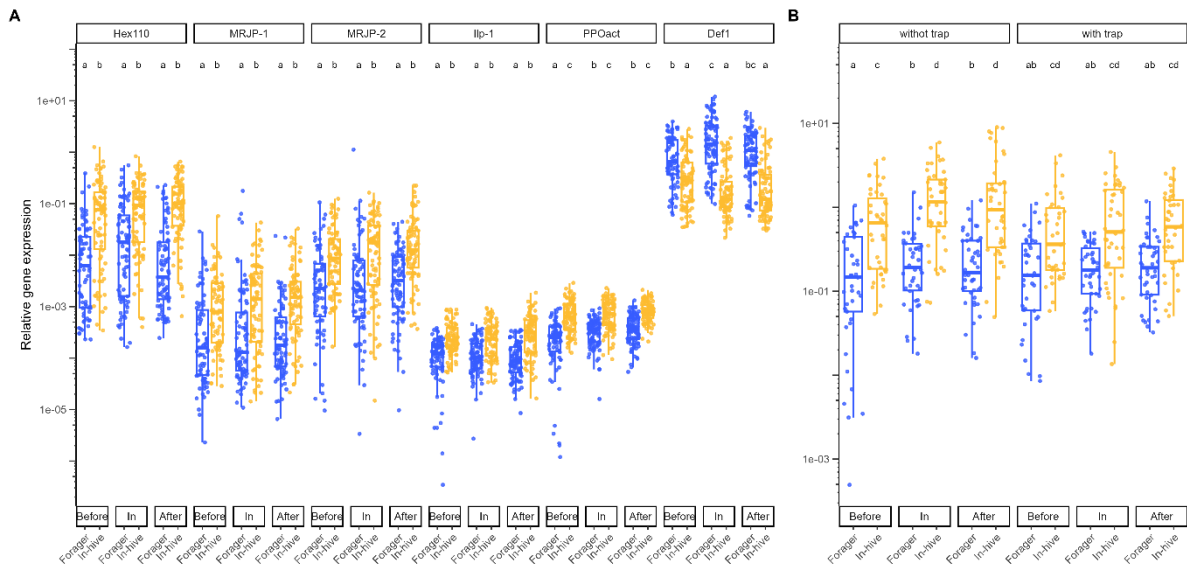


Abbildung 4.9: Detaillierte Darstellung des relativen Expressionslevels ausgewählter Kandidatengene. A) Betrachtung der Unterschiede zwischen Sammel- (blau) und Stockbienen (orange) pro Zeitpunkt innerhalb der Gene, B) Betrachtung des zusätzlichen Faktors Pollenfalle für die relativen Expressionslevel des Gens Vitellogenin (*Vg*). Unterschiedliche Buchstaben entsprechen signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen (n = 24 Völker pro Gruppe, N = 4 Standorte) (LMM: $\alpha = 0.05$).

Ähnlich den Ergebnissen des Mikrobioms der Honigbienen konnten mithilfe der ausgewählten Kandidatenbiomarker ebenfalls keine Einflüsse der Stressoren Fungizidexposition oder Nahrungslimitierung festgestellt werden. Unterschiede zwischen den Sammler- und Stockbienen ergaben sich besonders bei den Genen *Hex110*, *MRJP-1*, *MRJP-2*, *Ilp-1*, *PPOact*, *Def1* sowie *Vg*, sodass diese auch in Zukunft als Biomarker zur Unterscheidung von adulten Bienen unterschiedlicher Aufgabentypen genutzt werden könnten.

Arbeitspaket 1.6: Überwinterungserfolg und Verarbeitung der Daten [abgeschlossen, publiziert]

Beteiligte Partner: JKI, CE, RUB, UHOH, IBI und FUB

Der Überwinterungserfolg der Völker aus dem Versuchsjahr 2022 wurde im Frühjahr 2023 anhand von Populationsschätzungen ermittelt. Zusätzlich wurden Proben (Stockbienen, Bienenbrot und Honig) für die Rückstandsanalyse gesammelt, um die etwaig verbliebenen Rückstände der Fungizidexposition bewerten zu können. Insgesamt lag der Überwinterungserfolg der Honigbienenvölker bei 94 % (110/117 Völker überwinterten erfolgreich). Innerhalb der Jungvölker konnten keine Unterschiede in der Volksstärke gemessen werden, und nur die sehr starken Wirtschaftsvölker der Kontrollflächen ohne Nahrungslimitierung unterschieden sich von den übrigen Wirtschaftsvölkern, die mindestens einem Stressor ausgesetzt waren.

Die Ergebnisse und Interpretationen der Daten wurden bereits in wissenschaftlichen Fachzeitschriften veröffentlicht und finden sich unter Wueppenhorst et al. (2024a, b).

MODUL 2: Entwicklung eines pollenanalytischen Verfahrens zur Bestimmung von Nahrungspflanzen

Arbeitspaket 2.1: Sammeln, Verifizieren, Validieren von Pollenproben für Aufbau einer Pollenbilddatenbank
[abgeschlossen, Publikation – aktueller Status *provisionally accepted/minor revision*]

Beteiligte Partner: UFZ, TUI, CE, UHOH und JKI

Während der Projektlaufzeit konnten von den Projektpartnern (UFZ, UHOH, JKI) insgesamt 4.434 Antheren-Proben für den Aufbau der Pollenbilddatenbank gesammelt werden. Die Proben umfassen 696 Pflanzenarten, welche bienenrelevante Arten wie u.a. *Brassica napus*, *Phacelia tanacetifolia*, *Lavandula angustifolia*, *Tilia cordata*, *Malus sylvestris* oder *Salix caprea* darstellen. Alle 4.434 Antheren-Proben wurden am UFZ aufbereitet. Von allen Proben aus Leipzig und Hohenheim erfolgte mindestens eine zytometrische Messung. Für die zusätzlichen Proben aus Braunschweig aus 2023 erfolgte zunächst die zytometrische Messung von knapp 100 Arten, die besonders relevant für die Pollenbilddatenbank war. Mit 120 dieser Arten wurde ein großer Classifier trainiert, welcher bereits eine recht hohe *Accuracy* ($\sim 80\%$) erreicht. Die verbleibenden Proben sind eingelagert und können bei Bedarf noch gemessen werden. Die manuelle Qualitätssicherung ist ebenfalls für die wichtigsten Proben der Datenbank erfolgt. Für 172 der Antheren-Proben aus Hohenheim erfolgte während der Aufbereitung ein Probensplit zur Verifizierung der Art. Bei 18 dieser Proben konnte die Zielpflanze nicht verifiziert werden, da sich nur Pollenhüllen finden ließen oder die Pollenkörner schon eingefallen waren.

Der Versuch zur Variabilität von Pollenmerkmalen, die an vier verschiedenen Arten durchgeführt wurde, untersuchte sechs Pollenmerkmale im zeitlich-räumlichen Kontext. Dabei wurden sowohl reife als auch unreife Pollen analysiert. Es zeigte sich, dass selbst in diesem kleinen Datensatz teilweise eine große Variation in den Pollenmerkmalen einer Art vorhanden ist (Abbildung 4.10, 4.11).

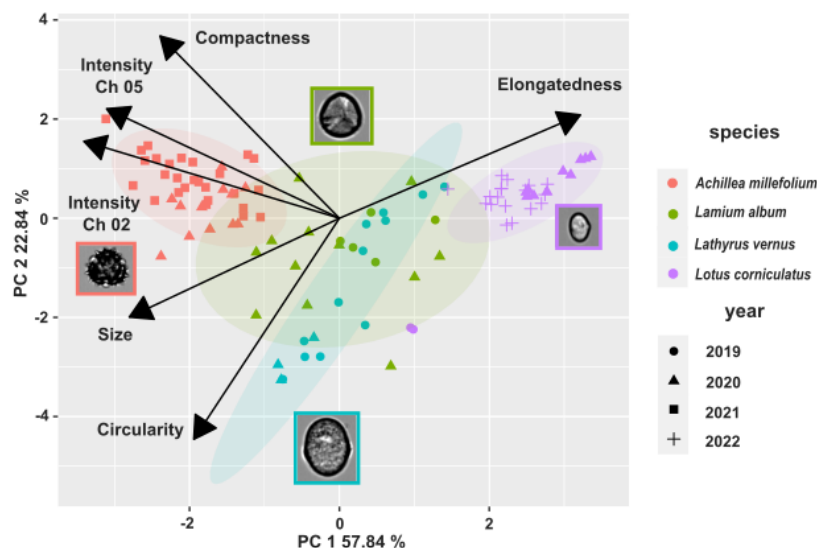


Abbildung 4.10: Hauptkomponentenanalyse von sechs ausgewählten Pollenmerkmalen der vier untersuchten Arten (*A. millefolium* - rot, *L. album* - grün, *L. vernus* - blau, *L. corniculatus* - lila) und dem Jahr der Sammlung (Symbole). Die Pfeile zeigen die Polleneigenschaften, die die Hauptunterscheidung bestimmen, und die Bilder in den entsprechenden Rechtecken zeigen ein repräsentatives mikroskopisches Bild des Pollens, welches mit bildbasierter Durchflusszytometrie aufgenommen wurde.

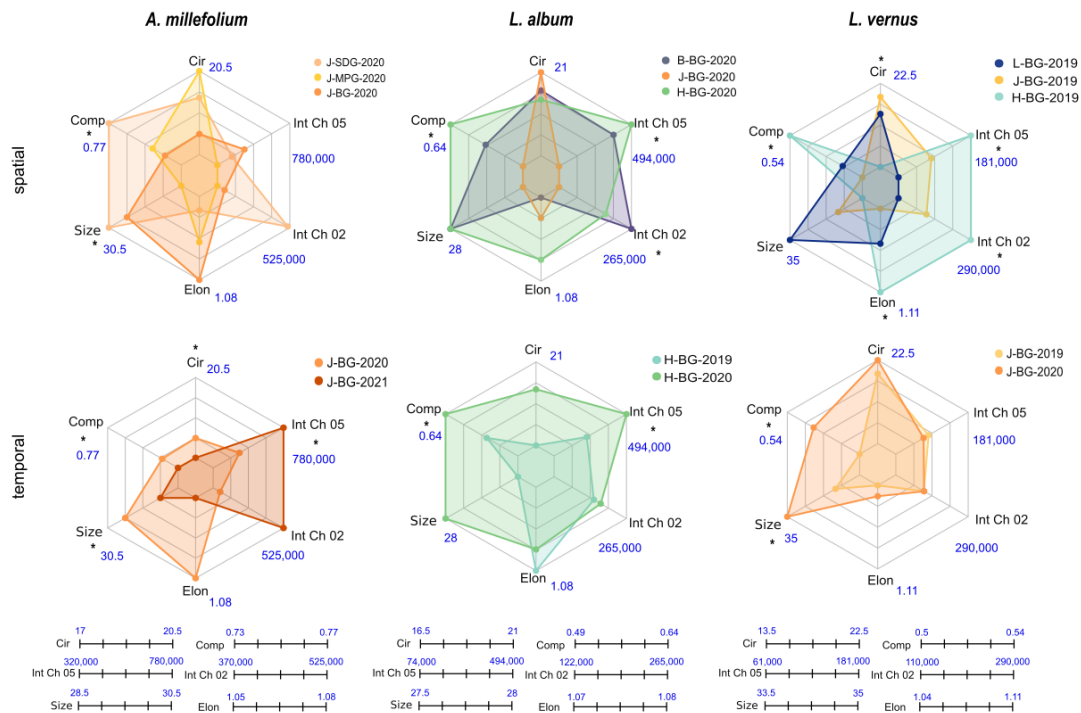


Abbildung 4.11: Netzdiagramme sechs ausgewählter Merkmale für drei untersuchte Arten (*Achillea millefolium*, *Lamium album*, *Lathyrus vernus*), unterteilt in räumliche Untersuchung (Standort der Sammelorte: J-Jena, B-Berlin, H-Halle, L-Leipzig, BG-Botanischer Garten, SDG-Halbtrockenrasen, MPG-mesophiles Grünland) und zeitliche Untersuchung (Sammeljahr). Die ausgewählten Merkmale sind Rundheit (Cir), Kompaktheit (Comp), Länge (Len), Länglichkeit (Elon), Intensität Ch 02 (grüne Fluoreszenzintensität) (Int Ch02) und Intensität Ch 05 (rote Fluoreszenzintensität) (Int Ch05). Sternchen markieren statistisch signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$), die mittels ANOVA und anschließender Post-hoc-Tests ermittelt wurden. Die Skalierung der Achsen für jede Art basiert auf dem minimalen und maximalen Messwert für jedes Merkmal, die durch die entsprechenden Zahlenstrahlen unter den Netzdiagrammen gekennzeichnet sind.

