**DER EINFLUSS VERSCHIEDENER KONSTITUTIONS- UND
UMWELTFAKTOREN AUF DIE ANFÄLLIGKEIT DER HONIG-
BIENE (*APIS MELLIFICA* L.) GEGENÜBER
ZWEI INSEKTIZIDEN PFLANZENSCHUTZMITTELN ***

*L'influence de différents facteurs internes et externes
sur la sensibilité des abeilles (*Apis mellifica* L.)
à l'égard de deux produits phytosanitaires insecticides*

Anastasios LADAS

*Institut für Landwirtschaftliche
Zoologie und Bienenkunde der
Universität Bonn*

SUMMARY

**THE INFLUENCE OF SOME INTERNAL AND EXTERNAL FACTORS UPON THE
INSECTICIDE RESISTANCE OF HONEYBEE**

The following influences upon insecticide resistance of honey bees were tested : age, race, degree of inbreeding, application in light and darkness and *Nosema* infection. The applied insecticides were *DiDiTan* (DDT) for contact and the organophosphate *Dipterex* for oral effect.

A new method for the application of the contact insecticide was developed while for the oral application a standard laboratory method was used.

Young bees proved less resistant to DDT than older ones in 22° C as well as in 35° C.

The Caucasian bees showed lesser susceptibility to *DDT* and *Dipterex* than bees of the Carniolan and Italian race. Between Carniolan bees of different geographical origin significant differences in resistance could also be observed.

Two inbred Carniolan lines ($F = 0,25$) reacted differently to *DDT*. In the hybrids of these two lines ($F = 0,03$), however, no difference could be found in comparison to the paternal line, but they proved more resistant than bees of the maternal line. In contact as well as

* Für die Überlassung des Themas sowie das Interesse am Fortgang der Untersuchungen danke ich Herrn Dr. DRESCHER, ebenso allen Institutsmitgliedern, die mir bei den experimentellen Arbeiten behilflich waren. Herr Prof. Dr. WURMBACH ermöglichte mir die Durchführung der Arbeit im Institut für Landwirtschaftliche Zoologie und Bienenkunde, Universität Bonn.

in feeding experiments the keeping of the bees in darkness resulted in an increased toxicity of the insecticides. The effects after keeping in darkness and light are significant. — Carniolan bees artificially infected with *Nosema* spores proved more susceptible to DDT and *Dipterex* than healthy bees.

DDT shows a negative temperature coefficient, which means that with decreasing temperature the effect of the insecticide increases. The effect of *Dipterex* is less influenced by temperature, only a minor positive temperature coefficient could be demonstrated. The pH-value of the *Dipterex* solution was of great influence on toxicity.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Einfluß der Faktoren Alter, Rasse, Inzuchtgrad, Applikation bei Licht- und Dunkelhaltung und Nosemainfektion auf die Wirkung des Kontaktgiftes *DiDiTan Ultra* (DDT-Wirkstoff) und des Fraßgiftes *Dipterex* (Phosphorsäureester) bei Bienen wurde geprüft. Zur Ermittlung des Kontaktgiftwertes von DDT konnte eine neue Applikationsmethode entwickelt werden. Die Bestimmung des peroralen Toxizitätsgrades von *Dipterex SP 80* erfolgte mit einer standardisierten Laboratoriumsmethode.

Sowohl bei 22° C als auch bei 35° C zeigten sich Jungbienen empfindlicher gegenüber *DiDiTan Ultra* als alte Bienen.

Die *Caucasica*-Bienen erwiesen sich als widerstandsfähiger gegenüber *DiDiTan Ultra* und *Dipterex SP 80* im Vergleich mit Bienen der *Carnica*- und *Ligustica*-Rasse. Statistisch gesicherte Verträglichkeitsunterschiede gegenüber *DiDiTan Ultra* konnten auch bei Bienen verschiedener *Carnica*-Herkünfte festgestellt werden.

Zwei ingezüchtete Linien (*Carnica*, $F = 0,25$) reagierten gegenüber *DiDiTan Ultra* unterschiedlich. Bienen der F_1 -Generation ($F = 0,03$) dagegen zeigten keinen Unterschied gegenüber den Bienen des Vätervolkes; sie waren aber widerstandsfähiger als die Tiere des Muttervolkes.

Sowohl bei Kontakt- (*DiDiTan Ultra*) als auch bei Fraßversuchen (*Dipterex SP 80*) steigerte Dunkelheit die Wirkung der geprüften Insektizidpräparate. Der Unterschied zwischen der Bienenreaktion bei Licht- und Dunkelhaltung ist signifikant.

Mit *Nosema*sporen künstlich infizierte Bienen (*Carnica*) waren anfälliger gegenüber *DiDiTan Ultra* und *Dipterex SP 80* als nicht infizierte.

DDT besitzt einen negativen Temperaturkoeffizienten, d.h. die Wirksamkeit des Giftes nimmt bei sinkender Temperatur zu.

Dipterex SP 80 ist weniger temperaturabhängig als *DiDiTan Ultra*. Es besitzt einen positiven Temperaturkoeffizienten.

Als ausschlaggebend für den Toxizitätsgrad von *Dipterex SP 80* erwies sich der pH-Wert bzw. das Alter der jeweils zur Anwendung kommenden Giftlösung. Im alkalischen wässrigen Bereich ist der Giftwert von *Dipterex SP 80* größer als im sauren.

I. — EINLEITUNG

Der verbreitete Einsatz chemischer Stoffe zur Bekämpfung landwirtschaftlicher Schadinsekten erfordert die Prüfung der in den Handel gebrachten Präparate auf ihre Toxizität gegenüber der Honigbiene.

Zur Durchführung dieser Prüfung steht eine standardisierte Laboratoriumsmethode zur Verfügung (STUTE, 1969). Bei den verwendeten Bienen lassen sich jedoch in einigen Fällen merkliche Unterschiede in der Reaktion auf die Insektizide bei gleicher Applikationsform feststellen (MAURIZIO und SCHENKER, 1957; ANDERSON und ATKINS, 1958; BERAN, 1958; KOCH, 1959; ATKINS und ANDERSON, 1962; GRAVES und MACKENSEN, 1965).

Aufgabe dieser Untersuchung war es, den Einfluß verschiedener konstitutioneller und konditioneller Faktoren — Alter, Rasse bzw. Herkunft,

Inzuchtgrad, Applikation bei Licht und Dunkelheit und Nosemainfektion auf die toxische Wirkung von zwei Insektiziden (DDT und « DiptereX ») auf Bienen zu untersuchen.

Die beiden Präparate wurden aus zwei verschiedenen Insektizidkategorien gewählt, um eventuell vorhandene multiple Resistenz bestimmter Bienenherkünfte zu prüfen (ATKINS und ANDERSON, 1962; GRAVES und MACKENSEN, 1965).

Zur Durchführung der Versuche entwickelte ich eine eigene Methode der Insektizidapplikation und der Haltung der Versuchstiere.

II. — MATERIAL UND METHODE

a. — Insektizide und Bienenmaterial

Insektizide: Für die Versuche habe ich die Handelspräparate *DiDiTan Ultra* (SCHERING AG — Berlin) und *DiptereX SP 80* (Farbenfabriken BAYER AG — Leverkusen) benutzt. Die Packungen wurden während der zweijährigen Versuchsdauer im Kühlschrank bei 3 — 6° C luftdicht aufbewahrt.

DiDiTan Ultra enthält 80 % Dichlor-diphenyl-trichloräthan (DDT). Das Präparat wirkt als Kontakt- und Fraßgift und besitzt langanhaltende Wirkung. Die für die Praxis empfohlenen Konzentrationen schwanken je nach Anwendungsbereich zwischen 0,1 — 1 %.

DiptereX SP 80 ist ein 80 % iges Phosphorsäureester-Präparat. Es wirkt vor allem als Magengift. Der Wirkstoff besitzt ausserdem eine Tiefen- und systemische Wirkung (UNTERSTENHÖFER, 1957, 1958; UNTERSTENHÖFER und FREHSE, 1963). Sein Toxizitätsgrad ist stark vom pH-Wert und von der Temperatur des Lösungsmittels abhängig (SCHRADER, 1963; UNTERSTENHÖFER und FREHSE, 1963). Die Halbwertszeiten von *DiptereX* betragen in wässriger Lösung von ca. 20° C bei pH = 8,0 63 Minuten, bei pH = 7,0 386 Minuten und bei pH = 6,0 89 Stunden. Die Umsetzungsquote ist bei pH = 5,4 sehr niedrig (MÜHLMANN und SCHRADER, 1957; METCALF et al., 1959; FUCUTO, 1961; SCHRADER, 1963).

Die Konzentration des Präparates *DiptereX SP 80* beträgt in der landwirtschaftlichen Praxis 0,1 bis 0,15 %.

Bienenmaterial: Für die Versuche dienten Bienen (*Apis mellifica* L.) verschiedener Rassen bzw. Herkünfte (Tab. 1).

