

# ZUKUNFT BIENE



Endbericht

Stichtag: 30. September 2021

Forschungsprojekt Nr. 101295

## Zukunft Biene 2 – Grundlagenforschungsprojekt zur Förderung des Bienenschutzes und der Bienengesundheit

Kurztitel: **Zukunft Biene 2**

**Mit Unterstützung von Bund, Land und Europäischer Union**

 **Bundesministerium**  
Landwirtschaft, Regionen  
und Tourismus

Europäische Union



Dieser Endbericht wurde am 30.09.2021 über Dafne (<https://www.dafne.at>) zur Approbation eingereicht.

## Endbericht

Stichtag: 30. September 2021

An der Projektabwicklung und Berichtserstellung beteiligte Einrichtungen:

- Karl-Franzens-Universität Graz
  - Institut für Biologie
- AGES
  - Institut für Saat- und Pflanzgut, Pflanzenschutzdienst und Bienen, Abteilung Bienenkunde und Bienenschutz
  - Institut für Veterinärmedizinische Untersuchungen Mödling
  - Fachbereich Daten, Statistik, integrative Risikobewertung
- Veterinärmedizinische Universität Wien
  - Institut für Virologie

### **Ansprechpartner für Rückfragen:**

Projektleiter: Dr. Robert Brodschneider, Karl-Franzens-Universität Graz, Institut für Biologie,  
Tel: 0316 380 5602; [robert.brodschneider@uni-graz.at](mailto:robert.brodschneider@uni-graz.at)

Dr. Linde Morawetz, AGES, Institut für Saat- und Pflanzgut, Pflanzenschutzdienst und Bienen, Ab-  
teilung Bienenkunde und Bienenschutz Wien, Tel: 050 555 33 120; [linde.morawetz@ages.at](mailto:linde.morawetz@ages.at)

## Autoren und Autorinnen des Endberichts

- Vorwort:** Robert Brodschneider
- Modul (U):** Hannes Oberreiter, Robert Brodschneider
- Modul (A):** Linde Morawetz, Hemma Köglberger, Adi Steinrigl,  
Katharina Etter, Sigrid Träger, Antonia Griesbacher, Rudolf Moosbeckhofer
- Modul (V):** Kerstin Seitz, Till Rümenapf, Benjamin Lamp

## Finanzierung

Laufzeit: 22.12.2017 – 30.09.2021

Das Projekt wurde im Rahmen der Bund-Bundesländer-Kooperation finanziert durch:

Bundesministerium für Landwirtschaft, Regionen und Tourismus	€ 251.397,00
Biene Österreich (davon 50% aus dem EGFL)	€ 270.000,00
Bundesländer	€ 160.000,00
Eigenmittel Karl-Franzens-Universität Graz	€ 33.347,62
Eigenmittel AGES	€ 74.015,69
Eigenmittel Vetmed	€ 85.262,00

# Inhaltsverzeichnis

<b>Autoren und Autorinnen des Endberichts</b> . . . . .	<b>iv</b>
<b>Finanzierung</b> . . . . .	<b>v</b>
<b>Vorwort</b> . . . . .	<b>xii</b>
<b>Danksagung</b> . . . . .	<b>xiv</b>
<b>Zusammenfassung</b> . . . . .	<b>1</b>
<b>Project summary</b> . . . . .	<b>5</b>
<b>1 (U) Wintersterblichkeit</b> . . . . .	<b>8</b>
<b>1.1 Einleitung</b> . . . . .	<b>8</b>
<b>1.2 Methodik</b> . . . . .	<b>13</b>
1.2.1 Datenerhebung . . . . .	13
1.2.2 Datenvalidierung und Fehlerkontrolle . . . . .	14
1.2.3 Statistik . . . . .	14
<b>1.3 Ergebnisse</b> . . . . .	<b>16</b>
1.3.1 Repräsentativität . . . . .	16
1.3.1.1 Beteiligung . . . . .	16
1.3.1.1.1 Longitudinalstudie . . . . .	17
1.3.1.2 Anonyme Teilnahme versus nicht anonyme Teilnahme . . . . .	19
1.3.1.3 Online-Antworten versus Papierfragebogen-Antworten . . . . .	20
1.3.1.4 Betriebsgröße . . . . .	22
1.3.1.5 Geografische Herkunft . . . . .	22
1.3.1.6 Bienenstandort . . . . .	23
1.3.2 Verlustrate in Österreich, den Bundesländern und den Bezirken . . . . .	24
1.3.2.1 Österreich . . . . .	24
1.3.2.2 Populationsdynamik . . . . .	25
1.3.2.3 Bundesländer . . . . .	27
1.3.2.4 Bezirke . . . . .	30
1.3.2.5 Elementarschäden . . . . .	31
1.3.3 Symptome . . . . .	32
1.3.4 Verteilung der Völkerverluste . . . . .	33
1.3.5 Risikoanalyse . . . . .	35
1.3.5.1 Seehöhe . . . . .	35
1.3.5.2 Betriebsgröße . . . . .	37
1.3.5.3 Betriebsweise . . . . .	38
1.3.5.3.1 Zertifizierte Bio-Imkereien . . . . .	39
1.3.5.3.2 Wanderimkerei . . . . .	40
1.3.5.3.3 Bienen aus Zuchtprogramm für Varroatoleranz . . . . .	41
1.3.5.3.4 Kunststoff-Beuten . . . . .	42
1.3.5.3.5 Isolierte Beuten im Winter . . . . .	43
1.3.5.3.6 Offener Gitterboden im Winter . . . . .	44
1.3.5.3.7 Fremdwachs . . . . .	45
1.3.5.3.8 Naturwabenbau . . . . .	46
1.3.5.3.9 Kleine Brutzellen (5,1 mm oder weniger) . . . . .	47
1.3.5.3.10 Vereinigung von Völkern . . . . .	48
1.3.5.4 Wabenhygiene . . . . .	48

1.3.5.5	Trachtangebot	50
1.3.5.5.1	Raps ( <i>Brassica napus</i> )	51
1.3.5.5.2	Sonnenblume ( <i>Helianthus annuus</i> )	53
1.3.5.5.3	Mais ( <i>Zea mays</i> )	55
1.3.5.5.4	Spätblühende Zwischenfrüchte	57
1.3.5.5.5	Waldtracht	59
1.3.5.5.6	Waldtracht mit Melezitose	61
1.3.5.6	Bekämpfung der Varroamilbe	63
1.3.5.6.1	Bestimmung des Varroabefalls	65
1.3.5.6.2	Ameisensäure - Kurzzeit	70
1.3.5.6.3	Ameisensäure - Langzeit	72
1.3.5.6.4	Andere biotechnische Methoden	74
1.3.5.6.5	Synthetisch Chemische Methode	76
1.3.5.6.6	Drohnenbrutentnahme	78
1.3.5.6.7	Hyperthermie	80
1.3.5.6.8	Milchsäure	82
1.3.5.6.9	Oxalsäure - Träufeln (Mischung)	84
1.3.5.6.10	Oxalsäure - Sprühen/Träufeln	87
1.3.5.6.11	Oxalsäure - Verdampfen	90
1.3.5.6.12	Thymol	93
1.3.5.6.13	Andere Methode / Sonstiges	95
1.3.5.6.14	Behandlungskombinationen	96
1.3.5.7	Königinnen-Verluste	98
1.3.5.7.1	Königinnenprobleme	100
1.3.5.7.2	Im Einwinterungsjahr begattete Königin („junge Königin“)	103
1.3.5.8	Verkrüppelte Flügel	106
1.3.6	Möglichen Risikofaktoren im Überblick	108
<b>1.4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>109</b>
1.4.1	Populationsdynamik in Österreich	109
1.4.2	Repräsentativität und Anonymität	110
1.4.3	Bundesländer und Bezirke	111
1.4.3.1	Seehöhe	111
1.4.4	Symptome	112
1.4.5	Betriebsgröße	112
1.4.6	Betriebsweisen	113
1.4.6.1	Zertifizierte Bio-Imkerei	113
1.4.6.2	Wanderimkerei	114
1.4.6.3	Bienen aus Zuchtprogramm für Varroatoleranz	114
1.4.6.4	Bauart des Bienenstockes (Kunststoff-Beuten, Isolierte Beuten, offener Gitterboden)	115
1.4.6.5	Fremdwachs und Naturwabenbau	115
1.4.6.6	Kleine Brutzellen (5,1 mm oder weniger)	116
1.4.6.7	Vereinigung von Völkern	116
1.4.7	Wabenhygiene	116
1.4.8	Trachtangebot	116
1.4.8.1	Raps ( <i>Brassica napus</i> )	117
1.4.8.2	Sonnenblume ( <i>Helianthus annuus</i> )	117
1.4.8.3	Mais ( <i>Zea mays</i> )	118
1.4.8.4	Spätblühende Zwischenfrüchte	118
1.4.8.5	Waldtracht und Waldtracht mit Melezitose	118

1.4.9	Bekämpfung der Varroamilbe	119
1.4.9.1	Bestimmung des Varroabefalls	119
1.4.9.2	Behandlungsmethoden	120
1.4.9.2.1	Ameisensäure	120
1.4.9.2.2	Synthetisch Chemische Methode	121
1.4.9.2.3	Drohnenbrutentnahme	121
1.4.9.2.4	Hyperthermie	121
1.4.9.2.5	Biotechnische Maßnahmen	122
1.4.9.2.6	Oxalsäure	122
1.4.9.2.7	Thymol	123
1.4.9.2.8	Kombinationen	123
1.4.10	Königinnen-Verluste	124
1.4.10.1	Königinnenprobleme	125
1.4.10.2	Im Einwinterungsjahr begattete Königin („junge Königin“)	125
1.4.11	Verkrüppelte Flügel	126
1.4.12	Zusammenfassung	126
<b>1.5</b>	<b>Anhang</b>	<b>128</b>
<b>2</b>	<b>(A) Virenmonitoring</b>	<b>133</b>
<b>2.1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>133</b>
2.1.1	Pathologie der untersuchten Viren	133
2.1.2	Auftreten von Bienenviren in Österreich	135
2.1.3	Ziel des Projektmoduls	136
<b>2.2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>136</b>
2.2.1	Zeitablauf	136
2.2.2	Anwerbung und Auswahl der TeilnehmerInnen	137
2.2.3	Stichprobengröße und Auswahl der TeilnehmerInnen	139
2.2.4	Durchführung der Probenahme	141
2.2.5	Probenbearbeitung	142
2.2.6	Abfrage Winterverluste	142
2.2.7	Virusanalytik	143
2.2.7.1	Plasmide und Bienenhomogenate zur Methodenetablierung und Validierung	143
2.2.7.2	Nukleinsäureextraktion aus Bienenhomogenaten	145
2.2.7.3	Methodenetablierung und -validierung zum Nachweis und zur Quantifizierung von ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A, DWV-B und SBV	145
2.2.7.4	CBPV-Ringversuch und Quantifizierung weiterer CBPV Referenzproben	147
2.2.7.5	Methodenetablierung und -validierung zum Nachweis und zur Quantifizierung von IAPV und KBV	148
2.2.7.6	Testung und Quantifizierung der Projektproben	149
2.2.8	Statistik	150
2.2.8.1	Zusammenhang zwischen Prävalenz bzw. Virustiter und Standort- bzw. Volksfaktoren	150
2.2.8.2	Einflussfaktoren auf die Winterverluste	150
<b>2.3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>152</b>
2.3.1	Kontakt mit den Projektteilnehmerinnen und Projektteilnehmern	152
2.3.2	Kennwerte der teilnehmenden Imkereibetriebe	154
2.3.3	Ergebnisse Virusdiagnostik	154
2.3.3.1	Prozesskontrollen	154
2.3.3.2	Negativextraktionskontrollen	155
2.3.3.3	Semi-quantitativer Nachweis der Apis-Actin mRNA	155
2.3.4	Virusprävalenz und Viruskonzentration	155



2.3.5	Geographische Varianz in der Virusprävalenz und Viruskonzentration . . . . .	159
2.3.5.1	Bundesländer . . . . .	159
2.3.5.2	Seehöhe . . . . .	163
2.3.6	Zusammenhang Virusprävalenz und Viruskonzentration mit imkerlichen Praktiken . . . . .	167
2.3.6.1	Wabenerneuerung . . . . .	167
2.3.6.2	Waben aus abgestorbenen Völkern . . . . .	169
2.3.6.3	Art der Völkervermehrung . . . . .	172
2.3.7	Zusammenhang Virusprävalenz und Viruskonzentration mit den berichteten Symptomen der Völker . . . . .	177
2.3.7.1	erhöhter Totenfall vor dem Bienenvolk . . . . .	177
2.3.7.2	Varroamilben auf Bienen . . . . .	178
2.3.7.3	Bienen mit verküppelten Flügeln . . . . .	180
2.3.7.4	Schwarz-glänzende Bienen . . . . .	182
2.3.7.5	Sackbrutsymptome . . . . .	183
2.3.8	Zusammenhang Viruskonzentration und Winterverluste . . . . .	184
2.3.8.1	Logistische Regression . . . . .	184
2.3.8.2	Random-Forest-Modell . . . . .	186
2.3.8.3	Vergleich der Vorhersagekraft der Winterverlust-Modelle . . . . .	188
<b>2.4</b>	<b>Diskussion . . . . .</b>	<b>189</b>
2.4.1	Repräsentativität der StudienteilnehmerInnen . . . . .	189
2.4.2	Prävalenzlevel . . . . .	190
2.4.3	Höhe Virustiter . . . . .	191
2.4.4	Unterschiede geographische Verbreitung . . . . .	192
2.4.5	Einfluss von imkerlichen Praktiken . . . . .	193
2.4.5.1	Wabenerneuerung . . . . .	193
2.4.5.2	Waben aus abgestorbenen Völkern . . . . .	194
2.4.5.3	Völkervermehrung . . . . .	194
2.4.6	Aussagekraft von Virussympomen . . . . .	195
2.4.7	Winterverluste . . . . .	196
2.4.7.1	DWV-B . . . . .	196
2.4.7.2	Varroamilben auf Bienen . . . . .	197
2.4.7.3	ABPV . . . . .	197
2.4.7.4	CBPV . . . . .	197
2.4.7.5	Anzahl schwacher Völker . . . . .	198
2.4.7.6	Vollständigkeit der Modelle . . . . .	198
2.4.8	Zusammenfassung und Fazit . . . . .	198
<b>2.5</b>	<b>Anhang . . . . .</b>	<b>200</b>
2.5.1	Anhang I: Anleitung zur Probenahme . . . . .	200
2.5.2	Anhang II: Fragebogen Probenahme 2019 . . . . .	204
2.5.3	Anhang III: Ergebnis Virenanalyse . . . . .	205
2.5.4	Anhang IV: Informationsblatt zu unseren Ergebnismitteilungen . . . . .	207
2.5.4.1	„Frage und Antwort“ Katalog . . . . .	208
2.5.4.2	Bekämpfung der Viruserkrankungen . . . . .	211
<b>3 (V)</b>	<b>Virendiagnostik und -prophylaxe bei Honigbienen . . . . .</b>	<b>212</b>
<b>3.1</b>	<b>Einleitung . . . . .</b>	<b>212</b>
<b>3.2</b>	<b>Material und Methoden . . . . .</b>	<b>214</b>
3.2.1	Methodik - Überblick . . . . .	214
3.2.2	Ausgangslage der Studie . . . . .	214

3.2.3	Arbeiten mit Honigbienen ( <i>Apis mellifera</i> )	215
3.2.3.1	Präparation von Bienenpuppen	215
3.2.3.2	Produktion von Virusstocks	215
3.2.3.3	Probenbearbeitung	215
3.2.4	Arbeiten mit RNA und DNA	216
3.2.4.1	Extraktion von RNA	216
3.2.4.2	Konventionelle reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	216
3.2.4.3	Reverse-Transkriptase-quantitative-PCR (RT-qPCR)	216
3.2.4.4	Klonierung von Plasmiden	217
3.2.4.5	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	217
3.2.4.6	Sanger Sequenzierung	218
3.2.5	Herstellung und Aufreinigung der Antigene	218
3.2.5.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	218
3.2.5.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	218
3.2.5.3	Coomassie-Brillant-Blau R 250 Färbung	218
3.2.5.4	Westernblot	219
3.2.5.5	Nickel-Affinitätschromatographie	219
3.2.5.6	Dialyse der gereinigten Proteine	219
3.2.5.7	Dichtegradientenzentrifugation der Virusstocks	219
3.2.5.8	Immunisierungen der Versuchstiere	220
3.2.6	Arbeiten mit eukaryontischen Zellen	220
3.2.6.1	Hybridomatechnik	220
3.2.6.2	ELISA-Screening der Hybridome	220
3.2.6.3	Immunoblot-Screening	221
3.2.6.4	Protein G Platten-Screening	221
3.2.6.5	Selektion der Hybridome	222
3.2.6.6	Adaption der Hybridome an serumfreies Medium	222
3.2.6.7	Aufreinigung der Hybridomüberstände	222
3.2.6.8	Isotypisierung der Antikörper	222
3.2.6.9	Etablierung des direkten Sandwich-ELISAs	223
3.2.6.10	ELISA-Tests mit definierten Proben und Feldproben	223
<b>3.3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>224</b>
3.3.1	Antigene	224
3.3.1.0.1	Überblick	224
3.3.1.0.2	Akutes Bienenparalysevirus (ABPV)	224
3.3.1.0.3	Sackbrutvirus (SBV)	228
3.3.1.0.4	Flügeldeformationsvirus (DWV)	229
3.3.2	Immunisierungen	229
3.3.2.1	Akutes Bienenparalysevirus (ABPV)	229
3.3.2.2	Sackbrutvirus (SBV)	230
3.3.2.3	Flügeldeformationsvirus (DWV)	230
3.3.3	Antikörper	231
3.3.3.1	Akutes Bienenparalysevirus (ABPV)	231
3.3.3.1.1	Antikörper gegen die bakteriell exprimierten Strukturproteine VP1, VP2 und VP3	231
3.3.3.1.2	Antikörper gegen das hochreine Virus	233
3.3.3.2	Sackbrutvirus (SBV)	233
3.3.3.2.1	Antikörper gegen das bakteriell exprimierte Strukturprotein <i>mCherry</i> -VP1	233
3.3.3.2.2	Antikörper gegen das hochreine Virus	233
3.3.3.3	Flügeldeformationsvirus (DWV)	233
3.3.3.3.1	Antikörper gegen das bakteriell exprimierte Strukturprotein VP1 des DWV-A	233

3.3.3.3.2	Antikörper gegen die rekombinanten Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 des VDV/DWV-B	234
3.3.3.3.3	Antikörper gegen das hochreine Virus	234
3.3.4	ELISA-Tests mit definierten Proben	234
3.3.5	ELISA-Tests mit Feldproben	236
3.3.5.0.1	Isotypisierung der Antikörper	236
<b>3.4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>237</b>
Veröffentlichungen und Vortragstätigkeit während der Projektdauer (22.12.2017 bis 30.09.2021)		239
Abkürzungsverzeichnis		244
Literatur		245

## Vorwort

Seit Oktober 2019 durfte ich als Nachfolger des ursprünglichen Projektleiters Karl Crailsheim das Projekt „Zukunft Biene 2“ leiten. Er, sowie auch Rudolf Moosbeckhofer von der AGES, haben während des Projekts den wohlverdienten Ruhestand angetreten. Ich möchte mich noch einmal bei beiden für die hervorragende Zusammenarbeit über viele Jahre bedanken!

Wenn wir nun auf das vier Jahre dauernde Projekt zurückblicken, ist das ein Blick auf Weiterentwicklungen sowohl in der Imkerei, der angewandten Forschung zur Honigbiene, als auch Entwicklungen der Gesellschaft. Im Jahr 2020 hat ein Virus unter der Menschheit eine Pandemie ausgelöst, wie wir es zu unseren Lebzeiten noch nicht erfahren haben. Es hat sich durch diese Pandemie aber auch gezeigt, wie wichtig eine lokale Versorgung mit lebenswichtigen Gütern ist, die Imkerei stellt hier keine Ausnahme dar. Vielleicht ist uns nun auch etwas verständlicher, welche Gefahr von Viren im Allgemeinen, aber auch von Viren die die Honigbiene befallen, ausgehen können. Fast möchte ich meinen, der Schwerpunkt des im Jahr 2017 gestarteten Projekts „Zukunft Biene 2“ mit der Erforschung der wichtigsten Bienenviren sei perfekt gewählt! Durch Covid-19 haben weite Teile der Bevölkerung vermehrt Einblick in virologische Untersuchungen bekommen, und die tatsächliche Relevanz dieser Forschung erlebt. Begriffe wie „PCR-Test“, „Schnelltest“, „Inzidenz“, und viele weitere sind im Sprachgebrauch der Medien und der Menschen angekommen.

Tatsächlich haben wir im vorliegenden Projekt Forschung an genau an der angesprochenen Thematik Bienenviren durchgeführt. In der ersten großangelegten Untersuchung zu Bienenviren in Österreich, hat die AGES als Projektpartner die Prävalenz derartiger Viren an circa 200 Standorten in Österreich erhoben. Ein Zusammenhang des DWV-B Virus (und in abgeschwächter Form des ABPV Virus) mit der Wintersterblichkeit konnte dabei nachgewiesen werden. Dies ergänzt die aus dem vorangegangenen Projekt bereits belegte Rolle der Varroamilbe für Völkerverluste. Sowohl die auf Fragebögen basierende Untersuchung der Universität Graz, als auch die Feldstudie der AGES zeigen eindeutig, dass das Vorkommen verkrüppelter Flügel und damit ein Symptom einer DWV-Infektion während der Saison ein Hinweis auf drohende Völkerverluste ist.

Der Virenbefall von Bienenvölkern zeigt sich dem Imker oder der Imkerin aber nicht immer so deutlich. Der veterinärmedizinische Forschungspartner, das Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien, hat eine jahrelange Expertise in der Untersuchung von Viren. Ihre Hauptaufgabe im Projekt war es daher die Grundlagen für einen „Schnelltest“ für drei Bienenviren zu entwickeln. Neben ihrer Forschung daran haben die Kolleginnen und Kollegen der Vetmed auch Covid-19 PCR-Tests durchgeführt.

Als Verantwortlicher des am Institut für Biologie der Universität Graz durchgeführten Moduls „Wintersterblichkeit“ darf ich auf zwei Zeiträume zurückblicken. Zum einen auf die bereits seit 14 Jahren an der Universität Graz durchgeführte Untersuchung der Winterverluste im Allgemeinen, und zum anderen auf die vier in diesem Endbericht detailliert vorgestellten Überwinterungsperioden. Die Winterverluste von Bienenvölkern lagen dabei in den vier hier berichteten Jahren unter dem langjährigen Durchschnitt. Dennoch wurden regional auch erhöhte Verlustraten festgestellt. Eine Analyse, welche Betriebsweisen hohen Verlusten entgegenwirken finden Sie im ersten Teil dieses Endberichts.

Wir haben uns in den vier Jahren Projektlaufzeit bemüht, unsere Arbeit sowie die Ergebnisse transparent und verständlich zu kommunizieren. Ich hoffe, dass dies dazu geführt hat, der Imkerschaft und allen an der Bienengesundheit Interessierten einen Einblick in unsere Erkenntnisse zu bieten. Ich wünsche mir auch, dass diese Erkenntnisse in der nächsten Zukunft weitere Früchte tragen, etwa in einer Verbesserung der Bienengesundheit, einem besseren Verständnis der wichtigen Faktoren für die Bienengesundheit, und weiteren Erkenntnissen und Forschungsarbeiten zur Honigbiene in Österreich.

Ich möchte mich mit diesem Vorwort bei allen MitarbeiterInnen des Projekts, bei den beteiligten ImkerInnen, sowie natürlich bei den Fördergebern für die hervorragende Zusammenarbeit bedanken. Die Fördergeber

werden namentlich auf der nächsten Seite genannt, die Autorinnen und Autoren des Endberichts auf Seite iv. Ich möchte aber noch einmal betonen, wie wichtig langfristige und substantielle Förderung unserer Forschungsarbeit ist, auch wenn Auswirkungen auf die Gesellschaft und Bienenpopulation vielleicht nicht sofort wahrgenommen werden. Diese Freiheit zu forschen spiegelt sich in den folgenden Ergebnissen wider und hat erlaubt komplexe Fragestellungen zu erarbeiten sowie sorgfältig zu beschreiben.

Robert Brodschneider, Projektleiter  
Graz, am 03.09.2021

## Danksagung

Großer Dank gebührt den Geldgebern dieses Projektes, dem Bundesministerium für Landwirtschaft, Regionen und Tourismus, den Bundesländern, der Biene Österreich, und den beteiligten Forschungseinrichtungen (Karl-Franzens-Universität Graz, AGES, Veterinärmedizinische Universität Wien), letzteren auch für die Stellung des wissenschaftlichen Personals.

Der Großteil unserer Untersuchungen wäre nicht möglich, gäbe es nicht eine hervorragende Kooperation zwischen der österreichischen ImkerInnenschaft und den beteiligten WissenschaftlerInnen sowie den technischen MitarbeiterInnen – auch hierfür besonderen Dank.

Robert Brodschneider,  
Projektleiter „Zukunft Biene 2“

## Zusammenfassung

**Im Modul U** werden die Winterverluste von Bienenvölkern erhoben und auf Risikofaktoren hin untersucht. In Österreich wird diese Untersuchung seit dem Winter 2007/08 durchgeführt. Die Winterverlustraten in den vier Umfragejahren der Untersuchung für Österreich waren 2017/18 11,8% (95% CI: 11,1-12,5%), 2018/19 15,2% (95% CI: 14,4-16,1%), 2019/20 12,6% (95% CI: 11,9-13,3%) und 2020/21 12,5% (95% CI: 11,8-13,3%). Der laufende Mittelwert der Winterverluste für Österreich über die vier Umfragejahre beträgt 13,0%.

Die Beteiligungsrate war zwischen 4,4% und 5,2%, wobei die Anzahl der bei „Biene Österreich“ gemeldeten Imkereien und auch Bienenvölkern so hoch wie noch nie seit dem Beginn unserer Winterverlustumfrage sind. Nur durch die erfolgreiche freiwillige Teilnahme vieler Imker und Imkerinnen an unserer Umfrage ist es uns überhaupt möglich Winterverluste und ihre möglichen Faktoren über mehrere Jahre hinweg zu untersuchen. Hierbei wurden Analysen über die geografische Verteilung der Winterverluste, zu den begleitenden Symptomen, sowie zur Betriebsweise durchgeführt. Ein wichtiger Faktor war außerdem die Analyse der Behandlungsmethoden, welche zur Bekämpfung von *Varroa destructor* eingesetzt wurden und deren Einfluss auf die Wintersterblichkeit. Sowie auch Trends und Verteilung der durchaus heterogenen Imkerei in Österreich explorativ darzustellen.

Auf Bundeslandebene zeigt sich nur selten eine statistisch signifikante Abweichung der Verlustraten vom österreichischen Durchschnitt. Vergleicht man aber die Bundesländer direkt, haben Wien und Niederösterreich in drei von vier Umfragejahren eine signifikante höhere Wahrscheinlichkeit für höhere Winterverlustraten. Die Unterschiede zwischen Bundesländern können auf Imkereidemographie oder ökologischen Faktoren beruhen, wie der Landnutzung. Eine Analyse der gemeldeten Symptome zeigt deutliche Unterschiede zwischen den Jahren, wobei das gemeldete Symptom „keine oder nur wenige tote Bienen im oder vor dem Volk“ in allen Jahren am häufigsten war.

Über die Umfragejahre konnten bei Faktoren die auf Professionalität, Erfahrung in der Imkerei etc. hindeuten signifikant niedrigere Verlustraten festgestellt werden. Hierzu zählen zum Beispiel die Betriebsgröße (größere Betriebe haben weniger Verluste) und Wanderimkereien (haben in zwei von vier Jahren geringere Verlustraten). Auch konnte in den letzten drei Umfragejahren ein positiver Effekt für einen eigenen Wachs-Kreislauf identifiziert werden, was wiederum auf die Professionalität der ImkerInnen oder auf generelle Qualitätsprobleme mit Wachs hindeuten könnte. Bei den restlichen abgefragten Betriebsweisen konnte kein signifikanter Einfluss auf die Wintersterblichkeit festgestellt werden.

Bei der Analyse der Trachtquellen zeigt sich, dass ImkerInnen mit einer Waldtracht eine signifikante Wahrscheinlichkeit für geringere Winterverluste in zwei von vier Jahren hatten. Dies könnte wieder mit der Landnutzung aber auch mit Wetterphänomenen zusammenhängen. Die Trachtquelle Mais zeigt wiederum in drei aufeinanderfolgenden Jahren eine erhöhte Winterverlustrate und kann als Risikotrachtquelle bezeichnet werden. Es können aber keine kausalen Gründe für die erhöhten Verluste beim Vorhandensein bestimmter Trachten genannt werden. Die Trachten können aber als Indikator von für Bienenvölker nicht idealen Standorten gesehen werden. In diesem Zusammenhang könnte eine einseitige Ernährung durch mangelndes Trachtangebot, welches durch Monokulturen zustande kommt, stehen. Melezitose, der sogenannte Zementhonig, zeigt in keinem Jahr einen Zusammenhang mit der Wahrscheinlichkeit für Verluste über den Winter. Die mit Abstand häufigsten Meldungen eines Melezitose-Eintrags wurden 2019 von unseren TeilnehmerInnen gemeldet.

Bei der Varroabekämpfung zeigt sich ein leichter Abwärtstrend bei der Verwendung von Ameisensäure, besonders bei der Variante der Kurzzeitbehandlung. Eine Zunahme gibt es bei Oxalsäure mittels Verdampfung, biotechnischen Maßnahmen und synthetischen chemischen Mitteln. Die Behandlungsmethoden und deren Kombinationen unterscheiden sich nur kaum in Bezug auf die Winterverlustraten, aber eine Thymolbehandlung im Sommer und Oxalsäurebehandlung mittels fertiger Mischung im Sommer und Winter zeigte in zwei Umfragejahren eine signifikante Wahrscheinlichkeit für höhere Verlustraten. Oxalsäure

mittels Verdampfen und die synthetisch chemischen Methoden zeigen in zwei von vier Jahren eine signifikant geringere Winterverlustrate. Die Drohnenbrutentnahme nur im Sommer erscheint unzureichend und führt zu signifikant höheren Winterverlusten, als wenn diese Methode im Frühling und Sommer durchgeführt wird.

Die Vitalität und Wichtigkeit der Königin für ein Bienenvolk auf den Überwinterungserfolg zeigt sich durch den positiven Effekt auf die Überlebenswahrscheinlichkeit bei aktivem Austausch der alten Königinnen, sowie eine signifikant geringere Wahrscheinlichkeit Winterverluste zu erleiden, wenn Königinnenprobleme nur selten beziehungsweise gar nicht während der Saison auftreten. Die Winterverluste durch „unlösbare Königinnenprobleme“ betragen im laufenden Mittel über die vier Umfragejahre 3,6%. Kein Bundesland hat hier signifikant höhere Verlustraten verzeichnet als der österreichische Durchschnitt.

Als Verbindung zu den beiden anderen Modulen, sei auf das Ergebnis signifikant höherer Winterverluste bei Imkereien hingewiesen die während der Saison Bienen mit verkrüppelten Flügeln beobachtet haben oder keine Angaben darüber machen konnten. Dieses Symptom kann von einer Virenerkrankung stammen.

**Im Modul A** wurde ein österreichweites Monitoring von Bienenviren durchgeführt. Trotz der Bedeutung der Bienenviren für die Bienengesundheit ist über das Vorkommen von Viren in Österreichs Honigbienenvölkern bisher nur begrenztes Wissen vorhanden, das keine gesicherten Aussagen zur generellen Prävalenz der Bienenviren in Österreich erlaubt. Daher wurde die Prävalenz von acht Bienenviren auf Bienenstandniveau über drei Jahre erhoben. Diese Viren umfassten das Akute Bienenparalyse-Virus (ABPV), das Schwarze Königinnenzellen-Virus (BQCV), das Chronische Bienenparalyse-Virus (CBPV), das Flügeldeformationsvirus (getrennt in Typ A [DWV-A] und Typ B [DWV-B]), das Israelische Akute Paralyse-Virus (IAPV), das Kashmir-Bienenvirus (KBV) und das Sackbrutvirus (SBV).

Mit dem Endbericht liegen die Ergebnisse für drei Probenahmen im Herbst 2018, 2019 und 2020 vor. In den drei Jahren nahmen insgesamt 211 ImkerInnen aus ganz Österreich teil, 176 davon die gesamte Projektzeit (Stichprobenzahl 2018: n=198; 2019: n=193; 2020: n=190). In 99% der untersuchten Proben wurde zumindest ein Virus gefunden (576 von 581 Proben). Die maximale Anzahl an detektierten Viren pro Probe waren fünf (3% der Proben). In den meisten Proben wurden entweder drei Viren (43% der Proben) oder vier Viren (32%) nachgewiesen. In 17% der Proben wurden zwei Viren nachgewiesen, sehr selten nur ein einziges Virus (4% der Proben).