Die erste Evaluation des Datensatzes erfolgte mit verschiedenen *Deep Learning* Architekturen. Die Modelle ResNext50_32x4d, ResNet50 und VGG wurden mit allen verfügbaren Kanälen trainiert, zusätzlich wurde ResNext50_32x4d mit einer reduzierten Kanalauswahl (0, 1, 2, 3, 4, 5, 8) getestet. Die initiale Klassifikation erreichte eine außergewöhnlich hohe Genauigkeit von 99.998 % bei der Verwendung der Kanäle 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 15, 16, 18, 20, 21. Diese ungewöhnlich hohe Genauigkeit führte zur Entdeckung eines statistischen Bias. Bei einer neuen Aufteilung der Daten nach Messungen fiel die *Accuracy* auf etwa 56 %. Zur Verbesserung wurden verschiedene Regularisierungstechniken implementiert, darunter räumliche Transformationen, Kanal-Rauschen und Kanal-Reduktion zur Entropieminimierung. Zusätzlich kamen Techniken wie Sharpness-Aware Minimization, synaptische Skalierung und multi-synaptische Konnektivität zum Einsatz. Die speziell entwickelten Anti-Bias-Mechanismus erreichte schließlich eine Genauigkeit von 96.8 %. Die finale Validierung auf statistisch unabhängigen Daten ergab eine robuste Klassifikationsgenauigkeit von 98.6 %.

Die Analyse der Datenqualität und Klassifikationsgenauigkeit zeigte, dass die Komplexität der Daten einen signifikanten Einfluss auf die Klassifikationsergebnisse hatte. Bei der Verwendung des vollen Spektrums wurden Genauigkeiten von bis zu 100 % erreicht, was allerdings auf einen weiteren möglichen Bias hindeutete. Die RGB-Transformation reduzierte die Genauigkeit, während multispektrale Bilder höhere Genauigkeiten lieferten. Bei der Klassifikation nach Arten wurden unterschiedliche Genauigkeiten erreicht: *Lotus corniculatus* (100 %), *Lathyrus*

vernus (95 %), *Achillea millefolium* (83 %) und *Lamium album* (73 %). Die Gesamtgenauigkeit lag bei 93 % mit einer balancierten Genauigkeit von 88 %.

Die Analyse der Variabilität zwischen verschiedenen Standorten und Jahren zeigte deutliche Unterschiede. Die Variabilität der Merkmale war standortabhängig, wobei Berlin (2.44), Halle (2.50) und Jena (2.50) ähnliche Werte aufwiesen, während Leipzig (1.70) eine geringere Variabilität zeigte. Bei den Arten zeigte *Achillea millefolium* die höchste Variabilität (3.82), gefolgt von *Lamium album* (2.60), *Lathyrus vernus* (2.25) und *Lotus corniculatus* (1.66). Die zeitliche Variabilität war im Jahr 2021 am höchsten (3.93), gefolgt von 2019 (2.21), 2020 (1.96) und 2022 (1.60). Dabei wurde zwischen "leichten" (1.55), "mittleren" (1.84) und "schwierigen" (3.39) Trainingsdaten unterschieden. Diese Erkenntnisse können genutzt werden um anhand von klassischen Merkmalen den Wert neuer Daten abzusehen und gezielt Daten zu bestimmen, die dem Datensatz nutzen.

Für Daten, die innerhalb einer Blühsaison aufgenommen wurden, konnten ebenfalls Variation in Pollengröße, -form und -fluoreszenz festgestellt werden, die auf unterschiedliche phänologische Entwicklungsstadien der Pollenkörner zurückzuführen sind (Abbildung 4.12). Diese beobachteten Variationen sind nicht nur von ökologischer Bedeutung, sondern auch entscheidend für eine gute automatisierte Pollenidentifizierung mittels bildgestützter Analysemethoden. Schlussfolgernd kann man aus dieser Vorstudie festhalten, dass für eine robuste Klassifikation der Pollenbilder eine umfassende Pollendatenbank notwendig ist, die es notwendig macht, für jede Art von Probenmaterial unterschiedliche Standorte und Zeitpunkte zu berücksichtigen.

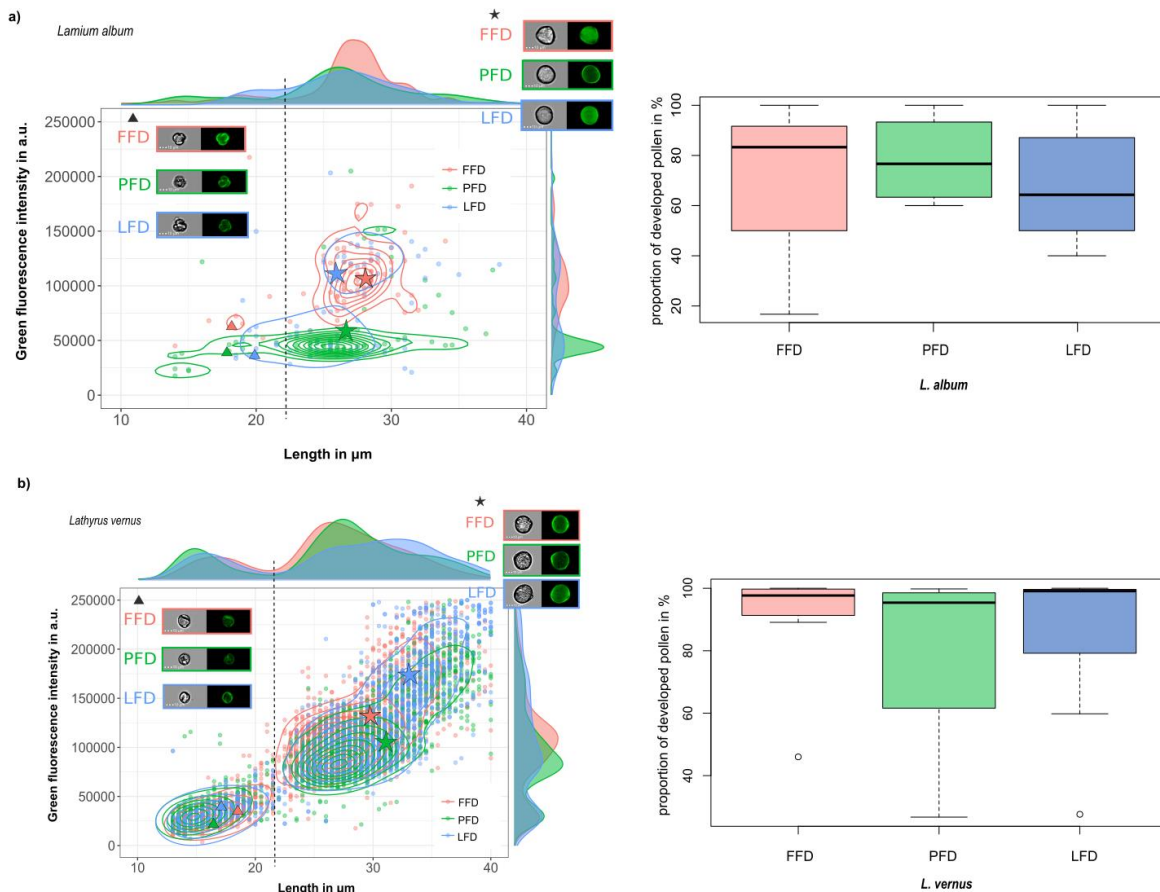


Abbildung 4.12: Dichte- und Punktdiagramme zweier ausgewählter Merkmale sind für zwei untersuchte Arten (a) *L. album*, (b) *L. vernus* auf der linken Seite zu sehen. Boxplots mit dem Prozentsatz der entwickelten Pollen sind für das Phänologiestadium auf der rechten Seite dargestellt. Die ausgewählten Merkmale sind Pollenlänge und Intensität Ch 02 (grüne Fluoreszenzintensität). Abgebildet sind die Verteilungen an verschiedenen Probenahmetagen während der phänologischen Entwicklung (Erster Blütentag (FFD) - rot, Hauptblütentag (PFD) - grün, Letzter Blütentag (LFD) - blau) pro Art. Die gestrichelte Linie zeigt den Schwellenwert, der die Populationen voneinander trennt. Die mikroskopischen Bilder der entwickelten Pollen, die mit MIFC für jeden der drei Sammeltagen aufgenommen wurden, sind im Hellfeld- und im grünen Fluoreszenzkanal dargestellt und in der Grafik mit einem Stern gekennzeichnet. Ebenso werden mikroskopische Bilder von unentwickelten Pollen von denselben Sammeltagen für beide Kanäle gezeigt und mit einem Dreieck im Diagramm markiert. Ein gepaarter t-Test ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den phänologischen Stadien, weder für *L. album* noch für *L. vernus*.

Um die Variabilität von Pollenmerkmalen innerhalb einer Art noch weiter zu untersuchen, wurden am JKI 112 Proben von 28 *Brassica napus*-Sorten gesammelt. Diese Proben wurden, wie in Kapitel 3 (Arbeitspaket 2.1) beschrieben, gesammelt, aufbereitet und mithilfe des Durchflusszytometers gemessen. Für eine erste Analyse wurden zunächst die Pollenmerkmale Größe, Form und Fluoreszenz untersucht. Die vorläufigen Ergebnisse deuten dabei auf Sortenunterschiede in diesen Pollenmerkmalen hin (Abbildung 4.13, 4.14). Dies ist insbesondere interessant, da die Proben anders als bei der anderen Vorstudie zu den Pollenmerkmalen alle am gleichen Standort und in einem ähnlichen Zeitraum gesammelt wurden.

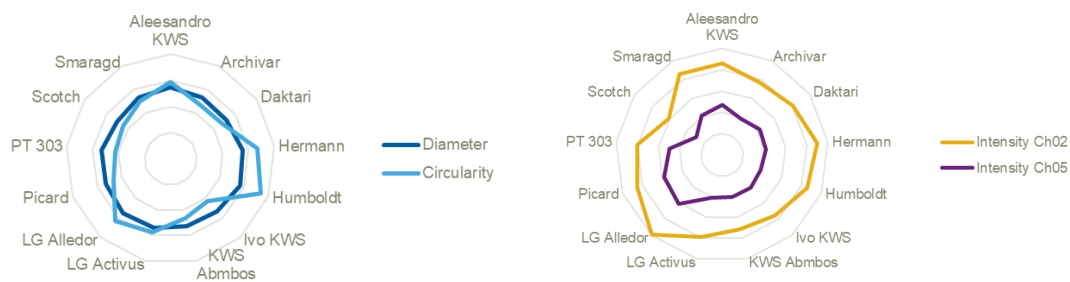


Abbildung 4.13: Netzdiagramme für ausgewählte *Brassica napus*-Sorten. Die dargestellten Merkmale sind Größe (Diameter), Rundheit (Circularity), Intensität Ch 02 (grüne Fluoreszenzintensität) (Intensity Ch02) und Intensität Ch 05 (rote Fluoreszenzintensität) (Intensity Ch05). Statistische Tests wurden noch keine durchgeführt.