Ich arbeitete mit Sommer- und Winterbienen. Verdeckelte Brutwaben entnahm ich den entsprechenden Bienenvölkern, ließ die Arbeiterinnen in einem Brutschrank schlüpfen, markierte die frischgeschlüpften Bienen auf dem Thorax und gab sie in ein Pflegevolk. Diese Art der Behandlung lieferte altersmäßig definierte Bienen in adäquater physiologischer Verfassung.

Geringe Abweichungen von dieser Behandlung erforderte die Prüfung der mit Nosemasporen infizierten Bienen. 18 bis 25 Tage alte Bienen entnahm ich dem Pflegevolk und infizierte sie im Laboratorium mit Nosemasporen. Jeweils 10 mg Sporenpräparat (aus an Nosema erkrankten Bienen gewonnen* und ca. 30 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt) wurden mit 2 ml einer 50%igen Zuckerlösung gemischt. Aus dieser Sporenaufschwemmung erhielt jede Biene 10 mm³ (das entspricht ca. 400 000 — 500 000 Sporen / Biene). Anschließend wurden 30 bis 40 infizierte Tiere in Holzkästchen (Volumen ca. 150 mm³) 6, 7 und 8 Tage im Brutschrank bei ca. 32° C gehalten (GOETZE et al., 1959) und während dieser Zeit mit 50%igem Zuckerwasser gefüttert. Die Kontrollbienen erfuhren die gleiche Behandlung. Nach dieser Vorbehandlung applizierte ich die beiden Insektizide bei beiden Gruppen.

Im Anschluß an die Versuche erfolgte eine lichtmikroskopische Untersuchung der toten und lebenden Bienen zur Bestimmung des Infektionsgrades. Dazu wurde das Abdomen jeder Biene isoliert und in etwa 0,5 ml Wasser zerquetscht. Die Befunde aus jedem Versuch sind in Prozent dargestellt.

* Das Sporenmaterial lieferte mir freundlicherweise Herr Dr. K.-P. Gross (Nieder-Eschbach).

TAB. 1. — *Rassen und Herkünfte der Versuchsbienen*
 TABL. 1. — *Race et origine des abeilles utilisées pour les essais*

Rasse Race	Herkunft Origine
a) <i>Carnica</i> :	1. Trifolium (langjährig. Zuchtstamm des Inst. f. Landw. Zoologie u. Bienenkunde) Trifolium (souche entretenue depuis de longues années par l'Institut de Zoologie agrico et d'apiculture) 2. Mazedonien. Macédoine.* 3. Österreich. Autriche.* 4. Ungarn. Hongrie.*
b) <i>Carnica</i> : (Inzucht)** (Consanguine)	1. Inzuchtkoeffizient $F = 0,25$ Coefficient de consanguinité $F = 0,25$ 2. » $F = 0,25$ 3. » $F = 0,03$ (F_1 -Generation, Kreuzung : $1-\text{♀} \times 2-\text{♂}$ ♂) (Génération F_1 , croisement : $1. \text{♀} \times 2. \text{♂}$ ♂).
c) <i>Ligustica</i> :	Züchter PIANA (Bologna). Élevage PIANA (Bologne)
d) <i>Caucasica</i> :	Importiertes Material aus Russland. Matériel importé de Russie.

* Nachkommen von importierten Original-Königinnen.

Descendants de reines d'origine importées.

** Herkunft der ingezüchteten Bienenlinien (1,2) aus einem Ausgangsvolk.

Origine des lignées consanguines (1,2) à partir d'une colonie.

Außerdem prüfte ich die Wirkung beider Präparate auf Bienenarbeiterinnen unter den Bedingungen der Licht- und Dunkelhaltung in zwei Brutschränken gleicher Bauart bei gleicher Temperatur (28° C). Zur Beleuchtung diente eine in etwa 20 cm Abstand von den Versuchstieren im Brutschrank angebrachte Glühbirne (25 Watt).

b. — Prüfmethode

Herstellung der Versuchskäfige zur Bestimmung der Kontaktgiftwirkung : Das Präparat löste ich in reinem Azeton. Ein optimal gleichmäßiger Film des gelösten Insektizides auf einer Cellophanfolie (Zellglas No 305, Fa. HETZEL & Co. — Stuttg.) konnte durch folgendes Spritzverfahren erzielt werden : 0,2 ml Flüssigkeit wurden mit einer geeichten Pipette in eine Glasdüse eingeführt. Der Abstand der Düsenpitze von einem ca. 15 × 15 cm messenden gestanzten Cellophanblättchen betrug etwa 4,5 cm. Das Cellophanblatt lag auf einer drehbaren Scheibe. Der Fußlotpunkt der Düse auf dem Cellophan bzw. der Drehscheibe war ca. 1,5 cm vom Mittelpunkt der Scheibe entfernt. Die Scheibe drehte sich mit 78 Umdreh./Minute während ein Preßluftstrom (unter 1 at) durch den Zerstäuber geleitet wurde. Nach dem Öffnen des kleinen Hahnes der Glasdüse war in 4-5 Sekunden die gesamte Flüssigkeit appliziert (Abb. 1). Der aufgesprühte Film bedeckte einen kreisförmigen Teil des Blattes von etwa 7 cm Durchmesser (Abb. 2), wobei keine wesentliche Schrumpfung des Cellophans erfolgte. Sprühverluste traten bei dieser Methode nicht in nachweislichem Umfang auf.

Jeweils zwei der so behandelten Cellophanscheiben bildeten Boden und Deckel von flachen zylindrischen Käfigen (Volumen ca. 45 cm³, Gesamtoberfläche ca. 100 cm², behandelte Fläche ca. 75 cm²). Der große Anteil der mit dem Präparat bedeckten Cellophanfläche garantierte einen intensiven Kontakt mit den Tieren. Für die ringförmige Seitenfläche (Peripherie) der

ABB. 1. — Apparatur zur Giftverteilung

FIG. 1. — Appareil pour la répartition du toxique

ABB. 2. — DiDiTan-Ultra-Filmbildung auf Cellophan

FIG. 2. — Formation du film de DiDiTan-Ultra sur la cellophane

Käfige fanden gleichmäßig (mit Hilfe einer Kreissäge) geschnittene Ringe von ca. 11 mm Höhe aus einem Plastikabflußrohr Verwendung (70 mm Nennweite; Fa. Kunststoffwerk Gebr. Anger GmbH & Co. — München). In jeden Ring bohrte ich zur Bienen einbringung und -fütterung eine Öffnung von 8 mm Durchmesser. Ein zentral gelochtes Korkstück diente dem Verschuß der Öffnung sowie dem Festhalten des pipettenförmigen Futterröhrchens (80 mm lang, 5 mm Durchmesser). Infolge der etwas nach oben gerichteten Stellung der Pipette konnte die zur Fütterung verwendete 50%ige Zuckerlösung nicht herausfließen (Abb. 3 und 4). Diese Anordnung ermöglichte eine Futterversorgung ohne Kontamination durch das zu prüfende Mittel.

ABB. 3. — Kunststoffring mit Futtereinrichtung

FIG. 3. — Anneau de matière plastique avec dispositif pour le nourrissement

ABB. 4. — Cellophankäfig besetzt mit Bienen und Fütterungsanlage

FIG. 4. — Cage de cellophane occupée par les abeilles et dispositif pour le nourrissement

Zur Befestigung der Cellophanscheiben am Ring brachte folgende Methode Erleichterung und Zeitersparnis: Jedes Cellophanblatt wurde ca. 1/2 Std. nach Aufbringen des Spritzbelages mit der begifteten Schicht nach oben so auf die kreisförmige Öffnung (ca. 7,5 cm $\varnothing$) eines Polystyrolkästchens gelegt, daß die mit DiDiTan behandelte Kreisfläche gerade die Öffnung bedeckte. Ein auf der äußeren Fläche mit Leim (Pelikan, Gummi Gum) bestrichener Käfigring wurde leicht auf das behandelte Cellophan gedrückt. Dieses legte sich dem Ring an und klebte fest. Die überragenden Teile des Cellophans wurden abgeschnitten. Dasselbe Verfahren wurde für den Verschuß der anderen Seite des Käfigs wiederholt.

Zur Trocknung des Leimes und zur Verdunstung der Azetonreste verblieben die Käfige vor Einbringung der Versuchsbienen ca. 2 Std. in Raumtemperatur. Mit einer Nadelbürste perforierte ich die Cellophanflächen, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Tiere sicherzustellen.

Die einmalige Benutzung des Käfigs schaltete Fehlerquellen durch ältere Giftspuren aus; zugleich ersparte sie umständliche Reinigungsarbeit.

Bestimmung der Kontaktgiftwirkung

Durch diese Versuchsanordnung sollte der Toxizitätsgrad des Präparates *DiDiTan Ultra* bei Bienen unterschiedlicher genetischer Konstitution und bei verschiedenen Umweltfaktoren ermittelt werden. Eine Voraussetzung war zunächst die Bestimmung der Giftmenge, die unter standardisierten Versuchsbedingungen eine 50%ige Abtötung der Versuchstiere einer « Standardpopulation » in Dauerkontakt (Residualwirkung) erreicht.