In den Bienenproben wurden sechs der acht untersuchten Viren gefunden, die Viren IAPV und KBV wurden in keiner Probe nachgewiesen. BQCV (Prävalenz: <96%) und DWV-B (Prävalenz: 88-92%) wurden am häufigsten nachgewiesenen, sie waren fast in jeder Probe vorhanden. SBV wurde am dritthäufigsten gefunden, die Prävalenz variierte dabei signifikant zwischen den Jahren (Prävalenz: 62-81%). Auch beim vierthäufigsten Virus ABPV wurden signifikante Prävalenzschwankungen zwischen den Jahren gemessen (Prävalenz: 33-54%). CBPV wurde selten nachgewiesen, die Prävalenz variierte hier zwischen 6% und 9%. DWV-A trat im gesamten Untersuchungszeitpunkt extrem selten auf, nur vier der 581 Proben waren positiv auf dieses Virus.

Der Virustiter der positiven Proben variierte bei allen detektierten Viren um mehrere Zehnerpotenzen. Der minimal gemessene Titer lag bei allen Viren zwischen  $10^4$  und  $10^8$  RNA-Kopien/mL Homogenat. Der maximal gemessene Wert lag zwischen  $10^7$  und  $10^{12}$  RNA-Kopien/mL Homogenat. Anders ausgedrückt wurden in den Proben zwischen Zehntausenden und einer Milliarde RNA-Kopien/mL Homogenat festgestellt. Die drei Viren ABPV, BQCV und SBV hatten die geringsten Titer (Median in allen Jahren unter  $10^6$  RNA-Kopien/mL). Bei diesen drei Virusarten wurden jedoch auch Werte von über  $10^9$  RNA-Kopien/mL Homogenat gemessen. Bei CBPV und DWV-B lag der Median in allen drei Jahren zwischen  $10^6$  und  $10^9$  RNA-Kopien/mL Homogenat und war damit deutlich höher als bei den drei anderen Viren. Entsprechend hatten auch über 25% der positiven Proben von CBPV und DWV-B einen Virustiter über  $10^8$  RNA-Kopien/mL Homogenat. Der Virustiter der vier positiven DWV-A Proben bewegte sich zwischen  $10^4$  und  $10^9$  RNA-Kopien/mL Homogenat.



Die Prävalenz von ABPV, CBPV, DWV-B und SBV unterschied sich zwischen den verschiedenen Bundesländern. Die Viren traten in Wien und dem Burgenland besonders häufig auf, in Tirol sehr selten. Dies mag an der unterschiedlichen Seehöhe der Bienenstände in den verschiedenen Bundesländern liegen. Denn ABPV, DWV-B und SBV kamen signifikant häufiger in niederen als in höheren Lagen vor. Auch der Titer von DWV-B und BQCV stand in negativen Zusammenhang mit der Seehöhe. Es ist zu vermuten, dass eine verkürzte Brutzeit durch die kühleren klimatischen Bedingungen in größeren Höhen eine Hauptursache für eine verringerte Virusverbreitung und -reproduktion auf diesen Ständen ist.

Es gab keinen klaren Zusammenhang zwischen dem Virusauftreten und drei untersuchten imkerlichen Praktiken (Wabenerneuerung, Verwendung von Futterwaben aus abgestorbenen Völkern, Völker Vermehrung). Dies mag teilweise daran liegen, dass sich die teilnehmenden Imkerbetriebe größtenteils an die Empfehlung der guten imkerlichen Praxis hielten. Daher war die Stichprobenanzahl an Betrieben mit suboptimalen Praktiken zu gering, um gesicherte Aussagen über Unterschiede zwischen verschiedenen Praktiken treffen zu können.

Um den Zusammenhang zwischen Winterverluste und Bienenviren zu beschreiben, wurden zwei verschiedene Modellierungsansätze gerechnet. Zusätzlich zu den Daten der Virustiter wurden acht weitere potentielle Einflussfaktoren zu den Eigenschaften des Betriebes und der Völker in die Modellierungen aufgenommen. Beide Modelle bestätigten den Zusammenhang zwischen einem hohen DWV-B Titer und einer hohen Wahrscheinlichkeit von Winterverlusten. Ein hoher ABPV Titer war auch mit höheren Winterverlusten verbunden, wenn auch der Effekt deutlich schwächer als bei DWV-B war. Die Beobachtungen von ImkerInnen von Virussymptome im Volk wurden mit den Virusdaten korreliert. Dabei wurden die Symptome „Varroamilben auf Bienen“ und „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ als wichtige Anzeichen für das ABPV Auftreten bzw. einen erhöhten Virustiter von ABPV und DWV-B bestätigt. Unsere Empfehlung ist daher, dass Imkerinnen und Imker bei Völkerdurchsichten im Sommer und Herbst ihre Aufmerksamkeit verstärkt auf diese Symptome lenken sollten. So können Virusprobleme schnell erkannt und entsprechende Gegenmaßnahmen eingeleitet werden.

**Im Modul V** wurden Reagenzien zum Nachweis viraler Antigene erzeugt und „Enzyme linked immunosorbent assays (ELISA)“ zum schnellen und kostengünstigen diagnostischen Nachweis von Virusinfektionen bei Honigbienen im Labor und im Feld erzeugt. Bei den Reagenzien handelt es sich um monoklonale Antikörper (mAK), die hochspezifisch drei Bienenviren (DWV, ABPV und SBV) detektieren. Der Virusnachweis soll ähnlich wie der Schnelltest der aktuellen COVID-19 Diagnostik erfolgen und dem Imker ohne apparativen Aufwand binnen Minuten ein Ergebnis liefern. Zusätzlich wurde ein ELISA-Test im Labor etabliert, der weitaus kostengünstiger als die derzeit üblichen RT-qPCR Virusnachweise ist. Als Projektdauer wurden drei Jahre veranschlagt, wobei ein planmäßiger Projektbeginn nach Eingang der Finanzierung eingehalten werden konnte.

Es wurden geeignete Antigen-Präparationen für die Immunisierungen und Tests produziert. Dafür wurden Antigene des Deformed wing virus (DWV-A), Varroa destructor Virus (VDV/DWV-B), Sackbrutvirus (SBV) sowie des Virus der akuten Bienenparalyse (ABPV) durch gentechnische Methoden in Bakterien produziert. Die Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 von ABPV, das Strukturprotein VP1 des SBV und die Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 von VDV/DWV-B wurden erfolgreich exprimiert und chromatographisch aufgereinigt. Diese Antigene wurden zur Immunisierung von Mäusen verwendet. Als Ergänzung zu den gentechnisch erzeugten Antigenen wurden große Mengen von SBV, ABPV und DWV durch Infektion von Bienenpuppen erzeugt und mittels Dichtegradientenzentrifugation gereinigt. Die hochreinen Viruspräparationen von ABPV, SBV und DWV wurden wiederum zur Immunisierung von Versuchsmäusen herangezogen. Bei allen Versuchstieren konnte die Serokonversion bestätigt werden. Nach Fusion der B-Lymphozyten mit Myelomzellen konnten für ABPV und SBV nach aufwendiger Selektion jeweils drei hochaffine Antikörper bestimmt werden, die natives Virus direkt aus der mechanisch homogenisierten Bienenprobe erkennen können. Gegen VP1 des DWV-A waren bereits vor Projektstart Antikörper aus vorangegangenen Arbeiten vorhanden, die im Rahmen des Projekts näher charakterisiert wurden. Diese Antikörper erkennen denaturiertes Virus aus der Bienenprobe. Im Gegensatz zur Probenaufarbeitung für

den Nachweis von ABPV und SBV müssen die Bienen deshalb unter anderen Bedingungen homogenisiert werden. Um die Probenbearbeitung für die drei Viren zu vereinheitlichen und praktikabler zu gestalten, werden derzeit neue Antikörper gegen DWV getestet.

Wir haben das Projektziel erreicht, einen schnellen, kostengünstigen Test gegen drei wichtige virale Bienenpathogene zu entwickeln. Der Sandwich-ELISA für den Virusnachweis im Labor konnte erfolgreich etabliert werden. Für die Marktreife eines Dreifach - Schnelltests, der durch den Imker am Bienenstand durchgeführt werden kann, sind weitere Anpassungen in Absprache mit Entwicklungspartnern notwendig.

## Project summary

In **Module U**, the yearly winter losses of bee colonies are surveyed and examined for risk factors. In Austria, this survey has been conducted since the winter of 2007/08. The winter loss rates in the four survey years for Austria were 2017/18 11.8% (95% CI: 11.1-12.5%), 2018/19 15.2% (95% CI: 14.4-16.1%), 2019/20 12.6% (95% CI: 11.9-13.3%) and 2020/21 12.5% (95% CI: 11.8-13.3%). The running mean of winter losses for Austria over the four survey years is 13.0%.

The participation rate has been between 4.4% and 5.2%, with the number of beekeepers reported by “Biene Österreich” and also bee colonies being higher than at any time since we started our winter loss survey. Only through the voluntary participation of many beekeepers in our survey is it possible for us to investigate winter losses and their possible factors over several years. Analyses were carried out on the geographical distribution of winter losses, on the accompanying symptoms, as well as on beekeeping practices. A key factor was the analysis of treatment methods used to combat *Varroa destructor* and the influence of these methods on winter mortality. As well as to present trends and distribution of the quite heterogeneous beekeeping in Austria in an explorative way.

At the state level, there is rarely a statistically significant deviation from the Austrian average loss rate. However, if we compare the states directly, Vienna and Lower Austria have a significant probability of higher winter loss rates in three out of four survey years. The differences between states could be due to beekeeping epidemiology or ecological factors, such as land use. An analysis of reported symptoms shows significant differences between years, with the reported symptom “no or few dead bees in or in front of the colony” being the most common in all years.

Over the survey years, significantly lower loss rates were found for factors that indicate parameters such as professionalism, experience in beekeeping, etc. These include, for example, operation size (larger beekeeping operations have fewer losses) and migratory beekeepers showing lower loss rates in two out of four years. In addition, in the last three survey years, a positive effect for an own wax cycle could be identified, which in turn could indicate the professionalism of the beekeepers or general quality problems with wax. No significant influence on winter mortality could be found in the remaining surveyed beekeeping practices.

The analysis of honeybee foraging sources shows that beekeepers with a honeydew flow had a significant probability of lower winter losses in two out of four years. This could again be related to land use but also to weather phenomena. Bees foraging on maize showed an increased winter loss rate in three consecutive years and can be described as a risk foraging source. However, no causal reasons can be given for the increased losses in the presence of foraging sources. The foraging source maize could also be seen as an indicator of locations that are not ideal for honeybee colonies. This could be related to an unbalanced diet due to a lack of nectar and pollen sources, which is caused by monocultures. Melezitose, the so-called cement honey, shows no connection with the probability of losses over winter in any year. By far most reports of melezitose were reported by our participants in 2019.

For varroa control methods, there is a slight downward trend in the use of formic acid, especially in the short-time treatment variant. There is an increase in the use of oxalic acid by means of evaporation, biotechnical measures, and synthetic chemical agents. The treatment methods and their combinations differ only slightly in terms of winter loss rates, but thymol treatment in summer and oxalic acid treatment by means of ready-made mixture in summer and winter showed a significant probability of higher loss rates in two survey years. Oxalic acid by evaporation and the synthetic chemical methods showed significantly lower winter loss rates in two out of four years. Drone brood removing / cutting only in summer appears insufficient and leads to significantly higher winter losses than when this method is carried out in spring and summer.

The vitality and importance of the queen for a colony on overwintering success is shown by the positive effect on survival probability of active replacement of old queens, as well as a significantly lower probability of suffering winter losses if queen problems occur only rarely or not at all during the season. The winter losses due to “unsolvable queen problems” amount to 3.6% as a running average over the four survey years. No state recorded significantly higher loss rates than the Austrian average.

As a link to the other two modules, note the result of significantly higher winter losses in beekeepers who observed bees with crippled wings during the season or could not provide information about them. This symptom may be due to a viral disease.

**Content of module A** is a monitoring for bee viruses in Austria. Despite the impact of bee viruses on bee health, our knowledge of the viruses' occurrence in Austrian honeybee colonies is limited and does not allow an estimation of the viruses' prevalence in Austria. Thus, data about the prevalence of eight bee viruses were collected during three years. The viruses analysed were the Acute Bee Paralysis Virus (ABPV), the Black Cell Queen Virus (BQCV), the Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV), the Deformed Wing Virus (separated in type A [DWV-A] and type B [DWV-B]), the Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV), the Kashmir Bee Virus (KBV) and the Sacbrood Virus (SBV).

In this final report the results of all three sampling cycles in autumn 2018, 2019 and 2020 are being reported. In these three years a total of 211 beekeepers from all over Austria took part, 176 of them were involved during the entire project (sample size 2018: n=198, 2019: n=193, 2020: n= 190). In 99% of the analysed samples at least one virus was detected (576 of 581 samples). The maximum number of detected viruses was five (3% of the samples). In most samples either three (43% of the samples) or four viruses (32% of the samples) were detected. In 17% of the samples two viruses were detected, rarely only one virus (4% of the samples).

Six out of eight analysed bee viruses were detected in the bee samples, the viruses IAPV and KBV were never detected. BQCV (prevalence: <96%) and DWV-B (prevalence: 88-92%) were the most frequently detected viruses, they were present in nearly every sample. SBV was detected third most frequent, whereas the prevalence varied significantly between the years (prevalence: 62-81%). With the fourth most frequent virus ABPV we also measured significant prevalence variations (prevalence: 33-54%). CBPV was detected seldom, its prevalence varied between 6% and 9%. DWV-A was detected rarely during the sample period, only four out of 581 samples were positive for this virus.

For all detected viruses the positive samples' titers ranged between several decimal powers. The minimal titer for all viruses was measured between  $10^4$  -  $10^8$  RNA-copies/mL homogenate. The maximal titer value ranged between  $10^7$  -  $10^{12}$  RNA-copies/mL homogenate. In other words, the titer values of the samples ranged between ten thousands and one billion RNA-copies/mL homogenate. The three viruses ABPV, BQCV und SBV showed the lowest titers (median in all years below  $10^6$ ). With CBPV and DWV-B the median ranged in all three years between  $10^6$  and  $10^9$  RNA- copies/mL homogenate and was considerably increased in comparison to the other three viruses. Thus, over 25% of the positive samples of CBPV and DWV-B were measured with a virustiter above  $10^8$  RNA- copies/mL homogenate. The titer of the four positive DWV-A samples ranged between  $10^4$  and  $10^9$  RNA-copies/mL homogenate.

The prevalence of ABPV, CBPV, DWV-B and SBV differed significantly between the different federal provinces. The viruses' highest prevalences were measured in Vienna and in Burgenland. In Tyrol the lowest prevalences were measured. This patterns may have been caused by differences in the apiaries' sea levels in the different federal provinces. ABPV, DWV-B and BQCV were detected significantly more frequently at lower sea levels than on higher ones. Additionally, the DWV-B and BQCV titer was negatively correlated with the sea level. It is to be assumed that the brood rearing period is shortened by the cooler climate at higher sea levels, which may be the main reason for a decreased virus reproduction in these apiaries.

There was no significant correlation between virus prevalence and the three evaluated beekeeping practices (comb exchange, usage of food combs from dead colonies, colony splitting). The reason may be partly that the majority of the participating beekeepers were following the suggestions of good beekeeping practices.

Therefore the sample size of beekeeping operations with suboptimal practices were too low to make verified conclusions.

In order to correlate winter loss and bee viruses, two different model types were calculated. For modelling the titer values of the six viruses and eight further influencing factors concerning beekeeping operation and colony characteristics were used. Both models highlighted a positive correlation between the DWV-B titer and high winter losses. A high ABPV titer was also an indication for winter loss, although the correlation was considerably weaker than with DWV-B. Beekeepers' observation of virus symptoms in the colonies were correlated with virus data. These data confirmed that the symptoms "varroa mite on bees" and "bees with deformed wings" are important indications for ABPV prevalence and elevated titer in ABPV and DWV-B, respectively. Thus, we recommend that beekeepers focus their attention onto these symptoms during the colony inspections in summer and autumn. This allows to detect virus problems fast and gives the possibility to take steps against them.

**The aim of Module V** is to generate monoclonal antibodies for the detection of viral gene products and for the development of enzyme linked immunosorbent assays (ELISA). Analogous to the rapid COVID-19 antigen detection kits, the ELISA will be used for rapid, low cost detection of viral infections in honey bee colonies in the laboratory and under field conditions.

Antigen preparations were produced for immunizations and tests. For this purpose, bacteria were genetically modified to produce antigens of deformed wing virus (DWV-A), Varroa destructor virus (VDV / DWV-B), sacbrood virus (SBV) and acute bee paralysis virus (ABPV). The structural proteins VP1, VP2 and VP3 of ABPV, the structural protein VP1 of SBV and the structural proteins VP1, VP2 and VP3 of VDV / DWV-B were successfully expressed and purified using chromatographic methods. These antigens were used to immunize mice. In addition to the genetically engineered antigens, large amounts of SBV, ABPV and DWV were generated by infection of bee pupae and purified by means of density gradient centrifugation. Mice were immunized using these high-purity virus preparations. Seroconversion was confirmed in all animals. After the B-lymphocytes were fused with myeloma cells, three high-affinity antibodies were determined for ABPV and SBV. They were able to recognize the native virus directly from the mechanically homogenized bee sample. Antibodies against VP1 of DWV-A were already available at the institute of virology from previous work and were characterized in more detail during the project. However, the existing DWV antibodies only recognize denatured antigen. Therefore, the sample for detection of DWV needs to be prepared differently, compared to samples for detection of ABPV and SBV. In order to standardize the sample processing for the three viruses, additional antibodies against native DWV antigens are currently being tested.

We achieved the project goal of developing a fast, inexpensive test against three important viral bee pathogens. A sandwich ELISA for virus detection in the laboratory was successfully established. For a rapid multiplex test, that can be carried out by the beekeeper at the apiary, further adjustments with development partners are necessary.

# 1 (U) Wintersterblichkeit

## 1.1 Einleitung

In den letzten Jahren hat das Thema Bienensterben weltweit immer mehr an Bedeutung gewonnen, nicht zuletzt dadurch, dass auch die Zahl der natürlichen Bestäuber wie Wildbienen, Hummeln, Schmetterlinge und Schwebfliegen deutlich sichtbar abnimmt (Hallmann et al., 2017). Die Bedeutung der Honigbiene — ökologisch und ökonomisch — ist entscheidend und unumstritten. Sie bestäubt beim Sammeln von Pollen und Nektar einerseits viele Wildpflanzen, wodurch sie erheblich zur Erhaltung der Artenvielfalt beiträgt, und andererseits auch viele vom Menschen genutzte Pflanzen. Aufgrund der Stärke ihrer Völker, der Zucht- und Transportmöglichkeit an den Ort des gewünschten Bestäubungseinsatzes kann sie gezielt als Bestäuber von Kulturpflanzen eingesetzt werden. Ihre Bestäubungsleistung ist enorm und wird jährlich auf einen finanziellen Wert von 153 Milliarden Euro weltweit beziehungsweise 14,2 Milliarden Euro in der EU geschätzt (Gallai et al., 2009). Damit ist die Biene nach dem Rind und dem Schwein das dritt wichtigste Tier für die Ernährung des Menschen (Kearns et al., 1998).

Die größten Gefahren für Bienen, Hummeln, Schmetterlinge und andere Insekten sind vom Menschen verursacht. Es wird vermutet, dass der Rückgang der natürlichen Bestäuber mit dem Verlust von Habitaten, dem Einsatz von Pestiziden, der Ausbreitung von Parasiten und Pathogenen sowie mit Umweltverschmutzung und dem Klimawandel zusammenhängt (Biesmeijer et al., 2006; Cameron et al., 2011; vanEngelsdorp et al., 2011; Cornman et al., 2012; Goulson, 2013; Steinhauer et al., 2014; Zee et al., 2014; Clermont et al., 2015; Woodcock et al., 2016; Steinhauer et al., 2018; Belsky und Joshi, 2019; Neov et al., 2019). Für die ökonomisch wie auch ökologisch wichtige Honigbiene *Apis mellifera* konnte auch der Einfluss des Menschen durch die Betriebsweise (Krankheitsprophylaxe und -bekämpfung) auf Völkerverluste nachgewiesen werden (Jacques et al., 2017). Das Thema Bienensterben ist von breitem gesellschaftlichen Interesse und in den letzten Jahren finden sich hoch emotionalisierte Berichterstattungen in den österreichischen Medien zu diesem Thema (Huber und Aichberger, 2020).

Generell ist das Bienensterben kein neues Phänomen (Neov et al., 2019). Im Gegenteil, schon seit Beginn der Bienenhaltung vor etwa 7.000 Jahren in Mesopotamien gibt es Überlieferungen von krankheitsbedingten Völkerverlusten (Flügel, 2015). Bereits zu dieser Zeit gab es ausführlichere Schriften, aus Griechenland und dem Römischen Reich stammend, über die Haltung der Biene und Vorgehensweisen bei Erkrankungen. Im deutschsprachigen Raum sind bis ins 17. Jahrhundert keine Aufzeichnungen über Bienenverluste bekannt. Erst der Wunsch von Teilen der Bevölkerung, die Bienenhaltung zu verbessern, sorgte dafür, dass Bienenkrankheiten, wie etwa die Faulbrut oder Ruhr, dokumentiert wurden. Völkerverluste, die nicht auf Pathogene zurückzuführen sind, wurden während der industriellen Revolution durch die Optimierung der Beuten sowie Züchtung der Honigbiene weitestgehend reduziert. Dies, sowie der Fortschritt der Bakteriologie zu Beginn des 20. Jahrhunderts und etwas später die Möglichkeit Viren nachzuweisen, ermöglichte erstmals die Erforschung von Krankheitserregern, welche für hohe Bienenverluste verantwortlich sind. Im Laufe des 20. Jahrhunderts wurde eine Vielzahl von Massensterben von Bienenvölkern verzeichnet, bei welchen die genaue Ursache nicht bekannt war. Als erstes großes Massensterben wurde 1906 jenes auf der englischen Insel Wight („Isle of Wight Disease“) dokumentiert (Neumann und Norman L Carreck, 2009; Flügel, 2015; Neov et al., 2019).

Im letzten Jahrzehnt hatten besonders die USA immer wieder mit extremen Winterverlusten von Bienenvölkern zu kämpfen. Mehrere Jahre in Folge haben dort etwa 30% der eingewinterten Völker nicht überlebt (vanEngelsdorp et al., 2007; vanEngelsdorp et al., 2008; vanEngelsdorp et al., 2010, 2011; Steinhauer et al., 2014; Lee et al., 2015). Auch Brasilien verzeichnete in den Jahren 2013-2017 sehr hohe Verlustraten,

wobei hier Pestizide als Hauptursache für die Verluste vermutet werden (Castilhos et al., 2019). Dennoch häufen sich die Fälle, in denen keine eindeutigen Gründe für das Massensterben festgestellt werden können. Es wird angenommen, dass die Ursachen für das Bienensterben komplex sind und dass der Auslöser für dieses Phänomen eine Kombination von mehreren Faktoren ist (Moritz et al., 2010; Brodschneider und Crailsheim, 2013; Steinhauer et al., 2014; Belsky und Joshi, 2019; Neov et al., 2019). In den USA spricht man von „colony collapse disorder“, kurz CCD (vanEngelsdorp et al., 2009; Williams et al., 2010). Im deutschsprachigen Raum wird CCD auch als „Bienen-Verschwindekrankheit“ bezeichnet (Flügel, 2015). Die Symptome sind: wenige adulte Bienen in den Völkern, verdeckelte Brut kann vorhanden sein, es finden sich aber keine toten Bienen in und um die Völker (vanEngelsdorp et al., 2009).

Seit einigen Jahren werden auch in Europa immer wieder hohe Winterverluste von Bienenvölkern verzeichnet (Chauzat et al., 2016). In Österreich ist ein Massensterben von Honigbienenvölkern im Winter mit derart hohen Verlusten von bis zu dreißig Prozent über mehrere Jahre in Folge — wie in den USA — bislang, mit Ausnahme der Winter 2011/12 und 2014/15, nicht aufgetreten. Im internationalen Vergleich waren die Verluste in Österreich in den vergangenen Jahren, mit Ausnahme der Winter 2011/12, 2014/15 und 2016/17, gering bis durchschnittlich (Zee et al., 2012, 2014; Brodschneider et al., 2016, 2018b, 2019a). In den ersten vier Jahren der vom Zoologischen Institut (jetzt: Institut für Biologie) der Karl-Franzens-Universität Graz durchgeführten Untersuchungen lagen sie zwischen 9,3% und 16%. Verluste dieser Größenordnung können durch Nachzucht im Sommer kompensiert werden (Brodschneider et al., 2019a). Im Winter 2011/12 verloren die österreichischen ImkerInnen jedoch 25,9% ihrer eingewinterten Völker (Brodschneider und Crailsheim, 2013) und im Winter 2014/15 sogar 28,4% (Crailsheim et al., 2018). Als Ursachen für die hohe Wintersterblichkeit werden Parasiten und Pathogene, allen voran die Milbe *Varroa destructor*, durch den Menschen ausgebrachte Pestizide, mangelhafte Ernährung durch ein einseitiges oder zeitlich verkürztes Trachtangebot, sowie die unzureichende Betreuung durch den Menschen, aber auch sozioökonomische Faktoren vermutet (Genersch et al., 2010; Budge et al., 2015a,b; Goulson et al., 2015; Lee et al., 2015; Moritz und Erler, 2016; Jacques et al., 2017; Tsvetkov et al., 2017; Woodcock et al., 2017). Weitere Gründe können außerdem Verluste von Königinnen, Probleme mit Königinnen — etwa aufgrund von Schädigungen durch Neonicotinoide (Williams et al., 2015; Dussaubat et al., 2016; Wu-Smart und Spivak, 2016; Siefert et al., 2020) — oder schlichtweg das Verhungern von Völkern während des Winters sein. Auch eine Rolle spielen die Betriebsgröße der Imkerei, sprich die Anzahl der vorhandenen Völker und die damit einhergehende Professionalität im Bienenmanagement, sowie das Wandern mit Bienenstöcken zu verschiedenen Trachtquellen (Zee et al., 2012; Steinhauer et al., 2014; Zee et al., 2014; Lee et al., 2015; Gray et al., 2019; Oberreiter und Brodschneider, 2020). Eine einfache, alleinige Ursache für die Winterverluste ist sehr selten auszumachen. Vielmehr sind die Ursachen, auch in Österreich, komplex und vielfältig und somit in ihrer Bedeutung schwer einzuschätzen (Brodschneider et al., 2010; Moritz et al., 2010; Potts et al., 2010; Brodschneider und Crailsheim, 2013; Staveley et al., 2014; Döke et al., 2015; Goulson et al., 2015; Oberreiter und Brodschneider, 2020).

Ein Parasit, welcher seit den 1980er Jahren für Völkerverluste in Österreich und Deutschland verantwortlich gemacht wird ist die aus Asien eingeschleppte, ektoparasitische Milbe *Varroa destructor* (Genersch et al., 2010; Rosenkranz et al., 2010; Morawetz et al., 2019). Die Analyse der von den ImkerInnen durchgeführten Behandlungen gegen diesen Risikofaktor ist daher von großer Bedeutung um Verluste zu reduzieren. Ursprünglich war nur die östliche Honigbiene *Apis cerana* von diesem Parasiten befallen. Heute ist die Varroamilbe beinahe weltweit — mit Ausnahme einiger Gebiete im Norden Europas, Australien und einigen Inseln — verbreitet (Dahle, 2010; Brodschneider und Crailsheim, 2011). *Apis mellifera* hat mit dem ursprünglichen Wirt *Apis cerana* nur das aggressive Verhalten als Abwehrstrategie gegenüber dem Parasiten gemein, wenngleich das bei der westlichen Honigbiene *Apis mellifera* geringer ausgeprägt ist. Unterschiede zwischen den beiden Arten zeigen sich etwa im Hygieneverhalten und bei *Apis cerana* der weitgehenden Limitierung des Befalls auf Drohnenbrut (Rosenkranz et al., 2010).

Die Vermehrung von *Varroa destructor* findet in verdeckelten Drohnen- und Arbeiterinnenbrutzellen statt

(Traynor et al., 2020). Als Nahrung der Milbe dient hauptsächlich der Fettkörper von Larven und adulten Bienen (Ramsey et al., 2019). Nach dem Schlupf der Biene ernährt sich die weibliche Milbe parasitisch für mehrere Tage an Ammenbienen und schädigt damit auch erwachsene Bienen (Ramsey et al., 2019). In dieser Ausbreitungsphase benützt *Varroa destructor* die adulte Biene als Transportmittel, um in neue Brutzellen oder gar entfernt liegende Bienenvölker zu gelangen (Traynor et al., 2020). Die Parasitierung der Brut führt unter anderem zu einem Gewichtsverlust, welcher sich auf den späteren Paarungserfolg von Drohnen auswirkt, außerdem kann sich die Lebensspanne von Arbeiterinnen verkürzen. Der Befall von Sammlerinnen beeinflusst das Lernvermögen und das Heimflug-Verhalten (Kralj und Fuchs, 2006; Kralj et al., 2007; Rosenkranz et al., 2010; Noël et al., 2020). Die betroffenen Bienen leiden zudem unter Orientierungsschwierigkeiten, was möglicherweise der Verbreitung der Milbe dient. Zudem wird der Aufbau wichtiger Proteinreserven, die für den Überwinterungserfolg entscheidend sind, erschwert (Amdam et al., 2004). Durch die Parasitierung mit der Varroamilbe wird durch eine Immunsuppression die Vermehrung von Viren bei Sekundärinfektionen erleichtert. Am besten bekannt ist die durch Varroose begünstigte Infektion mit dem Flügeldeformationsvirus (Deformed Wing Virus, DWV), welche sich durch die stark verkümmerten Flügel und verkürzte Abdomina (Hinterleibe) der Bienen auszeichnet (Rosenkranz et al., 2010). Bienenvölker, in denen dieses Virus nachgewiesen wurde, waren schwächer, das heißt sie hatten weniger mit Bienen besetzte Waben und Brut als nicht befallene Völker (Budge et al., 2015b). Mit DWV infizierte adulte Bienen zeigen eine verkürzte Lebensspanne, ein jüngeres Sammelalter und eine verkürzte Sammelzeitspanne (Benaets et al., 2017), aber auch die Übertragung anderer Viren steht in Zusammenhang mit der Varroamilbe (Traynor et al., 2016). Ein hoher Parasitierungsgrad durch *Varroa destructor* im Monat September hat neben anderen Faktoren wie dem Alter der Königinnen, dem Erfahrungsgrad der ImkerInnen, der Stärke der Völker im September, einen großen Einfluss auf das Ausmaß der Winterverluste (Morawetz et al., 2019).

Fehlende oder von ImkerInnen mangelhaft durchgeführte Behandlungen gegen *Varroa destructor* führen zumeist zu einer Schwächung oder sogar zum Verlust des Volkes innerhalb von zwei bis drei Jahren (Rosenkranz et al., 2010). Die Bekämpfung des Parasiten basiert entweder auf biotechnischen Maßnahmen (zum Beispiel Entnahme von verdeckelter Drohnen- oder Arbeiterinnenbrut, Bannwabenverfahren, Brutunterbrechung), Einsatz zugelassener Tierarzneimittel auf Basis organischer Säuren (Ameisen-, Oxal-, Milchsäure), ätherischer Öle (Thymol, Eucalyptol, Menthol, Kampfer) und Akariziden aus verschiedenen Wirkstoffgruppen. Je nach chemischen Eigenschaften der eingesetzten Stoffe (fett- beziehungsweise wasserlöslicher Wirkstoff) kann es dabei zu einer ungewollten Ansammlung der Stoffe in Honig und Wachs, bis hin zur Beeinflussung der Gesundheit des Volkes kommen (Rosenkranz et al., 2010; Noël et al., 2020). Entscheidend für den Erfolg der Behandlung ist der Zustand des Volkes (mit beziehungsweise ohne verdeckelte Brut), die Art und der Zeitpunkt der jeweiligen Varroabehandlung (Brodtschneider und Crailsheim, 2013; Zee et al., 2014).

Neben der Varroamilbe existieren in Österreich noch andere Schädlinge, die der Gesundheit der Völker zusetzen. Zu erwähnen ist unter anderem das Mikrosporidium *Nosema* spp., dass in den Arten *N. ceranae* und *N. apis* in Österreich nachgewiesen wurde. Dieser Einzeller befällt die Epithelzellen des Mitteldarms adulter Tiere und wirkt dort als intrazellulärer Parasit, der Dysenterie, eine Entzündung des Darms mit einhergehender Diarrhö, auslöst. Die durch *Nosema* spp. ausgelöste Krankheit wird als Nosemose bezeichnet und war Mitte des 20. Jahrhunderts noch eine sehr häufig vorkommende Bienenkrankheit in Europa (Flügel, 2015). Weitere Bedrohungen sind Bakterien, die Amerikanische Faulbrut (*Paenibacillus larvae*) oder Europäische Faulbrut (*Melissococcus plutonius*) auslösen, Pilze (*Ascosphaera apis*, *Aspergillus flavus*), Amöben (*Malpighamoeba mellificae*), weitere Arthropoden wie die Tracheenmilbe (*Acarapis woodi*) und in geringem Ausmaß Innenschädlinge wie zum Beispiel die Große und Kleine Wachsmotte (*Galleria mellonella*, *Achroia grisella*) oder der Totenkopfschwärmer (*Acherontia atropos*) (Brodtschneider und Crailsheim, 2011). Die Liste der vorkommenden Schädlinge in Österreich könnte in Zukunft noch durch den kleinen Bienenstockkäfer (*Aethina tumida*) (Neumann, 2016) und die asiatischen Hornisse (*Vespa velutina*) (Monceau et al., 2014) ergänzt werden.