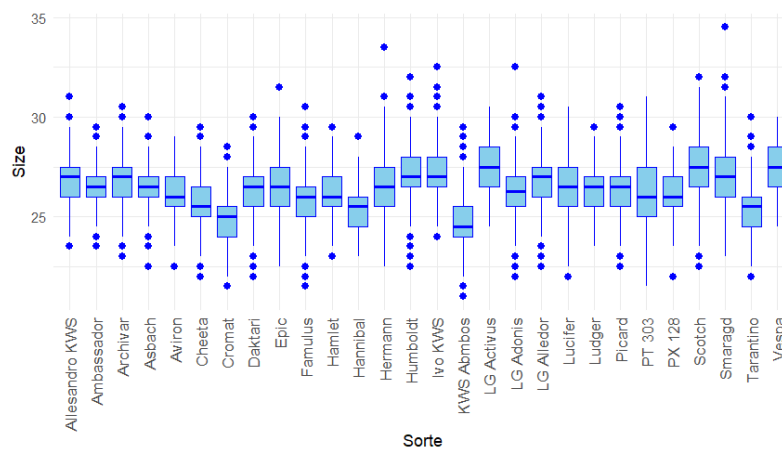


Abbildung 4.14: Boxplot für alle *Brassica napus*-Sorten für das Pollenmerkmal Größe (in μm).

Arbeitspaket 2.2: Aufbau einer bundesweiten Pollenbilddatenbank basierend auf Pollenhörschen-Proben [abgeschlossen, Publikation in Bearbeitung]

Beteiligte Partner: UFZ, TUI und UHOH

149 Pollenhörschen-Proben aus dem vom Land Baden-Württemberg finanzierten Projekt wurden am UFZ vollständig im Labor aufbereitet und anschließend mindestens einmal mit dem Zytometer gemessen. Von allen Proben erfolgte zudem die mikroskopische Auszählung in Hohenheim (UHOH). Für die ersten Auswertungen wurde sich auf 10 Proben konzentriert, die hauptsächlich „*Brassica napus*“-Pollen enthielten. Die Identifizierung der Pollen aus den Pollenhörschen-Proben mit dem großen Classifier, welcher 120 Arten enthält, führte jedoch zu unerwarteten Fehlklassifikationen.

Für Rapspollen wurden die Pollenmerkmale in verschiedenen Matrices (direkt von der Pflanze, in Pollenhörschen und im Honig) verglichen (Abbildung 4.15). Hier wird deutlich, dass sich die Pollenmerkmale insbesondere im Honig stark von den Merkmalen der Pollen direkt von der Pflanze unterscheiden können, was eine automatisierte Erkennung erschwert. Schlussfolgernd aus diesen Ergebnissen wurde begonnen matrix-spezifische Classifier zu etablieren.

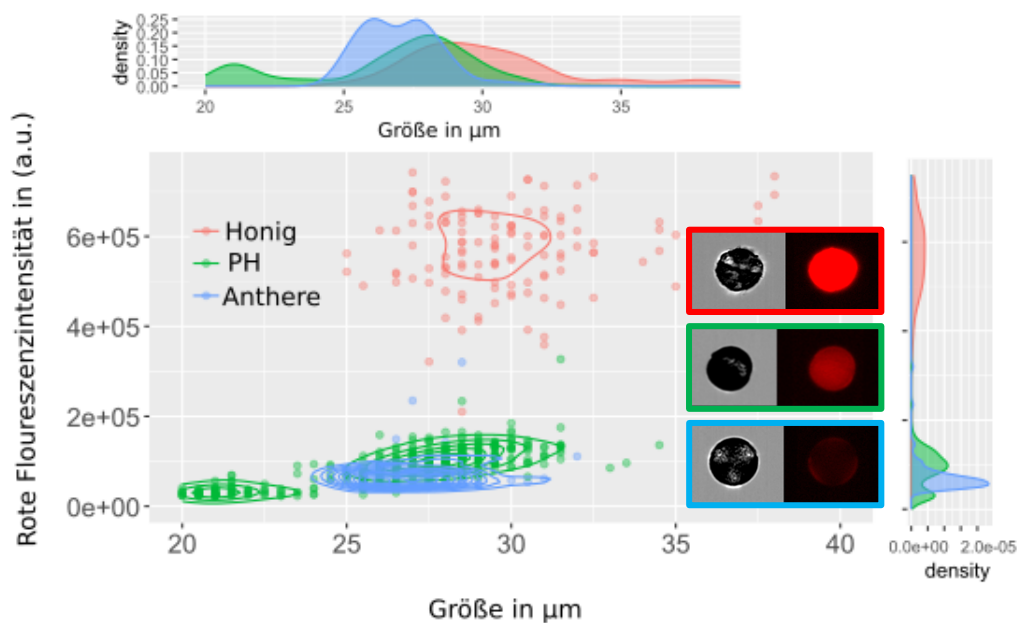


Abbildung 4.15: Dichte- und Punktdiagramm für zwei Pollenmerkmale von *Brassica napus*-Pollen aus verschiedenen Quellen. Die dargestellten Merkmale sind die Pollenlänge und die Intensität von Kanal 05 (rote Fluoreszenzintensität). Gezeigt werden die Verteilungen der Merkmale von Pollen aus Antheren (blau), Pollenhörschen (PH, grün) und Honig (rot).

Arbeitspaket 2.3: Erweiterung der Pollenbilddatenbank basierend auf verschiedenen Matrices [abgeschlossen, Publikation in Bearbeitung]

Beteiligte Partner: UFZ, TUI, CE, UHOH und JKI

Zusätzlich zu den Pollenhörschen-Proben, wurden 89 verschiedene Honig-Proben zur Erweiterung der Pollenbilddatenbank verwendet. Auch diese Proben wurden alle am UFZ aufbereitet und mindestens zweimal zytometrisch gemessen. Da die mikroskopischen Auszählungen von 80 Honigen aus Hohenheim (UHOH) oder Celle (LAVES) vorlagen, wurde bei allen Sortenhonigen der Hauptpollen manuell annotiert.

Für eine Studie, die überprüfen soll inwieweit sich die Zytometrie in Verbindung mit maschinellem Lernen für die Identifizierung der Hauptpollen in Sortenhonigen eignet, wurden 12 Sortenhonige (u.a. Raps-, Edelkastanie- und Sonnenblumenhonig) ausgewählt. Aufgrund der überraschenden Ergebnisse der Pollenhörschen-Proben (Abbildung 4.15), wurden verschiedene Modelle/Classifier basierend auf den Pollenbildern aus verschiedenen Quellen mit dem geräte-spezifischen Software-KI-Modul des Zytometers trainiert und getestet. Es stellte sich dabei heraus, dass sich die Pollen im Honig am besten mit Pollenbildern aus anderen Sortenhonigen bestimmen lassen (Abbildung 4.16).

Probability of predicted classes					
	Brassica	Castanea	Helianthus	no_pollen	other_pollen
Brassica	96.5	0.0	1.5	0.0	0.0
Castanea	1.5	99.9	0.3	0.0	0.0
Helianthus	1.0	0.0	97.6	0.0	0.0
no_pollen	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0
other_pollen	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0

Abbildung 4.16: Confusion-Matrix für das Classifier-Training basierend auf Pollenbildern aus Sortenhonigen. Die Pollenklassen in diesem Training sind Raps (*Brassica*), Edelkastanie (*Castanea*), Sonnenblume (*Helianthus*), keine Pollen (z.B. Schmutzpartikel), andere Pollen (z.B. *Bellis perennis*). Auf der x-Achse sind die vorhergesagten Pollenklassen und auf der y-Achse die vorgegebenen Pollenklassen. An der Schnittstelle der Achse erkennt man die Identifizierungswahrscheinlichkeit.

Ein erster direkter Vergleich der Zytometrie Ergebnisse mit den Mikroskopieergebnissen zeigt, dass sich vor allem Rapshonigpollen vergleichbar gut mittels Zytometrie bestimmen lassen (Abbildung 4.17). Aber auch bei Edelkastanien- und Sonnenblumenpollen aus Honigen kommt der Classifier auf ähnliche Pollenanteile, wie bei der klassischen Mikroskopie (Abbildung 4.17).

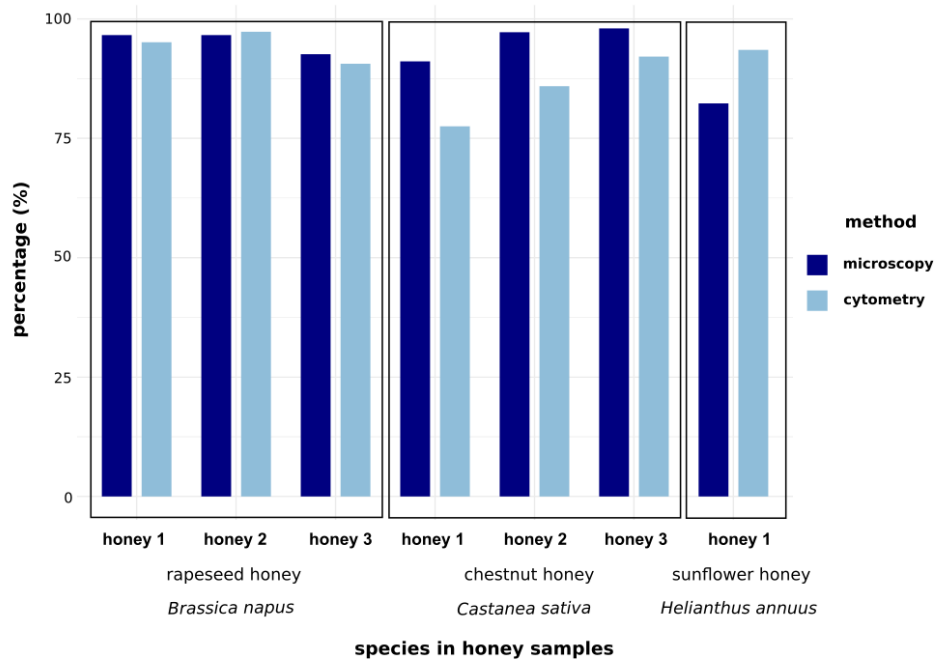


Abbildung 4.17: Balkendiagramm für den Anteil des jeweiligen Hauptpollens in 7 Sortenhonigen (3 Rapshonige, 3 Edelkastanienhonig, 1 Sonnenblumenhonig) identifiziert mittels Mikroskopie (dunkelblau) und Zytometrie (hellblau).

Die vorläufigen Ergebnisse des in Kapitel 3 (AP 2.3) beschriebenen Ringversuchs zeigen, dass sowohl bei der mikroskopischen als auch bei der zytometrischen Pollenanalyse Schwankungen zwischen den Versuchsteilnehmern bzw. zwischen den Messungen pro Mischung auftreten können (exemplarisch hierfür Abbildung 4.18), wobei jedoch bei den manuellen mikroskopischen Auswertungen die Variation der Messergebnisse größer war, als zwischen der gleichen Anzahl an zytometrischen Messungen. Mischungen 1 bis 3 bestanden aus Antherenpollen mit variierenden Anteilen der Arten *Acer*, *Brassica*, *Prunus*, *Taraxacum* und *Robinia*. Im Gegensatz dazu enthielten Mischungen 4 und 5 Pollenhöschen, in denen die Anteile von *Acer*, *Aesculus*, *Pyrus*, *Taraxacum* und *Salix* unterschiedlich zusammengesetzt waren. In den Mixen 1 bis 3 konnten die direkt von den Antheren gesammelten *Acer negundo*-Pollen von keinem Teilnehmer korrekt zugeordnet werden (sie wurden entweder als "unbekannt" oder als "weitere" klassifiziert). In Mix 4-5 ist dies nicht vorgekommen.