In jedem Versuch wurden in der Regel 5 Konzentrationsstufen bei zehnmaliger Wiederholung, falls nicht anders angegeben, geprüft. Die Abstufung der Konzentrationen erfolgte zumeist nach dem von BERAN et NEURURER (1955) und KOCH (1959) verwendeten Verfahren der « Halbierungsreihen ».

Versuchsbienen eines bestimmten Alters sammelte ich von den Waben und setzte sie im Laboratorium sofort in die mit einer bestimmten Insektizidmenge versehenen Käfige. In jeden Käfig wurden durch die Seitenöffnung 10 Bienen unbetäubt eingebracht und mit Futter (50%ige Zuckerlösung, mittels einer Injektionsspritze ins Röhrchen gesaugt) versorgt (Abb. 3).

Zur Kontrolle dienten ausschließlich mit Azeton in gleicher Weise behandelte Käfige. Mit wenigen Ausnahmen wurde in den Gift- und Kontrollversuchen die gleiche Anzahl von Bienen geprüft.

Die Käfige verblieben 24 Stunden lang bei der gewünschten Temperatur im Brutschrank. Nach dieser Zeit erfolgte eine Registrierung des Totenfalles. Auf die Einhaltung einer bestimmten rel. Feuchte im Innern des Brutschrankes wurde geachtet.

Bestimmung der per os- Giftwirkung

Die perorale Giftapplikation von *Dipterex SP 80* erfolgte auf der Basis der von GOETZE (1932) veröffentlichten Methode (WEAVER, 1949; BERAN et NEURURER, 1955; KOCH, 1959).

Die von den Waben des Pflegevolkes abgesammelten Bienen verblieben etwa 1 Stunde bei Zimmertemperatur ohne Futter, um das Futterbedürfnis zu steigern. Danach wurden sie unbetäubt einzeln in ein Glasröhrchen von etwa 70 mm Länge und 8 mm Durchmesser gebracht und erhielten individuell mittels einer geeichten Mikropipette die vorgesehene Giftmenge. Diese wurde in einer mit Aqua dest. hergestellten 50%igen Zuckerlösung frisch angesetzt. Die Benutzung von Leitungswasser führte zu unkontrollierten Versuchsbedingungen. Auch hier wurde die gleiche Anzahl von Dosierungsstufen bzw. Wiederholungen und nach demselben Verfahren wie bei den Kontaktversuchen geprüft. Vor dem Beginn der Applikation bestimmte ich den pH-Wert jeder Konzentrationsstufe.

Während der Fütterung aus der Mikropipette verblieb die Biene in dem Röhrchen. Die Aufnahme der süß schmeckenden Lösung erfolgte zumeist sehr schnell; so war die Verabreichung der Lösung an 80 — 100 Bienen etwa 2 Stunden nach ihrem Ansatz beendet. Alle Tiere erhielten mit je 10 mm³ des Zuckerwasser-Giftgemisches ein für alle Dosierungen konstantes Flüssigkeitsvolumen. Daß die Bienen die aufgenommene Giftlösung erbrachen, wie BERAN und NEURURER (1955) berichtet, konnte ich nicht beobachten. Die gleiche Anzahl von Kontrollbienen erhielt bei sonst gleichartiger Behandlung nur eine 50%ige Zuckerlösung.

Je 10 Tiere von den Gift- und Kontrollversuchen wurden in Holzkästchen getrennt untergebracht und, mit 50%iger Zuckerlösung als Futter, weiter wie bei den Kontaktversuchen im Brutschrank auf Verhalten und Überleben geprüft.

Während bei den Kontaktversuchen Bienen zwischen 5 — 12 und 20 — 32 Tage alt untersucht wurden, waren für die Fraßversuche nur Altbienen verwendbar, da die Jungbienen

(bis zum 12. Tag nach meiner Versuchsmethode) bei der Applikation dieses Mittels in vorgegebener Zeit keine ausreichende Menge aufnehmen.

Um eventuelle Fehlerquellen auszuschließen, habe ich die zu vergleichenden Versuchsreihen zur selben Zeit angesetzt, falls es nicht anders erwähnt ist.

c. — Versuchsauswertung

Die Versuchsbienen wurden 24 Stunden nach der Giftapplikation kontrolliert und die Anzahl der toten registriert.

Für die Bestimmung des Toxizitätsgrades der beiden Mittel wählte ich die LD₅₀.

Die Auswertung der Versuche ist nach dem Verfahren der « Probitanalyse » durchgeführt worden (BLISS, 1935; FINNEY, 1952; WEBER, 1964). Dadurch kann man am besten die mittlere letale Dosis (LD₅₀) feststellen (vgl. auch KOCH, 1959; FINK und HUND, 1965; FINK u.a., 1966)*.

Bei der Besprechung der Ergebnisse sind für jeden Versuch in den Tabellen die Regressionsgleichungen, die LD₅₀ und die relative Wirksamkeit mit den 95%-Vertrauensgrenzen, die X²-Werte für die Homogenität, Parallelität sowie relative Wirksamkeit und — soweit notwendig — die zugehörigen Freiheitsgrade angeben.

Die Tabellen sind die Wiedergabe von Varianzanalysen, bei der ein totales x² folgendermaßen aufgegliedert wurde :

	FG	Bemerkungen
	Degrés de liberté	Observations
1. Homogenität		
innerhalb der V ₁	n ₁ — 2	n _j = Anzahl der Dosierungen
Versuche V ₂	n ₂ — 2	Nombre des doses
..... :	:	
Homogénéité à l'intérieur de V _j	n _j — 2	(j = 1,2,..., m) =
l'essai V _m	n _m — 2	Index für den Versuch
(Somme)	Σn _j — 2m	Index de l'essai
(Somme)	m — 1	
2. Parallelität		
Parallélité		
(Somme)	Σn _j — (m + 1)	
(Somme)	m — 1	
3. rel. Wirksamkeit		
Activité relative		
(Somme) = Total	Σn _j — 2	
(Somme) = Total		

Die Versuche, bei denen für die Auswertung innerhalb jeder Dosis mit einer in der Regel aus 100 Bienen ermittelten Mortalität (in %) gerechnet worden ist, sind aus 2 — 5 Teilversuchen zusammengesetzt, die an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden. Vor der Zusammen-

* Die Rechnungen wurden weitgehend unter Benutzung von zwei Computer-Programmen über « Probitanalyse » im Mathematisch-Naturwissensch. Institut, Abt. elektron. Datenverarbeitung, IBM-7090/1410 — der Universität Bonn (Programm BMD0 3 S) und in dem Bayerwerk-Rechenzentrum, IBM-360/65 — Leverkusen durchgeführt. — Herrn Dr. Fink und Herrn Dipl. Mathem. Hund (Leverkusen) danke ich für ihre Hilfe.

fassung wurden die Teilversuche nach dem oben angegebenen Schema der Varianzanalyse auf Übereinstimmung, d.h. auf Reproduzierbarkeit geprüft. Von wenigen Ausnahmen abgesehen, die dann von der weiteren Verrechnung ausgeschlossen wurden, war die Bedingung der Reproduzierbarkeit stets erfüllt. Die natürliche Mortalität der Bienen in den Kontrollversuchen lag mit wenigen Ausnahmen sehr niedrig; sie wurde deshalb in den Rechnungen nicht berücksichtigt.

III. — ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei der Wiedergabe der Versuchsergebnisse in den Tabellen finden nachfolgende Symbole und Abkürzungen Verwendung :

u = untere Grenzen

o = obere Grenzen

LD₅₀ = nach Individualanpassung

+ = LD₅₀ nach Parallelanpassung

R = rel. Wirksamkeit (Numerus der Differenz der Logarithmen von LD₅₀ nach Parallelanpassung)

Irrtumswahrscheinlichkeit in Prozent :

> 5 = 0 (kein signifikanter Unterschied)

5-1 = *

1-0,1 = **

< 0,1 = ***

a. — Kontaktversuche unter Berücksichtigung von :

1. Alter

Die tatsächlich je Biene durch Kontakt bis zur Abtötung aufgenommene Giftmenge bleibt unbekannt. Eine exakte Berechnung ist nicht möglich, da die Giftaufnahme u.a. von der gleichmäßigen Verteilung, der Dicke der Schicht und der Bewegung der Bienen im Käfig abhängt (BERAN et NEURURER, 1955). Die Haltungsbedingungen der Bienen während der Versuchsdauer wie Raum, Futterangebot, Gasaustausch usw. können als geeignet betrachtet werden, da bei den Kontrollen keine oder nur eine sehr niedrige Sterblichkeit zu verzeichnen war.