Der Mensch fördert durch die räumliche Nähe vieler Bienenvölker an einem Bienenstand die horizontale Verbreitung der Krankheitserreger (Fries und Camazine, 2001; Seeley und Smith, 2015; Forfert et al., 2016; Bartlett et al., 2021). Kulhanek et al., 2021, zeigten in einem Feldexperiment, dass Völker die öfter fremde Bienen einlassen auch eine höhere Anzahl an Milben aufweisen. Ein Zusammenhang mit Räuberei oder vermehrtes Abfliegen beziehungsweise Zufliegen von Völkern mit starkem Milbebefall konnte nicht bestätigt werden. Die Verbreitung von Krankheiten kann aber nicht nur durch eine hohe Völkerdichte an einem Standort, sondern auch durch Handel und Wanderinkerei über weite Entfernungen stattfinden. Internationale Untersuchungen von Zee et al., 2012, 2014 sowie Ergebnisse aus den USA (Steinhauer et al., 2014; Lee et al., 2015) zeigen, dass größere Betriebe in manchen Jahren sogar geringere Winterverluste als kleinere Betriebe verzeichneten, was neben der hohen Völkerdichte auch auf andere Faktoren bei der Verbreitung schließen lässt. Auch eine vertikale Erregerübertragung mancher Krankheiten über Ei- oder Samenzellen ist möglich (Fries und Camazine, 2001; Yue et al., 2007; Peng et al., 2015).

Immer mehr Studien widmen sich der Erforschung der synergetischen Wirkung verschiedener Stressfaktoren. Untersuchungen zeigen die Zusammenhänge zwischen dem subletalen Einfluss von Pestiziden und gesteigertem Pathogenbefall bei Honigbienen (Pettis et al., 2012; Di Prisco et al., 2013; Alburaki et al., 2017; Annoscia et al., 2020). Zum Beispiel verursacht das Neonicotinoid Clothianidin eine Schwächung des Immunsystems, und damit eine stärkere Infektion mit dem Flügeldeformationsvirus (Di Prisco et al., 2013). Auch die Kombination von Neonicotinoiden und der Varroamilbe resultieren in höheren Verlustraten, insbesondere bei den langlebigen Winterbienen (Straub et al., 2019). Pettis et al., 2012 stellte zudem eine höhere Anzahl von *Nosema* spp.-Sporen unter dem Einfluss von Imidacloprid fest, ein Hinweis für eine gesteigerte Anfälligkeit für den Darmparasit *Nosema* spp. Larven, die mit Amerikanischer Faulbrut infiziert und gleichzeitig subletalen Dosen bestimmter Pestizide ausgesetzt waren, zeigten eine signifikant höhere Mortalität als Larven die nur einem dieser beiden Stressoren ausgesetzt waren (Hernández-López et al., 2017). DeGrandi-Hoffman und Y. Chen, 2015 beschreiben den Zusammenhang zwischen Ernährung und der Immunität eines Bienenvolkes gegen Viren und die negative Kombination mit der Varroamilbe. Die Ergebnisse dieser Studien unterstützen somit die Annahme multifaktorieller Ursachen hoher Winterverluste. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich die Aufsummierung mehrerer Risikofaktoren, wie zum Beispiel Krankheitserreger, Mangelernährung und Pestizidkontamination, stärker als ein Faktor allein, und auch die Summe der einzelnen Schädigungen auf den Überwinterungserfolg auswirken kann (Goulson et al., 2015; Barroso-Arévalo et al., 2019). Eine gezielte Einleitung von Gegenmaßnahmen wird dadurch erschwert (Brodtschneider und Crailsheim, 2013).

Die Dokumentation der Winterverluste ist aus mehreren Gründen sehr wichtig: einerseits wegen der bereits erwähnten ökonomischen und ökologischen Bedeutung der Honigbiene und andererseits, um die Ursachen zu ergründen und entsprechend darauf reagieren zu können. Die Umfrage bieten auch eine Plattform für die teilnehmenden ImkerInnen mittels Anmerkungen ihre persönlichen Einsichten und Erfahrungen in einer wissenschaftlichen Datenbank zu hinterlegen. Die Erhebung der Winterverluste in Österreich erfolgte seit 2008 durch das Institut für Biologie (vormals: Zoologie) der Karl-Franzens-Universität Graz im Rahmen des Forschungsnetzwerkes COLOSS (prevention of honey bee Colony LOSSes; Brodtschneider et al., 2010; Brodtschneider und Crailsheim, 2013). Seit der Überwinterungsperiode 2013/14 erfolgen diese Erhebungen im Rahmen des Projektes „Zukunft Biene“ unter Einhaltung der von COLOSS etablierten und immer weiter angepassten Standards. Die Befragung erfolgte anhand des im Rahmen von COLOSS erarbeiteten Fragebogens: ImkerInnen in ganz Österreich werden auf freiwilliger Basis und auf Wunsch auch anonym zur Zahl ihrer eingewinterten Völker, deren Standort sowie zum Völkerverlust befragt. Zudem werden auch Fragen zur Betriebsweise, Behandlung der Völker gegen die Varroamilbe und zu ökologischen Faktoren (etwa zum Trachtangebot) gestellt. Diese standardisierte Vorgehensweise, auch als Citizen Science oder Bürgerbeteiligung bezeichnet, erlaubt die Gewinnung großer Datensätze über das Bienensterben im Winter und ermöglicht zusätzlich zur Analyse der Winterverluste in Österreich auch internationale Vergleiche (Brodtschneider et al., 2016, 2018b, 2019a). In Österreich konnte mithilfe dieser Daten ein Zusammenhang von Wetter und Landnutzung mit Winterverlusten festgestellt werden (Switanek et al., 2017; Kuchling

et al., 2018; Becsi et al., 2021). Die Befragung der ImkerInnen stellt aber nur eine der im Rahmen von „Zukunft Biene“ getätigten Maßnahmen dar. In weiteren Untersuchungen im Rahmen von „Zukunft Biene“ wurden ausgewählte Völker auch Inspektionen durch geschulte ExpertInnen unterzogen und aufwändige Untersuchungen von Probenmaterial durchgeführt. Die Umfragen bilden eine wichtige Datenbasis für vertiefende Untersuchungen und sind somit, gemeinsam mit weiteren Untersuchungen (zum Beispiel gezielte Probenahmen im Teilprojekt „Virenmonitoring“), der Grundstock im Kampf gegen hohe Winterverlustraten (Zee et al., 2015). Dabei spielt die Datenerhebung über mehrere Jahre eine sehr wichtige Rolle, da erst durch Langzeitstudien mögliche temporäre Trends im Imkereisektor berücksichtigt werden können und die Diskussion über die beobachteten Ergebnisse dadurch eine stärkere Aussagekraft hat. Zusätzlich können durch die Datenbasis auch mögliche aufkommende neue Probleme in der österreichischen Imkerei bereits frühzeitig erkannt werden und man hat qualitativ hochwertige Vergleichsdaten über mehrere Jahre.

## 1.2 Methodik

### 1.2.1 Datenerhebung

Die Erhebung der Winterverluste von Bienenvölkern in Österreich wird jährlich zwischen Februar und Mai mittels eines von COLOSS festgelegten Fragebogens durchgeführt. Der Fragebogen, der auch Fragen zur Betriebsweise inkludiert, ist so aufgebaut, dass ein breites Spektrum an Informationen mit einem für die ImkerInnen geringen zeitlichen Aufwand abgefragt wird. Es werden außerdem von jeder Imkerei nur einfach festzustellende Fakten abgefragt, die ohne technische Hilfsmittel beantwortet werden können. Im Fragebogen wird die Anzahl an eingewinterten und die Anzahl an verlorenen Bienenstöcken in drei Kategorien abgefragt (verloren (tote Völker, leere Beuten), verloren durch Elementarschaden, weisellos oder drohnenbrütig), sowie damit in Zusammenhang stehende mögliche Risikofaktoren (Wanderimkerei, Behandlungsmethode, Trachtpflanzen etc.). Anhand der Summe an eingewinterten Völkern abzüglich der verlorenen Völker in Verbindung mit dem jeweiligen Risikofaktor wird dann die Winterverlustrate ermittelt.

Die Teilnahme kann entweder anonym oder nicht-anonym, durch das Hinterlassen von Kontaktdaten, erfolgen. Die Papierfragebögen werden per Post an Imkervereine versendet und bei Veranstaltungen verteilt. Die Umfrage ist auch online auf [www.bienenstand.at](http://www.bienenstand.at) verfügbar sowie, in einer Kurzversion, in der Zeitschrift „Biene Aktuell“ im jeweiligen Frühjahr veröffentlicht. Dadurch sollte eine möglichst große Reichweite erzielt werden und auch ImkerInnen ohne Internetzugang haben somit die Chance zur Teilnahme (Zee et al., 2013).

Die im Fragebogen gestellten Fragen beziehen sich auf Standort und Größe der Imkerei, die Anzahl der verlorenen Völker, sowie auch den möglichen Transport der Völker, die Betriebsweise, bestimmte Nahrungsquellen der Bienen und auch die Behandlung gegen die Varroamilbe. Die Fragen beinhalteten: Anzahl an eingewinterten Völkern mit junger Königin (Nulljährige Königin), beobachtete Königinnen Probleme in der Sammelsaison im Vergleich zu bisherigen Erfahrungen, Offener Gitterboden im Winter, Isolierte Beuten im Winter, Kunststoff Beuten, Zertifizierte Bioimkerei, Bienen aus Zuchtprogramm für Varroatoleranz, Kleine Brutzellen (5,1mm oder weniger), Naturwabenbau (ohne Mittelwand), Wachskauf (kein eigener Wachskreislauf), Anteil an erneuerten Brutwaben (in relativen Prozentgruppen), die Häufigkeit der Beobachtung von verkrüppelte Bienen in der Sammelsaison (Häufig, Selten, Keine, Weiß nicht) und Vereinigung von schwachen Völkern vor dem Winter seit der Umfrage 2019/20. Die Auswahl der Fragen erfolgte durch Vorschläge von ImkerInnen aus vorherigen Umfragen oder Diskussionsgruppen, diese Fragen wurden von COLOSS evaluiert und nach entsprechender Prüfung in den internationalen Fragebogen aufgenommen.

Bei Winterverlusten wurde zwischen Völkerverlusten und Völkern mit Königinnen-Problemen unterschieden. Für die Gesamtverlustrate wurden beide addiert. Des Weiteren wurden auch in Bezug auf die verlorenen Völker leicht erkennbare Symptome abgefragt. Dabei konnten die ImkerInnen berichten, ob sie viele tote Bienen im oder vor dem Volk hatten, ob sie keine oder nur wenige tote Bienen im oder vor dem Volk hatten, ob tote Bienen in Zellen gefunden wurden, ob die Bienen kein Futter im Stock hatten (verhungert), verhungert sind, obwohl genug Futter im Volk war (Futterabriss), ob sie keines der oben genannten oder unbekannte Symptome hatten und letztlich ob sie, unabhängig vom Schadbild, aufgrund von Elementarschäden (Flut, Vandalismus, Specht, etc.) Völker verloren hatten. Die Anzahl an Völkern die durch Elementarschäden verloren gingen wurde in weiterer Folge nicht in die Verlustraten und Risikoanalyse aufgenommen, da es sich hierbei nicht strikt um biologische (zum Beispiel Alter der Königin) oder Risikofaktoren durch Betriebsweisen handelt. Seit der Umfrage 2017/18 werden die TeilnehmerInnen außerdem zum Auftreten von verkrüppelten Flügeln befragt, einem möglichen Hinweis auf eine Infektion mit einem Pathogen oder Probleme in der Brutpflege.

Da es zwei Versionen von Fragebögen gab, wurden bei der längeren Version zusätzlich Fragen zu Trachtquellen (Sonnenblumen, Waldtracht, Spätblühende Zwischenfrüchte, Waldtracht mit Melezitose, Raps, Mais) und Varroa- Behandlungsmethoden sowie deren Zeitraum und ob es Varroa-Befall gab, beziehungsweise wie kontrolliert wurde und auch hier gegebenenfalls der Zeitraum abgefragt.

Unser Ziel war es, so viele Daten wie möglich zu sammeln, um eine gute Repräsentation der Situation in Österreich zu bekommen. Alle beteiligten ImkerInnen haben an der Umfrage freiwillig teilgenommen. Eine Verpflichtung bestand lediglich für jene Imkereien, die (freiwillig) am Österreichischen Bienengesundheitsprogramm (ÖBGP) teilnahmen. Alle Imkereien unabhängig von der Größe ihrer Betriebe konnten mitmachen. In die Auswertung wurden nur jene Fragebögen aufgenommen, aus denen die Winterverlustrate berechnet werden konnte. Fehlerhafte oder unvollständige Fragebögen wurden nicht ausgewertet. Dazu zählten beispielsweise Fragebögen, in denen die Angaben zum Standort fehlten und/oder keine Angaben über die Anzahl der eingewinterten oder überlebenden Völker gemacht wurden. Offensichtliche Duplikate wurden nach eingehender Prüfung ebenfalls entfernt.

Zur Wahrung der persönlichen Daten der TeilnehmerInnen, wurde eine Datenschutzerklärung zwischen den an der Auswertung beteiligten Personen erstellt. Alle persönlichen Daten wurden bei der Auswertung entfernt. Wenn eine Kontaktmöglichkeit angegeben wurde, wurde diese nur zur Nachfrage verwendet, um fehlende oder fehlerhafte Daten zu korrigieren.

### 1.2.2 Datenvalidierung und Fehlerkontrolle

Wenn ImkerInnen über einen Papierfragebogen teilnahmen, wurden die Daten manuell in eine Microsoft Excel-Datei übertragen, in welcher alle Umfragedaten gesammelt wurden. Die automatische Überprüfungen der Datenqualität erfolgte mit Formeln in Excel, um Verarbeitungsfehler zu minimieren und mögliche ungültige Antworten hervorzuheben, zum Beispiel mehr Kolonien verloren als existent, wie in Brodschneider und Crailsheim, 2013; Zee et al., 2013 beschrieben. Diese widersprüchlichen Einträge oder Mehrfacheinträge desselben Imkers/derselben Imkerin wurden entfernt. Fehlende Antworten und eine geringere Anzahl an Fragen im Fragebogen der Zeitschrift „Biene Aktuell“ führten zu einer verringerten Anzahl von Antworten auf manche Fragen. Wenn die Anzahl an Antworten für einen Faktor für eine sinnvolle statistische Analyse nicht ausreichte, wurden die Daten nicht verwendet.

Die TeilnehmerInnen gaben nur die grobe Position des Hauptbienenstandes zur Überwinterung bekannt, das heißt mindestens Bezirk und Postleitzahl. Die Geolokalisierungen für die Koordinaten zur Höhenschätzung wurden mit dem R Package „tidygeocoder“ Cambon et al., 2021 und dem Google Webservice *Geocoding* erstellt und, falls dies fehlschlug, durch eine manuelle Suche ergänzt. Um falsche Geolokalisierungen zu minimieren wurden die resultierenden Standorte auf einer Bezirkskarte aufgezeichnet und auf korrekte Zuordnung zu den Bezirken getestet, wie von den TeilnehmerInnen der Umfrage angegeben. Die folgende Höhenschätzung für die Standorte wurde mit dem Topografiemodell SRTM-3v4 über einen Webdienst durchgeführt (GeoNames, o.D.). Die Standortkarten wurden mit R (R Core Team, 2021) und Shapefiles unter einer „kreativen gemeinsamen Lizenz“ erstellt<sup>1</sup>.

### 1.2.3 Statistik

Alle Antworten wurden in einer Excel-Datei zusammengeführt, um die Auswertung der gesamten Daten, das heißt sowohl jener aus den Online-Fragebögen als auch der von den Papierfragebögen, durchführen zu können. Die statistische Software R (R Core Team, 2021) und das Paket tidyverse (Wickham et al.,

<sup>1</sup>[https://www.data.gv.at/katalog/dataset/bev\\_verwaltungsgrenzenstichtagsdaten150000](https://www.data.gv.at/katalog/dataset/bev_verwaltungsgrenzenstichtagsdaten150000) 01.04.2019, Bundesamt für Eich- und Vermessungswesen

2019), wurden für die Datenanalyse und die Erstellung von Grafiken verwendet. Der Code, inklusive einer Auflistung der restlichen hier nicht erwähnten Pakete, ist auf GitHub unter einer MIT-Lizenz verfügbar<sup>2</sup>. Eine einfache Onlineversion wurde auch öffentlich zugänglich gemacht: <http://bienenstand.at/uncategorized/confidence/>.

Die Schätzung der Verlustraten basiert auf der jeweiligen Gesamtzahl der verlorenen Völker (siehe Formel 1.1) und wird nicht auf Betriebsebene berechnet, sondern immer Anhand der verglichenen Gruppen. Die Konfidenzintervalle (CI) wurden für jede analysierte Gruppe aus einem eigenen Null-Modell erstellen, welche mit Hilfe eines Generalisierten Linearen Modells (GZLM) mit quasi-binomialer Verteilung und der Linkfunktion „logit“ berechnet wurden. Die Erstellung erfolgte nach wissenschaftlich etablierten Methoden (Zee et al., 2013). Die so berechnete Verlustschätzung ist als Fehlerbalken dargestellt, wobei die horizontalen Linien vom Fehlerbalken den 95% CI darstellen. Diese 95% CI können vereinfacht so erklärt werden, dass langfristig in 100 Vergleichen der Populationsparameter, die wirkliche Verlustrate in Österreich, 95 mal im Fehlerbalken Intervall liegt und fünf mal eine Fehlschätzung vorliegt. Zusätzlich sind bei den meisten Risikofaktoranalysen die individuellen TeilnehmerInnen Verlustraten auf Betriebsebene graphisch im Hintergrund durch graue Punkte angedeutet. Um signifikante Unterschiede zu identifizieren wurden die Konfidenzintervalle zwischen den Faktoren verglichen. Wenn sich die Konfidenzintervalle nicht überlappten, zählten wir dies als signifikanten Unterschied. Die Verluste von Bienenvölkern durch Elementarschaden wurden in der Auswertung nicht inkludiert, außer wenn explizit im Text erwähnt.

$$\frac{\sum \text{Verlust Bienenvölker} - \sum \text{Verlust durch Elementarschäden}}{\sum \text{Bienenvölker eingewintert}} * 100 \quad (1.1)$$

In unserer Auswertung wird keine Korrektur für die Kumulierung des Alphafehlers vorgenommen, da in unserem Fragebogen verschiedene Hypothesen getestet werden und mögliche Überschneidungen der Hypothesen nur schwer einzuteilen sind. Deswegen versuchen wir über mehrere Jahre die gleichen Fragen beizubehalten um Irrtumswahrscheinlichkeiten in der Statistik zu vermindern. Ein analysierter Risikofaktor der über mehrere Jahre einen signifikanten Einfluss auf die Winterverluste zeigt hat wahrscheinlich eine starke Aussagekraft. Untersuchte Faktoren können aber auch einer Korrelation mit einer annualen Variable unterliegen wie zum Beispiel dem Wetter (Switanek et al., 2017).

Für die Analyse der Kombination verschiedener Behandlungsmethoden wurde der Anwendungszeitpunkt für die Behandlungsmethoden in Frühling, Sommer und Winter unterteilt. In den Kombinationen sind die Monate Jänner, Februar und März des Folgejahres nicht berücksichtigt. Zusätzlich haben wir die Methode „Entfernung der Drohnenbrut“ exkludiert und die Methoden „Oxalsäure Träufeln (oder Sprühen)“ und „Oxalsäuremischungen (Hiveclean/Bienenwohl/Varromed)“ zusammengeführt, um die Stichproben der Kombinationen zu erhöhen. TeilnehmerInnen mit der gleichen Behandlungskombination wurden zur weiteren Auswertung gruppiert und die Verlustrate wie zuvor beschrieben berechnet. Um statistisch relevante Ergebnisse zu erhalten wurden nur Kombinationen mit mindestens 15 TeilnehmerInnen, zumindest in einem Untersuchungsjahr, verwendet.

<sup>2</sup>GitHub: [https://github.com/HannesOberreiter/coloss\\_austria\\_colony\\_losses\\_zukunftbiene2](https://github.com/HannesOberreiter/coloss_austria_colony_losses_zukunftbiene2)

## 1.3 Ergebnisse

### 1.3.1 Repräsentativität

#### 1.3.1.1 Beteiligung

Über die vier Jahre Projektdauer war die prozentuelle Beteiligungsrate der österreichischen Imkereien an unserer Umfrage zu den Winterverlusten konstant zwischen 4,4%-5,2% (Tabelle 1.2). Die Anzahl der Imkereien und auch Bienenvölker ist über die letzten vier Jahren gestiegen und ist momentan so hoch wie noch nie seit dem Beginn von „Zukunft Biene I“ im Winter 2013/14 (Abbildung 1.1). Die Anzahl der ImkerInnen hat auch einen neuen Höchststand im Vergleich zum Jahr 1990 erreicht, der Beginn der uns zur Verfügung stehenden Aufzeichnung (Tabelle 1.1). Hierbei sei hingewiesen, dass es erst durch die Einführung der Bestandsmeldung seit 2017 im Veterinärinformationssystem (VIS) eine Meldepflicht für ImkerInnen in Österreich besteht. Die Grundlage für die Berechnung der Rückmeldungen (in %) und Veränderung der Anzahl an Imkereibetrieben und Völker in Österreich seit 2013 bilden die Daten von „Biene Österreich“ (Tabelle 1.2).

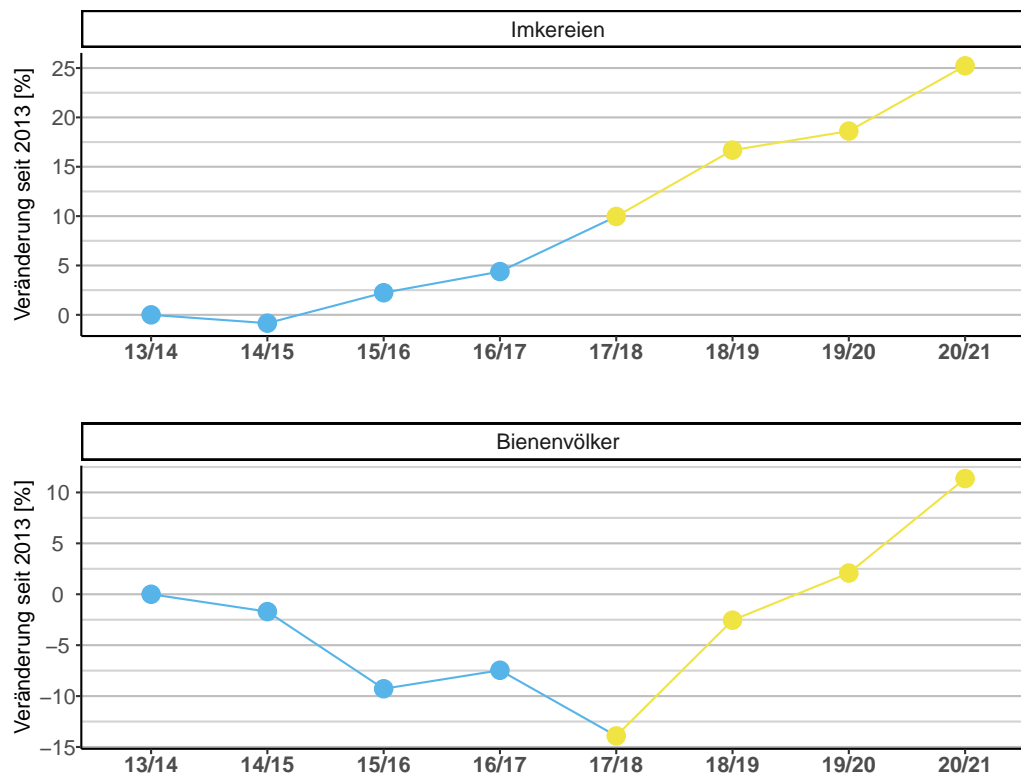


Abbildung 1.1: Prozentuelle Veränderung der Anzahl an Imkereibetriebe und Bienenvölker seit der Umfrage im Winter 2013/14, auf Basis der Daten von „Biene Österreich“ (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Anzahl der ImkerInnen und Bienenvölker in Österreich. Daten von „Biene Österreich“, seit 2017 auf Basis der Meldungen ins Veterinärinformationssystem (VIS) für den jeweiligen Stichtag 31. Oktober.

Jahr	ImkerInnen	Bienenvölker	Mittelwert Völker
1990	30.802	457.061	14,8
1995	28.447	393.723	13,8
2000	25.541	363.967	14,3
2003	24.421	327.346	13,4
2006	23.000	311.000	13,5
2010	24.451	367.583	15,0
2011	24.490	368.183	15,0
2012	25.099	376.485	15,0
2013	25.492	382.638	15,0
2014	25.277	376.121	14,9
2015	26.063	347.128	13,3
2016	26.609	354.080	13,3
2017	28.032	329.402	11,8
2018	29.745	372.889	12,5
2019	30.237	390.607	12,9
2020	31.923	426.121	13,3

Tabelle 1.2: Beteiligungsrate an unserer Umfrage zu den Winterverlusten seit Winter 2013/14.

Jahr	Imkereien			Bienenvölker		
	Gesamt <sup>1</sup> [#]	Umfrage [n]	Anteil [%]	Gesamt <sup>1</sup> [#]	Umfrage <sup>2</sup> [n]	Anteil [%]
2013/14	25.492	1.023	4,0	382.638	18.794	4,9
2014/15	25.277	1.259	5,0	376.121	22.882	6,1
2015/16	26.063	1.289	4,9	347.128	23.418	6,7
2016/17	26.609	1.656	6,2	354.080	43.852	12,4
<b>2017/18</b>	28.032	1.391	5,0	329.402	28.373	8,6
<b>2018/19</b>	29.745	1.534	5,2	372.889	33.651	9,0
<b>2019/20</b>	30.237	1.539	5,1	390.607	30.724	7,9
<b>2020/21</b>	31.923	1.406	4,4	426.121	29.638	7,0

<sup>1</sup>Die angeführten Gesamtzahlen beziehen sich auf Imkereien und Bienenvölker in Österreich und beruhen auf Angaben der „Biene Österreich“. Diese Zahlen bilden die Grundlage für die Berechnung der Rückmeldungen, siehe Tabelle 1.1.

<sup>2</sup>Gesamtsumme der eingewinterten Bienenvölker der teilnehmenden Imkereien.

### 1.3.1.1.1 Longitudinalstudie

Durch die Aufnahme von vier aufeinanderfolgenden Jahren können wir auch eine einfache Langzeitanalyse durchführen. Anhand der freiwilligen Angabe einer Kontakt Adresse und durch die Angabe des Bundeslandes wurden TeilnehmerInnen aus dem Datensatz selektiert die alle vier Jahre teilgenommen haben. Insgesamt handelt es sich dabei um 135 ImkerInnen, welche in den vier Jahren in Summe eine Steigerung der Bienenvölker erreichten (Tabelle 1.3). Vergleicht man die Verlustrate dieser TeilnehmerInnen mit den restlichen TeilnehmerInnen, zeigt sich eine signifikante niedrigere Verlustrate für die LangzeitteilnehmerInnen in den Umfragejahren 2017/18 und 2020/21 (Abbildung 1.2, Tabelle 1.4).

Tabelle 1.3: Anzahl der eingewinterten Völker über die Jahre für TeilnehmerInnen die über alle vier Umfragejahre teilgenommen haben ( $n = 135$ ).

Jahr	Mittelwert	Median	Summe
2017/18	22	14	3.011
2018/19	25	15	3.430
2019/20	26	15	3.545
2020/21	27	16	3.659

Tabelle 1.4: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten in Abhängigkeit ob LangzeitteilnehmerIn (alle vier Jahre) oder nicht über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21.

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
LangzeitteilnehmerInnen	135	9,7	8,8	(7,2 - 10,8)
Unbekannt	1.256	90,3	12,1	(11,4 - 12,9)
<b>18/19</b>				
LangzeitteilnehmerInnen	135	8,8	14,3	(11,9 - 17,2)
Unbekannt	1.399	91,2	15,3	(14,4 - 16,3)
<b>19/20</b>				
LangzeitteilnehmerInnen	135	8,8	14,0	(11,8 - 16,6)
Unbekannt	1.404	91,2	12,4	(11,7 - 13,2)
<b>20/21</b>				
LangzeitteilnehmerInnen	135	9,6	10,2	(8,6 - 12,1)
Unbekannt	1.271	90,4	12,9	(12,1 - 13,7)

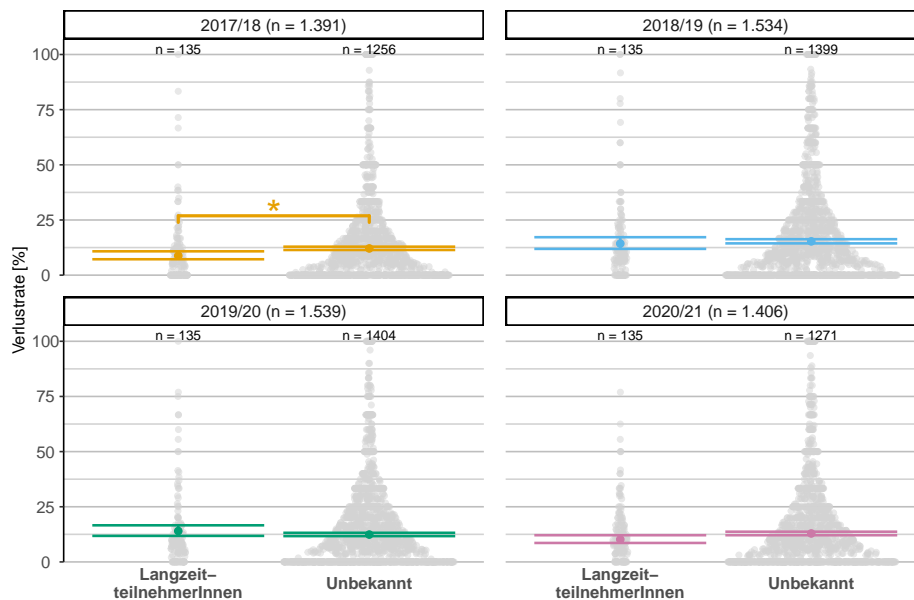


Abbildung 1.2: Höhe der Winterverluste LangzeitteilnehmerInnen zu Anonymen oder die in weniger als vier Jahren teilgenommen haben in Prozent (und 95% CI) über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.



### 1.3.1.2 Anonyme Teilnahme versus nicht anonyme Teilnahme

Die Umfrage war freiwillig und konnte vollständig anonym ausgefüllt werden. Das Verhältnis zwischen Imkereien die anonym Teilgenommen haben und welche die eine Kontaktmöglichkeit (Kontaktadresse, E-Mail oder Telefonnummer) hinterlassen haben blieb über die Untersuchungsjahre in etwa konstant (Tabelle 1.5). Im Winter 2018/19 gab es einen signifikanten Unterschied, wobei anonyme TeilnehmerInnen eine höhere Verlustrate zeigen (Abbildung 1.3-2018/19). In den restlichen untersuchten Jahren konnte hier kein statistischer Unterschied festgestellt werden (Abbildung 1.3).