Für die Zytometrie wurde zunächst der einfachste Fall eines Modells bei Bekanntsein aller Pollenklassen trainiert, d.h. nur mit den Einzelproben der fünf Pflanzen das Modell trainiert. In weiteren Schritten soll auch ein größeres Modell getestet werden, bei dem die Identität der Pollen nicht als vorausgesetzt angenommen wird. Der Methodenvergleich für beispielsweise Mix 5 mit diesem einfachsten Modell verdeutlicht jedoch, dass dabei beide Verfahren bei den meisten Pollenarten zu ähnlichen Pollenanteilen in den Proben mit unterschiedlichen Pollenzusammensetzungen führen (Abbildung 4.18). Im nächsten Schritt soll ein erweitertes Modell trainiert werden, unter Einbeziehung zusätzlicher *Acer*-, *Aesculus*- und *Pyrus*-Proben, die im Rahmen des NutriBee-Projekts gesammelt wurden. Dies sollte zur Verbesserung der Identifizierung dieser Proben beitragen.

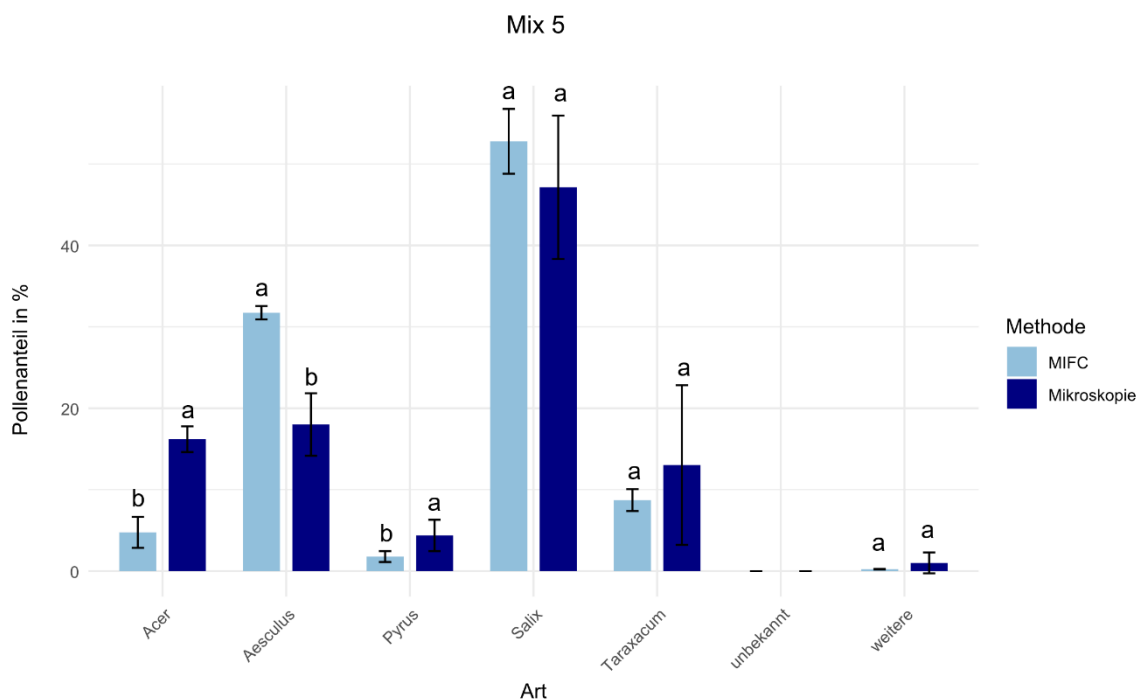


Abbildung 4.18: Balkendiagramm, beispielhaft für Mix 5 (Pollenhöschen) des Ringversuches. Es ist der gemittelte Pollenanteil in Prozent der jeweiligen Art für die mikroskopische (hellblau) und zytometrische (dunkelblau, MIFC) Pollenanalyse abgebildet. Die Buchstaben verdeutlichen signifikante Unterschiede zwischen den Methoden innerhalb einer Art, basierend auf einer ANOVA mit anschließend durchgeführtem Tukey-Test. Unterschiedliche Buchstaben weisen auf signifikante Differenzen hin, während identische Buchstaben anzeigen, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede vorliegen.

Arbeitspaket 2.4: Evaluierung von Maßnahmen für bestäuberfreundlichen Pflanzenschutz und Pflanzenbau [in Bearbeitung]

Beteiligte Partner: UFZ, TUI, CE und JKI

Aus dem Pflanzenschutzmittelversuch aus Modul 1 hat das UFZ 30 gepoolte Pollenhöschen-Proben erhalten, welche alle aufbereitet und einmal zytometrisch gemessen wurden. Mit diesen Daten soll überprüft werden, ob Pflanzenschutzmittel die Pollenmorphologie verändern. Zusätzlich zu den gepoolten Proben sollen noch ungepoolte Proben analysiert werden. Diese Auswertung befindet sich noch in Bearbeitung.

Modulübergreifendes Ziel: Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses

Im Zeitraum des Projektes wurden verschiedene Methodenworkshops veranstaltet, um die im Projekt beteiligten NachwuchswissenschaftlerInnen zu fördern.

- Berlin - Workshop zu Modul 1 - Rückstandsanalytik – 21.-22.02.2022, organisiert durch Dr. Gabriela Bischoff (JKI)
- Berlin - qPCR/Genexpression – Training projektspezifischer Methodik zu Modul 1 im Bereich Molekularbiologie und Datenauswertung für K. Wüppenhorst (JKI, 13.06.-01.07.2022, 18.07.-12.08.2022) und E. Friedrich (UHOH, 07.11.-18.11.2022), organisiert durch M. Mating (FUB)
- Leipzig - Workshop zu Modul 2 - Hochdurchsatzanalytik und Deep Learning (Titel: Von der Pollenprobe zur Pollenerkennung) – 29.11.2022, organisiert durch Dr. S. Dunker und F. Walther (UFZ)
- Celle - Weiterbildung Pollenanalyse - Vorstellung projektspezifischer Methodik für Dr. S. Dunker und F. Walther (UFZ) zu Modul 2 im Bereich Honiganalyse und vor allem der Pollenanalyse – 30.-31.05.2023, organisiert durch M. Janke (CE).
- Hohenheim - Workshop zu Modul 1 – Honiganalytik, klassische Pollenbestimmung und Imkerei – 07.11.2023, organisiert durch E. Friedrich (UHOH)

Einige Ergebnisse wurden, wie bereits in der detaillierten Darstellung zu den einzelnen Arbeitspaketen aufgeführt, durch die Doktoranden in einschlägigen *peer-reviewed* Fachzeitschriften veröffentlicht (siehe Punkt 10), sodass für sie die Möglichkeit besteht kumulativ zu promovieren.

Die DoktorandInnen bekamen weiterhin die Möglichkeit die Ergebnisse ihrer Arbeiten auf nationalen sowie internationalen Tagungen vorzustellen und so mit einem breiten Fachpublikum in Diskurs zu kommen und sich ein eigenes Netzwerk aufzubauen. Eine detaillierte Übersicht über alle Tagungsbeiträge und damit verbundenen Teilnahmen an Tagungen und anderen Fachveranstaltungen findet sich unter Punkt 10.

5. Diskussion der Ergebnisse

MODUL 1: Vergleichende Stressorenwirkung auf Jung- und Wirtschaftsvölker

Die Ergebnisse des Versuchs wurden umfassend vor dem Hintergrund der aktuellen Forschung diskutiert und interpretiert. Die Diskussion ist den entsprechenden Publikationen zu entnehmen und im Folgenden wird nur auf zusätzliche projektbezogene Diskussionspunkte eingegangen.

Arbeitspaket 1.1: Kunstschwarmbildung und Voranalyse der Darm-Mikroflora

Die Abundanzen der einzelnen Mikrobiomvertreter der Larven fielen sehr gering bis nahezu fehlend aus (Abbildung 4.1C). Aus der wissenschaftlichen Literatur ist außerdem bekannt, dass Bienen nach dem Schlupf nahezu „mikrobiomfrei“ sind und sich das Mikrobiom nach dem Schlupf neu etabliert. Da sich gezeigt hat, dass auch die in unserem Versuch beprobten Larven ein Mikrobiom mit geringen Abundanzen aufweist, wurde daraufhin entschieden auf die weitere Beprobung der Larven im Versuchsjahr 2022 zu verzichten und stattdessen Sammelbienen zu untersuchen. Es war zu erwarten, dass sich aufgrund der unterschiedlichen Umwelteinflüsse und Expositionsbedingungen stärkere und relevantere Unterschiede zwischen den Stockbienen und Sammelbienen zeigen werden, die für die Bewertung der Fitness der Honigbienen von Bedeutung sind.

Arbeitspaket 1.2: Populations- und Brutentwicklung

Die Diskussion der Ergebnisse im Fachkontext ist der Publikation Wueppenhorst et al. (2024a) zu entnehmen. Abweichungen vom Versuchsplan wurden nicht vorgenommen und bedürfen daher keiner weiteren Diskussion.

Arbeitspaket 1.3: Wirkstoffverteilung in relevanten Matrices

Die Diskussion der Ergebnisse im Fachkontext ist der Publikation Wueppenhorst et al. (2024b) zu entnehmen. Abweichungen vom Versuchsplan wurden nicht vorgenommen und bedürfen daher keiner weiteren Diskussion.

Arbeitspaket 1.4: Entwicklung des Mikrobioms unter Stressoreneinfluss

Die Diskussion der Ergebnisse im Fachkontext ist der Publikation Wueppenhorst et al. (2024a) zu entnehmen.

Auf eine weitreichende Auswertung der Bienenbrotproben wurde im Projektverlauf abgesehen. Die Beprobung des Bienenbrotes fand an allen Standorten wie geplant statt und die Proben wurden im Verlauf 2023 vollständig mittels Hochdurchsatzmethoden am LAVES-CE gemessen. Nach technischer Umstrukturierung der dortigen Labore wurden alle technischen Analyseschritte entsprechend neu etabliert und validiert. Insgesamt wurden 360 Bienenbrotproben gesammelt und mittels qPCR die fünf Vertreter des Mikrobioms sowie die Referenz quantifiziert. In Abbildung 5.1A sind die mittleren Cycle Threshold (C_t)-Werte der technischen Replikate der Proben aufgeführt. Hierbei fällt bereits auf, dass eine Quantifizierung von *S. alvi* nicht möglich war. In Abbildung 5.1B sind die verbliebenen C_t -Werte nach Filterung der Ergebnisse für die passenden Schmelztemperaturen der resultierten Amplifikate aufgetragen. In Rot dargestellt sind hierbei zusätzlich alle Datenpunkte über einem C_t -Wert von 35, die aus biologisch-technischer Sicht als nicht quantifizierbar eingestuft werden. Dies führt dazu, dass

schlussendlich nur maximal ca. zwei Drittel bzw. keine (*Lactobacillus* Firm 4/5 und *S. alvi*) Messdaten pro Art für die weitere Analyse hätten herangezogen werden können. Von einer weiterführenden Analyse wurde daher abgesehen.