Die Untersuchungen mit *DiDiTan* bei der Honigbiene ergaben, daß zwischen dem Alter der Tiere und der Wirksamkeit des Giftstoffes eine Abhängigkeit besteht (vgl. Tab. 2). Die Jungbienen waren empfindlicher als die älteren Bienen. Dieser Unterschied in der altersbedingten Empfindlichkeit konnte bei Bienen verschiedener Rassen und für zwei Temperaturstufen nachgewiesen werden. Auffallend ist die unterschiedliche Anfälligkeit von Jung- und Altbienen (*Caucasica*) bei 35° C. Die LD₅₀ wurde für die 5-9 Tage alten Bienen mit 216, 5 mcg und für die 22-26 Tage alten Tiere mit 250,2 mcg ermittelt.

1) Kontaktversuche

1) Essais par contact

TAB. 2. — Vergleich zwischen Bienen verschiedenen Alters.

TABL. 2. — Comparaison d'abeilles de différents âges.

Carnica « Trifolium » (CT) > 1 = Alter 5.-9. Tag, 2 = Alter 22.-26. Tag; Temp. $22 \pm 1^\circ \text{C}$; rel. Luftf. 65-85 %.
Caucasica (C) > 1 = Alter 5.-9. Tag, 2 = Alter 22.-26. Tag; Temp. $22 \pm 1^\circ \text{C}$; rel. Luftf. 65-85 %.
Caucasica (c) > 1 = Alter 5.-9. Tag, 2 = Alter 22.-26. Tag; Temp. $35 \pm 1^\circ \text{C}$; rel. Luftf. 55-65 %.

Bienenvolk	Probitgrade a b	Homogenität FG χ^2	LD ₅₀ u o	Parallelität a b χ^2	Rel. Wirksamkeit u R o χ^2
CT	— 6,28 6,80	3 3,082	43,8 45,6 47,0	— 6,27 6,80 0,001	45,4 ⁺ 1,014 1,074 1,139 6,076*
	— 6,48 6,79	3 1,576	47,0 49,0 51,3	— 6,48	48,8 ⁺
C	— 7,95 7,68	3 4,625	46,8 48,6 50,6	— 7,69 7,53 0,106	56,3 ⁺ 1,027 1,084 1,145 8,259**
	— 7,68 7,36	3 2,563	50,7 52,9 55,6	— 7,96	61,3 ⁺
c*	— 23,99 12,41	3 2,195	211,3 216,5 221,6	— 24,01 12,42 0,001	216,7 ⁺ 0,837 0,865 0,893 63,732***
	— 24,82 12,43	3 2,382	244,6 250,2 256,0	— 24,79	250,2 ⁺

* Diese Versuche fanden an verschiedenen Tagen statt. = Ces essais ont eu lieu des jours différents.

LD₅₀ = Menge (in mcg) *DiDiTan Ultra*, verteilt auf 75 cm² Fläche. = Quantité (en mcg) de *DiDiTan Ultra*, répartie sur 75 cm² de surface.

N.B. — On trouvera dans les tableaux 2 à 10 un certain nombre de termes et d'abréviations revenant de façon constante : nous en donnons ci-dessous la traduction ou le sens :

Alter : âge.

Tag : jour.

Temp. : température.

rel. Luftf. : humidité relative de l'air.

Bienenvolk : colonie d'abeilles.

Probitgrade : droite probit.

Homogenität : homogénéité.

LD₅₀ : DL₅₀ après ajustement individuel.

Parallelität : parallélité.

R = Rel. Wirksamkeit : activité relative de DL₅₀ après ajustement parallèle. (Différence des log.)

u = limite inférieure.

o = limite supérieure.

+ = DL₅₀ après ajustement parallèle.

Erreure probable en % :

> 5 = 0 (Pas de différence significative).

5 — 1 = *

1 — 0,1 = **

< 0,1 = ***

pH Werte : valeurs du pH.

Winterbienen : abeilles d'hiver.

FG : Degrés de liberté.

Unterschiedliche Empfindlichkeit bei Jung- und Altbienen gegenüber *DDT* haben auch GRAVES und MACKENSEN (1965) festgestellt. Obwohl das Alter der von ihnen als Stockbienen bezeichneten Versuchsgruppe unbekannt war, nehmen die Autoren an, daß die meisten getesteten Stockbienen älter als die eindeutig klassifizierten 2-8 Tage alten Tiere waren. Ihr Ergebnis, daß die 8 Tage alten Bienen empfindlicher als die vom 4. und 6. Tag reagierten, ist offenbar auf die verwendete Methode zurückzuführen; die 8 Tage lang im Käfig eingesperrten Bienen erfuhren wahrscheinlich eine größere Schwächung als die nur 4 oder 6 Tage unter diesen Bedingungen gehaltenen Tiere. Die höchste Mortalität wiesen die 2 Tage alten Bienen auf.

Bei per os-Versuchen mit *DDT* (rein) ermittelte Koch (1959) unterschiedliche Toxizitätswerte bei Jung- und Altbienen. Die LD_{50} lag bei Bienen zwischen dem 5. und 9. Tag bei 5, 9 mcg/Biene, bei älteren Tieren (17. - 21. und 30. - 32. Tag) bei 11,2-12,1 mcg/Biene.

Für andere Insektenspecies hat man verschiedene Mechanismen der unterschiedlichen *DDT*-Resistenz bei Larven und Imagines angeführt: Vermindertes Eindringungsvermögen durch die stärker ausgebildete Cuticula bei Imagines (BÖHM, 1951), Speicherung des *DDT* in Fett- und Lipoidreserven des Körpers mit nachfolgendem fermentativem Umbau in ungiftige Dichlorphenylelessigsäure (*DDE*) oder Dichlordiphenyläthylen (*DDA*) (Zusammenfassung siehe MARTIN, 1967; KLEIN und KORTE 1970).

Für *Apis mellifica* liegen bisher keinerlei physiologische Untersuchungen vor, die eine Erklärung der unterschiedlichen Empfindlichkeit von Jungbienen und älteren Imagines bei unterschiedlich hohen Temperaturen liefern.

2. Rasse und Inzuchtgrad

Wie aus den Tabellen 3 und 4 zu ersehen ist, wurden signifikant unterschiedliche Werte zwischen Bienen verschiedener Rassen bzw. Herkünfte festgestellt.

Bei einem Vergleich zwischen den Bienenrassen *Carnica* und *Caucasica* reagierten *Carnica*-Bienen empfindlicher gegenüber *DiDiTan Ultra* als die *Caucasica*-Bienen. Dieser Unterschied ist besonders deutlich bei der Temperatur von 35° C mit einer LD_{50} bei der *Carnica*-Rasse von 209,1 mcg und 250,2 mcg bei der *Caucasica*-Rasse. Eine erhöhte Widerstandsfähigkeit der *Caucasica*-Winterbienen gegenüber dem Präparat im Vergleich zu den *Ligustica*-Winterbienen war ebenfalls bei 22° C nachweisbar.

Die bisher dargestellten Versuchsergebnisse machen außerdem deutlich, daß die Umwelttemperatur und die Wirkung des Präparates *DiDiTan Ultra* auf die Honigbiene eng korreliert sind (Tab. 2 et 3). Während bei 22° C die LD_{50} zwischen 45-57 mcg schwanken, betragen sie bei 35° C 209-250 mcg. Die für 35° C ermittelten Wirkungsgeraden verlaufen bedeutend steiler als die bei 22° C, so daß keine rel. Wirksamkeit (Parallelanpassung) zustande kommt.

TAB. 3. — *Vergleich zwischen Bienen verschiedener Rassen.*

TABL. 3. — *Comparaison d'abeilles de différentes races.*

Carnica « Trifolium » (CT) > Alter 5.-9. und 22.-26. Tag; Temp. 22 ± 1° C; rel. Luftf. 65-85 %.
Caucasica
Carnica « Trifolium » (C) > Alter 22.-26. Tag; Temp. 35 ± 1° C; rel. Luftf. 55-65 %.
Caucasica
Caucasica (CW) > Alter 28.-32. Tag; Temp. 22 ± 1° C; rel. Luftf. 60-85 %; Winterbienen.
Ligustica « Piana » (LW)

Bienenvolk	Probitgrade a b	Homogenität FG %	LD ₅₀ u o	Parallelität a b %	u	Rel. Wirksamkeit R o %
CT	— 6,32	3 3,858	45,9 47,3	— 6,85	1,036	47,2 ⁺ 1,078 1,122 13,979***
CC	— 7,72	3 6,710	49,2 50,6	— 7,08		50,8 ⁺
C	— 18,41	3 1,373	202,7 209,1	— 20,84	1,152	209,7 ⁺ 1,192 1,236 77,238***
Cc	— 24,83	3 2,382	244,6 250,2	— 21,69		250,0 ⁺
CW ¹	— 7,51	3 4,541	54,6 56,8	— 7,76	0,822	56,4 ⁺ 0,868 0,913 25,457***
LW ¹	— 7,56	3 7,118	47,4 49,3	— 7,31		49,3 ⁺

¹ Für die Kontrolle wurden nur 250 Bienen je Versuchsreihe gebraucht.