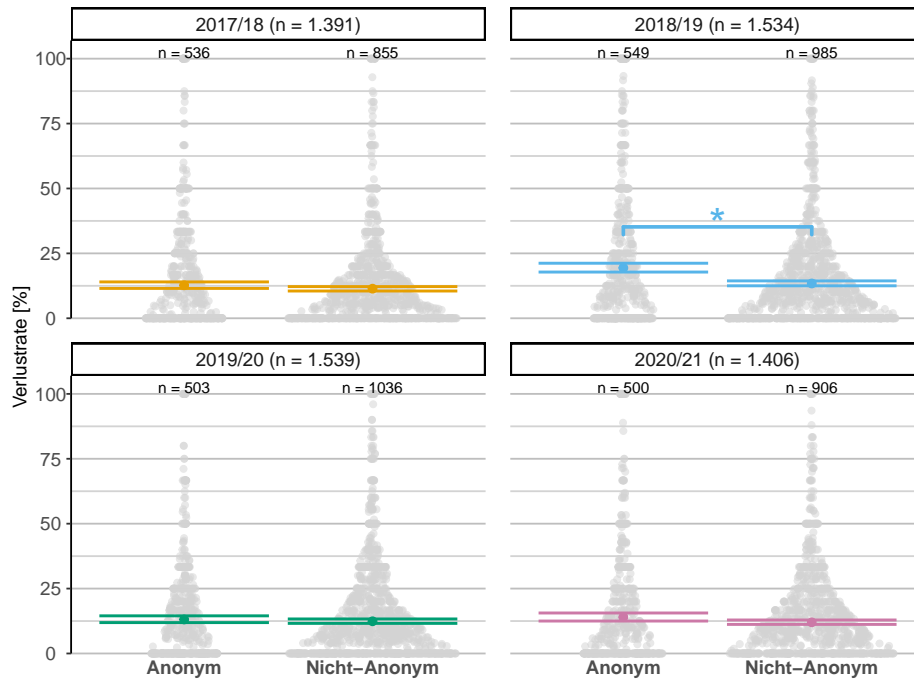


Abbildung 1.3: Höhe der Winterverluste anonymer TeilnehmerInnen und nicht-anonymer TeilnehmerInnen in Prozent (und 95% CI) über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

Tabelle 1.5: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten anonymer TeilnehmerInnen und nicht-anonymer TeilnehmerInnen über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Anonym	536	38,5	12,7	(11,5 - 14,0)
Nicht-Anonym	855	61,5	11,4	(10,5 - 12,2)
<b>18/19</b>				
Anonym	549	35,8	19,4	(17,8 - 21,2)
Nicht-Anonym	985	64,2	13,4	(12,5 - 14,4)
<b>19/20</b>				
Anonym	503	32,7	13,1	(11,9 - 14,5)
Nicht-Anonym	1.036	67,3	12,4	(11,6 - 13,3)
<b>20/21</b>				
Anonym	500	35,6	14,0	(12,5 - 15,6)
Nicht-Anonym	906	64,4	12,0	(11,2 - 12,9)

### 1.3.1.3 Online-Antworten versus Papierfragebogen-Antworten

Die Teilnahme war online, mittels Papierfragebogen oder Kurzfragebogen in der Zeitschrift „Biene Aktuell“ möglich. Tabelle 1.7 zeigt, wie viele ImkerInnen seit 2013/14 mit welchem Medium an unserer Untersuchung beteiligt haben. Die meisten Antworten erreichten uns Online, in der Umfrage 2020/21 waren dies bereits über 90% der Antworten. Die Teilnahme mittels Papierfragebogen hat in den letzten drei Jahren stark abgenommen (Tabelle 1.7). In den meisten Umfragejahren konnte kein signifikanter Unterschied der Verlustrate zwischen den Teilnahmetypen festgestellt werden (Tabelle 1.6, Abbildung 1.4). Ausgenommen im Untersuchungsjahr 2019/20, wo eine signifikant höhere Verlustrate bei Zeitschriften-TeilnehmerInnen im Gegensatz zu Online-TeilnehmerInnen festgestellt wurde (Abbildung 1.4).

Tabelle 1.6: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten der unterschiedlichen Teilnehmertypen (Online, Papier, Zeitschrift) über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Internet	1.101	79,2	11,4	(10,7 - 12,2)
Papier	238	17,1	13,5	(11,7 - 15,6)
Zeitschrift	52	3,7	14,6	(10,4 - 20,2)
<b>18/19</b>				
Internet	1.378	89,8	15,4	(14,5 - 16,3)
Papier	93	6,1	15,0	(11,7 - 19,1)
Zeitschrift	63	4,1	10,7	(7,0 - 16,0)
<b>19/20</b>				
Internet	1.362	88,5	12,3	(11,5 - 13,0)
Papier	91	5,9	13,9	(11,7 - 16,4)
Zeitschrift	86	5,6	18,7	(14,5 - 23,6)
<b>20/21</b>				
Internet	1.284	91,3	12,5	(11,8 - 13,3)
Papier	84	6,0	14,6	(11,0 - 19,0)
Zeitschrift	38	2,7	8,9	(5,2 - 14,8)

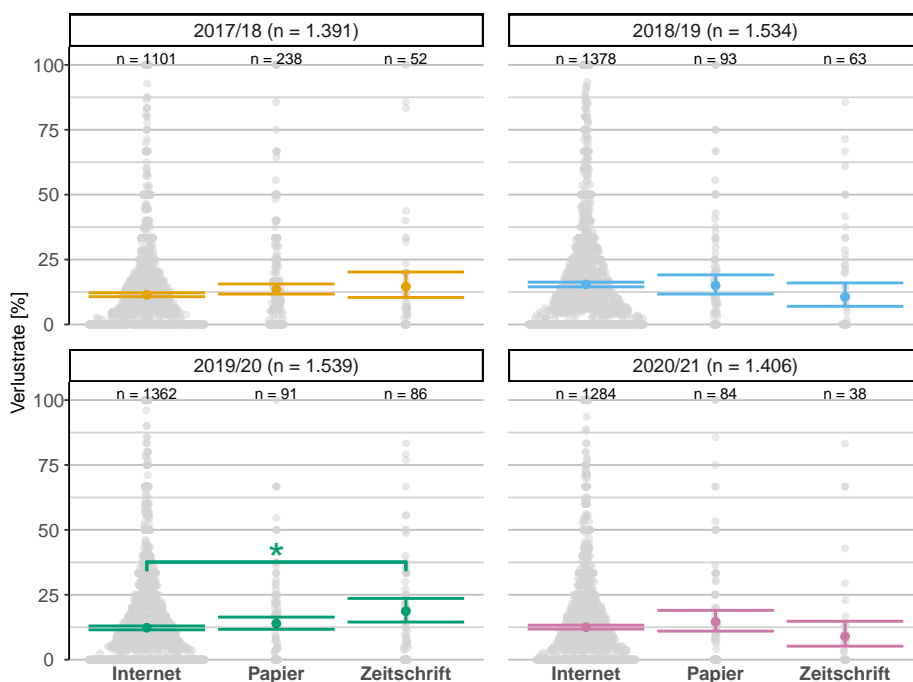


Abbildung 1.4: Höhe der Winterverluste über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21 der unterschiedlichen Teilnahmearten (Online, Papier, Zeitschrift) in Prozent (und 95% CI). Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

Tabelle 1.7: Teilnahmeart und die relative sowie absolute Verteilung an der Erhebung der Winterverluste von 2013/14 bis 2020/21.

Jahr	Internet		Papier		Zeitschrift	
	n	%	n	%	n	%
2013/14	679	66,4	318	31,1	26	2,5
2014/15	947	75,2	249	19,8	63	5,0
2015/16	944	73,2	290	22,5	55	4,3
2016/17	1.268	76,6	332	20,0	56	3,4
2017/18	1.101	79,2	238	17,1	52	3,7
2018/19	1.378	89,8	93	6,1	63	4,1
2019/20	1.362	88,5	91	5,9	86	5,6
2020/21	1.284	91,3	84	6,0	38	2,7

### 1.3.1.4 Betriebsgröße

Die Verteilung der Größen der teilnehmenden Betriebe ist in Abbildung 1.5-A grafisch dargestellt. Der Median der eingewinterten Völker in allen Untersuchungsjahren liegt bei 10 bzw. im Jahr 2020/21 bei 11, was in etwa der österreichischen Imkerei-Demographie entspricht. Der Mittelwert über die vier Untersuchungsjahre liegt zwischen 20-22 Völker pro Imkerei, das ist mehr als der österreichweit erwartete Mittelwert („Biene Österreich“, ca. 13 Völker/Imkerei, Tabelle 1.1). Der große Unterschied zwischen Median und Mittelwert erklärt sich durch die Verteilung der Bienenvölker und die Teilnahme von großen Imkereien mit jeweils über 150 eingewinterten Völkern (Abbildung 1.5-B).

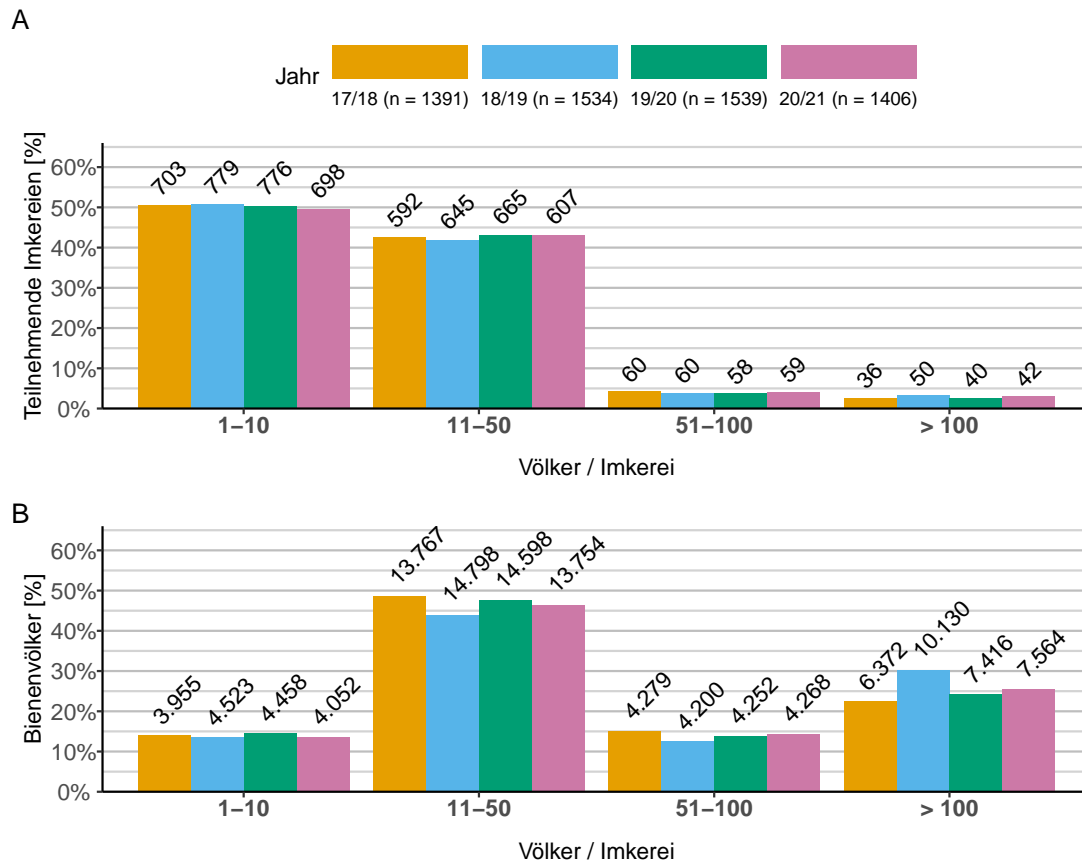


Abbildung 1.5: Betriebsgröße der teilnehmenden Imkereien über die Jahre 2017/18 bis 2020/21. (A) Anzahl der Imkereien in den jeweiligen Betriebsgrößen. (B) Summe der eingewinterten Bienenvölker in den jeweiligen Betriebsgröße.

### 1.3.1.5 Geografische Herkunft

Abbildung 1.6 zeigt die Anzahl der TeilnehmerInnen auf Basis des Haupt-Überwinterungsbienenstandes als Heatmap summiert auf Bezirksebene an, wobei Wien als eine Einheit behandelt wurde. Eine Heatmap ist eine Visualisierung von Daten mittels eines Farbgradienten, wobei in unserer Darstellung hohe Zahlen (also hohe TeilnehmerInnen Anzahl) dunklen Farben entsprechen und eine geringere Anzahl durch helle Farben visualisiert wird. Nicht gezählt sind TeilnehmerInnen deren Bienenstände über mehrere Bezirke verteilt sind. Die Karte zeigt eine Verbreitung der Haupt-Überwinterungsstände unserer TeilnehmerInnen über ganz Österreich. Unterschiedlich dominante Gebiete können durch Bezirksgröße oder geografische Gegebenheiten beeinflusst werden, da hier keine Normalisierung durchgeführt wurde.

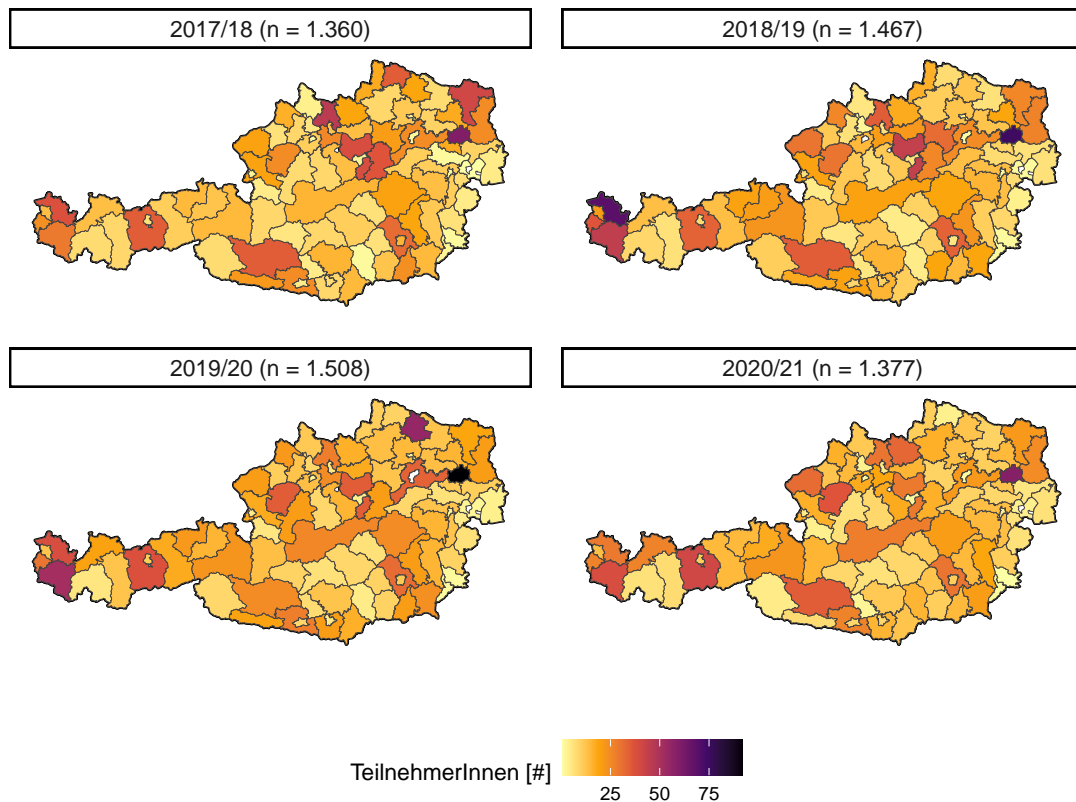


Abbildung 1.6: Summierte Anzahl der Haupt-Überwinterungsbienenstände der an der Untersuchung der Winterverluste teilnehmenden Imkereien auf Bezirksebene.

### 1.3.1.6 Bienenstandort

Des Weiteren wurden die TeilnehmerInnen in unserer Erhebung gefragt, ob sich all ihre Bienenvölker innerhalb eines 15 km Radius zum angegebenen Winterstandort befinden. Diese Information ist wichtig für weitere standortbezogene Auswertungen in denen mögliche Zusammenhänge zwischen den Winterverlusten und dem Wetter, der Landnutzung sowie der Seehöhe näher betrachtet werden können. Über die Projektjahre war diese Antwort in etwa gleichbleibend ohne große Änderungen. Der Großteil (75,1-85,4%) gibt an, dass alle Bienenvölker innerhalb dieses Radius befinden oder hat nur einen Bienenstand (Tabelle 1.8).

Tabelle 1.8: Absolute und relative Anzahl der Antworten zur Frage: Sind alle Ihre Bienenvölker innerhalb von etwa 15 km des genannten Hauptbienenstand?

Alle Völker innerhalb 15 km Radius	Imkereien [n]	[%]
<b>17/18</b>		
Ja	633	45,5
Nein	156	11,2
nur einen Bienenstand	555	39,9
Unsicher	6	0,4
keine Angaben	41	2,9
<b>18/19</b>		
Ja	579	37,7
Nein	162	10,6
nur einen Bienenstand	623	40,6
Unsicher	4	0,3
keine Angaben	166	10,8
<b>19/20</b>		
Ja	571	37,1
Nein	162	10,5
nur einen Bienenstand	585	38,0
Unsicher	4	0,3
keine Angaben	217	14,1
<b>20/21</b>		
Ja	588	41,8
Nein	161	11,5
nur einen Bienenstand	607	43,2
Unsicher	1	0,1
keine Angaben	49	3,5

## 1.3.2 Verlustrate in Österreich, den Bundesländern und den Bezirken

### 1.3.2.1 Österreich

Der langjährige Mittelwert der Verlustrate beträgt 15,8% seit 2007/08. Über die Projektjahre 2017/18 bis 2020/21 beträgt dieser Mittelwert 13,0%. Die Projektjahre sind im Gesamtvergleich durchschnittliche Ergebnisse ohne größere Abweichungen von den bisher erhobenen Daten in Österreich. Das Umfragejahr 2017/18 hatte im Projektzeitraum die niedrigsten Winterverluste mit 11,8% und das Jahr 2018/19 die höchsten Verlusten mit 15,2% (Abbildung 1.7). Auf alle Jahre bezogen ist die Verlustrate aus dem Winter 2015/16 mit 8,1% (95% CI: 7,4-8,8%) die niedrigste, jene aus dem Winter 2014/15 mit 28,4% (95% CI: 27,0-29,9%) die höchste seit Beginn der Erhebungen von Winterverlusten im Jahr 2007/08 (Tabelle 1.10).

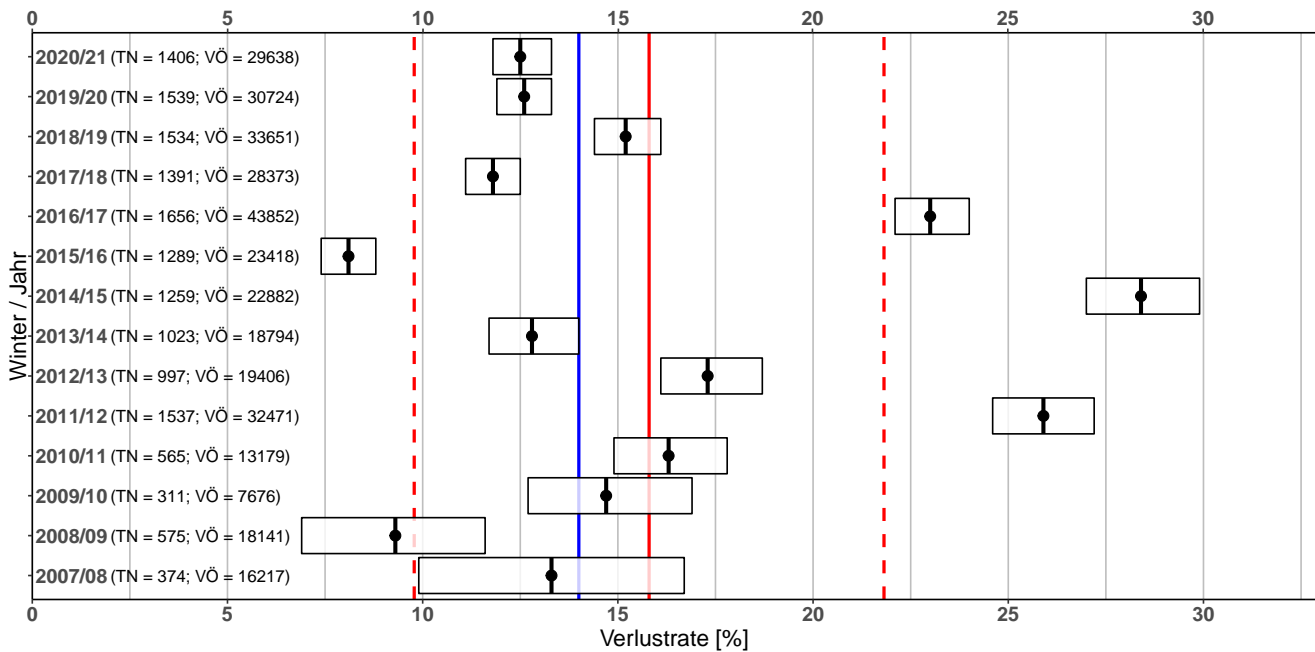


Abbildung 1.7: Höhe der Winterverluste in Österreich von 2007/08 bis 2020/21 in Prozent (und 95% CI). Rote Linie kennzeichnet den Mittelwert inklusive aktueller Umfrage; Rot strichlierte Linien Kennzeichnen die Standardabweichung vom Mittelwert. Blaue Linie kennzeichnet den Median Wert. TN = TeilnehmerInnen, VÖ = Gesamtsumme der eingewinterten Völker

### 1.3.2.2 Populationsdynamik

Die Berechnungen zur Populationsdynamik basieren auf den Angaben jener Imkereien, die auch die Anzahl ihrer Völker im Frühjahr des Einwinterungsjahres bekannt gegeben haben (Subpopulation). Mit Hilfe dieser Information konnte die Netto-Änderung der Population bis zum Herbst desselben Jahres (Einwinterungsvölker) berechnet werden. Die Zahl an Bienenvölkern im Frühjahr des Auswinterungsjahres konnte aus der Differenz zwischen eingewinterten und der im Winter verlorenen Völker berechnet werden. Dies berücksichtigt aber nicht etwaige im Winter zugekaufte oder verkaufte Völker, sowie die Netto-Änderung über den Sommer. Die Informationen zur Anzahl der Völker im Frühjahr, eingewinterten Völkern und zum Völkerverlust über den Winter des jeweiligen Jahres ermöglichen eine grafische Darstellung der Populationsdynamik österreichischer Bienenvölker vom Frühjahr 2013 bis zum Frühjahr 2021 (Abbildung 1.8).

Ausgehend von der Völkeranzahl im Frühjahr des Einwinterungsjahres stieg die Zahl an Bienenvölkern durch Vermehrung und Zukäufe jeweils bis zum Herbst an (Tabelle 1.9, „Vermehrung über den Sommer [%]“). Die prozentuelle Änderung der Anzahl der Bienenvölker vom Frühjahr des Auswinterungsjahres zum Frühjahr des Einwinterungsjahres ist in Tabelle 1.9 („Vergleich Frühjahr-Frühjahr [%]“) zu finden. Allgemein zeigt sich, dass die Vermehrung im Sommer manchmal eine konstante, manchmal sogar eine wachsende Bienenpopulation ermöglicht (Abbildung 1.8). Welche Netto-Zuwachsrate erforderlich wäre, um nach dem Winter wieder auf den Stand der Bienenpopulation im Herbst des Einwinterungsjahres zu kommen, ist unter „Ausgleich Verluste [%]“ ersichtlich.

Die tatsächliche Netto-Vermehrung über den Sommer liegt in den Projektjahren 2017/18 bis 2020/21 über der Schätzung des jeweiligen untersuchten Jahres, in der je berechnet worden war, welche Netto-Zuwachsrate erforderlich gewesen wäre, um eine konstante Population zu ermöglichen. Dies führt zu einer linearen Zunahme der Bienenvölker in unserer Schätzpopulation über die letzten vier Jahre. Über die

untersuchten Jahre ergibt sich mit einem einfachen linearen Modell anhand der Änderung an eingewinterten Völkern eine Steigerung von circa 9 Völker pro Jahr ( $R^2 = 0,97$ ), bei der hier dargestellten Untergruppe.

Tabelle 1.9: Populationsdynamik der Subpopulation (Imkereien mit vollständigen Angaben) untersuchter österreichischer Bienenvölker vom Frühjahr 2013 bis zum Frühjahr 2021.

Jahr	Imkereien [n]	Verlustrate [%] <sup>1</sup>	Anzahl Bienenvölker			Vermehrung Sommer [%]	Vergleich Frühjahr- Frühjahr[%]	Ausgleich Verluste [%] <sup>3</sup>
			Frühjahr [#] <sup>2</sup>	Eingewintert Herbst [#]	Ausgewintert Frühjahr [#]			
2013/14	973	12,9	14.319	17.816	15.518	24,4	8,4	14,8
2014/15	1.188	28,6	17.355	21.616	15.437	24,6	-11,1	40,0
2015/16	1.195	7,9	15.102	21.800	20.070	44,4	32,9	8,6
2016/17	1.537	22,5	27.695	40.141	31.108	44,9	12,3	29,0
2017/18	1.285	11,6	18.983	25.670	22.695	35,2	19,6	13,1
2018/19	1.465	15,3	24.747	31.036	26.277	25,4	6,2	18,1
2019/20	1.478	12,5	23.802	29.484	25.802	23,9	8,4	14,3
2020/21	1.322	12,5	22.325	27.550	24.114	23,4	7,8	14,2

<sup>1</sup> Verlustrate der teilnehmende Imkereien mit vollständigen Angaben zur Anzahl der Völker im Frühjahr des Einwinterungsjahres.  
<sup>2</sup> Völker im Frühjahr des Einwinterungsjahres.  
<sup>3</sup> Erforderliche Netto-Zuwachsrate, um nach dem Winter wieder auf den Stand der Bienenpopulation im Herbst des Einwinterungsjahres zu kommen.

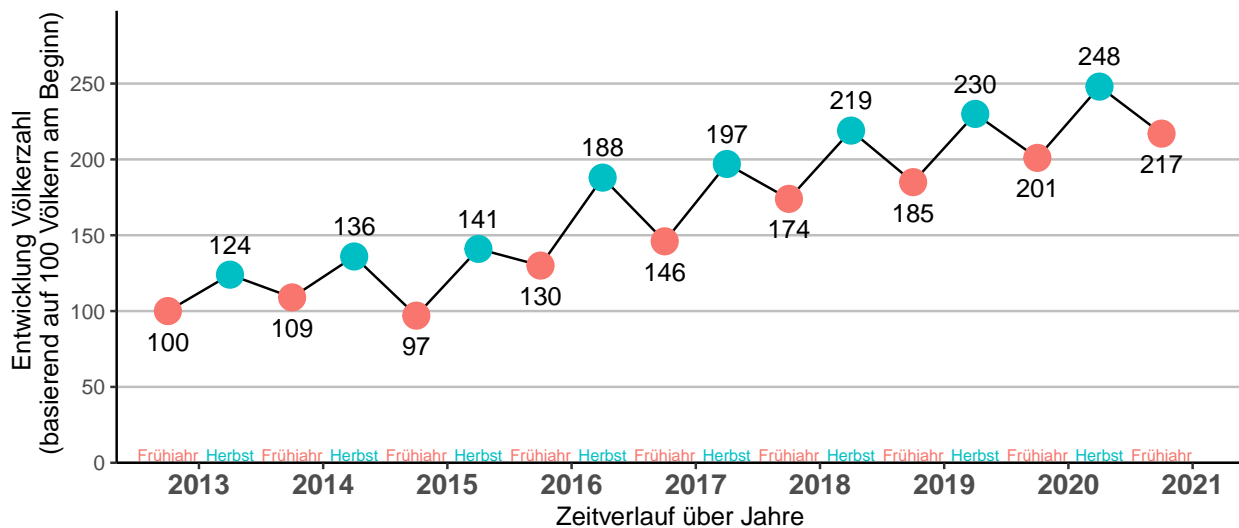


Abbildung 1.8: Theoretische Populationsdynamik von Bienenvölkern der TeilnehmerInnen seit dem Frühjahr 2013 basierend auf den Winterverlusten und Vermehrung über den Sommer aus Tabelle 1.9. Diese theoretische Entwicklung der Völkeranzahl basiert auf 100 Völkern zu Beginn.



### 1.3.2.3 Bundesländer

Zwischen den Bundesländern sind die Völkerverluste nicht gleichmäßig verteilt. Wien zeigt signifikant höhere Verluste in den letzten drei Jahren im Vergleich zu den anderen Bundesländern. Auch Niederösterreich hat in jedem Jahr der Untersuchung statistisch höhere Verlustraten als zumindest ein anderes Bundesland. Im Vergleich zur österreichischen Gesamtverlustrate ergeben sich nur selten signifikante Abweichungen. Hierbei sei erwähnt, dass die Gesamtverlustrate natürlich die Verlustrate der jeweiligen Bundesländer beinhaltet und somit ein statistischer Vergleich nicht möglich ist (Tabelle 1.11 und Abbildung 1.9). Abbildung 1.10 zeigt eine grafische Darstellung der mittleren Verlustraten anhand einer Österreich-Karte.

Die Tabelle 1.11 zeigt die Anzahl der teilnehmenden Betriebe, die Anzahl der eingewinterten Völker, die Anzahl der verlorenen Völker, Winterverluste aufgrund von Königinnenproblemen und die Verlustrate in Summe und Prozent (inklusive 95% Konfidenzintervall) für ganz Österreich und die einzelnen Bundesländer. Einen Überblick über die Winterverluste in ganz Österreich sowie in den Bundesländern für den gesamten Untersuchungszeitraum seit 2013/14, bietet die Tabelle 1.10.

Tabelle 1.10: Vergleich der Winterverlustraten [%] (und 95% CI) von 2013/14 bis 2020/21 für Österreich sowie die einzelnen Bundesländer.

Jahre	AUT		Bgld.		Ktn.		NÖ		OÖ	
2013/14	12,8	(11,7-14,0)	32,9	(15,1-57,5)	9,9	(7,8-12,5)	15,4	(13,6-17,4)	9,9	(7,6-12,8)
2014/15	28,4	(27,0-29,9)	40,4	(33,5-47,6)	30,6	(27,0-34,5)	27,8	(25,2-30,6)	25,2	(21,6-29,2)
2015/16	8,1	(7,4-8,8)	11,0	(6,7-17,6)	6,6	(5,4-7,9)	11,5	(9,8-13,5)	6,8	(5,5-8,4)
2016/17	23,0	(22,1-24,0)	20,2	(15,2-26,4)	21,9	(18,6-25,6)	24,2	(22,8-25,7)	18,9	(16,7-21,4)
2017/18	11,8	(11,1-12,5)	7,9	(4,8-12,6)	12,9	(10,5-15,7)	13,8	(12,5-15,2)	11,5	(10,1-13,1)
2018/19	15,2	(14,4-16,1)	9,9	(6,9-13,9)	11,5	(9,4-14,1)	17,0	(15,3-18,7)	17,5	(15,5-19,8)
2019/20	12,6	(11,9-13,3)	10,4	(6,7-15,7)	12,8	(10,7-15,2)	14,1	(12,8-15,6)	11,4	(9,9-13,1)
2020/21	12,5	(11,8-13,3)	11,6	(7,3-17,8)	14,2	(11,9-16,7)	14,1	(12,6-15,7)	12,7	(11,1-14,6)
Jahre	Sbg.		Stmk.		T		Vbg.		W	
2013/14	18,6	(13,5-25,1)	8,5	(6,7-10,7)	12,9	(9,0-18,1)	18,1	(12,1-26,2)	19,2	(12,7-27,9)
2014/15	33,6	(27,3-40,5)	22,5	(19,4-25,8)	26,7	(21,6-32,4)	28,0	(22,3-34,4)	52,6	(44,9-60,2)
2015/16	6,1	(4,1-9,1)	8,7	(7,0-10,6)	5,1	(3,7-6,9)	5,8	(3,7-9,1)	11,5	(7,2-17,8)
2016/17	16,8	(12,3-22,6)	19,3	(17,0-21,9)	25,1	(20,6-30,3)	33,8	(29,5-38,3)	24,8	(20,2-30,0)
2017/18	12,7	(9,1-17,5)	8,7	(7,3-10,3)	11,5	(9,0-14,6)	10,1	(8,1-12,5)	12,3	(9,3-16,0)
2018/19	16,2	(11,7-22,1)	13,0	(11,0-15,3)	11,4	(9,3-14,0)	17,7	(15,0-20,8)	19,6	(14,8-25,3)
2019/20	11,7	(8,5-15,8)	11,1	(9,5-12,9)	12,4	(10,0-15,1)	9,9	(7,8-12,5)	20,1	(16,8-23,8)
2020/21	10,8	(7,6-15,0)	11,0	(9,3-12,8)	12,3	(9,5-15,7)	12,3	(9,5-15,7)	17,1	(13,5-21,5)

Tabelle 1.11: Teilnehmende Imkereibetriebe, eingewinterte Völker und Verlustraten von Bienenvölkern über die Umfragejahre 2017/18 bis 2020/21 für Österreich und pro Bundesland. Völkerverluste durch „Elementarschaden (Flut, Vandalismus, etc.)“ sind nicht inkludiert.