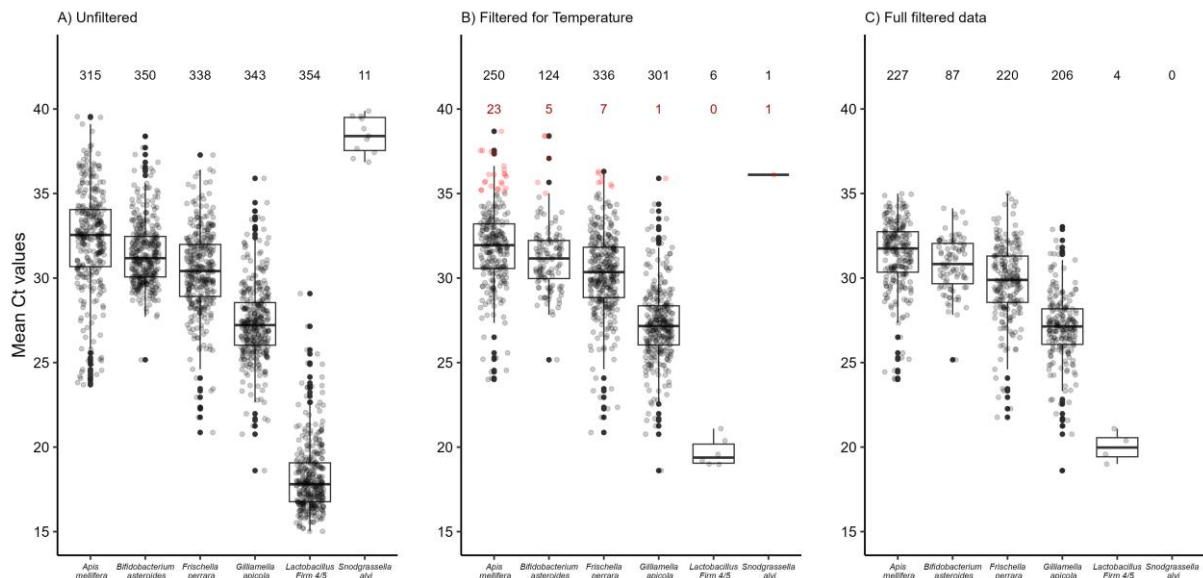


Abbildung 5.1: Cycle Threshold (C_t)-Werte der Bienenbrotproben. Die Datenpunkte bilden hierbei die mittleren C_t -Werte der technischen Replikate pro Volk und Zeitpunkt. A) Ungefilterte Rohdaten. B) Rohdaten gefiltert nach passender Schmelztemperatur der Amplifikate, C) Vollständig gefilterte Daten nach biologisch-technischen Standards ($C_t < 35$). Zahlen oberhalb der Datenpunkte geben die Anzahl der Datenpunkte (Stichprobengröße) pro Boxplot (Art) an.

Ein Vergleich mit der Literatur zeigt, dass bisherige Analysen des Mikrobioms im Bienenbrot ausschließlich mit Hilfe von *Next Generation Sequencing* (NGS) Methoden (wie bspw. Illumina MiSeq oder Ion Torrent) durchgeführt wurden (Tabelle 5.1). Hierbei werden die gesamten im Bienenbrot vorkommenden DNA-Informationen sequenziert und anschließend die quantifizierten Gensequenzen mit einer Datenbank abgeglichen und bestimmt. Die Bestimmung der im Bienenbrot gefundenen Organismen reicht dabei in den meisten Fällen nur bis auf die Gattungs- oder Familienebene. Eine Bestimmung auf Artebene ist hierbei nach aktuellem Stand meist nicht möglich. Unsere verwendete Methode zielte direkt auf die Quantifizierung der erwarteten Organismen auf Artebene ab. Obwohl die Literatur Hinweise darauf gibt, dass es sich bei den auf Gattungsebene bestimmten Organismen um die hier untersuchten Arten des Kernmikrobioms handeln könnte, konnten wir diese mithilfe unserer Methodenart nicht hinreichend quantifizieren. Wir schließen daraus, dass sich die hier verwendete Methode zwar für die Quantifizierung der Kernmikrobiomarten im Darm der Adulten sowie der Larven der Honigbiene eignet, nicht aber für das des Bienenbrotes.

Tabelle 5.1: Übersicht der verwendeten Methoden und Ziele zur Analyse des Mikrobioms im Bienenbrot.

Methodology	Target	References
Illumina MiSeq, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)	bee bread microbiome and its relationship with land use	Donkersley et al. 2018
16S rRNA pyrosequencing	active bacterial communities in genetically diverse/uniform colonies	Mattila et al. 2012
16S rRNA Ion Torrent NGS platform	microbiome differences between africanized bee and bee bread	Saraiva et al. 2015
Illumina MiSeq	differences in microbiome of different land-use pattern	Munzo-Colmenro et al. 2020
16S rRNA Illumina MiSeq platform TruSeqTM	<i>A. mellifera</i> + <i>A. cerana</i> microbiome changes from corbicular pollen to bee bread	Disaathanooowat et al. 2020
16S rRNA Illumina MiSeq	environmental factor (land-use) on microbiome of different bee hive niches	Gorochategui-Ortega et al. 2022
Illumina MiSeq	comparing microbiome of bee pollen and bee bread	Gosh et al. 2022
Illumina MiSeq	<i>Vairimorpha</i> (<i>Nosema</i>) <i>ceranae</i> infection on bee bread microbiome	Geordi et al. 2022
16S rRNA Illumina	layer comparison of bee bread	Wang et al. 2023
Ion Torrent PGM	differences between hives and apiculture practice	Santorelli et al. 2023
Plate cultivation and isolate identification	antibacterial potential of lactic acid and Bifidobacteria from honey bee and products	Ben-Miled et al. 2023
qPCR (only overall copy number using dilution series of known plasmid standard)	microbiome changes in bee bread over time	Anderson et al. 2023
16S rRNA sequencing	microbiome of bee products and transmission	Anderson et al. 2013

Arbeitspaket 1.5: Stressoren-Einflüsse anhand spezifischer Biomarker

Die Diskussion der Ergebnisse im Fachkontext ist derzeit nur bedingt möglich, da der komplette Datensatz noch nicht zusammenhängend ausgewertet werden konnte. Aktuell sind die letzten Proben gemessen und die Ergebnisse werden noch nach biologisch-technischen Standards gefiltert (siehe Diskussion zu AP 1.4). Abweichungen vom Versuchsplan wurden bereits in Abschnitten zur Methodik und Projektdurchführung erläutert.

Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben, kann man anhand der vorläufigen Ergebnisse ähnliche Beobachtungen wie zum Mikrobiom der Honigbienen erkennen. Die ausgewählten Kandidatenbiomarker waren geeignet Unterschiede zu detektieren, jedoch hatten die Stressoren Fungizidexposition oder Nahrungslimitierung keinen Einfluss auf die Gesamtheit der Genexpression. Lediglich die im Ergebnisteil beschriebenen Unterschiede zwischen den Sammler- und Stockbienen waren eindeutig. Hervorzuheben ist der Unterschied für den Biomarker Vitellogenin, welcher perfekt zur Unterscheidung von adulten Bienen mit unterschiedliche Aufgaben im Bienenstock, als auch zur Beschreibung des Ernährungszustands der Bienenvölker geeignet ist. Völker, die einer Pollenlimitierung ausgesetzt waren, zeigten bei den Stockbienen durchweg eine geringere Expression von Vitellogenin im Vergleich zu den Sammelbienen. Dies ist nachvollziehbar, da die Stockbienen den Pollen für die Entwicklung der Futterdrüsen und zur Produktion des Larvenfutters benötigen. Eine weitere Diskussion der Ergebnisse erfolgt nach finaler Auswertung der Daten und im Zusammenhang mit der Erstellung der dazugehörigen Fachveröffentlichung.

MODUL 2: Entwicklung eines pollenanalytischen Verfahrens zur Bestimmung von Nahrungspflanzen

Die Ergebnisse der Studien werden detailliert betrachtet und im Rahmen der aktuellen Forschung in den entsprechenden Publikationen interpretiert und diskutiert. Im Folgenden werden ausschließlich zusätzliche, projektbezogene Diskussionsaspekte betrachtet.

Arbeitspaket 2.1: Sammeln, Verifizieren, Validieren von Pollenproben für Aufbau einer Pollenbilddatenbank

Mit knapp 700 Pflanzenarten konnte eine umfassende Pollenbilddatenbank erstellt werden. Damit wurde das ursprüngliche Ziel, die 500 für Bienen-relevantesten Arten abzudecken, deutlich übertroffen. Allerdings konnten nicht alle der ursprünglich geplanten 500 Arten gesammelt werden, da einige Pflanzen aufgrund ihrer speziellen Lebensräume schwer zugänglich waren. Gleichzeitig wurde die Liste um zusätzliche Arten erweitert, die leichter zugänglich waren, sowie weitere insektenrelevante Arten. Die mikroskopische Validierung repräsentativer Proben zeigte überwiegend eine gute Übereinstimmung der im Projekt gesammelten Proben mittels mikroskopischer Analysen in Celle. Die Proben wurden in Botanischen Gärten gesammelt, da dort kontrollierte Bedingungen herrschen und die Artenzugehörigkeit eindeutig dokumentiert ist. Die Diskussion der Variationsstudie für einen kleinen Datensatz von Pollenmerkmalen wird der Publikation Walther et al. (2025, *in revision*) zu entnehmen sein. Die möglichen Variationen der Pollenmerkmale weiterer Arten in der Pollenbilddatenbank wurden durch die Sammlung an verschiedenen Orten und innerhalb verschiedener Jahre abgedeckt. Die vorläufigen Ergebnisse der Variationsstudie der Rapsorten unterstützen die Ergebnisse der Variationsstudie in einem kleinen Datensatz und bestärken den Aufbau einer möglichst vielfältigen Referenzdatenbank.

Die finale Evaluation der Daten aus KI-Sicht zielte darauf ab, die Klassifikationsgenauigkeit von Pollenproben unter Verwendung verschiedener Datensätze (Referenz, Honig, Mix) und unterschiedlicher Kanalkonfigurationen zu testen. Dabei wurden multiple Trainings- und Testszenarien mit variantem Kanalumfang (1-12 Kanäle), verschiedenen Datensätzen und unterschiedliche statistische Vorverarbeitungen durchgeführt, um die optimale Methode zur Pollenidentifikation zu ermitteln. Die Ergebnisse dieses komplexen Experiments offenbaren eine zentrale Herausforderung und gleichzeitig eine entscheidende Strategie in der Pollenklassifikation. Die Klassifizierungsgenauigkeit steigt signifikant, wenn gemischte Trainingsdatensätze verwendet werden. Die Analyse zeigt deutlich, dass weder reine Referenzdaten noch ausschließlich Honigproben eine hochpräzise Identifikation ermöglichen. Stattdessen erweisen sich gemischte Datensätze als geeignete Option, mit Klassifikationsgenauigkeiten von bis zu 46 %. Obwohl die Klassifikationsgenauigkeit – abhängig vom verwendeten Testdatensatz – insgesamt vergleichsweise niedrig ausfällt, erreicht das Modell bei unbekannten Proben eine höhere Erkennungsrate als ein Modell, das auf einem sehr homogenen Datensatz mit hoher Klassifikationsgenauigkeit trainiert wurde. Das Design dieses Experiments wurde so gewählt, dass möglichst viele Daten getestet werden und die Klassifikationsgenauigkeit niedrig genug ist, um signifikante Ergebnisse zu erhalten. Das Ergebnis impliziert, dass die Vielfalt und Komplexität der Pollenproben nur durch ein umfassendes, heterogenes Trainingsmaterial adäquat erfasst werden kann. Die Forschungsergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit, Trainingsdaten aus verschiedenen Quellen – Referenzproben, Honigproben und deren Mischungen – zu kombinieren, um robuste und präzise Klassifikationsmodelle zu entwickeln. Dieses Erkenntnis ist nicht nur methodisch bedeutsam, sondern markiert einen wichtigen Fortschritt in der automatisierten Pollenidentifikation.