Comme témoins on a utilisé seulement 250 abeilles par série d'essais.

TAB. 4. — *Vergleich zwischen Bienen verschiedener Rassen bzw. Herkünfte :*TABL. 4. — *Comparison d'abeilles de différentes races ou d'origines différentes pour une même race.**Ligustica* « Piana » (LP) ; *Carnica* : mazedonisch (M), österreichisch (O), ungarisch (U),
Macédoine (M), Autriche (O), Hongrie (U).Alter 8.-12. und 25.-30 Tag; Temp. $22 \pm 1^\circ \text{C}$; rel. Luftf. 60-80 %.

Bienenvolk	Probitgrade		Homogenität FG	LD_{50}		Parallelität		Rel. Wirksamkeit	
	a	b		u	o	a	b	u	R o
LP*	— 6,56	7,13	3	39,9	41,8	— 7,97		1,089	1,149
M	— 9,22	8,45	2	46,5	48,2	— 8,45	7,99	1,012	1,214
O	— 9,37	8,69	2	43,3	45,1	— 8,20	(2 FG)	0,881	1,130
M	— 9,22	8,45	2	46	48,2	— 7,93		0,910	0,963
U	— 6,81	6,94	2	48	50,3	— 8,05	1,338	50,1+	1,4592

* Diese Versuchsreihe wurde getrennt getestet.

Ces séries d'essais ont été testées séparément

(†) Zwischen LP und M = 23,2384*** ; LD_{50} nach Parallelaanpassung : LP = 42,0 ; M = 48,2.

Entre LP et O = 5,9475* ; LD_{50} après ajustement parallèle LP = 42,1 ; O = 44,9
 » M » O = 7,1678** ; » » M = 48,4 ; O = 45,1
 » U » O = 14,8468*** ; » » U = 50,1 ; O = 44,8
 » U » LP = 32,2166*** ; » » U = 50,3 ; LP = 41,9
 » M » U = 1,4592° ;

Die obigen Befunde bestätigen die Ergebnisse von HÄFLIGER (1949, 1954), daß DDT bzw. DDT-Präparate einen negativen Temperaturkoeffizienten besitzen, d.h. daß ihre Wirkung mit steigender Temperatur sinkt (KAESER, 1949; KOCH, 1959).

Unterschiede konnte ich zwischen *Ligustica* und verschiedenen *Carnica*-Herkünften feststellen (Tab. 4). Ein Vergleich zeigt, daß die für diesen Versuch zur Verfügung stehenden *Carnica*-Bienen ungarischer und mazedonischer Herkunft widerstandsfähiger sind als die österreichischer Herkunft. Zwischen ungarischen und mazedonischen *Carnica*-Bienen konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Merkliche Unterschiede bestanden dagegen zwischen den *Carnica*-Herkünften und *Ligustica*. Bienen dieser Rasse zeigten die höchste Empfindlichkeit gegenüber *DiDiTan Ultra*.

Aus den bisherigen Versuchsergebnissen wird außerdem deutlich, daß die *Caucasica*-Bienen eine höhere Toleranz gegenüber dem Präparat aufweisen als die Tiere der *Carnica*- und *Ligustica*-Rasse. Dieser Tatbestand wird in der Literatur als « rassenspezifische Ansprechbarkeit » bezeichnet und spielt vor allem eine besondere Rolle für die Prüfung von Pflanzenschutzmitteln auf ihren Toxizitätsgrad (UNTERSTENHÖFER, 1970).

Möglicherweise hat u.a. die unterschiedliche Körperkonstitution der Bienen zu diesem Ergebnis beigetragen; denn die *Caucasica*-Bienen waren größer und schwerer als die *Carnica*- bzw. *Ligustica*-Bienen. Stichproben von jeweils 10 vergifteten Bienen aus diesen Rassen ergaben, daß die *Caucasica*-Bienen ein um 10 -20% höheres Gewicht als die Tiere der *Carnica*- bzw. *Ligustica*-Rasse hatten.

Mit der Frage, ob zwischen Giftmenge und Körpergewicht der Insekten eine Beziehung besteht, haben sich BERAN (1953) und WAY (1954) befaßt. BERAN (1953) stellte nach DDT-Dauerkontaktbehandlung bei der Hausfliege fest, daß mit steigendem Gewicht der Fliegen die Mortalitätsquote abnahm. Nach WAY (1954) stieg die Widerstandsfähigkeit der Larven von *Diataraxia oleracea* L. nach DDT-Behandlung mit Verdoppelung des Gewichtes auf das 11 bis 12fache.

Zwischen den von mir und den von BERAN und NEURURER (1955) in ihrem Cellophankäfig-Test festgestellten Werten besteht trotz der verschiedenartigen Methoden im allgemeinen eine gute Übereinstimmung.

Da Inzucht im allgemeinen mit einer verminderten Vitalität der Organismen gekoppelt ist, wurde auch hier die Widerstandsfähigkeit von zwei ingezüchteten Bienen-Linien (*Carnica*) und ihrem Kreuzungsprodukt (Bienen der 1. Generation) gegenüber *DiDiTan Ultra* geprüft (Tab. 5).

Die untersuchten Bienen der Kreuzungs-Generation ($F = 0,03$) reagierten gegenüber dem Präparat gleichsinnig wie die des Vaternvolkes ($F = 0,25$), die Tiere dieser beiden Völker waren widerstandsfähiger als die Bienen des anderen Elternteils (Muttervolk $F = 0,25$); die ermittelten LD_{50} liegen jedoch auf der

TAB. 5. - Vergleich zwischen ingezüchteten Carnica-Bienen

TABL. 5. - Comparaison d'abeilles Carnica consanguines

1. = (F = 0,25); 2. = (F = 0,03), F₁-Generation - Kreuzung von 1. ♀ × 2. ♂ ♂
 Génération F₁ - Croisement de 1. ♀ × 2. ♂ ♂

Alter 20.-25. Tag; Temp. 22 ± 1° C; rel. Luftf. 60-80 %

Bienenvolk	Probitgerade		Homogenität FG	LD ₅₀		Parallelität		Rel. Wirksamkeit	
	a	b		u	o	a	b	u	R o
1.	— 4,95	6,14	2	39,4	41,8 44,0	—	5,11	1,088	41,7 ⁺ 1,165 1,250
2.	— 6,16	6,61	2	46,4	48,7 51,1	—	5,53 6,24 (2 FG)	1,049	48,7 ⁺ 1,124 1,207 19,713 ¹ (2 FG)
3.	— 5,04	6,00	2	44,6	47,0 49,5	—	5,43	0,899	47,0 ⁺ 0,965 1,035

¹ Zwischen 1 und 2 = 18,4393***

Entre 1 et 3 = 10,3972**

» 2 » 3 = 1,09070

Für die Kontrolle wurden 250 Bienen pro Versuchsvolk untersucht.

Comme témoins on a examiné 250 abeilles par colonie expérimentale.

TAB. 6. — *Vergleich zwischen Bienen (Carnica) bei Licht — (L) und Dunkelhaltung (D) während der Versuchsdauer*TABL. 6. — *Comparaison entre abeilles (Carnica) à la lumière (L) et à l'obscurité (D) pendant la durée de l'essai*

Alter 22.-25. Tag; Temp. 28 ± 1,5° C; rel. Luftf. 60-75 %

Reihe	Probitgrade a	Probitgrade b	Homogenität FG	Homogenität χ^2	LD ₅₀ u	LD ₅₀ o	Parallelität a	Parallelität b	Parallelität χ^2	u	Rel. Wirksamkeit R	o	χ^2
L	—	7,57	6,04	3	2,988	115,4	120,7	127,0	—	8,48	120,3 ⁺		
D	—	8,66	6,93	3	10,313	73,1	93,3	105,6	—	7,75	0,770	0,686	0,841 66,7679***
											92,8 ⁺		

TAB. 7. — *Vergleich zwischen Winterbienen (Carnica) mit Nosemasporen (N) infiziert und nicht infiziert (n)*TABL. 7. — *Comparaison entre abeilles d'hiver (Carnica) infectées avec des spores de Nosema (N) et non infectées (n)*

Alter 25.-30. Tag; Temp. 22 ± 1° C; rel. Luftf. 60-85 %

Reihe	Probitgrade a	Probitgrade b	Homogenität FG	Homogenität χ^2	LD ₅₀ u	LD ₅₀ o	Parallelität a	Parallelität b	Parallelität χ^2	u	Rel. Wirksamkeit R	o	χ^2
N	—	0,96	3,91	3	6,614	30,7	33,4	35,9	—	1,45	33,8 ⁺		
n	—	2,74	4,67	3	5,813	42,9	45,7	49,0	4,22	1,287	1,251	1,368	1,509 41,8127***
											46,2 ⁺		

Kontrollversuche : Beim Versuch N betrug die Mortalität 4,6 % und bei n = 3 %.

Témoins : dans l'essai N la mortalité fut de 4,6 % et de 3 % pour n.