	Teilnehmende Imkereien [n]	Völker eingewintert[n]	Tote Völker [n]	Verluste (Königinnen-Probleme) [n]	Summe Verlust [n]	Verlust [%]	CI [%]
<b>17/18</b>							
Österreich	1.391	28.373	900	2441	3.341	11,8	(11,1 - 12,5)
Burgenland	35	864	11	57	68	7,9	(4,8 - 12,6)
Kärnten	144	3.486	79	369	448	12,9	(10,5 - 15,7)
Niederösterreich	409	8.406	299	858	1.157	13,8	(12,5 - 15,2)
Oberösterreich	253	5.091	177	408	585	11,5	(10,1 - 13,1)
Salzburg	58	1.178	58	92	150	12,7	(9,1 - 17,5)
Steiermark	207	4.525	133	261	394	8,7	(7,3 - 10,3)
Tirol	120	2.275	57	204	261	11,5	(9,0 - 14,6)
Vorarlberg	105	1.578	62	97	159	10,1	(8,1 - 12,5)
Wien	60	970	24	95	119	12,3	(9,3 - 16,0)
<b>18/19</b>							
Österreich	1.534	33.651	1.304	3823	5.127	15,2	(14,4 - 16,1)
Burgenland	35	759	26	49	75	9,9	(6,9 - 13,9)
Kärnten	147	3.784	126	311	437	11,5	(9,4 - 14,1)
Niederösterreich	387	9.486	459	1149	1.608	17,0	(15,3 - 18,7)
Oberösterreich	276	5.951	232	812	1.044	17,5	(15,5 - 19,8)
Salzburg	74	1.586	54	203	257	16,2	(11,7 - 22,1)
Steiermark	218	5.706	188	554	742	13,0	(11,0 - 15,3)
Tirol	141	2.963	93	245	338	11,4	(9,3 - 14,0)
Vorarlberg	178	2.333	73	341	414	17,7	(15,0 - 20,8)
Wien	78	1.083	53	159	212	19,6	(14,9 - 25,3)
<b>19/20</b>							
Österreich	1.539	30.724	1.334	2539	3.873	12,6	(11,9 - 13,3)
Burgenland	33	521	23	31	54	10,4	(6,7 - 15,7)
Kärnten	151	3.743	140	338	478	12,8	(10,7 - 15,2)
Niederösterreich	389	8.085	408	734	1.142	14,1	(12,8 - 15,6)
Oberösterreich	285	5.908	271	404	675	11,4	(9,9 - 13,1)
Salzburg	78	1.234	54	90	144	11,7	(8,5 - 15,8)
Steiermark	222	4.770	186	342	528	11,1	(9,5 - 12,9)
Tirol	153	3.699	149	308	457	12,4	(10,0 - 15,1)
Vorarlberg	136	1.568	49	106	155	9,9	(7,8 - 12,5)
Wien	92	1.196	54	186	240	20,1	(16,8 - 23,8)
<b>20/21</b>							
Österreich	1.406	29.638	887	2832	3.719	12,5	(11,8 - 13,3)
Burgenland	43	839	29	68	97	11,6	(7,3 - 17,8)
Kärnten	154	3.644	79	437	516	14,2	(11,9 - 16,7)
Niederösterreich	310	6.645	225	712	937	14,1	(12,6 - 15,7)
Oberösterreich	294	6.416	221	596	817	12,7	(11,1 - 14,6)
Salzburg	74	1.528	35	130	165	10,8	(7,6 - 15,0)
Steiermark	216	5.199	153	417	570	11,0	(9,3 - 12,8)
Tirol	147	3.185	81	229	310	9,7	(8,0 - 11,8)
Vorarlberg	109	1.363	48	119	167	12,3	(9,5 - 15,7)
Wien	59	819	16	124	140	17,1	(13,5 - 21,5)

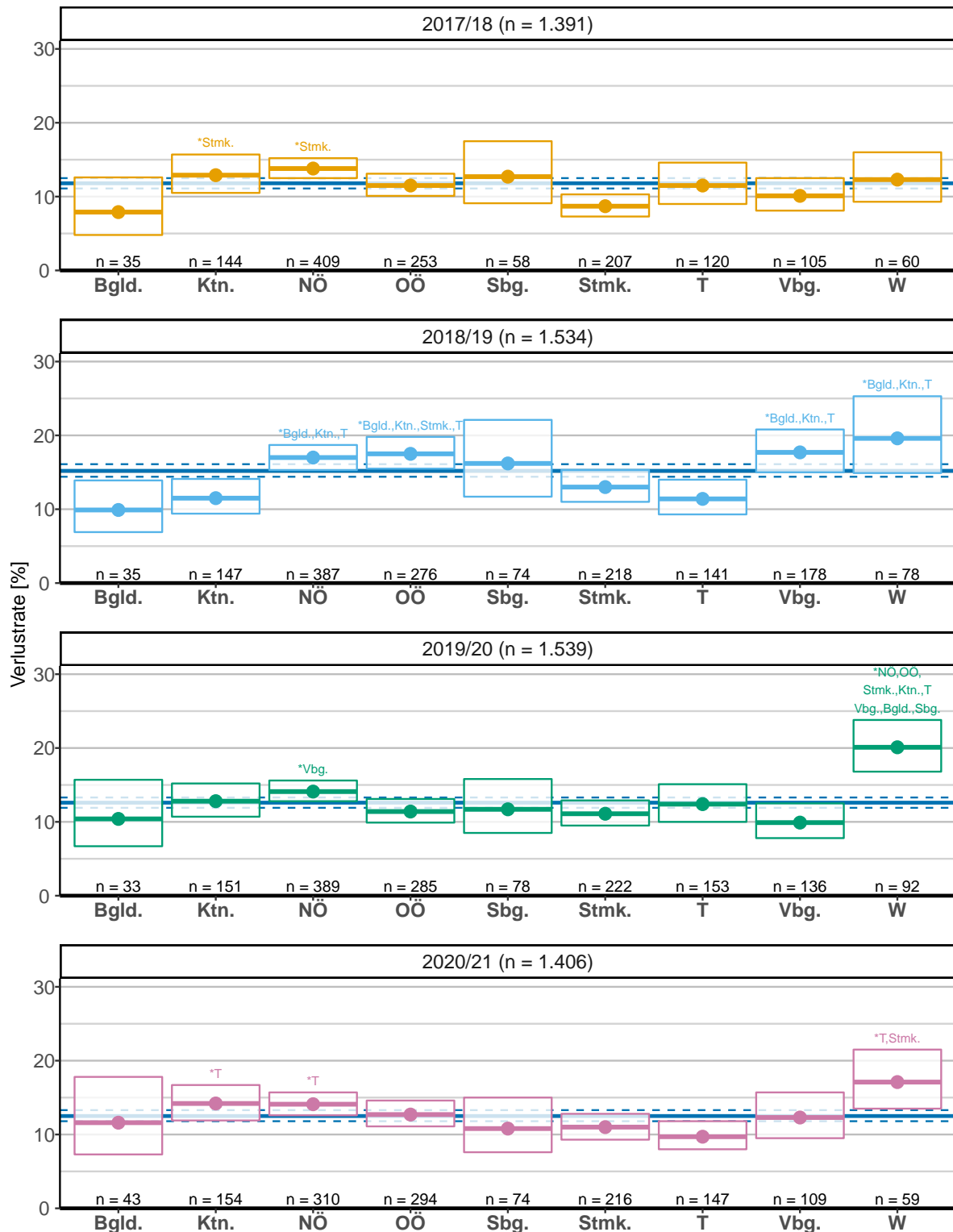


Abbildung 1.9: Höhe der Winterverluste über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21 der Bundesländer und Gesamtverlustrate als blaue horizontale Linie in Prozent (und 95% CI). Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) und Abkürzung des Bundesland, welches eine signifikant geringere Verlustrate hat, gekennzeichnet.

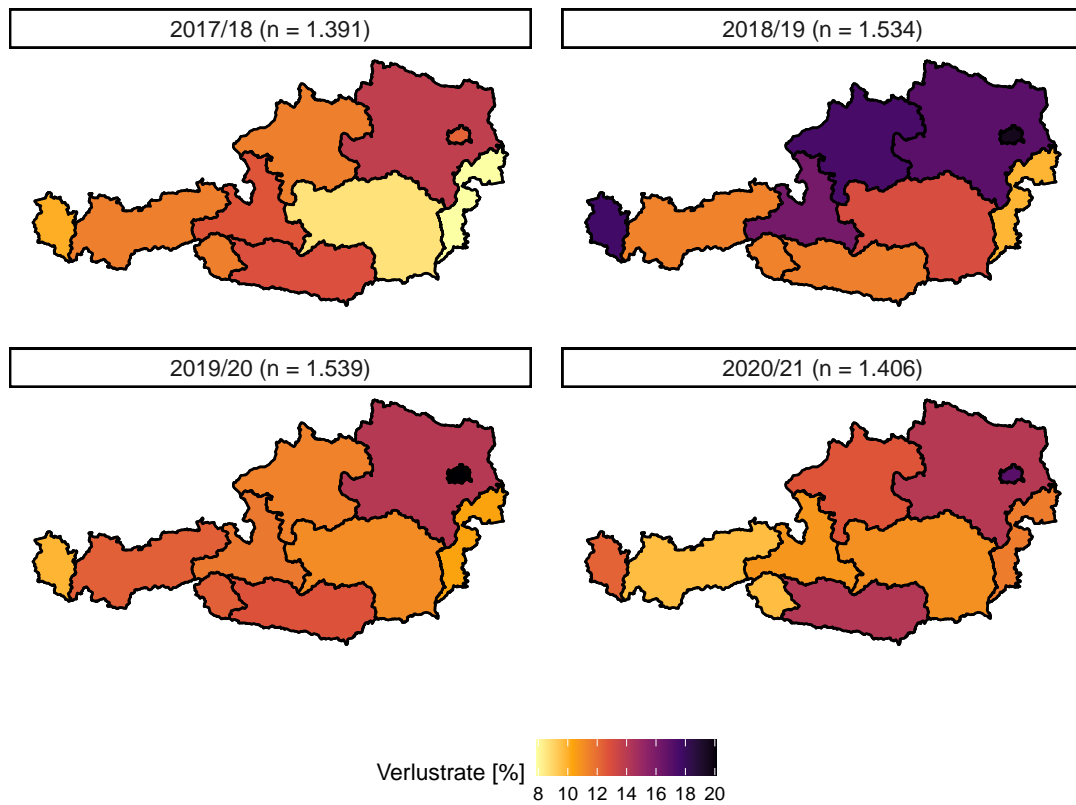


Abbildung 1.10: Winterverlusterate über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21 der Bundesländer.

### 1.3.2.4 Bezirke

Die Verlustraten, Anzahl der teilnehmenden Imkereien und Anzahl der eingewinterten Völker auf Bezirksebene sind im Anhang in den Tabellen 1.56 bis 1.64 aufgelistet. Die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungsjahre sind in den Tabellen zum Vergleich ebenfalls dargestellt. Abbildung 1.11 zeigt die mittleren Verlustraten der Bezirke als Karte über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21 im direkten Vergleich. Aus Gründen des Datenschutzes und der Repräsentativität werden nur jene Bezirke aufgelistet, bei denen mindestens Daten von fünf Imkereien zur Verfügung stehen. Hier sei noch einmal angemerkt, dass die Berechnung der Verlustraten in unserer Analyse auf den jeweiligen Gesamtzahlen basiert, das heißt Summe der eingewinterten Völker und die Summe der verlorenen Völker, und nicht auf Betriebsebene durchgeführt wird.

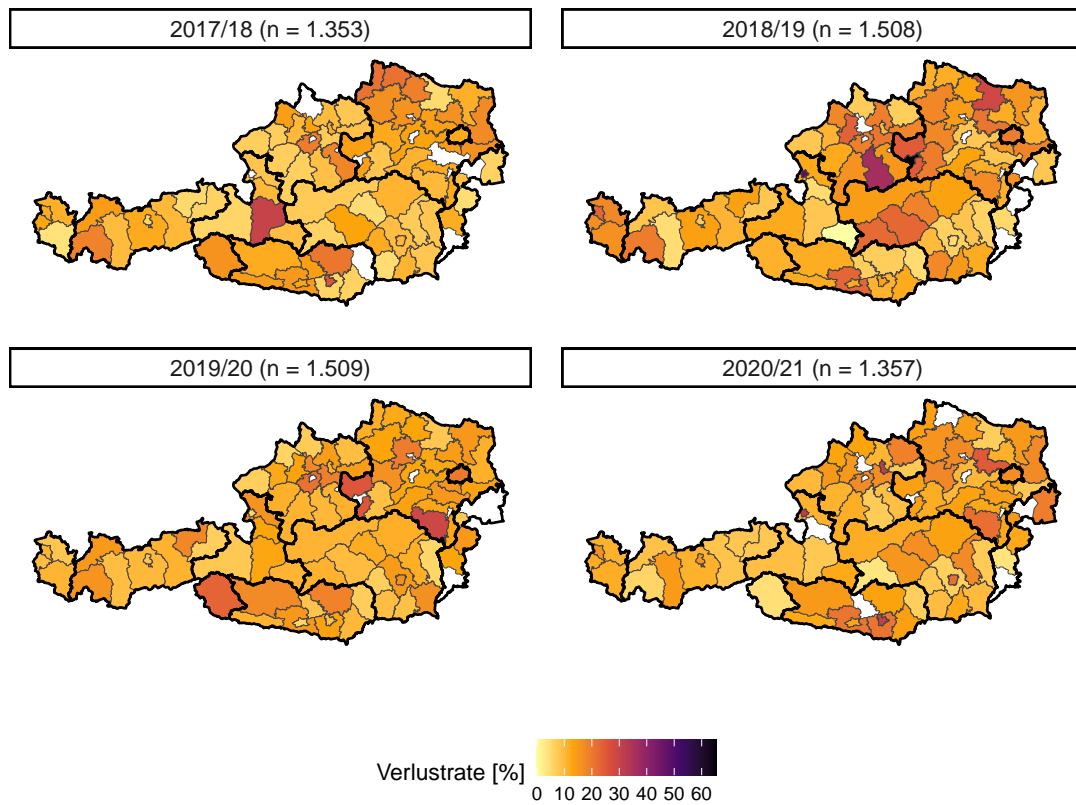


Abbildung 1.11: Verlustrate der einzelnen Bezirke über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21. Weiße Bezirke < 5 Antworten.

### 1.3.2.5 Elementarschäden

Die Anzahl der Völker die durch Elementarschäden den Winter nicht überlebt haben (Flut, Vandalismus etc.) sind nicht in der Risikoanalyse enthalten. Zur Vollständigkeit sind die Meldungen in Tabelle 1.12 angeführt.

Tabelle 1.12: Absolute Anzahl an Völkern die durch Elementarschäden (Flut, Vandalismus etc.) als Verlust gemeldet wurden sowie prozentuell zu der Gesamtsumme an verlorenen Völkern über den Winter.

Jahr	Elementarschäden [n]	[%]
2017/18	128	3,7
2018/19	166	3,1
2019/20	181	4,5
2020/21	112	2,9

### 1.3.3 Symptome

Für eine umfassende Analyse der Winterverluste ist es wichtig, die Symptome, welche mit den Völkerverlusten einhergehen, zu kennen. Imkereien mit Winterverlusten wurden daher gebeten, die an ihren Völkern beobachteten Symptome zu nennen. Folgende einfach und ohne weitere Hilfsmittel zu beurteilende Symptome standen zur Auswahl: a) hatten viele tote Bienen im oder vor dem Volk, b) hatten keine oder nur wenige tote Bienen im oder vor dem Volk, c) hatten tote Bienen in Zellen, und kein Futter im Stock (verhungert), d) hatten tote Bienen in Zellen, aber genug Futter im Stock (Futter nicht erreicht), e) hatten keine der oben genannten oder unbekannte Symptome. Abbildung 1.12 zeigt die Häufigkeiten der begleitenden Symptome über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21 im Vergleich. Zur Berechnung der relativen Häufigkeit wurden nur jene ImkerInnen genommen, welche Verluste und Symptome gemeldet haben. Mehrfachnennungen von mehreren Symptomen waren möglich, wobei einzelne Symptomtypen aber maximal gleich hoch sein konnten wie die gemeldeten Verluste.

Es zeigt sich, dass im Winter 2017/18 und 2020/21 die Symptome für klassisches Verhungern „c) hatten tote Bienen in Zellen, und kein Futter im Stock (verhungert)“ und Futterabriss „d) hatten tote Bienen in Zellen, aber genug Futter im Stock (Futter nicht erreicht)“ im Vergleich zu den anderen Jahren häufiger war. Im Winter 2018/19 wurde häufig das Symptom „a) hatten viele tote Bienen im oder vor dem Volk“ gemeldet und in diesem Jahr wurden auch in absoluten Zahlen die meisten Symptome gemeldet. In allen Jahren war prozentual das am meisten angegebene Symptom „b) hatten keine oder nur wenige tote Bienen im oder vor dem Volk“ wobei dieses Symptom im Umfragejahr 2019/20 besonders häufig gemeldet wurde.

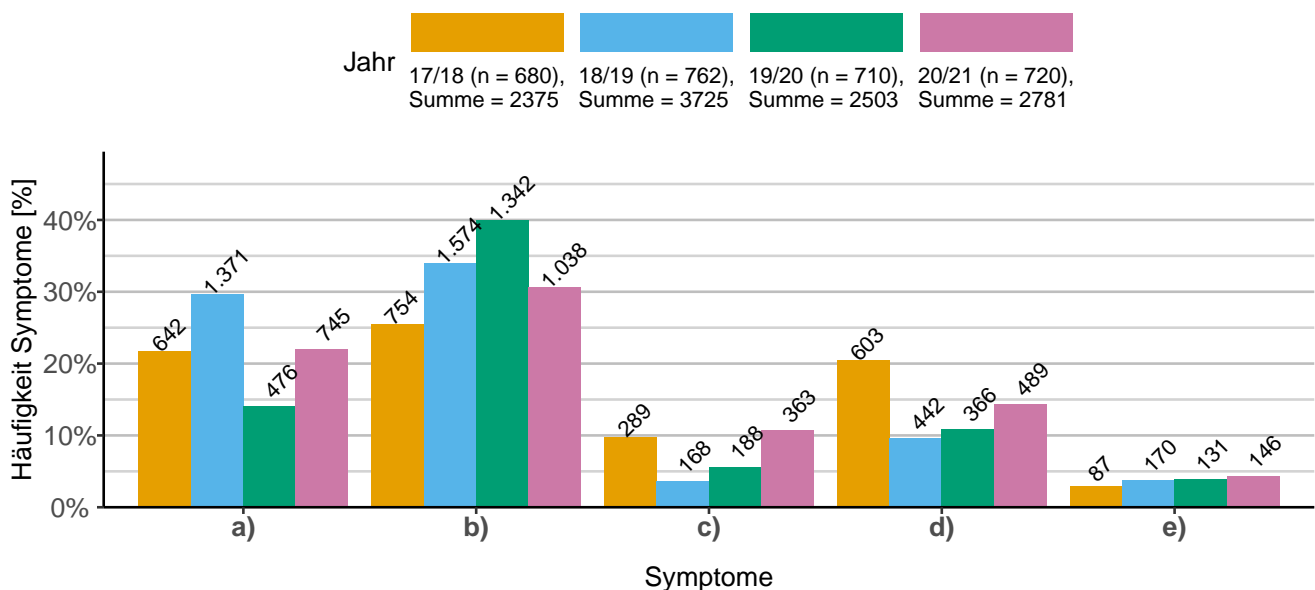


Abbildung 1.12: Häufigkeit der von ImkerInnen berichteten Symptome inklusive Mehrfachnennungen und unvollständigen Angaben a) bis e) in Prozent: a) Viele tote Bienen im oder vor dem Volk, b) keine oder nur wenige tote Bienen im oder vor dem Volk, c) tote Bienen in Zellen, kein Futter im Stock, d) tote Bienen in Zellen, aber genug Futter im Stock, e) keines der oben genannten oder unbekannte Symptome.

### 1.3.4 Verteilung der Völkerverluste

Für die Berechnung der Verteilung der Völkerverluste wird für jeden einzelnen Imkereibetrieb die Höhe des Gesamtverlustes (d.h. die Summe der toten oder verlorenen Völker und der von Königinnenproblemen betroffenen Völker) der insgesamt eingewinterten Völker in Prozent berechnet (Verlust auf Betriebsebene). Über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21 zeigt sich, dass circa ein Drittel der TeilnehmerInnen keine Winterverluste hat und rund 40% melden einen Verlust zwischen >0-20% (Abbildung 1.13). Die kumulative Summe an verlorenen Bienenvölkern in den gegebenen Verlust-Prozentgruppen zeigt, dass die absolute Menge an verlorenen Bienenvölkern in der Gruppe 11-20% am höchsten über alle Umfragejahre ist (Abbildung 1.14).

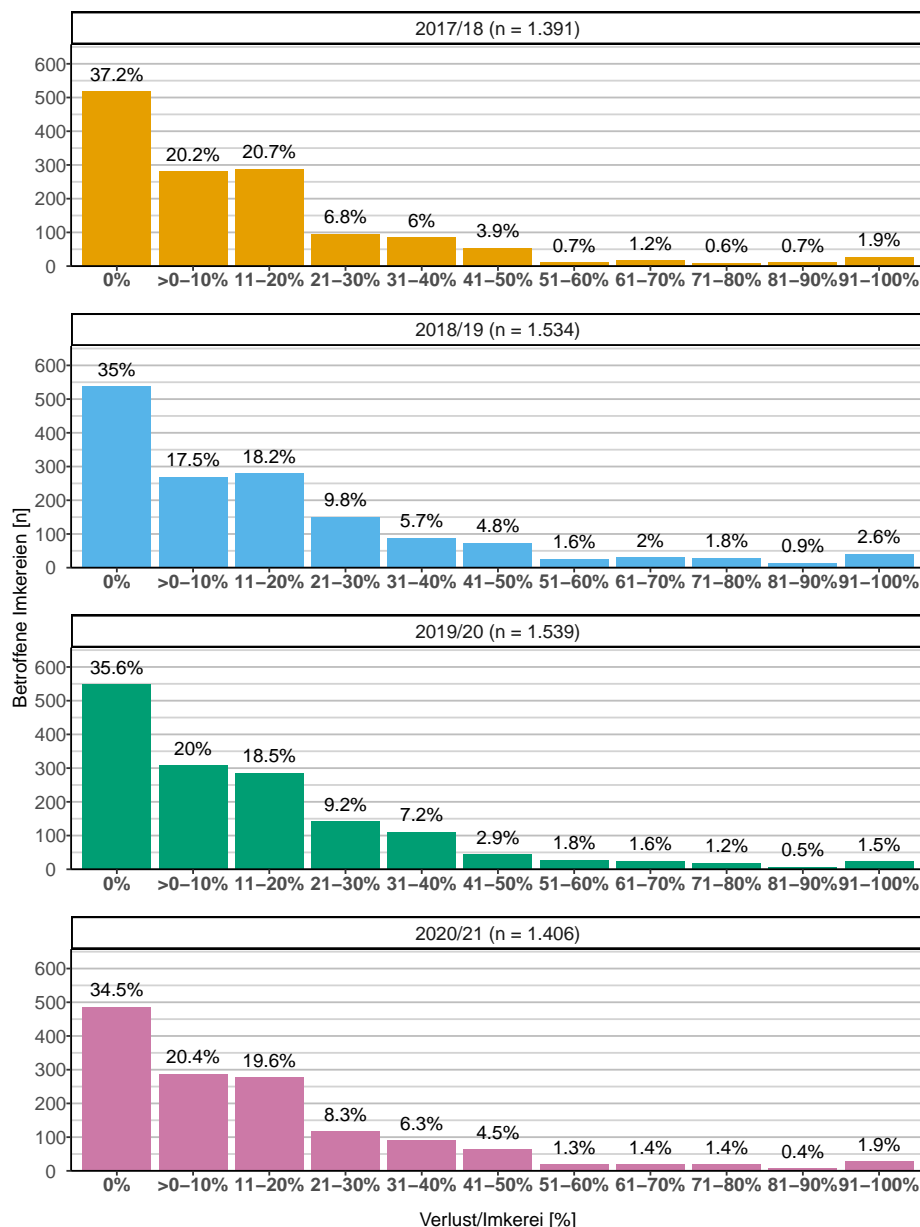


Abbildung 1.13: Verteilung der Verluste in Prozent pro teilnehmender Imkerei in 10%-Verlustgruppen, extra angeführt sind TeilnehmerInnen ohne Verluste in der Gruppe „0%“.

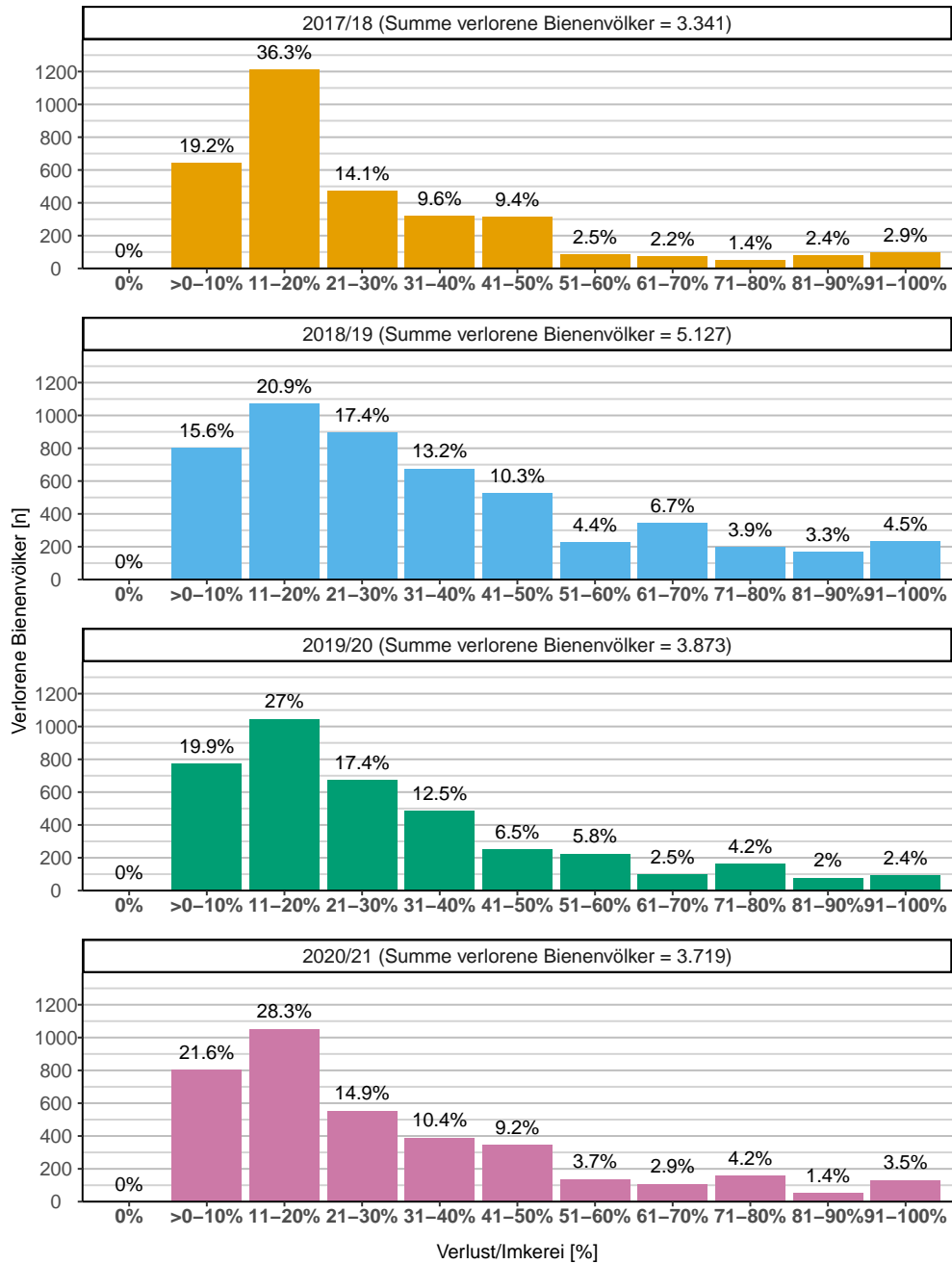


Abbildung 1.14: Summe der verlorenen Bienenvölkern innerhalb der 10%-Verlustgruppen. Zur Vollständigkeit ist die Verlustgruppe mit 0% auch angeführt.



### 1.3.5 Risikoanalyse

In der Risikoanalyse werden die Winterverlusten verschiedener Gruppen von Betriebsweisen miteinander verglichen. Besteht beispielsweise zwischen zwei Gruppen von Betriebsweisen ein signifikanter Unterschied, kann man daraus Schlussfolgerungen über die Bedeutung dieses Risikofaktors für Winterverluste von Bienenvölkern ziehen. Überlappen die Konfidenzintervalle der Verlusten von zwei oder mehreren Gruppen nicht, kann die untersuchte Betriebsweise, oder andere damit verknüpfte aber nicht erhobene Faktoren, als signifikanter Einflussfaktor auf die Höhe der Winterverluste betrachtet werden. In weiterer Folge werden die folgenden Faktoren dargestellt: [1.3.5.1 Seehöhe](#), [1.3.5.2 Betriebsgröße](#), [1.3.5.3 Betriebsweise](#), [1.3.5.4 Wabenhygiene](#), [1.3.5.5 Trachtangebot](#), [1.3.5.6 Bekämpfung der Varroamilbe](#), [1.3.5.7 Königinnen-Verluste](#), [1.3.5.7.1 Königinnenprobleme](#), [1.3.5.7.2 Im Einwinterungsjahr begattete Königin \(„junge Königin“\)](#), [1.3.5.8 Verkrüppelte Flügel](#).

#### 1.3.5.1 Seehöhe

Um den Einfluss der Seehöhe auf die Wintersterblichkeit von Bienenvölkern zu untersuchen, wurden die Haupt-Überwinterungsstandorte bezüglich ihrer Seehöhe in fünf Klassen eingeteilt: 0-200 m, 201-400 m, 401-600 m, 601-800 m, >800 m. Um die Genauigkeit der Auswertung zu erhöhen, wurden TeilnehmerInnen die „Nein“ oder „Unsicher“ bei der Fragestellung „Alle Bienenvölker innerhalb eines 15 km Radius“ angaben sowie ihre Bienenstände in „mehr als einem Bezirk“ verteilt haben in dieser Risikoanalyse nicht beachtet.

Im Umfragejahr 2018/19 zeigten Winterstandorte mit einer Seehöhe zwischen „201-400 m“ eine signifikant höhere Verlustrate als die Gruppe „600-800 m“ und „>800 m“. Im Folgejahr 2019/20 wurde für die Gruppe „201-400 m“ eine signifikant höhere Verlustrate im Vergleich zur Gruppe „401-600 m“ und „>800 m“ festgestellt. Im ersten Umfragejahr 2017/18 sowie im letzten 2020/21 konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung [1.15](#)).

Tabelle 1.13: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten in Abhängigkeit von der Seehöhe der Winterstandorte über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21. Nicht ausgewertet sind TeilnehmerInnen die „Nein“ oder „Unsicher“ bei Fragestellung „Alle Bienenvölker innerhalb eines 15 km Radius“ angaben, sowie ihre Bienenvölker in „mehr als einem Bezirk“ aufgestellt haben.

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
0-200	81	6,7	14,0	(10,9 - 17,8)
201-400	363	30,2	12,6	(11,0 - 14,3)
401-600	402	33,4	12,5	(11,2 - 14,0)
601-800	181	15,1	10,8	(8,7 - 13,3)
>800	175	14,6	9,8	(7,9 - 12,0)
<b>18/19</b>				
0-200	116	8,8	16,7	(13,4 - 20,6)
201-400	375	28,5	17,2	(15,3 - 19,3)
401-600	424	32,2	15,3	(13,6 - 17,1)
601-800	212	16,1	12,8	(10,7 - 15,1)
>800	190	14,4	11,3	(9,2 - 13,8)
<b>19/20</b>				
0-200	97	7,2	15,3	(12,5 - 18,7)
201-400	372	27,5	15,4	(13,8 - 17,3)
401-600	445	32,9	11,9	(10,6 - 13,3)
601-800	210	15,5	13,0	(11,1 - 15,3)
>800	227	16,8	11,6	(9,8 - 13,6)
<b>20/21</b>				
0-200	80	6,6	13,8	(9,6 - 19,5)
201-400	353	28,9	13,3	(11,8 - 15,0)
401-600	379	31,0	13,4	(11,9 - 15,1)
601-800	201	16,5	12,4	(10,5 - 14,7)
>800	208	17,0	11,4	(9,4 - 13,7)

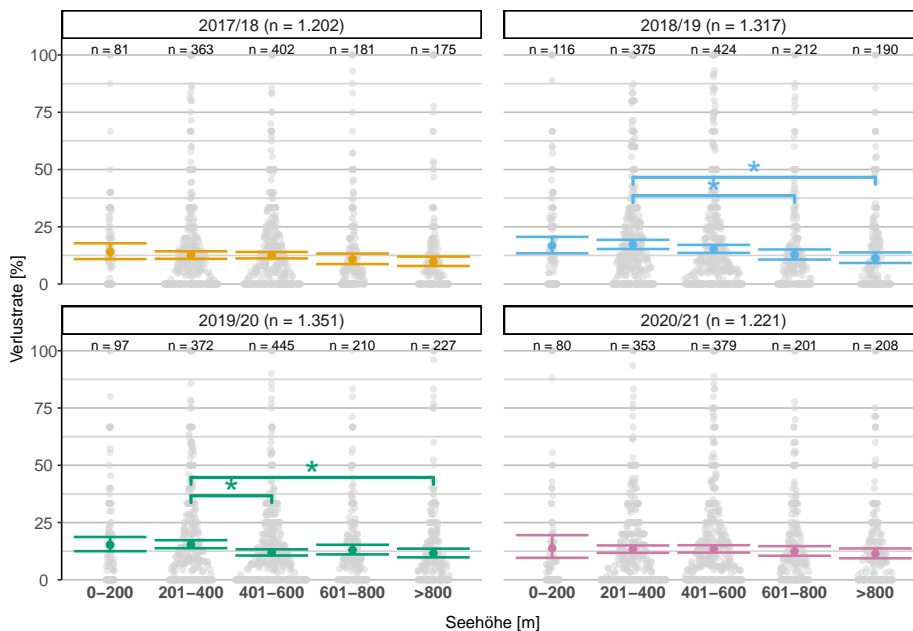


Abbildung 1.15: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Seehöhe der Winterstandorte. Nicht ausgewertet sind TeilnehmerInnen die „Nein“ oder „Unsicher“ bei Fragestellung „Alle Bienenvölker innerhalb eines 15 km Radius“ angaben, sowie ihre Bienenvölker in „mehr als einem Bezirk“ aufgestellt haben. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

### 1.3.5.2 Betriebsgröße

Die Analyse zeigt über die Untersuchungsjahre, dass Imkereien mit einer kleineren Anzahl an Bienenvölkern (weniger als 20), tendenziell und auch statistisch signifikant höhere Winterverlustraten haben. Zwischen den größeren Betrieben mit 21-50 betreuten Völkern und mit über 50 Völkern ist kein statistischer Unterschied festzustellen (Abbildung 1.16). Die Anzahl der ImkerInnen in den drei definierten Betriebsgrößen blieb über die Umfragejahre konstant (Tabelle 1.14).