Arbeitspaket 2.2: Aufbau einer bundesweiten Pollenbilddatenbank basierend auf Pollenhörschen-Proben

Die Pollenbilddatenbank, welche mit Pollen von Antheren erstellt worden ist, eignete sich nur begrenzt für die Identifizierung der Pollenhörschen-Proben. Die unterschiedlichen Ausprägungen der verschiedenen Pollenmerkmale erschweren die Identifizierung, sodass es zu Fehlklassifikationen kommen kann. Um diese Fehlklassifikationen zu vermeiden, sollte die Pollenbilddatenbank um die Pollenhörschen-Bilder erweitert werden. Basierend auf den Erkenntnissen aus der Modellentwicklung wurde ein System zur kontinuierlichen Erweiterung der Pollenbilddatenbank implementiert. Es ermöglicht eine effiziente Integration neuer Proben. Dies reduziert den Arbeitsaufwand für die Datenbankpflege erheblich. Das trainierte Modell kann durch seine modulare Architektur mit neuen Pollenarten erweitert werden, ohne ein vollständiges Neutraining zu erfordern. Die implementierten Debiasing-Mechanismen und Regularisierungstechniken gewährleisten dabei die Robustheit der Klassifikation auch bei neuen Proben. Die Datenbankerweiterung erfolgt in einem standardisierten Prozess. Neue Proben werden zunächst durch das bestehende Modell klassifiziert, bei Unsicherheiten erfolgt eine manuelle Überprüfung, und nach ausreichender Akkumulation neuer Daten wird ein gezieltes Nachtraining durchgeführt. Dieser iterative Ansatz ermöglicht eine kontinuierliche Verbesserung der Klassifikationsgenauigkeit bei gleichzeitiger Minimierung des manuellen Aufwands. Die Pollenbilddatenbank wird dadurch zu einem dynamischen System, das sich an neue Anforderungen und Pollenarten anpassen kann. Die weitere Diskussion der zytometrischen Pollenhörschenidentifizierung wird der Publikation Walther et al. (*in revision*) zu entnehmen sein.

Arbeitspaket 2.3: Erweiterung der Pollenbilddatenbank basierend auf verschiedenen Matrices

Für die Identifizierung von Pollen aus Honigen sind ähnliche Ergebnisse wie bei den Pollenhörschen-Proben mit dem Antheren-Classifer zu erwarten. Die entsprechende Diskussion der zytometrischen Honigpollenidentifizierung wird der Publikation Walther et al. (*in revision*) zu entnehmen sein.

Für einen kleinen Pollendatensatz konnte der Ringversuch zeigen, dass die zytometrische Pollenanalyse bei Antheren und Pollenhörschen-Proben zu ähnlichen Ergebnissen kommt wie die klassische Mikroskopie. Ein umfassenderer Datensatz, der die Praxis widerspiegelt, muss jedoch noch getestet werden.

Arbeitspaket 2.4: Evaluierung von Maßnahmen für bestäuberfreundlichen Pflanzenschutz und Pflanzenbau

Die Pollenanalyse des Pflanzenschutzmittelversuchs aus Modul 1 war zu Beginn des Projekts noch nicht geplant, jedoch fanden sich Studien, die zeigen, dass Pflanzenschutzmittel Pollenmerkmale beeinflussen können (Del Hierro & Guerra 2016, Padilla et al. 2017). Die finalen Auswertungen der gepoolten und bereits vermessenen Pollenproben aus dem Pflanzenschutzmittelversuch in Modul 1 stehen noch aus. Die ungepoolten Proben sollen noch auf dieselbe Weise untersucht werden. Die Analyse diesbezüglich steht ebenfalls noch aus, aufgrund eines Defekts am Zytometer. In einem nächsten Schritt soll getestet werden, ob ein Classifier in der Lage ist, behandelte und unbehandelte Pollen zu identifizieren.

6. Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse. Wurden im Projekt praxisrelevante Ergebnisse erzielt? Falls nein, bitte begründen, falls ja: erläutern, inwiefern diese Ergebnisse direkt praktisch anwendbar sind.

Die erzielten Ergebnisse aus dem Projekt wurden in Fachzeitschriften publiziert (s. Punkte 4 und 5). Weiterhin wurde das Projekt und dessen Ergebnisse in verschiedenen Berichten sowie Veranstaltungen der Öffentlichkeit und dem Fachpublikum präsentiert und zugänglich gemacht (s. Punkt 10).

Für Modul 1 wurde eine Pilotstudie in einem bundesweiten Freilandversuch nach guter landwirtschaftlicher und imkerlicher Praxis mit Jung- und Wirtschaftsvölkern durchgeführt. Dabei wurden zwei zentrale Stressoren getestet: Fungizidapplikation (Pictor® Active) in die Trachtpflanze (*Brassica napus*) bei Vollblüte und Nahrungslimitierung durch Pollenentzug. Beides sind *Worst-Case*-Szenarien der imkerlichen bzw. landwirtschaftlichen Routine. Die gewonnenen Ergebnisse von Modul 1 basieren auf einer Durchführung (einmalig) mit einem spezifischen Fungizid-Produkt (Inhaltsstoffe: Boscalid und Pyraclostrobin) und dienen dem grundlegenden wissenschaftlichen Verständnis der Interaktion von Honigbienen und Pflanzenschutzmitteln in der Agrarlandschaft, am Beispiel eines Fungizidproduktes. Basierend auf diesen Ergebnissen lassen sich keine generellen Praxisempfehlungen für die Imkerei bzw. Landwirtschaft ableiten. Die Ergebnisse können nicht auf andere Fungizide bzw. Pflanzenschutzmittelanwendungen pauschalisiert werden.

Modul 2 ist immer noch im Stadium der Vorlaufforschung bzw. Entwicklung der automatisierten Hochdurchsatzmethodik. Solange das System nicht marktreif ist, lassen sich damit auch keine Praxisempfehlungen ableiten.

Nach Rücksprache mit den wichtigsten Vertretern der Imkerei in Deutschland, Frau Annette Seehaus-Arnold (Präsidentin des Deutschen Berufs und Erwerbs Imker Bund e.V. (DBIB)) und Torsten Ellmann (Präsident des Deutschen Imkerbund e.V. (D.I.B.)), zu den aktuellen Ergebnissen und der Relevanz für die Imkerei, haben wir uns entschieden auf die Erstellung von Praxismerkblättern zu verzichten.

7. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; Hinweise auf weiterführende Fragestellungen

Die Ziele des Projektes wurden mit projektbedingten üblichen Abweichungen erreicht. Eine detaillierte Übersicht der erreichten Ziele und Ergebnisse findet sich unter Punkt 4 und eine Diskussion über die entstandenen Abweichungen unter Punkt 5.

8. Zusammenfassung

Im Rahmen des Projektes wurden junge Honigbienenstöcke gezielt in ihrer sensiblen Wachstumsphase diversen Stressoren (Fungizid, Pollenmangel) aussetzen, mit denen sie auch unter guter imkerlicher Praxis konfrontiert werden. In einem bundesweit angelegten Feldversuch mit mehrfachen Replikaten konnte gezeigt werden, dass Jungstöcke sich im Vergleich zu Wirtschaftsvölkern unter Stress (Nahrungsmangel, Pflanzenschutzmittel und deren Kombination) ähnlich entwickeln und dass die Stressoren nur kurzzeitig einen Einfluss auf die Volksentwicklung der Jungstöcke hatten. Rückstände der genutzten Fungizide wurden entlang des Weges von der Applikation im Feld bis hin zu den Larven in immer geringeren Konzentrationen gefunden. Ammenbienen scheinen hierbei eine besondere Rolle zu haben und die Rückstände bis zur Larve herauszufiltern. Weder auf den Überwinterungserfolg, noch das Darmmikrobiom der Arbeiterinnen und auch nicht auf ausgewählte physiologische Zielgene der Biene konnte ein Einfluss durch die Pflanzenschutzmittelanwendung beobachtet werden.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass Pollen eine hohe Variabilität für unterschiedliche Standorte, Jahre und Sorten aufweisen, was ein Hauptfaktor für die Identifizierungsgenauigkeit ist. Im Rahmen des Projektes konnte die Referenzdatenbank für Bienen-relevante Pollen und die Erkennung durch verschiedene Classifier signifikant erweitert werden. Verschiedene Matrices (z. B. Honig, Pollenhöschen) müssen zukünftig durch spezifische Referenzpollen und Classifier analysiert werden, da ausschließlich Antherenpollen dafür ungeeignet sind. Erste Tests mit monofloralen Honigen zeigten eine vielversprechende Genauigkeit in der Pollenerkennung, was mittels klassischer Mikroskopie in einem Ringversuch bestätigt werden konnte.

9. Literaturverzeichnis

- Badiou-Bénéteau A, Carvalho SM, Brunet JL, et al. (2012) Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: application to the systemic insecticide thiamethoxam. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 82:22-31
- Behm F, von der Ohe K, Henrich W (1996) Zuverlässigkeit der Pollenanalyse von Honig. Bestimmung der Pollenhäufigkeit. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 92:183-187
- Beug, H-J (2015) Leitfaden der Pollenbestimmung für Mitteleuropa und angrenzende Gebiete. 2nd ed. München, Verlag Dr. Friedrich Pfeil
- Bischoff G, Grasz B, Nowak H, et al. (2020) Looking for residues of pesticides in bees, plants and bee products. *Journal für Kulturpflanzen* 72:141-153
- Blot N, Veillat L, Rouzé R, et al. (2019) Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota. *PLoS One* 14:e0215466
- Böhme F, Bischoff G, Zebitz CPW, et al. (2019) From field to food II - will pesticide-contaminated pollen diet lead to a contamination of worker jelly? *Journal of Apicultural Research* 58:542-549
- Böhme F, Bischoff G, Zebitz CPW, et al. (2018) From field to food - will pesticide-contaminated pollen diet lead to a contamination of royal jelly? *Apidologie* 49:112-119
- Böhme F, Bischoff G, Zebitz CPW, et al. (2017) Chronic exposure of honeybees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), to a pesticide mixture in realistic field exposure rates. *Apidologie* 48:353-363
- Carnesecchi E, Svendsen C, Lasagni S, et al (2019) Investigating combined toxicity of binary mixtures in bees: Meta-analysis of laboratory tests, modelling, mechanistic basis and implications for risk assessment. *Environment International* 133:105256
- Carvalho SM, Belzunces LP, Carvalho GA, et al. (2013) Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: a case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32:2117-2124
- Dai P, Yan Z, Ma S, et al. (2018) The herbicide glyphosate negatively affects midgut bacterial communities and survival of honey bee during larvae reared *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66:7786-7793
- DeGrandi-Hoffman G, Chen Y, Simonds R (2013) The effects of pesticides on queen rearing and virus titers in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Insects* 4:71-89
- Del Hierro A, Guerra S (2016) Assessing the morphological variations on the pollen grains of *Solanum betaceum* caused by chemical, biological and ecological pesticides. *Biology and Medicine* 8:3
- DIN 10760:2002-05 Untersuchung von Honig - Bestimmung der relativen Pollenhäufigkeit. <https://dx.doi.org/10.31030/9252215>
- Dolezal AG, Carrillo-Tripp J, Judd TM, et al. (2019) Interacting stressors matter: Diet quality and virus infection in honeybee health. *Royal Society Open Science* 6:181803.
- Dunker S (2017) Device for automatic species analysis and method for carrying out the same. Publication number: WO2019/068352, Application Number: PCT/EP2017/075553
- Dunker S, Motivans E, Rakosy D, Boho D, Mäder P, Hornick T, Knight TM (2021) Pollen analysis using multispectral imaging flow cytometry and deep learning. *New Phytologist* 229:593-606
- Erban T, Sopko B, Kadlikova K, et al. (2019) *Varroa destructor* parasitism has a greater effect on proteome changes than the deformed wing virus and activates TGF- β signaling pathways. *Scientific Reports* 9:9400
- Hofmann M, Maeder P (2022) Synaptic scaling-an artificial neural network regularization inspired by nature. *IEEE transactions on neural networks and learning systems* 33:3094-3108
- Horn H, Lüllmann C (2017) Der Honig. InterQuality GmbH
- Hroncova Z, Havlik J, Killer J, et al. (2015) Variation in honey bee gut microbial diversity affected by ontogenetic stage, age and geographic location. *PLoS ONE* 10:e0118707
- Kablau A, Eckert JH, Pistorius J, Sharbati S, Einspanier R (2020) Effects of selected insecticidal substances on mRNA transcriptome in larvae of *Apis mellifera*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 170:104703