Der Nosemabefall der untersuchten Bienen wurde nach Coetzee u.a. (1959) klassifiziert (1 = je Gesichtsfeld vereinzelte Sporen, 2 = mittlerer Befall, 3 = starker Befall) und in Prozent ausgedrückt : Infizierte Bienen (N) : 1 = 15 %, 2 — 3 = 30 %; nicht infizierte (n) : 1 = 3 %, 2 — 3 = 7 %.

L'infection par Nosema des abeilles examinées a été évaluée selon Coetzee, entre autres, (1959) (1 = quelques spores isolées par champ visuel, 2 = infection moyenne, 3 = infection forte) et exprimée en % : Abeilles infectées (N) : 1 = 15 %, 2-3 = 30 %; non infectées (n) : 1 = 3 %, 2-3 = 7 %.

gleichen Ebene wie bei den vorstehend genannten untersuchten Bienenvölkern.

3. Licht- und Dunkelhaltung

Es ergab sich eine signifikant höhere Mortalität, wenn die Tiere während der Versuchsdauer bei Dunkelheit gehalten werden (Tab. 6). Vermutlich beruht dieser Unterschied darauf, daß die Bienen bei Licht aktiver waren und somit einen erhöhten Stoffwechsel hatten.

Die insektizide Wirkung von *DDT* ist eng mit der Umwelt- und Körpertemperatur der Insekten verbunden (HÄFLIGER, 1948). Nach Angaben mehrerer Autoren zeigt *DDT* — wie erwähnt — einen negativen Temperaturkoeffizienten bei Insekten (HÄFLIGER, 1949, 1954; KAESER, 1949; GUTHRIE, 1950; TAHORI und HOSKINS, 1953; KOCH, 1959).

Wahrscheinlich entwickeln die Bienen im Licht infolge gesteigerter Aktivität eine höhere Körpertemperatur als Tiere bei Dunkelhaltung. Die Toleranz größerer Giftmengen ist die Folge.

Laboratoriumsversuche über die Wirkung von Insektiziden auf die Honigbiene in künstlichem Licht sind mir nicht bekannt. Mehrere Autoren haben dagegen die Lichtverhältnisse und die Insektizidwirkungen auf andere Insektenarten untersucht.

LINDQUIST et al. (1946) stellten fest, daß sowohl UV-Licht als auch Sonnenlicht die Wirksemkeit von *DDT* gegen die Hausfliege herabsetzte. Andere Forscher berichten hierzu, daß eine verminderte *DDT*-Wirkung bei Sonnen- bzw. UV-Licht-Exposition eintritt (CHISHOLM u. KOBLITSKY, 1947; CHISHOLM et al. 1949; FLECK, 1949).

Versuche unter Anwendung mehrerer Pflanzenschutzmittel in künstlichem Licht gegen den Baumwollkapselkäfer (*Anthonomus grandis*) haben amerikanische Autoren durchgeführt. Sie fanden die Insektizidwirkung von *Parathion* gegen diesen Schädling im Licht niedriger als in Dunkelheit. Die Toxizität von *Parathion* war von der Lichtintensität abhängig. Sie nahm mit zunehmender Helligkeit ab und erreichte bei völliger Abdunkelung ihr Maximum (DRÖSSMAR, 1965; MISTRIC und GAINES, 1953).

4. Nosemainfektion

Ein enger Zusammenhang zwischen der Wirkung von *DiDiTan Ultra* und dem physiologischen Zustand der Bienen ließ sich im Versuch mit den mit *Nosema* infizierten und nicht infizierten Tieren nachweisen (Tab. 7). Die mit *Nosema* infizierten Bienen waren empfindlicher als die nicht infizierten. Die LD_{50} betrug bei ersteren 33,4 mcg und bei den nicht infizierten Tieren 45, 7.

Auffallend bei den Versuchen mit nosemainfizierten Bienen war die höhere Sterblichkeit der Kontrolltiere (Tab. 7). Dies ist offensichtlich methodisch bedingt, da die Tiere 5-8 Tage im Brutschrank gehalten und nur mit Zuckerwasser versorgt wurden.

STUTE (1966) stellte fest, daß zahlreiche eingeschickte Proben von vergifteten Bienen zugleich Nosemabefall aufwiesen. Im allgemeinen ist, wie THIEM (zit. EICHLER, 1965) und MEYERHOF (zit. EICHLER, 1965) ausführen, eine Giftanfälligkeit der Honigbiene parallel zu ihrem Nosema-Infektionsgrad anzunehmen.

b. — Fütterungsversuche, unter Berücksichtigung von :

1. Rasse

Während bei den Kontaktversuchen nur ein « qualitativer » Vergleich von Bienengruppen gegenüber dem in ihrem Milieu diffus angebotenen Präparat möglich war, konnte bei oraler Applikation die Wirkung des Giftes bei der einzelnen Honigbiene in Korrelation zur aufgewendeten Menge genau bestimmt werden.

Im Verlauf meiner Untersuchungen zeigte sich, daß die Wirkung von *Dipterex SP 80* bei der Biene eng mit dem pH-Wert der verabreichten Lösung bei definierter Giftkonzentration verbunden war.

Fraßversuche bei Gruppen von *Carnica*-Bienen (20.-25. Lebenstag), denen 1,5 mcg *Dipterex SP 80* je Biene innerhalb von 60 Minuten nach Bereitung der Lösung mit Leitungswasser verabreicht wurden, führten zu folgendem Ergebnis :

Fraßversuche mit Dipterex SP 80 bei Carnica-Bienen (20. — 25. Tag.)
Versuchsdauer : 24 Std. ; Temp. 22° C ; rel. Luftf. 60 — 80 %

Versuch	Anzahl gefütterte Bienen	Darbietungszeit in Minuten nach Ansetzen der Lösung	tote Bienen
Essai	Nombre des abeilles nourries	Temps (en minutes) entre la préparation de la solution et sa présentation aux abeilles	Abeilles mortes
1.	20 20 20	1. — 19. 20. — 39. 40. — 60.	6 13 18
2.	20 20 20	1. — 19. 20. — 39. 40. — 60.	3 11 18

Es liegt somit eine Korrelation zwischen zunehmender Mortalität der Bienen und der Darbietungszeit der *Dipterex*-Lösung nach ihrer Bereitung vor. Dieses Phänomen läßt sich durch die chemischen Eigenschaften des Mittels erklären. Der Wirkstoff ist im Wasser instabil und setzt sich leicht in die verwandte Verbindung « Dichlorphos » (*DDVP*) um, die erheblich giftiger für die Biene ist als *Dipterex* (BERAN, 1965 ; ANDERSON und ATKINS, 1966).

Wenn die gleiche Applikationsmenge (1,5 mcg/Biene) den Bienen 2 und

mehr Stunden nach Bereitung der Lösung zugeführt wurde, ergab sie innerhalb weniger Stunden eine 100 % ige Mortalität der Tiere. Danach kann die Hauptursache der grossen Differenz zwischen den Ergebnissen anderer Autoren (MAURIZIO u. SCHENKER, 1957; BERAN, 1958) in den unterschiedlichen pH-Werten bzw. in unterschiedlichem Alter der applizierten Lösung gesucht werden.

Diese Umlagerung in wässriger Lösung verursachte auch wohl die unterschiedlichen Glashaus-Versuchsergebnisse mit *Dipterex* auf die Honigbiene (BERAN und NEURURER, 1956).

Per os-Versuche mit Nektar, der aus mit *Dipterex* behandelten Pflanzen (*Borago officinalis*) gewonnen wurde, zeigten nach MAURIZIO und SCHENKER (1957) eine sehr hohe Bientoxizität bis 48 Stunden nach der Pflanzenbehandlung.

Andere Autoren (UNTERSTENHÖFER, 1957; ANDERSON et ATKINS, 1958) betrachten *Dipterex* als nicht gefährlich für die Biene. Diese Auffassung ist aber nur dann gültig, wenn das Mittel als Kontaktinsektizid Verwendung findet. Ich konnte unter ständiger Kontrolle des pH-Wertes der verabreichten Insektizid-Lösung den toxischen Effekt des Präparates bei Bienen unterschiedlicher genetischer Herkunft und bei bestimmten Umweltbedingungen ermitteln (Tab. 8).

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, waren die in meinem Versuch verwendeten *Caucasica*-Bienen widerstandsfähiger als die *Carnica*-Bienen. Dieser Unterschied zeigte sich eindeutig bei Temperaturen von 22° C und 35° C.

Beim Vergleich der ersten zwei Versuchsreihen der Tabelle ist festzustellen, daß (mit kleiner Differenzierung der untersuchten pH-Wert-Bereiche der applizierten Giftlösung) die Wirksamkeit des Präparates von der Temperatur abhängt. Die mittlere letale Dosis (mcg pro Biene) beträgt bei 35° C bei den *Carnica*-Bienen 3,2 und bei den *Caucasica*-Bienen 4,3. Sie ist bei 22° C mit 6,3 bei *Carnica*-Bienen und mit 7 bei *Caucasica*-Tieren etwa doppelt so hoch.