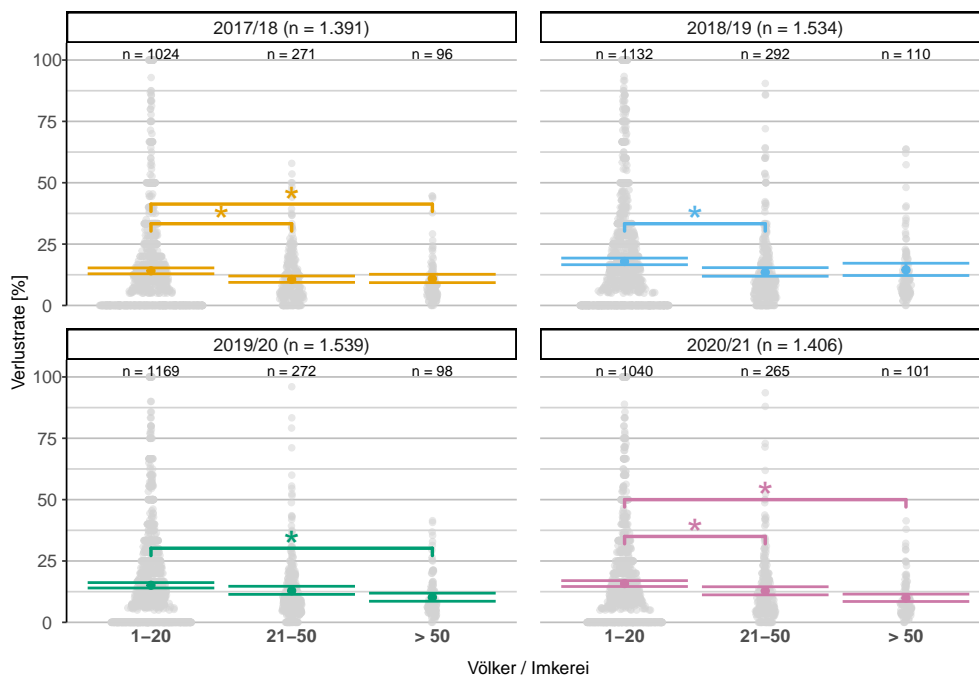


Abbildung 1.16: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Betriebsgröße über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21. Einteilung in 1-20, 21-50 und >50 Völker anhand der gemeldeten eingewinterten Völkeranzahl. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

Tabelle 1.14: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten anhand der Betriebsgröße (eingewinnte Bienenvölker) über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21.

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
1-20	1.024	73,6	14,1	(12,9 - 15,3)
21-50	271	19,5	10,6	(9,4 - 12,0)
> 50	96	6,9	10,9	(9,3 - 12,7)
<b>18/19</b>				
1-20	1.132	73,8	17,9	(16,6 - 19,3)
21-50	292	19,0	13,5	(11,9 - 15,4)
> 50	110	7,2	14,5	(12,2 - 17,2)
<b>19/20</b>				
1-20	1.169	76,0	15,1	(14,0 - 16,2)
21-50	272	17,7	12,9	(11,4 - 14,7)
> 50	98	6,4	10,2	(8,6 - 11,9)
<b>20/21</b>				
1-20	1.040	74,0	15,8	(14,6 - 17,0)
21-50	265	18,8	12,8	(11,2 - 14,5)
> 50	101	7,2	9,9	(8,5 - 11,5)

### 1.3.5.3 Betriebsweise

Seit 2016/17 werden die ImkerInnen, auch auf eigenen Wunsch, zu weiteren Details ihrer Betriebsweise befragt. Dabei konnten Angaben zu den Beuten gemacht und festgehalten werden, ob der Betrieb eine zertifizierte Bio-Imkerei ist, eine Wanderimkerei betreibt, Bienen auf Varroa-Toleranz züchtet, Fremdwachs zukauf oder neu seit 2019/20 ob schwache (weiselrichtige) Völker vor dem Winter vereinigt wurden. Mögliche Antwortmöglichkeiten zu den verschiedenen Betriebsweisen waren: „Ja“, „Nein“, „Unsicher“, „keine Angaben“. In der Analyse der Verlustraten wurde hierbei nur auf die Antworten „Ja“ und „Nein“ eingegangen.

Die abgefragten Betriebsweisen werden als einzelne Faktoren in Zusammenhang mit der Winterverlustrate analysiert. Es ist aber zu beachten, dass es auch Mehrfachnennungen gibt und mit größerer Betriebsgröße auch die Antworten anders ausfallen. Eine einfache deskriptive Netzwerkanalyse der Kombinationen zeigt diese ungleich Verteilung der Antworten (Abbildung 1.17). TeilnehmerInnen mit einer größeren Anzahl an Bienenvölkern (> 25 Bienenvölker) betreiben öfter eine Wanderimkerei und sind auch prozentual öfters zertifizierte Bio-Imkereien und auch die Kombination dieser zwei Kategorien tritt hier häufig auf. Bei den kleineren Hobby-Imkereien mit bis zu 25 Bienenvölkern, zeigt sich ein hoher Anteil mit Fremdwachszukauf und isolierten Beuten, die Kombination Gitterboden und Fremdwachs ist hier besonders häufig (Abbildung 1.17).

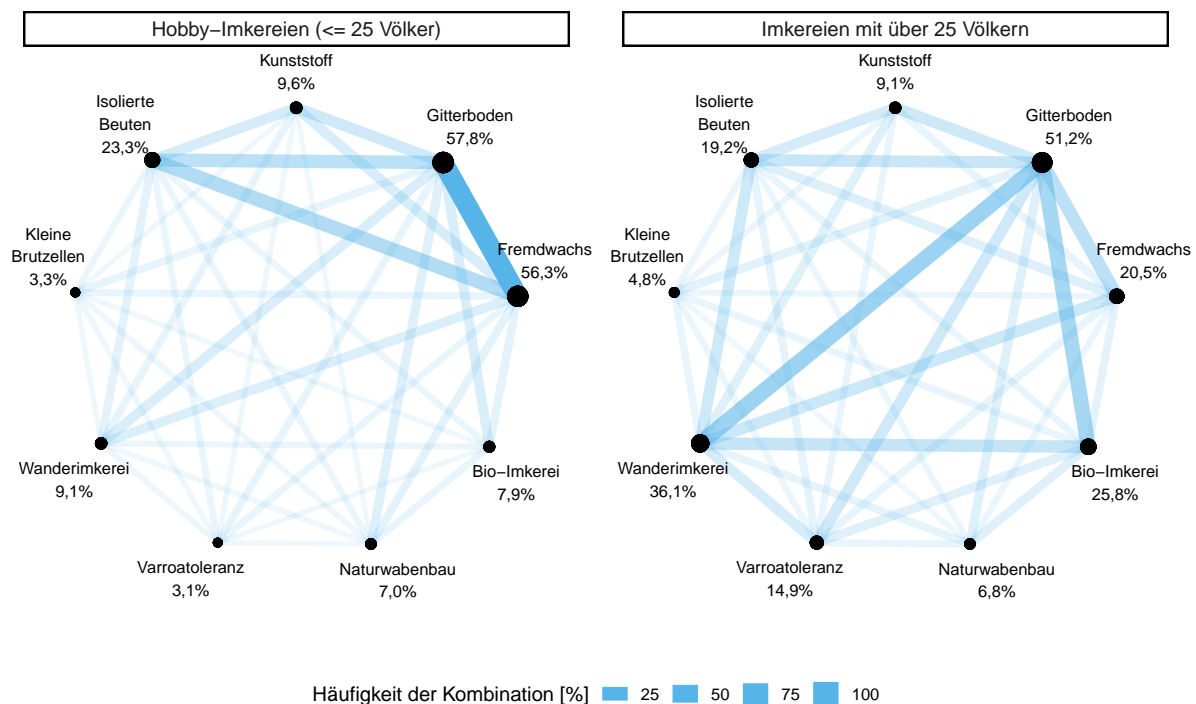


Abbildung 1.17: Deskriptive Netzwerk Analyse der Kombinationen von Betriebsweisen, aufgeteilt in große und kleine Imkereibetriebe über alle vier Umfragejahre. Die Breite, breiter ist mehr, und die Transparenz, weniger Transparenz ist mehr, der Verbindungen zeigt die relative Häufigkeit der Kombination zwischen den Betriebsweisen. Prozentangabe und Punktgröße die relative Häufigkeit der „Ja“ Antworten.

### 1.3.5.3.1 Zertifizierte Bio-Imkerei

Die Anzahl der TeilnehmerInnen mit einem zertifizierten Bio-Imkerei Betrieb war in der Umfrage 2017/18 bei circa 10% und in den folgenden drei Jahren recht konstant bei circa 12%. Ein signifikanter Unterschied zwischen zertifizierten und nicht zertifizierten Bio-Imkereien konnte in keinem Jahr festgestellt werden (Abbildung 1.18, Tabelle 1.15).

Tabelle 1.15: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten zur Frage „zertifizierte Bio-Imkerei“ über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21.

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Ja	140	10,1	11,7	(10,3 - 13,3)
Nein	1.057	76,0	11,4	(10,6 - 12,3)
Unsicher	16	1,2	7,9	(4,4 - 13,8)
keine Angaben	178	12,8	14,9	(12,6 - 17,5)
<b>18/19</b>				
Ja	182	11,9	15,2	(13,1 - 17,5)
Nein	1.196	78,0	15,1	(14,1 - 16,1)
Unsicher	6	0,4	8,8	(0,8 - 53,6)
keine Angaben	150	9,8	16,9	(13,9 - 20,3)
<b>19/20</b>				
Ja	183	11,9	11,3	(9,9 - 12,8)
Nein	1.213	78,8	12,5	(11,7 - 13,4)
Unsicher	7	0,5	37,3	(20,7 - 57,6)
keine Angaben	136	8,8	18,4	(15,1 - 22,3)
<b>20/21</b>				
Ja	173	12,3	12,3	(10,6 - 14,1)
Nein	1.088	77,4	12,8	(11,9 - 13,8)
Unsicher	6	0,4	10,5	(5,3 - 19,7)
keine Angaben	139	9,9	11,5	(9,3 - 14,1)

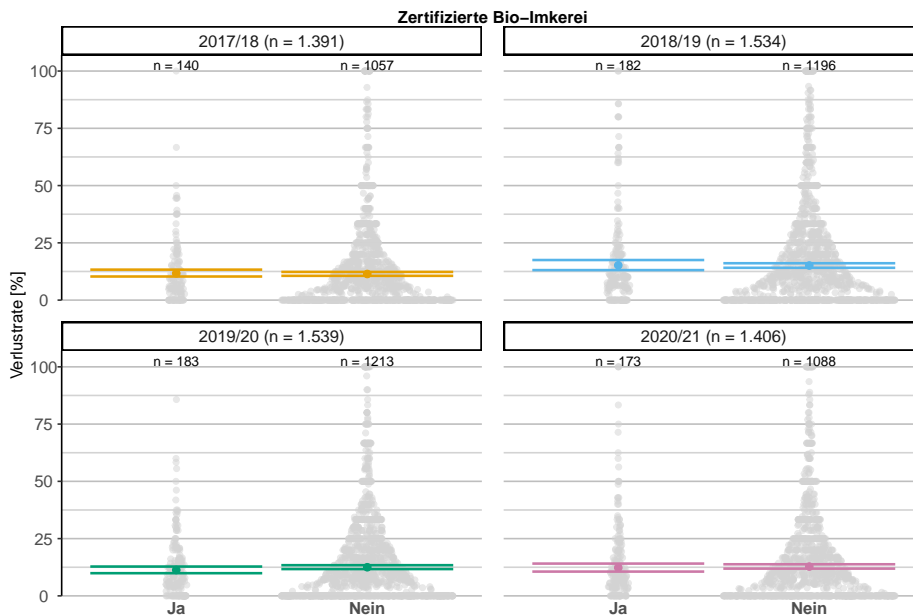


Abbildung 1.18: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Betriebsweise, ob eine zertifizierte Bio-Imkerei oder nicht gegeben ist über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21. Die Gruppe mit der Angabe „Unsicher“ und „Keine Angaben“ wurde nicht ausgewertet. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

### 1.3.5.3.2 Wanderimkerei

Die an unserer Studie teilnehmenden ImkerInnen wurden gefragt, ob sie ihre Bienen zu Trachtquellen oder Bestäubungseinsätzen transportieren (Verbringungen im Zuge der Zucht oder Ablegerbildung sind damit exkludiert). Über die Jahre sind im Durchschnitt circa 14,6% der TeilnehmerInnen mit ihren Bienenstöcken auf Wanderung mit einem leicht sinkenden Trend (Tabelle 1.16). In den Untersuchungsjahren 2018/19 und 2019/20 zeigten Wanderimkereien eine signifikant geringere Verlustrate im Vergleich zu Standimkereien (Abbildung 1.19).

Tabelle 1.16: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten zur Frage „Wanderimkerei“ über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21.

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Ja	216	15,5	10,8	(9,6 - 12,1)
Nein	1.144	82,2	12,2	(11,4 - 13,1)
Unsicher	4	0,3	16,1	(11,0 - 23,0)
keine Angaben	27	1,9	11,0	(7,0 - 17,0)
<b>18/19</b>				
Ja	225	14,7	11,3	(9,9 - 12,9)
Nein	1.292	84,2	17,3	(16,3 - 18,4)
Unsicher	4	0,3	7,9	(0,4 - 67,0)
keine Angaben	13	0,8	9,4	(4,8 - 17,3)
<b>19/20</b>				
Ja	226	14,7	10,5	(9,3 - 11,9)
Nein	1.295	84,1	13,8	(12,9 - 14,7)
Unsicher	6	0,4	7,4	(1,0 - 37,5)
keine Angaben	12	0,8	13,8	(9,6 - 19,4)
<b>20/21</b>				
Ja	191	13,6	11,0	(9,5 - 12,7)
Nein	1.208	85,9	13,2	(12,4 - 14,1)
Unsicher	2	0,1	10,7	(1,0 - 59,3)
keine Angaben	5	0,4	25,4	(9,6 - 52,1)

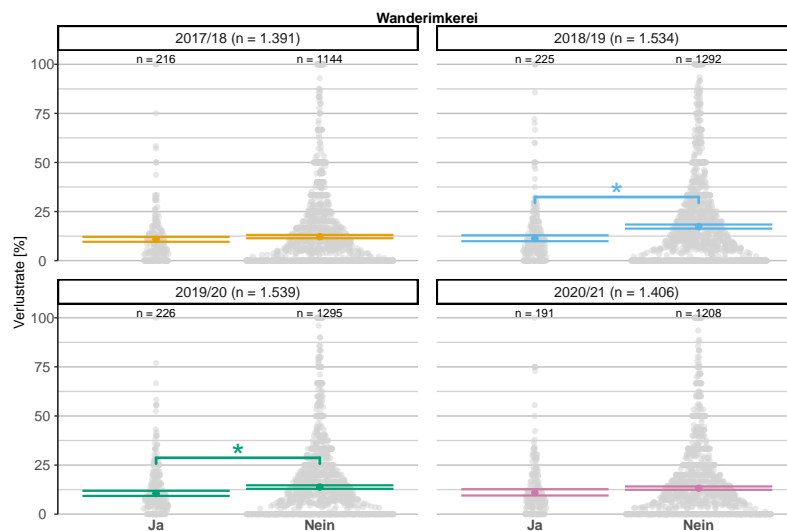


Abbildung 1.19: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Betriebsweise, ob mit Bienenstöcken zu Trachtquellen gewandert wird (Wanderimkerei) oder nicht über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21. Die Gruppe mit der Angabe „Unsicher“ und „Keine Angaben“ wurde nicht ausgewertet. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verluste auf Betriebsebene.

### 1.3.5.3.3 Bienen aus Zuchtprogramm für Varroatoleranz

Nur eine geringe Anzahl der TeilnehmerInnen führt hauptsächlich Völker mit Königinnen aus einer speziellen „Zucht für Varroa-Toleranz“ (Tabelle 1.17). In keinem Umfragejahr konnte ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 1.20).

Tabelle 1.17: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten zur Frage „Bienen aus Zuchtprogramm für Varroatoleranz“ über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21.

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Ja	69	5,0	9,7	(7,3 - 12,9)
Nein	1.074	77,2	11,5	(10,8 - 12,3)
Unsicher	62	4,5	11,0	(7,4 - 16,1)
keine Angaben	186	13,4	15,1	(13,1 - 17,4)
<b>18/19</b>				
Ja	98	6,4	14,4	(11,8 - 17,5)
Nein	1.211	78,9	14,7	(13,7 - 15,7)
Unsicher	64	4,2	18,4	(14,2 - 23,5)
keine Angaben	161	10,5	18,7	(16,0 - 21,8)
<b>19/20</b>				
Ja	77	5,0	10,3	(8,4 - 12,5)
Nein	1.271	82,6	12,7	(12,0 - 13,6)
Unsicher	45	2,9	16,7	(12,0 - 22,7)
keine Angaben	146	9,5	12,8	(10,2 - 15,8)
<b>20/21</b>				
Ja	82	5,8	11,1	(8,9 - 13,9)
Nein	1.125	80,0	12,8	(12,0 - 13,7)
Unsicher	45	3,2	14,0	(10,1 - 19,2)
keine Angaben	154	11,0	11,5	(9,5 - 13,9)

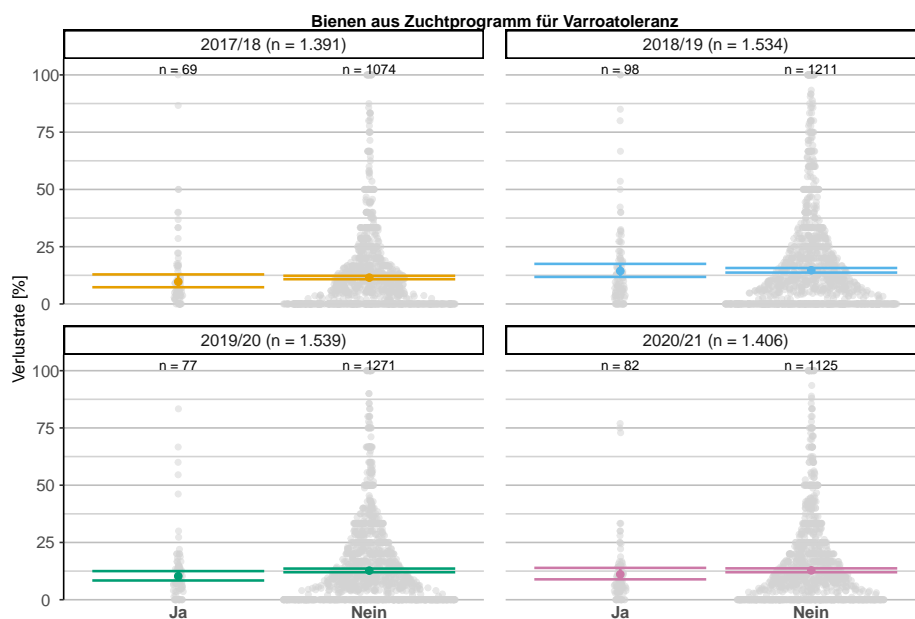


Abbildung 1.20: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Betriebsweise „Bienen aus Zuchtprogramm für Varroatoleranz“, der TeilnehmerInnen über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21. Die Gruppe mit der Angabe „Unsicher“ und „Keine Angaben“ wurde nicht ausgewertet. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

### 1.3.5.3.4 Kunststoff-Beuten

Als eine Frage zur Bauart des Bienenstockes wurde der mögliche Einfluss und die Verbreitung von „Kunststoff-Beuten“ erhoben. Die Anzahl der TeilnehmerInnen mit Kunststoff-Beuten ist von 7,8% im Jahr 2017/18 auf 10,5% im Jahr 2020/21 gestiegen (Tabelle 1.18). Ein signifikanter Unterschied in den Verlustraten konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 1.21).

Tabelle 1.18: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten zur Frage „Kunststoff-Beuten“ über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21.

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Ja	108	7,8	11,1	(8,7 - 13,9)
Nein	1.103	79,3	11,6	(10,8 - 12,4)
Unsicher	6	0,4	3,3	(0,8 - 12,8)
keine Angaben	174	12,5	14,4	(12,2 - 16,8)
<b>18/19</b>				
Ja	152	9,9	12,3	(9,9 - 15,2)
Nein	1.235	80,5	15,1	(14,1 - 16,0)
Unsicher	5	0,3	9,3	(2,5 - 28,7)
keine Angaben	142	9,3	19,2	(16,1 - 22,9)
<b>19/20</b>				
Ja	151	9,8	12,2	(9,9 - 14,9)
Nein	1.257	81,7	12,5	(11,7 - 13,2)
Unsicher	3	0,2	14,1	(1,0 - 71,7)
keine Angaben	128	8,3	14,3	(11,3 - 17,8)
<b>20/21</b>				
Ja	147	10,5	14,6	(12,1 - 17,5)
Nein	1.135	80,7	12,3	(11,5 - 13,2)
Unsicher	4	0,3	25,4	(6,8 - 61,5)
keine Angaben	120	8,5	12,0	(9,6 - 14,9)

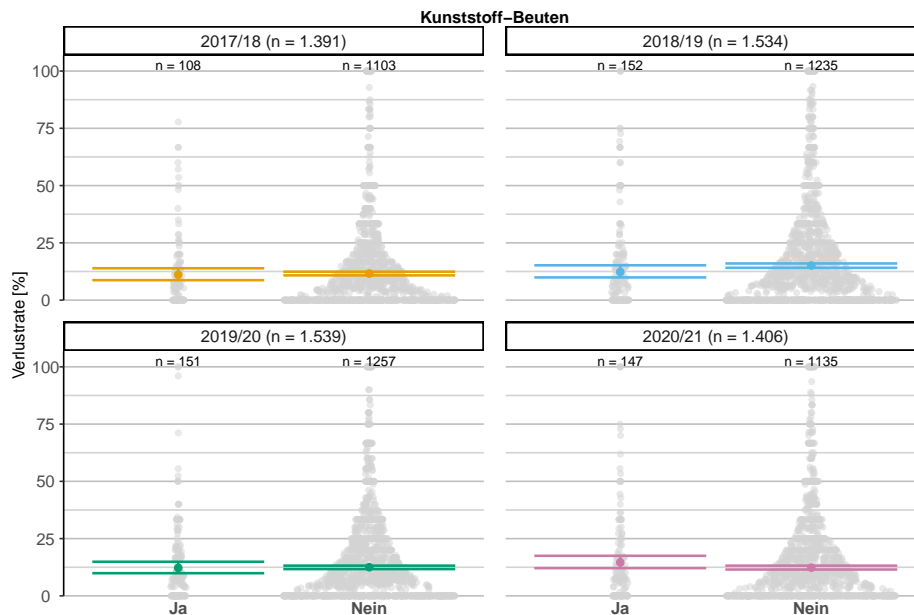


Abbildung 1.21: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Betriebsweise, ob „Kunststoff-Beuten“ eingesetzt wurden, der TeilnehmerInnen über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21. Die Gruppe mit der Angabe „Unsicher“ und „Keine Angaben“ wurde nicht ausgewertet. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.



### 1.3.5.3.5 Isolierte Beuten im Winter

Die Anzahl der TeilnehmerInnen die „Isolierte Beuten im Winter“ einsetzen ist von 20,3% im Jahr 2017/18 auf 25,2% im Jahr 2020/21 gestiegen (Tabelle 1.19). Ein signifikanter Unterschied in der Winterverlustrate, wenn Beuten isoliert wurden oder nicht, konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 1.22).

Tabelle 1.19: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten zur Frage „Isolierte Beuten im Winter“ über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21.

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Ja	283	20,3	11,4	(9,9 - 13,2)
Nein	935	67,2	11,6	(10,8 - 12,5)
Unsicher	29	2,1	14,7	(9,8 - 21,4)
keine Angaben	144	10,4	13,5	(11,3 - 16,1)
<b>18/19</b>				
Ja	341	22,2	16,2	(14,2 - 18,4)
Nein	1.034	67,4	14,6	(13,6 - 15,7)
Unsicher	31	2,0	14,6	(11,0 - 19,1)
keine Angaben	128	8,3	18,4	(15,2 - 22,2)
<b>19/20</b>				
Ja	339	22,0	13,6	(11,9 - 15,5)
Nein	1.039	67,5	12,6	(11,8 - 13,5)
Unsicher	42	2,7	15,2	(11,1 - 20,4)
keine Angaben	119	7,7	10,1	(7,9 - 12,8)
<b>20/21</b>				
Ja	355	25,2	12,9	(11,4 - 14,6)
Nein	911	64,8	12,5	(11,6 - 13,4)
Unsicher	34	2,4	17,9	(12,1 - 25,7)
keine Angaben	106	7,5	10,5	(8,3 - 13,1)

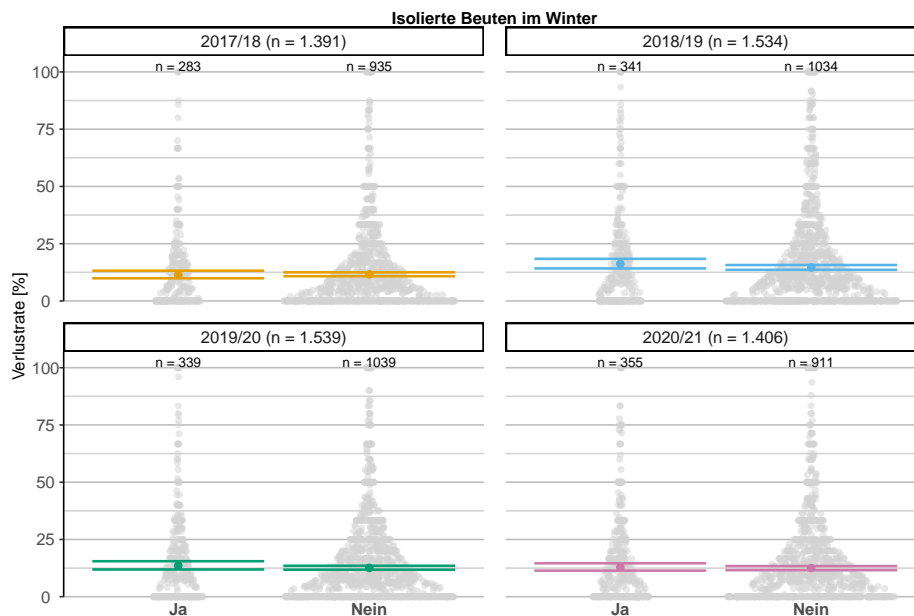


Abbildung 1.22: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Betriebsweise ob „Isolierte Beuten im Winter“ verwendet wurden, der TeilnehmerInnen über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21. Die Gruppe mit der Angabe „Unsicher“ und „Keine Angaben“ wurde nicht ausgewertet. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

### 1.3.5.3.6 Offener Gitterboden im Winter

Ein „Offener Gitterboden im Winter“ wird vom Großteil der ImkerInnen in unserer Umfrage eingesetzt mit über 55% (Tabelle 1.20). Ein signifikanter Unterschied in den Verlustraten konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 1.23).

Tabelle 1.20: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten zur Frage „Offener Gitterboden im Winter“ über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21.

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Ja	766	55,1	12,1	(11,2 - 13,1)
Nein	543	39,0	11,1	(10,0 - 12,3)
Unsicher	18	1,3	11,8	(7,9 - 17,3)
keine Angaben	64	4,6	14,6	(11,0 - 19,0)
<b>18/19</b>				
Ja	887	57,8	14,4	(13,4 - 15,6)
Nein	568	37,0	15,4	(14,0 - 16,9)
Unsicher	10	0,7	10,9	(5,1 - 21,8)
keine Angaben	69	4,5	23,1	(18,4 - 28,6)
<b>19/20</b>				
Ja	861	55,9	12,9	(12,0 - 14,0)
Nein	608	39,5	12,0	(11,0 - 13,1)
Unsicher	20	1,3	15,4	(9,1 - 24,8)
keine Angaben	50	3,2	13,3	(8,7 - 19,7)
<b>20/21</b>				
Ja	799	56,8	12,9	(11,9 - 14,0)
Nein	543	38,6	12,1	(11,0 - 13,4)
Unsicher	14	1,0	15,5	(10,1 - 23,1)
keine Angaben	50	3,6	11,3	(7,9 - 15,8)

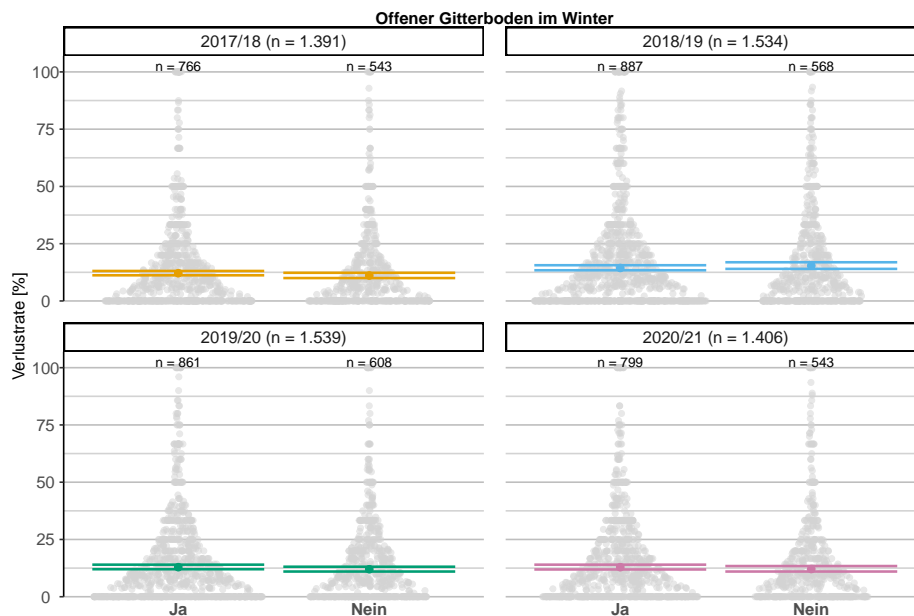


Abbildung 1.23: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Betriebsweise „Offener Gitterboden im Winter“ der TeilnehmerInnen über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21. Die Gruppe mit der Angabe „Unsicher“ und „Keine Angaben“ wurde nicht ausgewertet. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

### 1.3.5.3.7 Fremdwachs

In etwa die Hälfte der TeilnehmerInnen setzt Fremdwachs im Imkereibetrieb ein, der Anteil ist aber von 52,7% im Jahr 2017/18 auf 42,9% im Jahr 2020/21 gesunken (Tabelle 1.21). Imkereibetriebe die Fremdwachs eingesetzt haben zeigten in den Jahren 2018/19, 2019/20 und 2020/21 eine signifikant höhere Verlustrate im Vergleich zu Betrieben mit einem eigenen Wachskreislauf (Abbildung 1.24).

Tabelle 1.21: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten zur Frage „Einsatz von Fremdwachs“ über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21.