- Kwong WK, Moran NA (2016) Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology* 14:374-84
- Li YH, Zhou BL, Qian MR, et al. (2017a) Transfer and metabolism of triadimefon residues from rape flowers to apicultural products. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2017:7697345
- Li YH, Zhou BL, Qian MR, et al. (2017b) Transfer assessment of carbendazim residues from rape flowers to apicultural products. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2017:6075405
- López-Urbe MM, Ricigliano VA, Simone-Finstrom M (2020) Defining pollinator health: Assessing bee ecological, genetic, and physiological factors at the individual, colony, and population levels. *Annual Review of Animal Biosciences* 8:5.1–5.26
- Louveaux J, Maurizio A, Vorwohl G (1978) Methods of melissopalynology. *Bee World* 59:139-157
- Lückmann J, Tänzler V (2020) Honeybee brood testing under semi-field and field conditions according to Oomen and OECD GD 75: is there a difference of the brood termination rate? *Julius-Kühn-Archiv* 465:91-95.
- Motta EVS, Raymann K, Moran NA (2018) Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 115:10305-10310
- OECD (2007) Guidance document on the honey bee (*Apis mellifera* L.) brood test under semi-field conditions no. 75. ENV/JM/MONO, (75)
- Padilla F, Soria N, Oleas A, et al. (2017) The effects of pesticides on morphology, viability, and germination of Blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) and Tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.) pollen grains. *3 Biotech* 7:154
- PalDat - <https://www.paldat.org/>
- Pilling E, Campbell P, Coulson M, et al. (2013) A four-year field program investigating long-term effects of repeated exposure of honey bee colonies to flowering crops treated with thiamethoxam. *PLoS ONE* 8:e77193.
- Pollenwiki - <https://pollen.tstebler.ch/MediaWiki/index.php?title=Pollenatlas#gsc.tab=0>
- Romero S, Nastasa A, Chapman A, et al. (2019) The honey bee gut microbiota: strategies for study and characterization. *Insect Molecular Biology* 28:455-472
- Smutin D, Lebedev E, Selitskiy M, et al. (2022) Micro"bee"ota: Honey bee normal microbiota as a part of superorganism. *Microorganisms* 10:2359
- Sponsler DB, Johnson RM (2017) Poisoning a society: a superorganism perspective on honey bee toxicology. *Bee World* 94:30-32
- Steinigeweg C, Alkassab AT, Erler S, et al. (2023) Impact of a microbial pest control product containing *Bacillus thuringiensis* on brood development and gut microbiota of *Apis mellifera* worker honey bees. *Microbial Ecology* 85:1300-1307
- Straub L, Williams GR, Pettis J, et al. (2015) Superorganism resilience: eusociality and susceptibility of ecosystem service providing insects to stressors. *Current Opinion in Insect Science* 12:109-112
- Tauber JP, Collins WR, Schwarz RS, et al. (2019) Natural product medicines for honey bees: Perspective and protocols. *Insects* 10:356
- von der Ohe W, Oddo LP, Piana ML, et al. (2004) Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie* 35:S18-S25
- Wäldchen J, Mäder P (2019) Flora Incognita – wie künstliche Intelligenz die Pflanzenbestimmung revolutioniert. *Biologie in unserer Zeit* 49:99-101.
- Wang L, Meeus I, Rombouts C, et al. (2019) Metabolomics-based biomarker discovery for bee health monitoring: A proof of concept study concerning nutritional stress in *Bombus terrestris*. *Scientific Reports* 9:11423
- Wernecke A, Frommberger M, Forster R, et al. (2019) Lethal effects of various tank mixtures including insecticides, fungicides and fertilizers on honey bees under laboratory, semi-field and field conditions. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 14:239-249
- Wueppenhorst K, Alkassab AT, Beims H, et al. (2024a) Honey bee colonies can buffer short-term stressor effects of pollen restriction and fungicide exposure on colony development and the microbiome. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 282:116723
- Wueppenhorst K, Alkassab AT, Beims H, et al. (2024b) Nurse honey bees filter fungicide residues to maintain larval health. *Current Biology* 34:5570-5577
- Zheng H, Steele MI, Leonard SP, et al. (2018) Honey bees as models for gut microbiota research. *Lab Animal* 47:317-325

10. Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt (Printmedien, Newsletter usw.), bisherige und geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse

Publikationen (peer-reviewed):

- Dunker S, Boyd M, Durka W, Erler S, Harpole S, Henning S, Herzsuh U, Hornick T, Knight T, Lips S, Mäder P, Motivans Švara E, Mozarowski S, Rakosy D, Römermann C, Schmitt-Jansen M, Stoof-Leichsenring K, Stratmann F, Treudler R, Virtanen R, Wendt-Potthoff K, Wilhelm C (2022) The potential of multispectral imaging flow cytometry for environmental monitoring. *Cytometry Part A*, 101 (9): 782-799. DOI: 10.1002/cyto.a.24658 – Special Issue: ‘Best Practices in Plant Cytometry Part 2’
- Walther F, Plos C, Deilmann T, Lenk A, Römermann C, Rakosy D, Harpole WS, Hofmann M, Hornick T, Dunker S (2025) Multispectral imaging flow cytometry for spatio-temporal pollen trait variation measurements of insect-pollinated plants. *Cytometry Part A*, (minor revision)
- Wueppenhorst K, Eckert JH, Steinert M, Erler S (2022) What about honey bee jelly? Pesticide residues in larval food jelly of the Western honey bee *Apis mellifera*. *Science of the Total Environment*, 850: 158095. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.158095
- Wueppenhorst K, Alkassab AT, Beims H, Ernst U, Friedrich E, Illies I, Kirchner WH, Seidel K, Steinert M, Yurkov A, Erler S, Odemer R (2024) Honey bee colonies can buffer short-term stressor effects of pollen restriction and fungicide exposure on colony development and the microbiome. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 282: 116723. DOI: 10.1016/ecoenv.2024.116723.
- Wueppenhorst K, Alkassab AT, Beims H, Bischoff G, Ernst U, Friedrich E, Illies I, Janke M, Kehmstedt J, Kirchner WH, Odemer R, Erler S (2024) Nurse honey bees filter fungicide residues to maintain larval health. *Current Biology*, 34(23): 5570-5577. DOI: 10.1016/j.cub.2024.10.008

Vorstellung des Projektes in Form eines Berichtes:

- Künstliche Intelligenz für die Honiganalyse? In: bienen&natur (06/2021, Seiten 32-33)
- Pollenanalyse mit künstlicher Intelligenz. In: Schweizerische Bienen-Zeitung (Vol. 145, 07/2022, Seiten 28-29)
- Pistorius J, und Mitarbeitende (2022) Jahresbericht 2021, Institut für Bienenschutz. Seite 1-37
- Rosenkranz P, und Mitarbeiter (2022) Bericht der Landesanstalt für Bienenkunde der Universität Hohenheim für das Jahr 2021. Bienenpflege, 2022(03): 125-133
- Beims H, Boecking O, Janke M, Odemer F, Traynor K (2022) Institut für Bienenkunde (IB) Celle, Bundeweite Tätigkeit und internationale Anerkennung. LAVES Tätigkeitsbericht 2021, Seite 92-97
- Pistorius J, und Mitarbeitende (2023) Jahresbericht 2022, Institut für Bienenschutz. Seite 1-38 (<https://www.julius-kuehn.de/bs/informationmaterial>)
- Traynor K, und Mitarbeiter*innen (2023) Bericht der Landesanstalt für Bienenkunde der Universität Hohenheim für das Jahr 2022. Bienenpflege, 2023(04): 198-206
- Boecking O, Campell S, Dunker S, Janke M, von Kolson K, Küster L, Odemer F, Wöhlke A (2023) Institut für Bienenkunde (IB) Celle, Bundeweite Tätigkeit und internationale Anerkennung. LAVES Tätigkeitsbericht 2022, Seite 100-105

- Berg S, Illies I, Heidinger I (2023) Forschung in Veitshöchheim. *bienen&natur*, 2023(03): 32-35
- Berg S, Illies I, Heidinger I, Jäger R, Kammerer A, Wehner L (2024) Forschung in Veitshöchheim. *bienen&natur*, 2024(03): 32-35
- 4 Beenovation Projekte. In: *Deutsches Bienen-Journal* (01/2025, Seite 18-19)
- Von der Blüte in den Stock. In: *Deutsches Bienen-Journal* (02/2025, Seite 17)
- Ammenbienen als Schadstofffilter. In: *bienen&natur* (02/2025, Seite 09)

Vorstellung des Projektes im Rahmen eines Vortrages:

- Veitshöchheimer Imkerforum (05.02.2022, Online, ca. 600 Teilnehmer)
- Züchterschulungen (Multiplikatorenfortbildung) am 02.04.2022 (Schwarzenau), 09.05.2022 (Guglhör), 10.05.2022 (Kringell)
- Vorstellung auf den Verbandstagen (Landesverband Bayerischer Imker am 10.09.2022 in Bad Aibling, Verband Bayerischer Bienenzüchter am 18.09.2022 in Teising, Bayerische Imkervereinigung am 17.09.2022 in Weiden)
- Schulung der Fachwarte und Bienensachverständige am 12. und 20.11.2022 (Online, gesamt 380 Teilnehmer)
- Veitshöchheimer Imkerforum 2023 (Hybrid, 200 Teilnehmer in Präsenz, ca. 500 online)
- Züchterschulungen (Multiplikatorenfortbildung) am 02.05.2023 (Schwarzenau), 08.05.2023 (Guglhör) und 09.05.2023 (Kringell)
- Beenovation Auftaktveranstaltung (01.03.2023, Berlin), Präsentation des Verbundvorhabens durch PD Dr. S. Erler, weitere Teilnehmende: Dr. S. Dunker, Prof. R. Einspanier, Dr. K. Fechner, M. Janke, Prof. W.H. Kirchner, F. Walther.
- Vorstellung des Projektes im Rahmen eines Vortrags für das Schulprojekt "Ab in die Dolden" (Interview mit Franziska Walther (UFZ) zum Thema "Biodiversität erforschen!", 20.06.2023, https://www.teachtoday.de/Aktuelles/Aktionen/Challenge_Ab_in_die_Dolden/3301_Live_mit_Expertinnen.htm)
- Schulung der Fachwarte und Bienensachverständige am 11.11.2023 in Veitshöchheim (Präsenz und Online), 18.11.2023 in Regensburg, 25.11.2023 in Landsberg am Lech
- Weissacher Imkertag (10.03.2023), Hohenheimer Tag (12.03.2023), Badischer Imkertag (18.03.2023), Bezirksverein für Bienenzucht Besigheim e.V. (19.04.2023), Bezirksimkerverein Göppingen (21.09.2023), Bezirks-Imkerverein Biberach an der Riß e.V. (10.10.2023), Bezirksbienenzuchtverein Alb Lautertal e.V. (14.10.2023)
- Beenovation Vortragsreihe (Onlineveranstaltung): 24.10.2023 Vortrag von Dr. R. Odemer zum Thema „Bienen, Bits und Bytes: Digitales Honigbienenmonitoring“, inkl. Vorstellung und Einbindung von NutriBee
- 4. Beenovation Podcast-Folge „Einfluss von Pflanzenschutzmittel auf die Bienengesundheit und alternativer Pflanzenschutz“, Beitrag von PD Dr. S. Erler (Aufzeichnung am 26.10.2023) <https://beenovation.podigee.io/5-new-episode>
- Referententagung des Landesverbands Württembergischer Imker (12.11.2023)