Im Gegensatz zu *DiDiTan Ultra* besitzt *Dipterex SP 80* also einen positiven Temperaturkoeffizienten.

Signifikant ist auch die Differenz zwischen der Sterblichkeitsrate bei *Caucasica*- und *Ligustica*-Winterbienen (Tab. 8). Die *Caucasica*-Bienen vertrugen etwa die doppelte Giftmenge wie die *Ligustica*.

2. Licht- und Dunkelhaltung

Tab. 9 zeigt die erhöhte Giftmenge, die zur Erzielung des gleichen Effektes bei Licht erforderlich war.

Wie auch bei den Kontaktversuchen nahmen die Bienen bei Licht mehr normales Futter auf als die Tiere im abgedunkelten Brutschrank.

Eine derartige Herabsetzung der toxischen Wirkung durch Haltung der

2) Per os-Versuche
(LD₅₀ = in mcg/Biene)

2) Essais per os
(DL₅₀ = en mcg/Abeille)

TAB. 8. — *Vergleich zwischen Bienen verschiedener Rassen*

TABL. 8. — *Comparaison d'abeilles de différentes races*

Carnica « Trifolium » (CT) > Temp. 22 ± 1° C; rel. Luftf. 60-80 %; pH-Wert = 5,7-6,2; Alter 20.-25. Tag.
Caucasica (CC)
Carnica « Trifolium » (Ct) > Temp. 35 ± 1° C; rel. Luftf. 55-70 %; pH-Wert = 5,9-6,3; Alter 20.-25. Tag.
Caucasica (Cc)
Caucasica (CW) > Temp. 22 ± 1° C; rel. Luftf. 60-85 %; pH-Wert = 6,5-7,1; Alter 26.-32. Tag, Winterbienen.
Ligustica « Piana » (LW)

Bienenvolk	Probitgerade a b	Homogenität FG / ²	LD ₅₀ u o	Parallelität a b / ²	Rel. Wirksamkeit u R o / ²
CT	0,35	3 5,874	6,0 6,3 6,6	0,24	6,2+ 1,061 1,129 1,207 11,4466***
CC	— 0,21	3 2,938	6,7 7,0 7,5	— 0,08	7,0+
Ct	2,74	3 1,234	3,0 3,2 3,4	2,84	3,2+ 1,226 1,336 1,465 37,0007***
Cc	2,41	3 4,966	4,0 4,3 4,6	2,30	4,3+
CW ¹	2,02	2 0,390	20,6 24,2 30,2	1,72	23,3+ 0,405 0,481 0,552 61,5029***
LW ¹	2,20	2 2,088	9,9 11,3 12,7	2,48	11,2+

¹ Die Dosen sind mit 10 multipliziert, um das Auftreten negativer Logarithmen zu vermeiden. Die Bezugsgrößen sind daher für die Regressionsgleichungen nicht mcg, sondern 10 x mcg. Für die Kontrollversuche wurden 200 Bienen je Versuch getestet.

Les doses sont multipliées par 10 pour éviter l'apparition de Logarithmes négatifs. Les données utilisées dans les équations de régression ne sont donc pas exprimées en mcg mais en 10 x mcg.

Comme témoins on a utilisé 200 abeilles par essai.

TAB. 9. - *Vergleich zwischen Bienen (Caucasica) bei Licht - (L) und Dunkelhaltung (D) während der Versuchsdauer*
 TABL. 9. - *Comparison d'abeilles (Caucasica) maintenues soit à la lumière (L) soit à l'obscurité (D) pendant la durée de l'essai*

Alter 22.-25. Tag; Temp. $28 \pm 2^\circ \text{C}$; rel. Luftf. 60-75 %; pH-Wert = 6,0-6,6

Reihe	Probitgrade		Homogenität FG	LD ₅₀		Parallelität		Rel. Wirksamkeit	
	a	b		u	o	a	b	u	R o
L	2,96	3,36	3	3,7	4,1 4,4	2,94	3,38 0,012	4,1 ⁺ 0,716	0,807 0,904 12,9258***
D	3,25	3,40	3	3,0	3,3 3,6	3,26		3,2 ⁺	

TAB. 10. - *Vergleich zwischen Winterbienen (Carnica) mit Nosemasporen (N) infiziert und nicht infiziert (n)*
 TABL. 10. - *Comparison d'abeilles d'hiver (Carnica) infectées avec des spores de Nosema (N) et non infectées (n)*

Alter 25.-30. Tag; Temp. $22 \pm 1^\circ \text{C}$; rel. Luftf. 60-85 %; pH-Wert = 6,5-6,9

Reihe	Probitgrade		Homogenität FG	LD ₅₀		Parallelität		Rel. Wirksamkeit	
	a	b		u	o	a	b	u	R o
N ¹	1,18	2,89	3	18,2	20,9 23,9	0,67	3,27 1,788	21,9 ⁺ 1,176	1,383 1,632 16,531***
n ¹	— 0,54	3,77	3	26,6	29,5 32,5	0,21		29,5 ⁺	

¹ Für die Rechnungen mußten die Dosenwerte mit 10 multipliziert werden (vgl. Tab. 8 : CW, LW). Kontrollversuche : Bei N = 5 % und bei n = 3,75 % Mortalität (Ergebnis aus 240 Bienen je Versuch). Nosemabefunde (vgl. Tab. 9) : Infizierte Bienen (N) : 1 = 14 %, 2 — 3 = 39 % ; nicht infizierte (n) : 1 = 4 %, 2 — 3 = 9 %.

Pour les calculs les valeurs des doses ont dû être multipliées par 10 (cf. Tab. 8 : CW, LW)
 Témoins : pour N = 5 % et pour n = 3,75 % de mortalité (résultat obtenu sur 240 abeilles par essai).
 Présence de Nosema (cf. Tab. 9) : abeilles infectées (N) : 1 = 14 %, 2-3 = 39 % non infectées (n) : 1 = 4 %, 2-3 = 9 %.

Tiere im Licht nach der Giftapplikation wurde bei verschiedenen Insektiziden und bei anderen Insektenarten nachgewiesen (s.S. 13).

3. Nosemainfektion

Die Giftosis (LD_{50}) von *Dipterex SP 80* bei Bienen, die mit Nosemasporen infiziert waren, lag niedriger als bei den nicht infizierten, wie aus Tabelle 10 ersichtlich ist. Dieser Unterschied spricht für eine erhöhte Anfälligkeit von nosemainfizierten Bienen gegen Fraßgifte aus der Phosphorsäureestergruppe.

Wie bei den Kontaktversuchen führten auch hier methodische Gründe zu einer erhöhten Mortalität bei den Kontrollbienen (vergl. Tab. 7).

Eingegangen im Juni 1971.

Reçu pour publication en juin 1971.

RÉSUMÉ

Bien qu'une méthode normalisée soit utilisée pour tester la toxicité des produits phytosanitaires à l'égard de l'abeille, on constate souvent que les répétitions donnent des résultats divergents. Afin de déterminer l'influence de facteurs qui ne sont pas pris en considération par la méthode standard on a étudié : l'âge des abeilles, la race et le degré de consanguinité, l'éclaircissement et l'infection par noséma. Pour mettre en évidence une éventuelle résistance différentielle on a utilisé comme poison de contact le DiDiTan Ultra (DDT) et comme poison par ingestion le Dipterex (ester phosphorique). L'interprétation des résultats — influence des facteurs énumérés ci-dessus sur la $D.L._{50}$ — a été faite au moyen de l'analyse probit. Pour une application plus exacte du poison de contact on a mis au point une cagette monoservice composée d'un anneau de matière plastique et de feuilles de cellophane (Fig. 1-4). L'utilisation *per os* du Dipterex a été faite par nourrissage individuel d'abeilles âgées de plus de 10 jours.

Le tableau 2 montre l'influence de l'âge des abeilles expérimentales sur leur sensibilité au poison. Les jeunes abeilles sont plus sensibles que les abeilles âgées; ceci est valable en général pour plusieurs races étudiées. Très net également est le coefficient de température négatif du DDT; lorsque la température augmente la toxicité diminue. Si on compare entre eux des représentants de plusieurs races, on constate que les caucasiennes sont les plus résistantes (Tableau 3). Dans ce cas il se peut que le phénomène soit en rapport avec le poids individuel généralement plus élevé des abeilles caucasiennes. A l'intérieur même d'une race — on a étudié des carnioliennes de trois origines géographiques différentes — on peut mettre en évidence une sensibilité différentielle (Tableau 4). Les connaissances antérieures sur l'action du Dipterex ont été confirmées (Tableau 8).

On sait que, fréquemment, la consanguinité est liée à une diminution de la vitalité. Une comparaison de deux lignées consanguines ($F = 0,25$), développées à partir du même matériel de départ, a montré une différence significative de la résistance de ces deux lignées (Tableau 5). Les abeilles de la génération F_1 après croisement ($F = 0,03$) correspondaient, par leur moins grande sensibilité, à la lignée paternelle, laquelle se situait dans le domaine normal des colonies carnioliennes non consanguines.