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Ja	733	52,7	12,5	(11,3 - 13,7)
Nein	535	38,5	11,3	(10,4 - 12,3)
Unsicher	36	2,6	9,0	(5,7 - 13,9)
keine Angaben	87	6,3	13,9	(10,6 - 18,0)
<b>18/19</b>				
Ja	781	50,9	17,4	(16,0 - 19,0)
Nein	653	42,6	14,0	(12,9 - 15,2)
Unsicher	29	1,9	15,1	(9,8 - 22,6)
keine Angaben	71	4,6	19,0	(15,1 - 23,6)
<b>19/20</b>				
Ja	757	49,2	14,8	(13,6 - 16,1)
Nein	681	44,2	11,7	(10,8 - 12,7)
Unsicher	28	1,8	11,6	(8,3 - 15,9)
keine Angaben	73	4,7	12,3	(9,1 - 16,4)
<b>20/21</b>				
Ja	603	42,9	14,8	(13,3 - 16,3)
Nein	702	49,9	11,8	(10,9 - 12,8)
Unsicher	30	2,1	12,3	(8,0 - 18,3)
keine Angaben	71	5,0	11,7	(8,8 - 15,4)

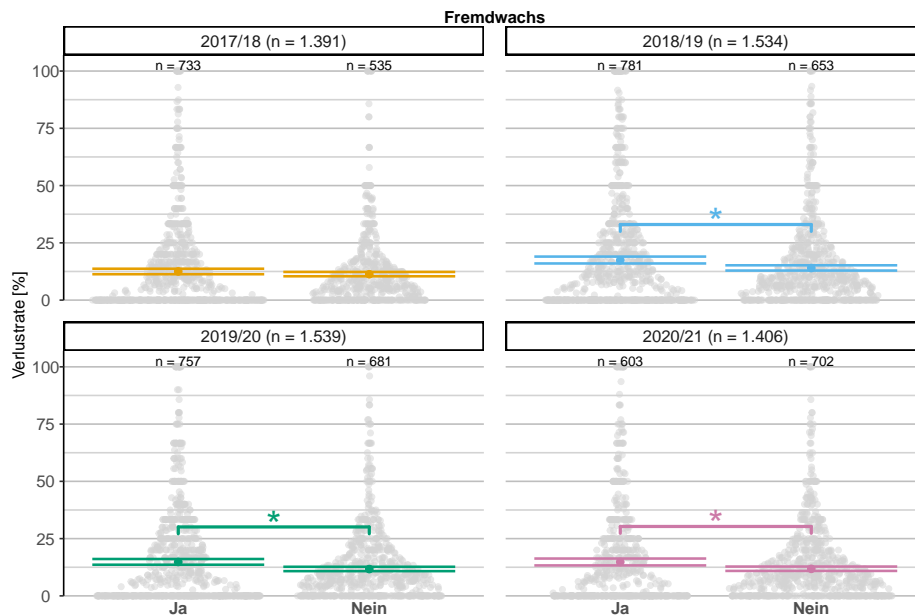


Abbildung 1.24: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Betriebsweise, ob Fremdwachs eingesetzt wurde, der TeilnehmerInnen über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21. Die Gruppe mit der Angabe „Unsicher“ und „Keine Angaben“ wurde nicht ausgewertet. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

### 1.3.5.3.8 Naturwabenbau

Die Praxis auf Mittelwände zu verzichten und Bienen hauptsächlich auf „Naturwabenbau“ zu halten wird nur von einem kleinen Anteil der TeilnehmerInnen angewandt (6,3-7,8%) (Tabelle 1.22). Ein signifikanter Unterschied in den Verlustraten konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 1.25).

Tabelle 1.22: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten zur Frage „Naturwabenbau“ über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21.

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Ja	93	6,7	13,4	(10,8 - 16,7)
Nein	1.084	77,9	11,3	(10,5 - 12,0)
Unsicher	33	2,4	14,8	(10,0 - 21,4)
keine Angaben	181	13,0	14,1	(11,8 - 16,8)
<b>18/19</b>				
Ja	96	6,3	13,1	(10,6 - 16,2)
Nein	1.237	80,6	14,8	(13,9 - 15,8)
Unsicher	44	2,9	17,1	(11,7 - 24,5)
keine Angaben	157	10,2	19,7	(16,7 - 23,0)
<b>19/20</b>				
Ja	120	7,8	12,6	(10,5 - 15,0)
Nein	1.243	80,8	12,6	(11,8 - 13,4)
Unsicher	35	2,3	10,6	(7,1 - 15,5)
keine Angaben	141	9,2	13,2	(10,5 - 16,5)
<b>20/21</b>				
Ja	102	7,3	14,2	(11,2 - 17,8)
Nein	1.116	79,4	12,3	(11,5 - 13,2)
Unsicher	34	2,4	15,7	(11,7 - 20,8)
keine Angaben	154	11,0	12,3	(10,3 - 14,7)

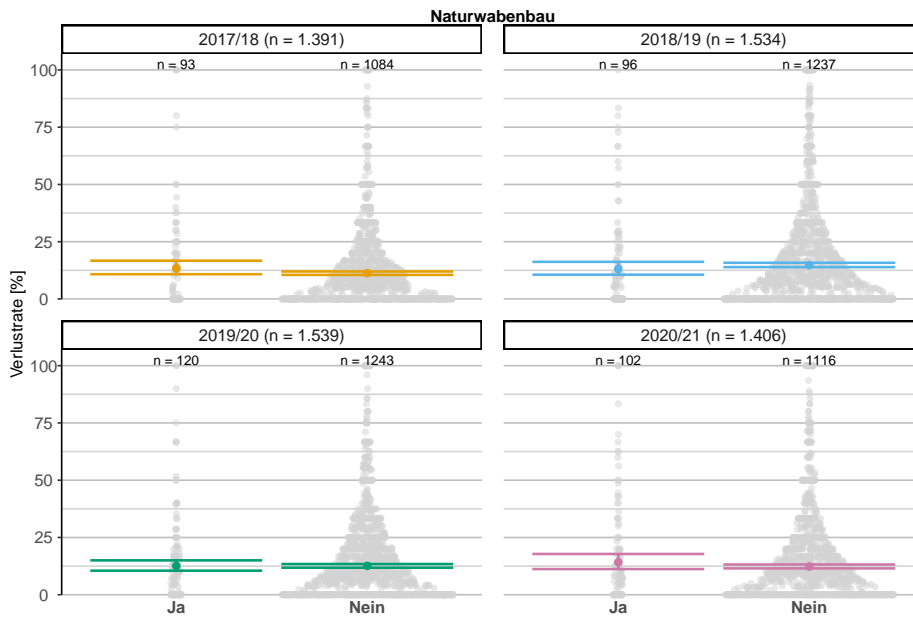


Abbildung 1.25: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Betriebsweise „Naturwabenbau“ der TeilnehmerInnen über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21. Die Gruppe mit der Angabe „Unsicher“ und „Keine Angaben“ wurde nicht ausgewertet. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

### 1.3.5.3.9 Kleine Brutzellen (5,1 mm oder weniger)

Mittelwände mit „kleinen Brutzellen (5,1 mm oder weniger)“ wird von circa 3,3% bis 4,5% im Jahr 2020/21 der TeilnehmerInnen verwendet (Tabelle 1.23). Im Jahr 2019/20 konnte hier eine signifikant geringere Verlustrate festgestellt werden, wenn solche kleinen Prägformen verwendet wurden, als wenn diese nicht eingesetzt wurden (Abbildung 1.26).

Tabelle 1.23: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten zur Frage „kleine Brutzellen (5,1 mm oder weniger)“ über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21.

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Ja	47	3,4	13,4	(10,7 - 16,6)
Nein	1.029	74,0	11,0	(10,2 - 11,8)
Unsicher	106	7,6	16,8	(13,5 - 20,8)
keine Angaben	209	15,0	14,7	(12,5 - 17,1)
<b>18/19</b>				
Ja	51	3,3	15,3	(12,1 - 19,1)
Nein	1.165	75,9	14,8	(13,8 - 15,8)
Unsicher	124	8,1	16,7	(12,8 - 21,5)
keine Angaben	194	12,6	18,1	(15,5 - 21,0)
<b>19/20</b>				
Ja	52	3,4	6,8	(4,9 - 9,3)
Nein	1.192	77,5	12,6	(11,8 - 13,4)
Unsicher	114	7,4	16,6	(13,6 - 20,0)
keine Angaben	181	11,8	15,3	(12,7 - 18,2)
<b>20/21</b>				
Ja	63	4,5	10,2	(7,5 - 13,6)
Nein	1.048	74,5	12,6	(11,8 - 13,5)
Unsicher	90	6,4	16,5	(12,6 - 21,3)
keine Angaben	205	14,6	12,2	(10,2 - 14,4)

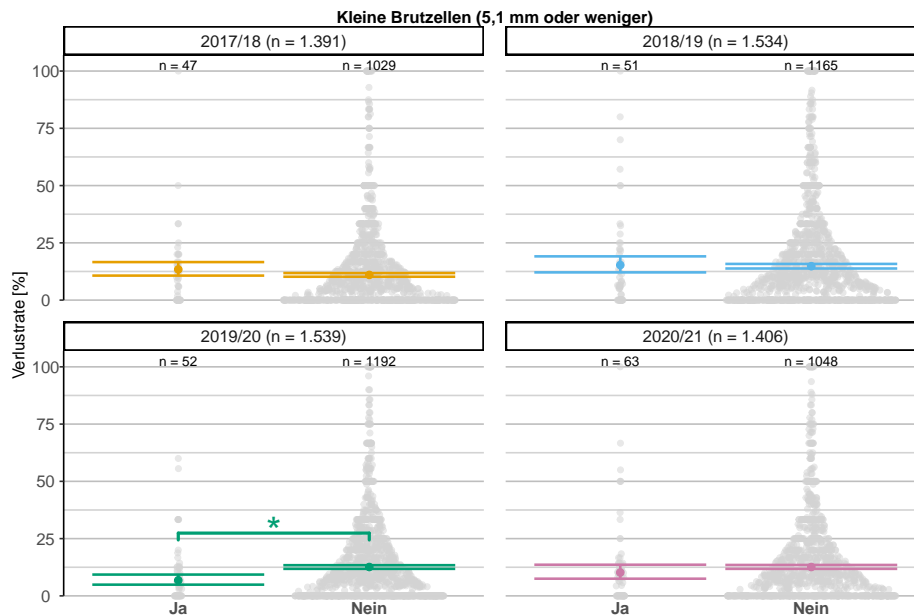


Abbildung 1.26: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Betriebsweise, ob „kleinen Brutzellen (5,1 mm oder weniger)“ eingesetzt wurden, der TeilnehmerInnenüber über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21. Die Gruppe mit der Angabe „Unsicher“ und „Keine Angaben“ wurde nicht ausgewertet. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

### 1.3.5.3.10 Vereinigung von Völkern

Neu in der Umfrage 2019/20 ist die Frage ob bereits vor dem Winter schwache (aber weiselrichtige) Völker vereinigt wurden. Insgesamt gaben circa 13,7% im Jahr 2019/20 und 17,0% im Jahr 2020/21 der TeilnehmerInnen an, Völker bereits vor dem Winter zu vereinigen (Tabelle 1.24). In der Winterverlustrate zeigt sich hier kein statistischer Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildung 1.27).

Tabelle 1.24: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten zur Frage „Vereinigung von Völkern“ über die Umfragejahre 2019/20 - 2020/21.

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>19/20</b>				
Ja	187	13,7	12,7	(10,7 - 14,9)
Nein	1.151	84,5	12,1	(11,3 - 12,9)
Unsicher	16	1,2	17,8	(10,2 - 29,4)
keine Angaben	8	0,6	9,8	(1,3 - 46,4)
<b>20/21</b>				
Ja	218	17,0	11,2	(9,8 - 12,7)
Nein	1.055	82,2	13,2	(12,3 - 14,1)
Unsicher	10	0,8	6,2	(0,9 - 32,5)
keine Angaben	1	0,1	7,7	

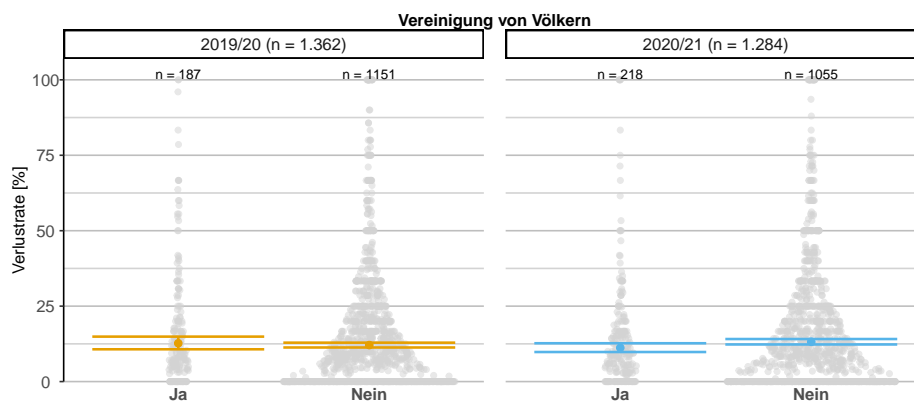


Abbildung 1.27: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Betriebsweise „Vereinigung von Völkern“ der TeilnehmerInnen über die Umfragejahre 2019/20 - 2020/21. Die Gruppe mit der Angabe „Unsicher“ und „Keine Angaben“ wurde nicht ausgewertet. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

### 1.3.5.4 Wabenhygiene

Wabenhygiene in Form von Erneuerung alter Brutwaben kann einen positiven Einfluss auf die Gesundheit der Bienen haben und möglicherweise auch das Überleben der Bienen im Winter beeinflussen. Die ImkerInnen wurden gefragt, welchen Anteil ihrer Brutwaben (in Prozentklassen) sie erneuert haben. Die meisten ImkerInnen (35-40%) erneuern zwischen 31-50% der Brutwaben. Die Gruppe „mehr als 50%“ ist bei circa 30% (Tabelle 1.25). Ein signifikanter Unterschied in den Verlustraten konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 1.28).

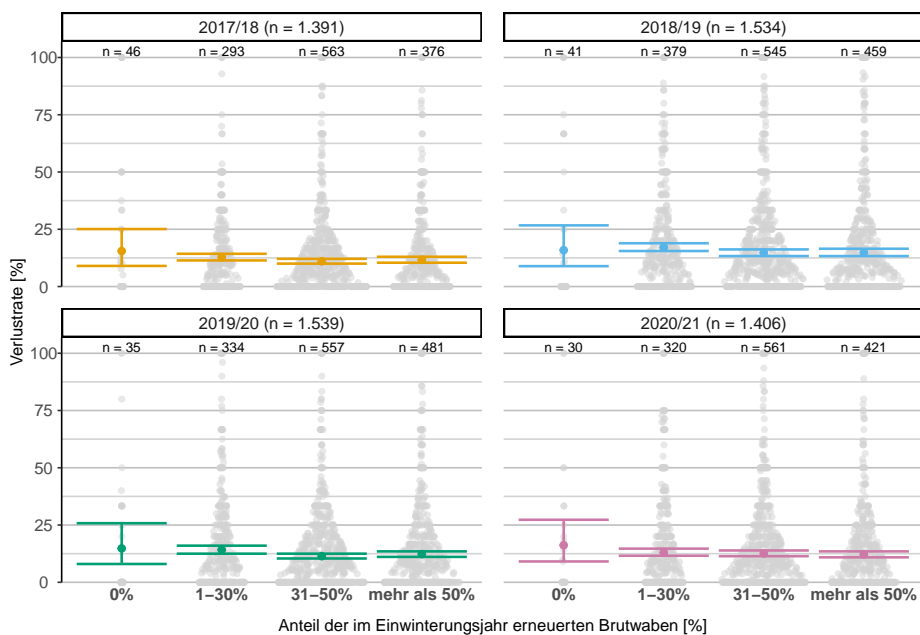


Abbildung 1.28: Höhe der Winterverluste von in Abhängigkeit vom Anteil der im Einwinterungsjahr erneuerten Brutwaben in Prozentklassen ( $\pm 95\%CI$ ) über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

Tabelle 1.25: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten anhand dem relativen Anteil der im Einwinterungsjahr erneuerten Brutwaben über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21.

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
0%	46	3,3	15,5	(9,0 - 25,1)
1-30%	293	21,1	12,8	(11,4 - 14,3)
31-50%	563	40,5	11,0	(10,0 - 12,1)
mehr als 50%	376	27,0	11,7	(10,4 - 13,0)
keine Angaben	113	8,1	14,8	(11,7 - 18,7)
<b>18/19</b>				
0%	41	2,7	15,9	(8,9 - 26,7)
1-30%	379	24,7	17,1	(15,5 - 18,9)
31-50%	545	35,5	14,7	(13,3 - 16,2)
mehr als 50%	459	29,9	14,8	(13,3 - 16,5)
keine Angaben	110	7,2	11,2	(8,2 - 15,0)
<b>19/20</b>				
0%	35	2,3	14,8	(8,0 - 25,8)
1-30%	334	21,7	14,2	(12,5 - 16,0)
31-50%	557	36,2	11,4	(10,4 - 12,5)
mehr als 50%	481	31,3	12,3	(11,1 - 13,5)
keine Angaben	132	8,6	18,0	(14,5 - 22,1)
<b>20/21</b>				
0%	30	2,1	16,2	(9,1 - 27,3)
1-30%	320	22,8	13,0	(11,6 - 14,7)
31-50%	561	39,9	12,6	(11,4 - 13,9)
mehr als 50%	421	29,9	12,2	(10,9 - 13,5)
keine Angaben	74	5,3	11,4	(8,2 - 15,6)

### 1.3.5.5 Trachtangebot

Die teilnehmenden ImkerInnen wurden nach spezifischen Trachtquellen gefragt, die von ihren Bienen beflogen wurden, um mögliche Risikotrachtquellen zu bestimmen. Zur Auswahl standen: Raps (*Brassica napus*), Mais (*Zea mays*), Sonnenblume (*Helianthus annuus*), spätblühende Zwischenfrüchte, Waldtracht sowie Waldtracht mit Melezitose. Zur groben Feststellung der Trachtgebiete wurde anhand der Haupt-Überwinterungsstandorte (ohne WanderimkerInnen) eine Karte der betroffenen ImkerInnen aufgezeichnet, welche in den folgenden Unterkapiteln angefügt ist. Die Trachtquellen werden nur als Einzelfaktoren betrachtet, mögliche Abhängigkeiten oder Kombinationen mit anderen Trachten werden bei der Verluststratenanalyse nicht beachtet. Eine einfache deskriptive Analyse der gemeinsam vorkommenden Trachten ist in Abbildung 1.29 dargestellt. Dieses Netzwerk zeigt eine häufige Kombination von Waldtracht und spätblühenden Zwischenfrüchten, sowie eine Verbindung zu Melezitose im Jahr 2019/20 wo diese häufig gemeldet wurde.

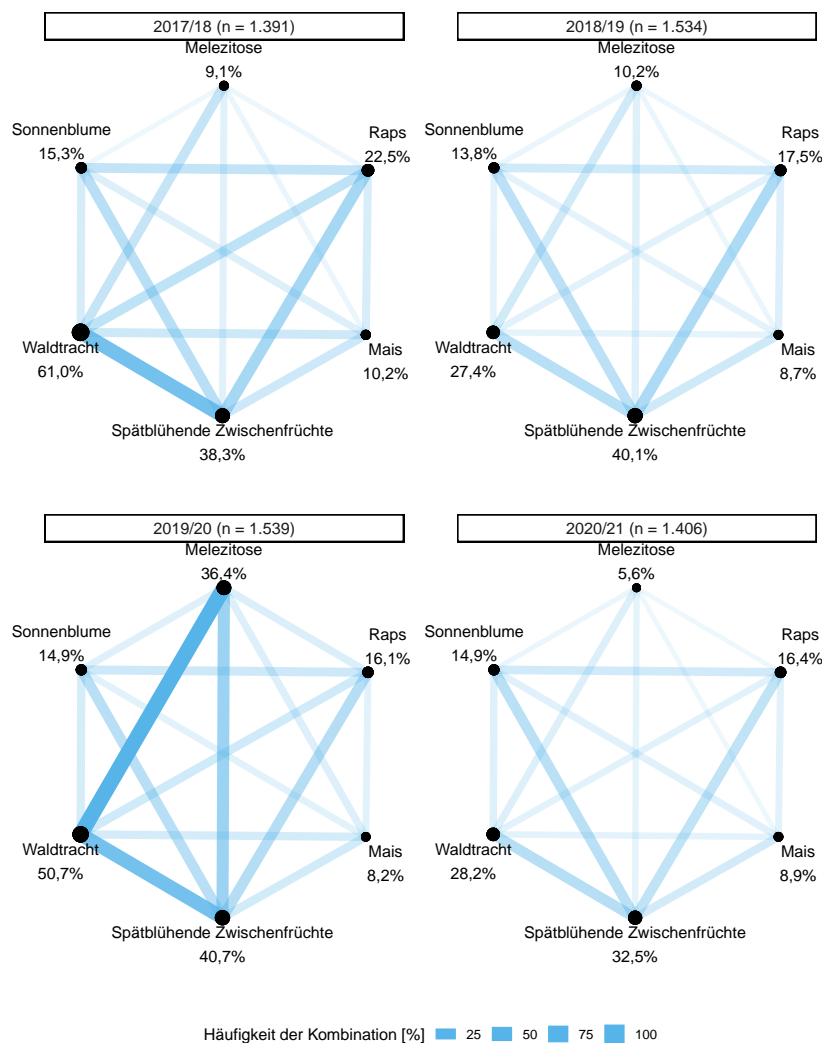


Abbildung 1.29: Deskriptive Netzwerk Analyse der Kombinationen von Trachtquellen, aufgeteilt in die Umfragejahre. Die Breite, breiter ist mehr, und die Transparenz, weniger Transparenz ist mehr, der Verbindungen zeigt die relative Häufigkeit der Kombination zwischen den Trachtquellen. Prozentangabe und Punktgröße die relative Häufigkeit der „Ja“ Antworten.



### 1.3.5.5.1 Raps (*Brassica napus*)

TeilnehmerInnen die eine Rapstracht hatten zeigten statistisch signifikant höhere Verlustraten im Jahr 2017/18 (Abbildung 1.30). Die Anzahl der Meldungen ist von 2017/18 mit 22,5% der TeilnehmerInnen mit Rapstracht auf 16,4% im Jahr 2020/21 gesunken (Tabelle 1.26 und Abbildung 1.31).

Tabelle 1.26: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Meldungen ob eine Raps Tracht vorhanden war oder nicht, über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21.

Rapstracht	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Ja	313	22,5	13,9	(12,6 - 15,2)
Nein	726	52,2	10,3	(9,4 - 11,3)
Unsicher	128	9,2	13,8	(10,9 - 17,3)
keine Angaben	224	16,1	12,0	(10,1 - 14,1)
<b>18/19</b>				
Ja	269	17,5	16,5	(14,6 - 18,7)
Nein	917	59,8	14,6	(13,5 - 15,8)
Unsicher	128	8,3	16,1	(13,2 - 19,5)
keine Angaben	220	14,3	15,3	(13,0 - 18,0)
<b>19/20</b>				
Ja	248	16,1	13,8	(12,3 - 15,4)
Nein	871	56,6	11,5	(10,7 - 12,4)
Unsicher	158	10,3	16,4	(13,9 - 19,3)
keine Angaben	262	17,0	13,7	(11,5 - 16,1)
<b>20/21</b>				
Ja	230	16,4	13,6	(11,7 - 15,6)
Nein	885	62,9	11,9	(11,0 - 12,9)
Unsicher	129	9,2	15,7	(12,9 - 18,9)
keine Angaben	162	11,5	12,6	(10,3 - 15,3)

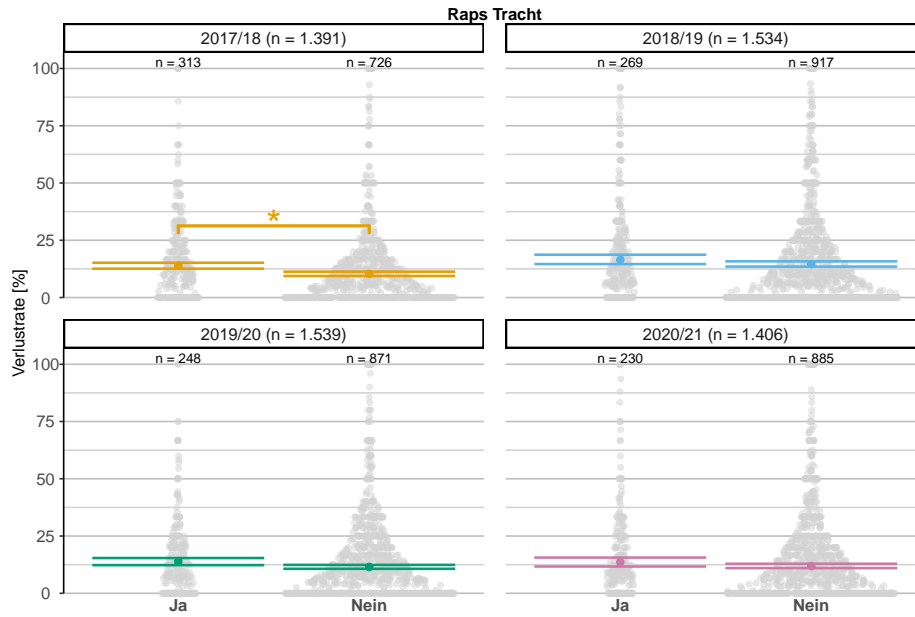


Abbildung 1.30: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit ob die Bienen die Trachtquelle Raps (*Brassica napus*) befliegen haben. Die Gruppe mit der Angabe „Unsicher“ und „Keine Angaben“ wurde nicht ausgewertet. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

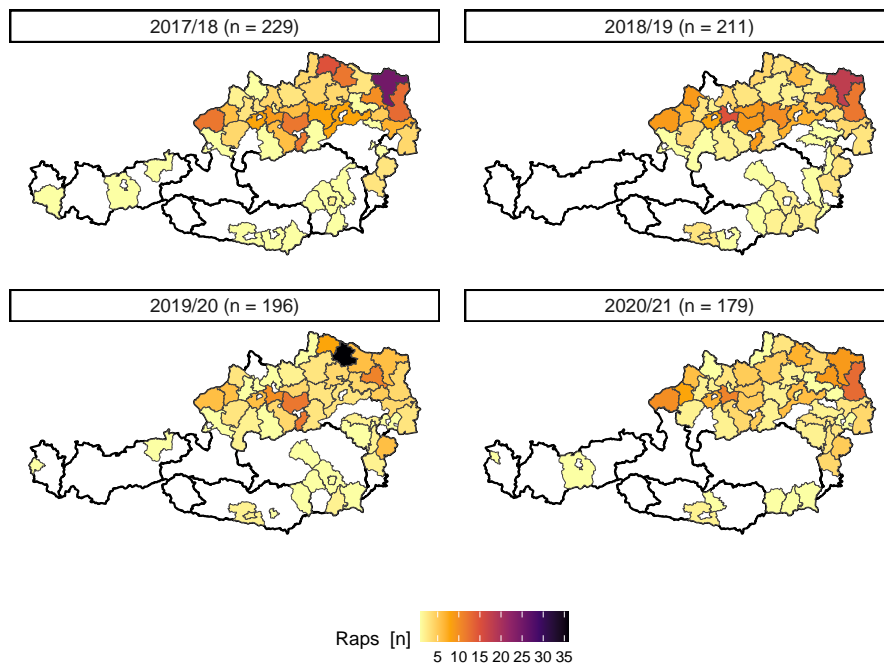


Abbildung 1.31: Anzahl der Meldungen der Trachtquelle Raps (*Brassica napus*) in absoluten Zahlen. Helle Farben kennzeichnen Bezirke mit weniger Antworten und dunkle Farben einer Häufung von Antworten, exklusive WanderimkerInnen. Nicht eingezeichnet Bezirke ohne Meldungen.

### 1.3.5.5.2 Sonnenblume (*Helianthus annuus*)

TeilnehmerInnen mit einer Sonnenblumentracht zeigten statistisch signifikant höhere Verlustraten im Jahr 2017/18 (Abbildung 1.32). Die Anzahl der Meldungen und Verbreitung der TeilnehmerInnen mit Sonnenblumentracht ist über die Jahre in etwa gleichgeblieben (Tabelle 1.27 und Abbildung 1.33).

Tabelle 1.27: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Meldungen ob eine Sonnenblumen Tracht vorhanden war oder nicht, über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21.

Sonnenblumentracht	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Ja	213	15,3	14,2	(12,6 - 15,8)
Nein	706	50,8	10,4	(9,6 - 11,4)
Unsicher	200	14,4	13,5	(11,2 - 16,2)
keine Angaben	272	19,6	12,9	(11,1 - 15,0)
<b>18/19</b>				
Ja	212	13,8	15,8	(13,8 - 17,9)
Nein	874	57,0	14,9	(13,8 - 16,1)
Unsicher	208	13,6	16,4	(13,8 - 19,4)
keine Angaben	240	15,6	15,6	(13,2 - 18,2)
<b>19/20</b>				
Ja	229	14,9	14,0	(12,3 - 15,9)
Nein	793	51,5	12,0	(11,1 - 13,0)
Unsicher	237	15,4	13,8	(11,8 - 16,1)
keine Angaben	280	18,2	12,8	(10,9 - 15,0)
<b>20/21</b>				
Ja	209	14,9	13,5	(11,7 - 15,5)
Nein	842	59,9	12,0	(11,1 - 13,0)
Unsicher	174	12,4	15,8	(12,9 - 19,1)
keine Angaben	181	12,9	12,7	(10,6 - 15,0)

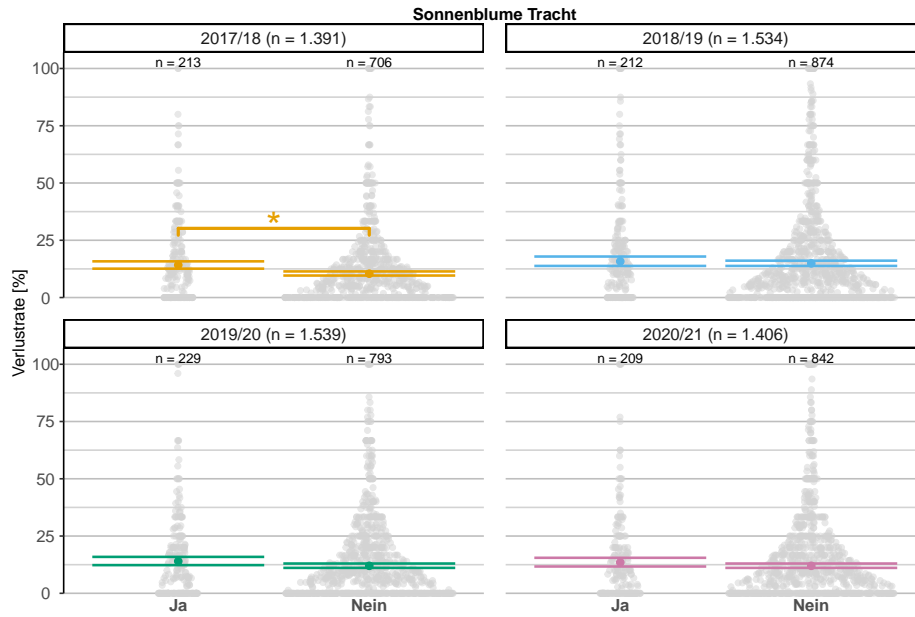


Abbildung 1.32: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit ob die Bienen die Trachtquelle Sonnenblume (*Helianthus annuus*) befliegen haben. Die Gruppe mit der Angabe „Unsicher“ und „Keine Angaben“ wurde nicht ausgewertet. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

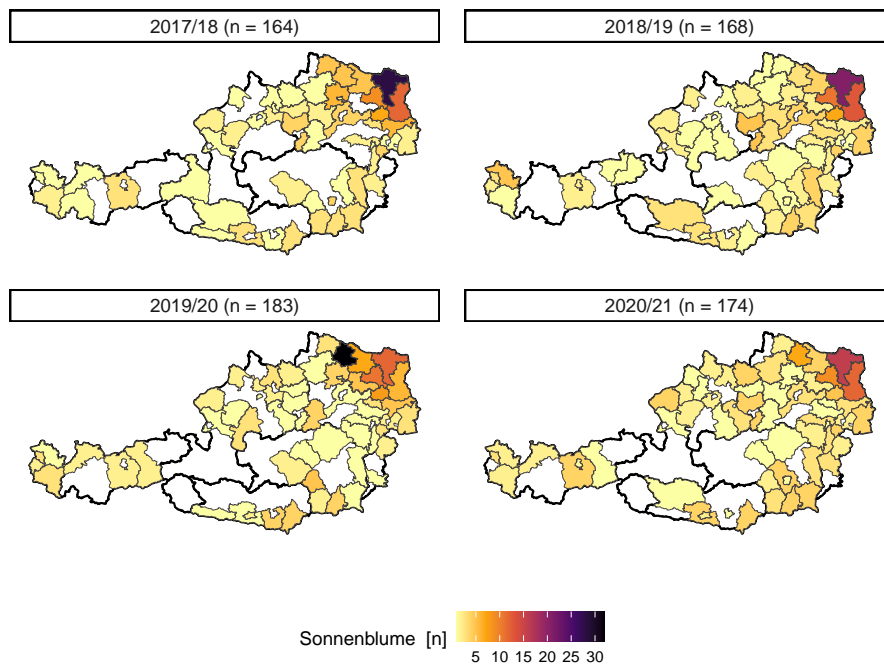


Abbildung 1.33: Anzahl der Meldungen der Trachtquelle Sonnenblume (*Helianthus annuus*) in absoluten Zahlen. Helle Farben kennzeichnen Bezirke mit weniger Antworten und dunkle Farben einer Häufung von Antworten, exklusive WanderimkerInnen. Nicht eingezeichnet Bezirke ohne Meldungen.

### 1.3.5.5.3 Mais (*Zea mays*)

In drei Umfragejahren zwischen 2017/18 bis 2019/20 hatten Imkereibetriebe mit sammelnden Bienen auf Mais eine signifikant höhere Verlustrate (Abbildung 1.34). Die Anzahl der Meldungen blieb in etwa gleich (Abbildung 1.35). Bei dieser Tracht gaben circa 20% der TeilnehmerInnen „Unsicher“ als Antwort (Tabelle 1.28).