- Besuchstage an der Landesanstalt für Bienenkunde: Führung Unibund (27.04.2023), Besuchertage der Imkervereine (23.04.2023, 10.09.2023), Führung Fachschaft AGRAR (05.05.2023), Besuch des Verkehrsministers Winfried Hermann (10.09.2023)
- Präsentation des Projektes auf der DAFA (Deutsche Agrarforschungsallianz) Strategiekonferenz: Fachforum Bienen und Landwirtschaft (17.-18.01.2024, Berlin); Austausch mit verschiedenen Interessenvertretern aus den Bereichen Imkerei, Landwirtschaft, Pflanzenbau und Forschung
- Veitshöchheimer Imkerforum (03.02.2024, Hybrid, 150 Teilnehmer in Präsenz, ca. 370 online)
- Beenovation Abschlussveranstaltung der Vernetzungs- und Transfermaßnahme „Zum Schutz von Bienen und Bestäuberinsekten in der Agrarlandschaft“: 17.10.2024 (Berlin), Präsentation der Ergebnisse durch PD Dr. Silvio Erler (Modul 1) und Frau Franziska Walther (Modul 2) durch je einen Vortrag und Frau Walther zusätzlich durch ein Poster

Tagungsbeiträge:

- Walther F, Plos C, Friedrich E, Hornick T, Hofmann M, Lahr D, Schroeder A, Janke M, Melching A, Mäder P, Dunker S: First results on the identification of insect-pollinated pollen. – 69. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V. (04/2022, Bad Überkingen-Oberböhringen)
- Wüppenhorst K, Eckert JH, Steinert M, Erler S: Pesticide residues in larval food jelly of the Western honey bee *Apis mellifera* – a review. – 69. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V. (04/2022, Bad Überkingen-Oberböhringen)
- Wüppenhorst K, Eckert JH, Steinert M, Erler S: A review about pesticide residues in larval food jelly of the Western honey bee *Apis mellifera*. – 9th European Congress of Apidology (EurBee 9) (09/2022, Belgrad, Serbien)
- Wüppenhorst K, Eckert JH, Steinert M, Erler S: Reviewing pesticide residues in larval food jelly of the Western honey bee *Apis mellifera*. – 15th International Symposium on Hazard of Pesticides to Bees (10/2022, York, UK)
- Wüppenhorst K, Eckert JH, Steinert M, Erler S: Pesticide residues in larval food jelly of the Western honey bee *Apis mellifera* – a review. – 14th Young Scientists Meeting (11/2022, Berlin)
- Walther F, Plos C, Deilmann T, Lenk A, Römermann C, Rakosy D, Harpole WS, Hornick T, Dunker S: Intraspecific temporal and spatial variability of zoophilous pollen traits. – 70. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V. (03/2023, Potsdam)
- Wüppenhorst K, Alkassab A, Beims H, Friedrich E, Illies I, Kirchner WH, Odemer R, Erler S: Combined effects of fungicide exposure and limited pollen resources on honey bee colony development. – 70. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V. (03/2023, Potsdam)
- Erler S, Eckert JH, Steinert M, Wueppenhorst K: Food jelly, a potential source for pesticides to harm honey bee larvae? – SETAC Europe 33rd Annual Meeting (05/2023, Dublin, Irland)
- Walther F, Plos C, Deilmann T, Lenk A, Römermann C, Rakosy D, Harpole WS, Hornick T, Dunker S: Spatio-temporal variation of zoophilous pollen traits within species - How diverse are pollen of insect-pollinated plants in space and time? – HIGRADE Konferenz 2023 (05/2023, Leipzig)

- Walther F, Plos C, Deilmann T, Lenk A, Römermann C, Rakosy D, Harpole WS, Hornick T, Dunker S: How diverse are pollen of insect-pollinated plants in space and time? – 52. Jahrestagung der Gesellschaft für Ökologie e.V. (09/2023, Leipzig)
- Wueppenhorst K, Alkassab A, Einspanier R, Ernst U, Friedrich E, Illies I, Janke M, Kirchner WH, Mating M, Odemer R, Yurkov A, Erler S: Combined stressors in the agriculture – Investigating more effects than honey bee colony development – 7th Central European Section Meeting of the International Union for the Study of Social Insects (09/2023, Cluj-Napoca, Rumänien)
- Wueppenhorst K, Alkassab AT, Einspanier R, Ernst U, Friedrich E, Illies I, Janke M, Kirchner WH, Mating M, Odemer R, Yurkov A, Erler S: Combined stressors in the agriculture – Investigating more effects than honey bee colony development – 15th Young Scientists Meeting – Conference 2023 (11/2023, Dossenheim)
- Wueppenhorst K, Alkassab AT, Beims H, Friedrich E, Illies I, Kirchner WH, Erler S, Odemer R: Kombiniertes Effekt einer Fungizidexposition und Nahrungslimitierung auf die Volksentwicklung der Honigbiene. – Beenovation-Workshop „Verbesserung der Bienengesundheit“, 31. Apisticus-Tag (02/2024, Münster)
- Friedrich E, Weimer M, Ernst U, Steiner R, Wüppenhorst K, Erler S, Illies I: Does pollen availability and fungicide exposure during the larval stages influence the life span of adult honey bees? – 71. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V. (03/2024, Münster)
- Illies I, Kaci S, Schierling A, Scheiner R: Effect of pollen traps on pollen foraging behavior of honeybees. – 71. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V. (03/2024, Münster)
- Walther F, Plos C, Deilmann TJ, Lenk AK, Römermann C, Friedrich E, Schroeder A, Campbell S, Janke M, Rakosy D, Harpole S, Hofmann M, Hornick T, Dunker S: Image-based multispectral flow cytometry – A new approach for fast and efficient pollen analysis. – 71. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V. (03/2024, Münster)
- Wueppenhorst K, Alkassab AT, Beims H, Bischoff G, Ernst U, Friedrich E, Illies I, Janke M, Kehmstedt J, Kirchner WH, Odemer R, Erler S: What are the transfer routes of fungicide residues from field to the hive? – 71. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V. (03/2024, Münster)
- Walther F, Dunker S, Janke M, Campbell S, Erler S, Hornick T, Rakosy D, Harpole S, Friedrich E, Schroeder A: Image-bases multispectral flow cytometry – a new analytical approach for fast and efficient pollen determination. – 6th International Symposium on Bee Products & Annual Meeting of the International Honey Commission (04/2024, Cluj-Napoca, Rumänien)
- Walther F, Plos C, Deilmann TJ, Lenk AK, Römermann C, Friedrich E, Schroeder A, Campbell S, Janke M, Rakosy D, Harpole S, Hofmann M, Hornick t, Dunker S: Image-based multispectral flow cytometry – A new approach for fast and efficient pollen analysis. – XV International Palynological Congress & XI International Organization of Palaeobotany Conference (05/2024, Prag, Tschechien)
- Wueppenhorst K, Alkassab AT, Beims H, Bischoff G, Ernst U, Friedrich E, Illies I, Janke M, Kehmstedt J, Kirchner WH, Odemer R, Erler S: What are the transfer routes of fungicide residues from field to the hive? – 10th Congress of Apidology (EurBee 10) (09/2024, Tallinn, Estland)
- Walther F, Dunker S, Janke M, Campbell S, Erler S, Hornick T, Rakosy D, Harpole S, Friedrich E, Schroeder A: Image-based multispectral flow cytometry – a new analytical approach for fast and efficient pollen determination. – 16th International Symposium of the Bee Protection Group Hazards of Pesticides to Bees (ICPPR) (10/2024, Sevilla, Spanien)

- Walther F, Dunker S, Janke M, Campbell S, Erler S, Hornick T, Rakosy D, Harpole S, Friedrich E, Schroeder A: Image-based multispectral flow cytometry – a new analytical approach for fast and efficient pollen determination. – iDiv Conference 2024 (11/2024, Leipzig)

Abschlussarbeiten:

Bachelorarbeiten:

- Christina Leicht – „Die Auswirkungen des Fungizids Pictor Active auf das Lern- und Erinnerungsvermögen der Westlichen Honigbiene (*Apis mellifera*).“ (Bachelor of Science, Ruhr- Universität Bochum) (2022)
- Rieke Steiner – „Einfluss von Fungizidbehandlung und Pollenlimitierung auf die Entwicklung der Honigbiene und ihre Lebenserwartung“ (Bachelor of Science im Studiengang Biologie, Technische Universität Braunschweig und JKI) (2022)

Masterarbeiten:

- Till Deilmann – „Patterns in phenology and functional traits of herbaceous plant species from Botanical gardens and natural habitats“ (Master of Science im Studiengang Evolution, Ökologie und Systematik, Friedrich-Schiller-Universität Jena und UFZ) (2022)
- Annalena Lenk – „Site-specific patterns in the seasonal variation in flowering and growth phenology“ (Master of Science im Studiengang Evolution, Ökologie und Systematik, Friedrich-Schiller-Universität Jena und UFZ) (2022)
- Marina Weimer – „Einfluss einer reduzierten Pollenversorgung und Fungizidbehandlung an Rapsblüten auf die Lebensdauer von Honigbienen und die Entwicklung der Futtersaftdrüsen bei Wirtschafts- und Jungvölkern“ (Master of Education im Studiengang Lehramt Biologie und Chemie, Universität Hohenheim) (2022)

Praktika:

- Britta Bock (M.Sc.) – „Differences in nectar and pollen collection in honeybees (*Apis mellifera*) located at fields (*Brassica napus*) treated with fungicides and stressed with pollen traps“ (Praktikumsbericht, Master of Science, Ruhr-Universität Bochum und LAVES-Institut für Bienenkunde Celle) (2022)
- Til Böttner (B.A.) – „Untersuchung der Flexibilität in der Arbeitsteilung von *Apis mellifera* (L.) Sammelbienen unter polleninduzierter Malnutrition“ (Praktikumsbericht, Bachelor of Science, Ruhr-Universität Bochum) (2022)
- Aleksandr Dmitriev (M.Sc.) – „Survey on generative adversarial networks to debias multispectral image data.“ (Master of Science im Studiengang Research in Computer & Systems Engineering, Technische Universität Ilmenau) (2023)
- Johanna Gustke (M.Sc.) – „Forschungspraktikum“ (Masterstudiengang Landscape Ecology and Nature Conservation, Universität Greifswald und UFZ) (2023)
- Diana Schneider (B.Sc.) – „Wirkstoffgehalte in Bienenmatrizes nach einer fungiziden Spritzmaßnahme in blühenden Winterraps“ (Bachelor of Science im Studiengang Agrarwissenschaften, Universität Hohenheim) (2022)
- Marie-Christine Seidel (M.Sc.) – „Synergistische Effekte von induziertem Proteinmangel und Pestiziden auf die Brutentwicklung von *Apis mellifera*“ (Praktikumsbericht, Master of Science, Ruhr-Universität Bochum) (2022)

- Saskia Süß (B.Sc.) – Berufspraktikum am UFZ Leipzig (Bachelorstudiengang Biologische Diversität und Ökologie, Georg-August Universität-Göttingen) (2022)
- Anastasiia Volgina (M.Sc.) – „Design, implementation and testing of an interactive active learning workflow in a distributed active learning pipeline for multispectral datasets“ (Master of Science im Studiengang Research in Computer & Systems Engineering, Technische Universität Ilmenau) (2023)

Zulassungsarbeiten:

- Sarah Kaci – „Untersuchungen zum Pollensammelverhalten von Honigbienen (*Apis mellifera* L.) im Winterraps“ (Lehramt Sek. II für Biologie und Chemie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg und LWG) (2023)

Online Medien:

- <https://www.researchgate.net/project/NutriBee-2> (nur bis Mitte des Jahres 2023, danach wurden alle Projekte durch ResearchGate entfernt)
- <https://nutribee.julius-kuehn.de/>
- <https://www.beenovation.de/>
- Twitter bzw. X: @AskDrODR