Lorsque les abeilles étaient maintenues à l'obscurité après contact avec le DDT leur DL_{50} était plus basse que lorsqu'elles étaient maintenues à la lumière (Tableau 6). L'activité accrue pendant l'éclairement augmentait probablement la température du corps ce qui avait pour conséquence de permettre la manifestation du coefficient de température négatif du DDT. L'éclairement ou l'obscurité après le nourrissage au Dipterex montraient un effet semblable (Tableau 9).

Le fait qu'on mette fréquemment en évidence une infection par nosema chez les abeilles intoxiquées laisse présumer que cette infection influence défavorablement la résistance aux toxiques. Les tableaux 7 et 10 démontrent l'abaissement de la DL_{50} chez les abeilles infectées artificiellement lorsqu'on les soumet à l'action du DDT et du Dipterex.

Une observation effectuée sur l'utilisation du Dipterex mérite encore d'être signalée. La toxicité de ce produit dépend de façon décisive de la valeur du pH du milieu aqueux dans lequel il est employé ainsi que du temps qui s'écoule entre la confection de la solution et son utilisation. La toxicité du Dipterex est plus élevée en milieu alcalin qu'en milieu acide; la toxicité augmente avec le vieillissement de la solution (Voir le tableau page 18, expériences de nourrissage).

Les résultats ci-dessus exposés donnent une indication sur les causes des différences obtenues dans les tests de toxicité de produits phytosanitaires, même lorsqu'une méthode standard est utilisée.

LITERATURVERZEICHNIS

- ANDERSON L.D., ATKINS E.L., 1958. Toxicity of Pesticides to Honey Bees in Laboratory and Field in Southern California. *J. of Econ. Entom.*, **51**, 103-108.
 1965. Research on the Effect of Pesticides on Honey Bees. *Amer. Bee J.*, **106**, 206-208, 1966.
 Pesticides usage in relation to beekeeping. *Ann. Rev. Entom.*, **13**, 213-238, 1968.
- ATKINS E.L., ANDERSON L.D., 1962. DDT resistance in honey bees, *J. Econ., Entom.*, **55**, 791-92.
- BERAN F., NEURURER J., 1955. Zur Kenntnis der Wirkung von Pflanzenschutzmitteln auf die Honigbiene (*Apis mellifica* L.) 1. Mitteilung. Bienengiftigkeit von Pflanzenschutzmitteln. (Wien) *Pflanzenschutzberichte*, **15**, 98-147.
- BLISS C.I., 1935. The calculation of the dosage mortality curve. *Ann. Applied Biol.*, **22**, 134-167.
- CHISHOLM RD., KOBLITSKY L., 1947. Effect of light on DDT residues, *Agric. Chemicals*, **2** (9), 35-37.
- CHISHOLM *et al.*, 1949 The toxicity of DDT deposits as influenced by sunlight. *J. Econ. Entomol.*, **42**, 154-55.
- DRÖSSMAR F., 1965. Lichtabhängige Wirkung von Strahlen und chemischen Substanzen, *Naturwiss. Rundschau*, **52**, Heft 11, 456.
- EICHLER W., 1965. *Handbuch der Insektizidkunde*, Verl. Volk und Gesundheit — Berlin.
- FINK H., HUND G., 1965. Probitanalyse mittels programmgesteuerter Rechenanlagen, *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)*, **15**, 624-30.
- FINK H., u.a., 1966. Vergleich biologischer Wirkungen mittels programmierter Probitanalyse, Sonderdruck — Methods of Information in Medicine — Methodik der Information in der Medizin. 5. Jahrg. (1), 19-25, F.K. Schattauer-Verl., Stuttgart.
- FINNEY D.J., 1952. *Probit Analysis*, 2. Edition, Cambridge.
- FLECK E.E., 1949, The action of ultraviolet light on DDT *J. Amer. Chem. Soc.*, **71**, 1034-1036.
- FUCUTO T.R., 1961. The Chemistry of Organic Insecticides. *Annual Rev. Entomol.*, **6**, 313-332.
- GAINES J.C., DEAN H.A., 1950. Effect of climatic factors on the toxicity of certain insecticides. *J. Econ. Entomol.*, **43**, 602-605.
- GOETZE G., 1932. Zwei neue Methoden zum quantitativen Studium der Giftigkeit von Insektiziden, *Anzeiger f. Schädlingskunde*, **8**, 54-57.
- GOETZE G., u.a., 1959. Versuche zur Selbstheilung und Therapie der Nosematose der Honigbiene, Bonn.
- GRAVES J.B., MACKENSEN O., 1965. Topical Application and Insecticide Resistance Studies on the Honey Bee. *U. Econ. Entomol.*, **58**, 990-993.

- GUTHRIE F.E., 1950. Effect of Temperature on Toxicity of Certain Organic Insecticides. *J. Econ. Entomol.*, **43**, 559-60.
- HÄFLIGER E., 1948. Der Einfluß der Temperatur auf die Giftwirkung des DDT bei Honigbienen (*Apis mellifica* L.) *Experientia*, **4**, 223-224.
1949. Comparative Toxicity of Various Insecticide to the Honeybee. *J. Econ. Entomol.*, **42**, 523-528.
1954. Der Einfluß der Temperatur auf die Wirkung von DDT-Präparaten, *Z. f. Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **61**, 433-444.
- KAESER W., 1948. Zur Frage einer temperaturbedingten Widerstandsfähigkeit der Honigbiene (*Apis mellifica* L.) gegenüber dem Kontaktinsektizid (Gesarol). *Anzeiger f. Schädlingskunde* **21**, 129-132.
- KOCH H., 1959. Über die Giftwirkung der beiden Insektizide Toxaphen und DDT auf verschiedene Imagoalstadien der Honigbiene (*Apis mellifica* L.) und ihre Abhängigkeit von der Temperatur. *Wiss. Zeitschr. der Karl-Marx-Univers. Leipzig, Mathem.-Naturwiss. Reihe*, Heft 1, 8. Jahrg., 203-215 1958/1959.
- LINDQUIST A.W. u.a., 1946. DDT residual type sprays as affected by light. *J. Econ., Entomol.*, **39**, 55-59.
- MAURIZIO A., SCHENKER P., 1957. Untersuchungen über die Ausscheidung bienengiftiger Pflanzenschutzmittel im Blütennektar, *Mitteil. der Schweizer. Entomolog. Gesellschaft*, **30**, 140-150.
- MISTRIC W. J., GAINES J.C., 1953. Effect of Wind and other Factors on the Toxicity of Certain Insecticides. *J. Econ. Entomol.*, **46**, 341-49.
- MÜHLMANN R., SCHRADER G., 1957. Hydrolyse der insektiziden Phosphorsäureester, *Z. Naturforschung*, **12 b**, 196-208.
- SCHRADER G., 1963. Die Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäure-Ester, 3. Aufl., Verlag Chemie GmbH. Weinheim/Bergstr.
- STUTE K., 1964. Über die Wirkungsweise einiger bienenschädlicher Insektizide, *Z. für Bienenforschung*, **7**, 89-97, 1964.
1966. Bienenschutz — Pflanzenschutz. *Westfälische Bienen-Zeitung*, **79**, Jahrgang, 304-6.
1969. Richtlinien für die Prüfung von Pflanzenschutzmitteln auf Bienengefährlichkeit, Bundesforschungsanstalt für Kleintierzucht, Celle, Januar 1969 (Sonderheft).
- TAHORI A.S., HOSKINS W.M., 1953. The absorbtion, distribution and metabolism of DDT in DDT-resistant housflies. *J. Econ. Entomol.*, **46**, 302-306 und 829-837.
- UNTERSTENHÖFER G., 1957. Dipterex, ein neues ungiftiges Insektizid. *Anzeiger f. Schädlingskunde*, **30**, Jahrg., 7-10.
- 1968/1 : Die Bedeutung der organischen Phosphorverbindungen für den Pflanzenschutz. *Pflanzenschutznachrichten Bayer*, **21**, Jahrg., 53-78.
1970. Allgemeines über Biologie und Prüfung der Insektizide und Akarizide, s. Wegler, R., *Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel*, Bd.1, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York., S. 57-76.
- UNTERSTENHÖFER G., FREHSE H., 1963. Wesen und Bedeutung der systemischen Wirkung von Insektiziden. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, **16**, 165-181.
- WAY M.J., 1954. The effect of body weight on the resistance to insecticides of the lastinstav larva of *Diabrotica oleracea* L. tho tomato moth. *Ann. Applic. Biol.*, **41**, 77-87.
- WEAVER N., 1949. The Toxicity of certain Organic Insecticides to Honeybees. *J. Econ. Entomol.*, **42**, 973-75.
- WEBER E., 1964. *Grundriß der biologischen Statistik*, 5. Auflage, VEB Gustav Fischer Verlag Jena.