Tabelle 1.28: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Meldungen ob Bienen auf Mais gesammelt haben oder nicht, über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21.

Mais	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Ja	142	10,2	15,1	(12,4 - 18,2)
Nein	681	49,0	10,3	(9,4 - 11,2)
Unsicher	284	20,4	12,9	(11,3 - 14,7)
keine Angaben	284	20,4	13,2	(11,7 - 14,9)
<b>18/19</b>				
Ja	134	8,7	18,1	(15,1 - 21,6)
Nein	859	56,0	13,8	(12,7 - 15,0)
Unsicher	294	19,2	17,3	(15,4 - 19,3)
keine Angaben	247	16,1	17,2	(15,0 - 19,7)
<b>19/20</b>				
Ja	126	8,2	17,7	(14,7 - 21,2)
Nein	802	52,1	11,6	(10,8 - 12,5)
Unsicher	321	20,9	13,7	(12,1 - 15,4)
keine Angaben	290	18,8	13,1	(11,2 - 15,3)
<b>20/21</b>				
Ja	125	8,9	15,3	(12,5 - 18,5)
Nein	824	58,6	11,8	(10,8 - 12,7)
Unsicher	256	18,2	14,8	(13,0 - 16,8)
keine Angaben	201	14,3	11,7	(9,9 - 13,8)

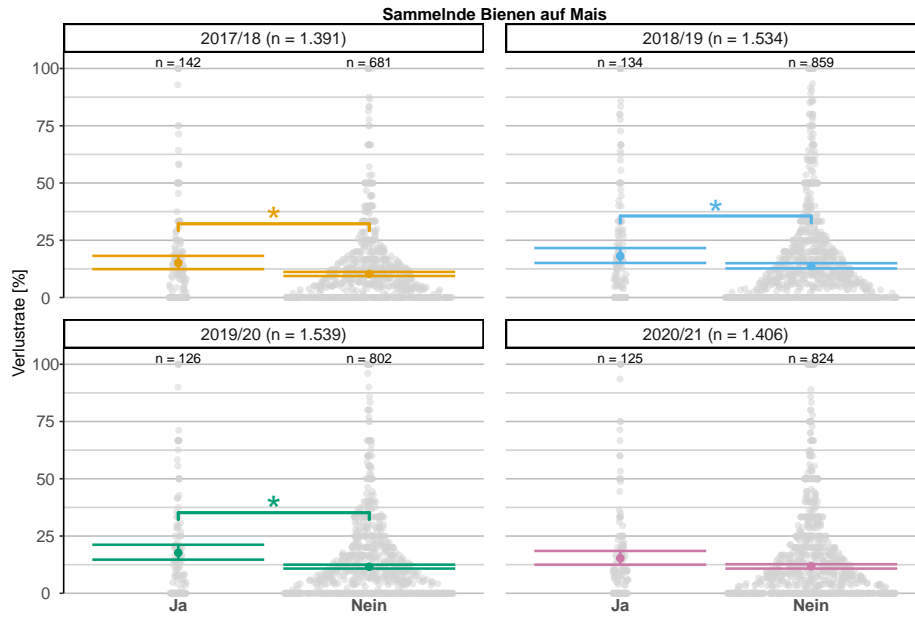


Abbildung 1.34: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit ob die Bienen die Trachtquelle Mais (*Zea mays*) befliegen haben. Die Gruppe mit der Angabe „Unsicher“ und „Keine Angaben“ wurde nicht ausgewertet. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

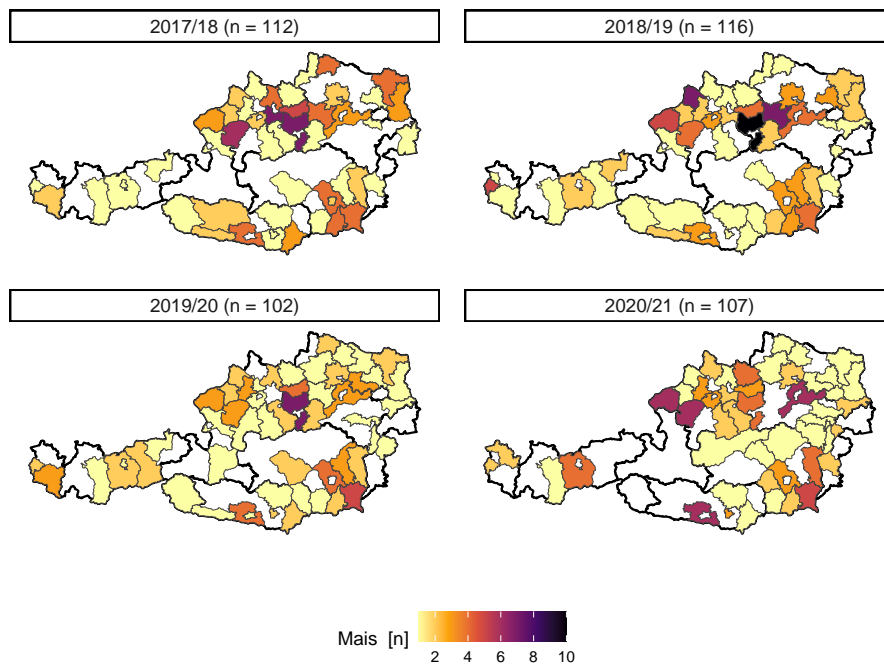


Abbildung 1.35: Anzahl der Meldungen der Trachtquelle Mais (*Zea mays*) in absoluten Zahlen. Helle Farben kennzeichnen Bezirke mit weniger Antworten und dunkle Farben einer Häufung von Antworten, exklusive WanderimkerInnen. Nicht eingezeichnet Bezirke ohne Meldungen.

### 1.3.5.5.4 Spätblühende Zwischenfrüchte

In dem Umfragejahren 2017/18 bis 2020/21 konnte keine statistisch signifikant höhere Verlustrate festgestellt werden, wenn die Bienen an spätblühende Zwischenfrüchte gesammelt haben (Abbildung 1.36). Die Anzahl und Verbreitung der Meldungen ist über die Jahre mit in etwa 40% gleich geblieben aber im letzten Untersuchungsjahr 2020/21 waren es nur 32,3%. Diese Tracht ist auch die mit den meisten „Unsicher“ Meldungen (Tabelle 1.29 und Abbildung 1.37).

Tabelle 1.29: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Meldungen ob eine Tracht von spätblühende Zwischenfrüchten vorhanden war oder nicht, über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21.

Spätblühende Zwischenfrüchte	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Ja	533	38,3	12,1	(11,0 - 13,2)
Nein	327	23,5	10,3	(9,1 - 11,8)
Unsicher	310	22,3	12,7	(11,2 - 14,5)
keine Angaben	221	15,9	13,0	(11,0 - 15,2)
<b>18/19</b>				
Ja	615	40,1	15,9	(14,6 - 17,3)
Nein	408	26,6	13,4	(11,9 - 14,9)
Unsicher	305	19,9	15,6	(13,5 - 17,9)
keine Angaben	206	13,4	17,9	(15,4 - 20,8)
<b>19/20</b>				
Ja	627	40,7	12,6	(11,6 - 13,7)
Nein	344	22,4	12,6	(11,2 - 14,1)
Unsicher	317	20,6	13,3	(11,7 - 14,9)
keine Angaben	251	16,3	11,9	(10,0 - 14,2)
<b>20/21</b>				
Ja	457	32,5	13,1	(11,8 - 14,6)
Nein	436	31,0	11,9	(10,7 - 13,2)
Unsicher	334	23,8	13,9	(12,3 - 15,6)
keine Angaben	179	12,7	11,5	(9,5 - 13,9)

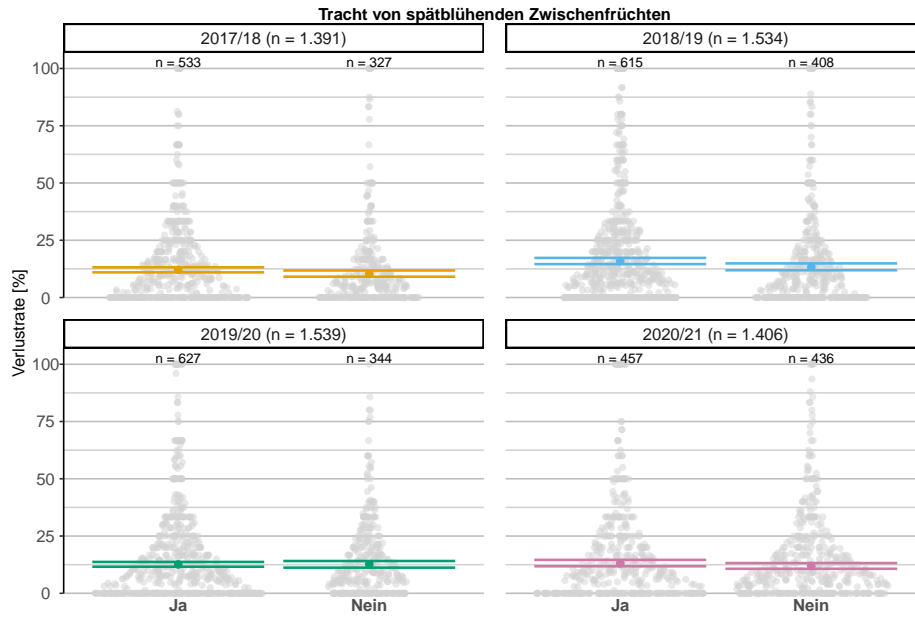


Abbildung 1.36: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit, ob die Bienen an spätblühenden Zwischenfrüchten gesammelt haben. Die Gruppe mit der Angabe „Unsicher“ und „Keine Angaben“ wurde nicht ausgewertet. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

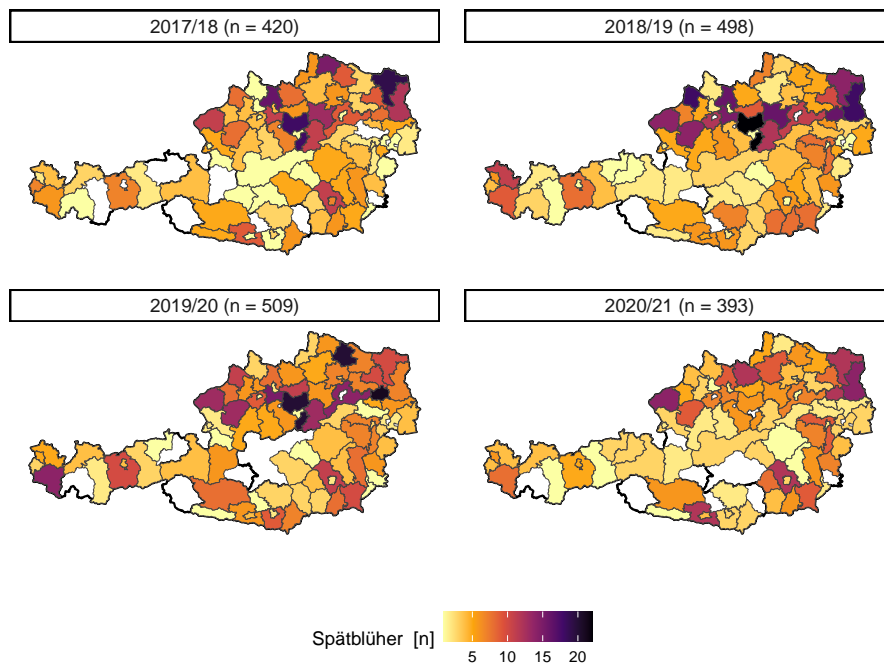


Abbildung 1.37: Anzahl der Meldungen von spätblühenden Zwischenfrüchten in absoluten Zahlen. Helle Farben kennzeichnen Bezirke mit weniger Antworten und dunkle Farben eine Häufung von Antworten, exklusive WanderimkerInnen. Nicht eingezeichnet sind Bezirke ohne Meldungen.



### 1.3.5.5.5 Waldtracht

Die Anzahl der Meldungen von einer Waldtracht variiert stark zwischen den Jahren. Die meisten Meldungen waren 2017/18 mit 61% der TeilnehmerInnen (Tabelle 1.30). Auch in der Verbreitung auf Bezirksebene zeigten sich hier Unterschiede (Abbildung 1.39). ImkerInnen die eine Waldtracht gemeldet haben zeigten 2017/18 und 2019/20 eine geringere Winterverlustrate im Vergleich zu jenen die keine hatten (Abbildung 1.38).

Tabelle 1.30: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Meldungen ob eine Waldtracht vorhanden war oder nicht, über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21.

Waldtracht	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Ja	849	61,0	10,8	(10,0 - 11,7)
Nein	251	18,0	14,6	(13,0 - 16,5)
Unsicher	145	10,4	12,7	(10,4 - 15,3)
keine Angaben	146	10,5	14,2	(11,7 - 17,1)
<b>18/19</b>				
Ja	421	27,4	13,9	(12,3 - 15,7)
Nein	691	45,0	15,5	(14,4 - 16,7)
Unsicher	235	15,3	16,1	(13,6 - 18,9)
keine Angaben	187	12,2	17,6	(15,0 - 20,4)
<b>19/20</b>				
Ja	780	50,7	11,4	(10,5 - 12,3)
Nein	372	24,2	14,4	(13,0 - 16,0)
Unsicher	182	11,8	13,7	(11,8 - 15,8)
keine Angaben	205	13,3	14,9	(12,6 - 17,6)
<b>20/21</b>				
Ja	396	28,2	11,3	(9,9 - 12,8)
Nein	649	46,2	13,4	(12,3 - 14,6)
Unsicher	212	15,1	12,0	(10,2 - 14,2)
keine Angaben	149	10,6	12,0	(10,0 - 14,3)

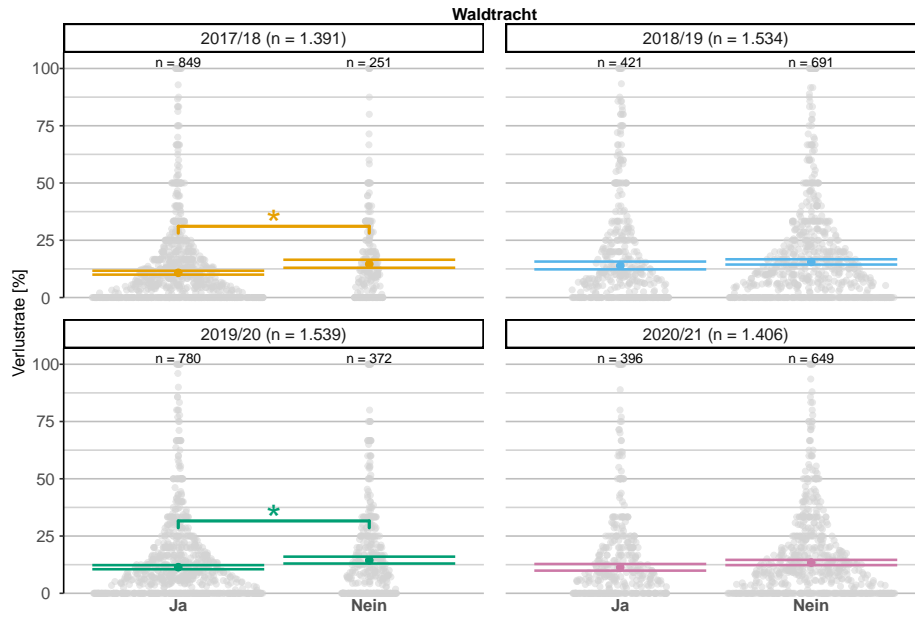


Abbildung 1.38: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit, ob eine Waldtracht vorhanden war oder nicht. Die Gruppe mit der Angabe „Unsicher“ und „Keine Angaben“ wurde nicht ausgewertet. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

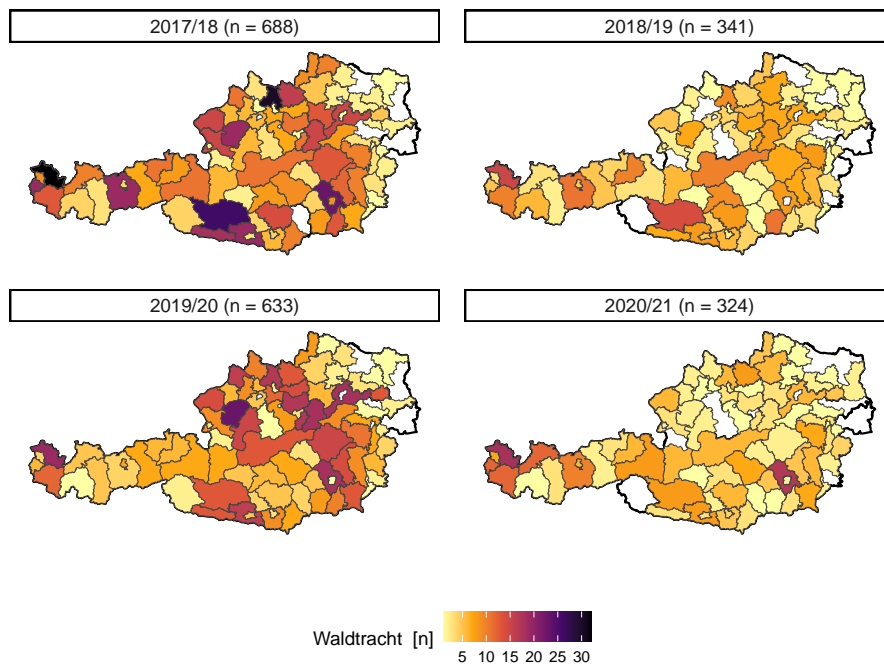


Abbildung 1.39: Anzahl der Meldungen von Waldtracht in absoluten Zahlen. Helle Farben kennzeichnen Bezirke mit weniger Antworten und dunkle Farben mit einer Häufung von Antworten, exklusive WanderimkerInnen. Nicht eingezeichnet sind Bezirke ohne Meldungen.

### 1.3.5.5.6 Waldtracht mit Melezitose

Die Meldungen Waldtracht mit Melezitose variiert wie auch die Waldtracht ohne Melezitose stark zwischen den Jahren und auch die Verbreitung auf Bezirksebene zeigt Unterschiede (Abbildung 1.41). Die meisten Meldungen mit 36,4% waren im Jahr 2019/20 und die geringsten im Jahr 2020/21 mit 5,6% (Tabelle 1.31). Ein signifikanter Unterschied in den Winterverlusten konnte in keinem Jahr festgestellt werden (Abbildung 1.40).

Tabelle 1.31: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Meldungen ob eine Waldtracht mit Melezitose vorhanden war oder nicht, über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21.

Melezitose	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Ja	127	9,1	12,9	(10,3 - 16,1)
Nein	849	61,0	11,1	(10,3 - 11,9)
Unsicher	128	9,2	13,2	(10,7 - 16,3)
keine Angaben	287	20,6	13,4	(11,8 - 15,2)
<b>18/19</b>				
Ja	157	10,2	17,4	(14,9 - 20,2)
Nein	1.014	66,1	14,1	(13,2 - 15,2)
Unsicher	122	8,0	19,5	(15,5 - 24,1)
keine Angaben	241	15,7	16,1	(13,6 - 18,9)
<b>19/20</b>				
Ja	560	36,4	11,6	(10,6 - 12,8)
Nein	643	41,8	13,5	(12,4 - 14,6)
Unsicher	105	6,8	15,0	(11,9 - 18,7)
keine Angaben	231	15,0	13,1	(11,0 - 15,6)
<b>20/21</b>				
Ja	79	5,6	11,4	(8,4 - 15,1)
Nein	1.024	72,8	12,5	(11,6 - 13,4)
Unsicher	96	6,8	15,2	(11,9 - 19,2)
keine Angaben	207	14,7	12,6	(10,6 - 15,0)

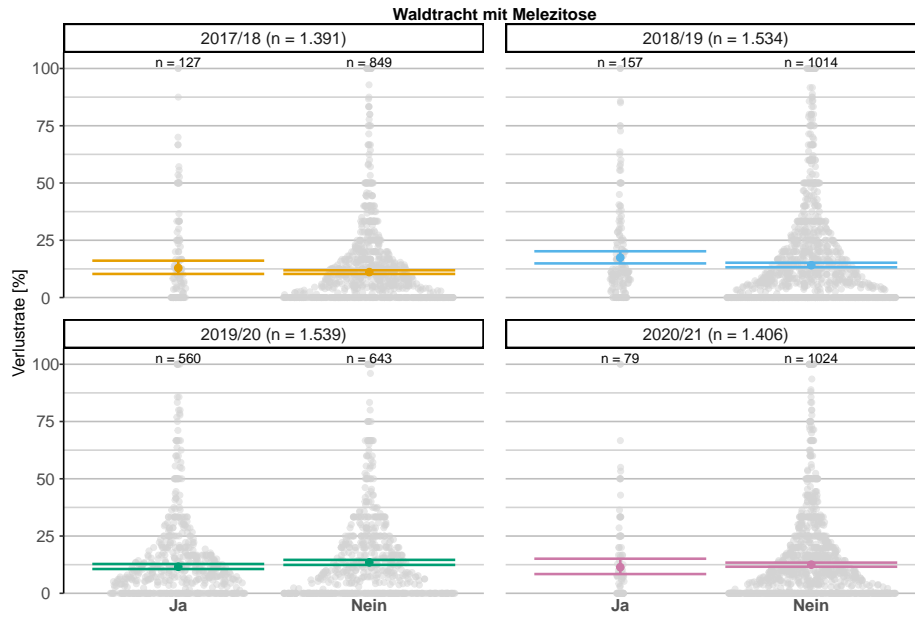


Abbildung 1.40: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit ob eine Waldtracht „mit Melezitose“ vorhanden war oder nicht. Die Gruppe mit der Angabe „Unsicher“ und „Keine Angaben“ wurde nicht ausgewertet. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

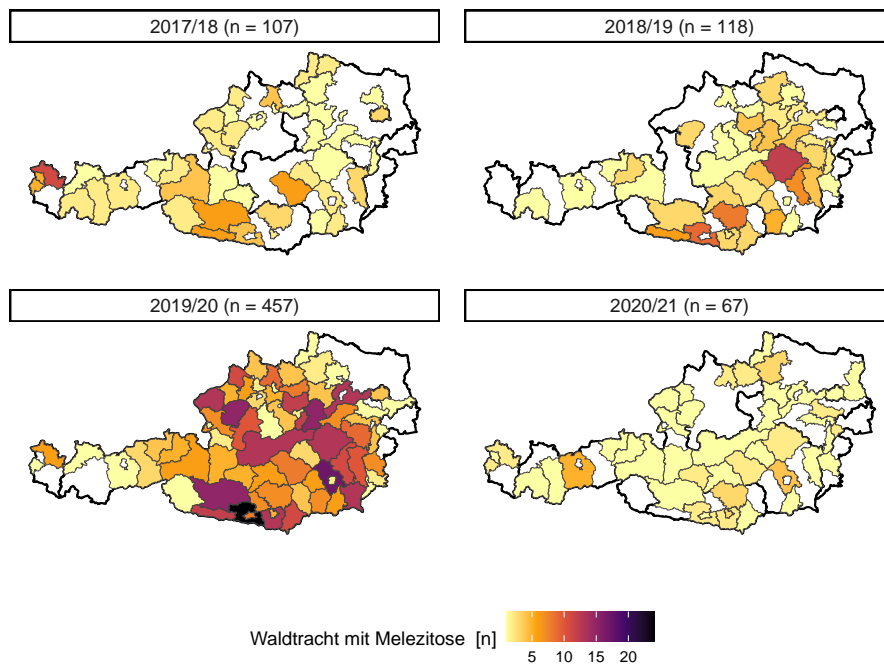


Abbildung 1.41: Anzahl der Meldungen von Waldtracht mit Melezitose in absoluten Zahlen. Helle Farben kennzeichnen Bezirke mit weniger Antworten und dunkle Farben eine Häufung von Antworten, exklusive WanderimkerInnen. Nicht eingezeichnet sind Bezirke ohne Meldungen.

### 1.3.5.6 Bekämpfung der Varroamilbe

Ein wichtiger Teil der Untersuchung sind Erhebungen über die Behandlungsmethoden gegen die Varroamilbe und deren Auswirkung auf die Winterverluste. Abbildung 1.42 zeigt die am Fragebogen zur Auswahl gestellten Behandlungsmethoden. Dabei wird aus Gründen der internationalen Vergleichbarkeit, der von COLOSS erarbeitete Katalog von möglichen Bekämpfungsmethoden verwendet. In den nachfolgenden Unterkapiteln wird die Häufigkeit der verwendeten Methoden sowie deren möglicher Einfluss auf die Winterverlustrate betrachtet. Für die detaillierte Risikoanalyse wurden die Behandlungsmethoden in Frühling, Sommer und Winter unterteilt und Kombinationen von denen es auch genügend Datensätze gab sind verglichen. In den Kombinationen sind die Monate Jänner, Februar und März des Folgejahres nicht berücksichtigt.

<b>☉ In welchen Monaten haben Sie Befallsmessungen oder Bekämpfungen gegen die Varroa-Milbe (bei Wirtschaftsvölkern) durchgeführt oder begonnen?</b>	Bitte nennen Sie bei monatsübergreifenden Behandlungen nur den ersten Monat!											
	2019											
	April	Mai	Juni	Juli	August	September	Oktober	November	Dezember	Jänner	Februar	März
Bestimmung Varroa-Befall (Milbenfall o.ä. Methode)												
Drohnenbrutentnahme												
Hyperthermie (Hitzebehandlung)												
Andere biotechnische Methode (Fangwabe, Bannwabe, totale Arbeiterinnen-Brutentnahme etc.)												
Ameisensäure Kurzzeitbehandlung (inkl. MAQS)												
Ameisensäure Langzeitbehandlung												
Milchsäure												
Oxalsäure Träufeln (oder Sprühen)												
Oxalsäure Verdampfen												
Oxalsäuremischungen (Hiveclean/Bienenwohl/Varromed)												
Thymol (Apiguard, Apilife VAR, ThymoVar)												
Tau-fluvalinat (Apistan)												
Flumethrin (Bayvarol, Polyvar)												
Amitraz (in Streifen, Apivar, Apitraz)												
Amitraz (Verdampfen)												
Coumaphos (Perizin)												
Coumaphos (Checkmite+)												
Anderes chemisches Produkt (welches?)												
Andere Methode (welche?)												

Aufgrund des internationalen Ansatzes dieser Untersuchung finden Sie in dieser Liste auch in Österreich nicht empfohlene/zugelassene Mittel. Eine Nennung dieser stellt keine Empfehlung dar.

Abbildung 1.42: Im Fragebogen zur Auswahl stehende Behandlungsmethoden gegen die Varroamilbe.

Eine der häufigsten Methoden zur Varroabekämpfung ist die Drohnenbrutentnahme, welche im Jahr 2017/18 noch von fast 64% der ImkerInnen in zumindest einem Monat durchgeführt wurde. Die Anzahl ist im Laufe der nächsten vier Jahre auf 56% gesunken. Auch die Ameisensäure Langzeit und Kurzzeitbehandlung nahm in der Anwendungshäufigkeit bei unseren TeilnehmerInnen über die Umfragejahre ab. Die Verwendung von Thymol oder einer Milchsäure Behandlung, welche nur von wenigen ImkerInnen eingesetzt wurde, hat in der Häufigkeit ebenfalls abgenommen. Eine Zunahme ist zu beobachten bei der Oxalsäurebehandlung mittels Verdampfung von 2017/18 mit 45,3% auf 53,7% im Jahr 2020/21. Im Gegensatz dazu hat die Oxalsäurebehandlung mittels Träufeln oder Sprühen (ohne fertige Mischungen) über die Jahre abgenommen. Die Gruppe „Andere biotechnische Maßnahmen“ hat sich von 2017/18 mit 20,2% auf 22,6% im Jahr 2020/21 gesteigert. Eine Zunahme der Anwendungen, obwohl nur sehr gering, ist auch bei „Chemische Methoden“ (Pestizide gegen Milben, wie zum Beispiel Amitraz) zu erkennen (Tabelle 1.32).

Tabelle 1.32: Anzahl (Prozent) der Imkereien, welche die genannte Methode zur Bekämpfung der Varroamilbe in zumindest einem Monat angewendet haben.

Jahr	Ja [n]	Ja [%]	Nein [n]	Nein [%]	Jahr	Ja [n]	Ja [%]	Nein [n]	Nein [%]
<b>Ameisensäure - Kurzzeit</b>					<b>Hyperthermie</b>				
17/18	619	47,7	678	52,3	17/18	60	4,6	1.237	95,4
18/19	605	41,6	849	58,4	18/19	68	4,7	1.386	95,3
19/20	537	37,5	894	62,5	19/20	66	4,6	1.365	95,4
20/21	513	38,0	838	62,0	20/21	50	3,7	1.301	96,3
<b>Ameisensäure - Langzeit</b>					<b>Milchsäure</b>				
17/18	695	53,6	602	46,4	17/18	64	4,9	1.233	95,1
18/19	704	48,4	750	51,6	18/19	56	3,9	1.398	96,1
19/20	702	49,1	729	50,9	19/20	50	3,5	1.381	96,5
20/21	603	44,6	748	55,4	20/21	37	2,7	1.314	97,3
<b>Andere biot. Methode</b>					<b>Oxalsäure - Mischung</b>				
17/18	262	20,2	1.035	79,8	17/18	357	27,5	940	72,5
18/19	305	21,0	1.149	79,0	18/19	381	26,2	1.073	73,8
19/20	367	25,6	1.064	74,4	19/20	386	27,0	1.045	73,0
20/21	305	22,6	1.046	77,4	20/21	370	27,4	981	72,6
<b>Andere Methode</b>					<b>Oxalsäure - Träufeln o. Sprühen</b>				
17/18	28	2,2	1.269	97,8	17/18	521	40,2	776	59,8
18/19	26	1,8	1.428	98,2	18/19	580	39,9	874	60,1
19/20	22	1,5	1.409	98,5	19/20	513	35,8	918	64,2
20/21	26	1,9	1.325	98,1	20/21	481	35,6	870	64,4
<b>Chemische Methoden</b>					<b>Oxalsäure - Verdampfen</b>				
17/18	24	1,9	1.273	98,1	17/18	588	45,3	709	54,7
18/19	30	2,1	1.424	97,9	18/19	700	48,1	754	51,9
19/20	33	2,3	1.398	97,7	19/20	741	51,8	690	48,2
20/21	35	2,6	1.316	97,4	20/21	726	53,7	625	46,3
<b>Drohnenbrutentahme</b>					<b>Thymol</b>				
17/18	829	63,9	468	36,1	17/18	145	11,2	1.152	88,8
18/19	803	55,2	651	44,8	18/19	131	9,0	1.323	91,0
19/20	777	54,3	654	45,7	19/20	111	7,8	1.320	92,2
20/21	757	56,0	594	44,0	20/21	109	8,1	1.242	91,9

### 1.3.5.6.1 Bestimmung des Varroabefalls

Um herauszufinden, ob die Bestimmung des Varroabefalls und möglicherweise daraus resultierende Handlungen einen Einfluss auf die Wintersterblichkeit haben könnten, wurden die ImkerInnen gefragt, ob sie den Varroabefall bestimmt hatten (zum Beispiel natürlicher Milbenfall mit Stockwindel oder Diagnose mittels Staubzuckermethode) oder nicht. Der Großteil der TeilnehmerInnen, mit über 90%, bestimmt den Varroabefall (Tabelle 1.33). Dabei zeigen die Monate Juli bis August die höchste Häufigkeit, wo die meisten ImkerInnen den Befall bestimmen (Abbildung 1.44).

Ein signifikanter Unterschied zwischen ImkerInnen die keine Bestimmung durchgeführt haben und welche die zumindest in einem Monat eine Bestimmung durchgeführt haben wurde nur im Jahr 2018/19 festgestellt. Hier hatten TeilnehmerInnen die keine Befallskontrolle gemacht haben signifikant höhere Verlustraten. Hierbei sei aber der große Unterschied zwischen den Stichproben anzumerken (Abbildung 1.43 und Tabelle 1.33).

Des Weiteren wurde untersucht, ob der Zeitpunkt (Jahreszeiten Einteilung siehe Abbildung 1.44, exklusive Frühjahr Folgejahr) und die Kombination der Bestimmung des Varroabefalls einen Einfluss auf den Überwinterungserfolg hat. Die Gesamtstichprobe ist hierbei kleiner als bei der Frage ob eine Varroakontrolle durchgeführt wurde, da nicht alle TeilnehmerInnen auch die spezifischen Monate angaben. Abbildung 1.45 zeigt die Winterverlustrate der TeilnehmerInnen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten und deren Kombinationsmöglichkeiten. Innerhalb der Gruppen und auch im Vergleich zu TeilnehmerInnen die keine Kontrolle durchgeführt haben gibt es keine statistisch signifikanten Unterschiede in den meisten Jahren. Im Jahr 2018/19 wurden signifikant höhere Verlustraten für die Gruppen „Keine Kontrolle“ und Kombination „Sommer und Winter“ im Vergleich mit den niedrigeren Verlustraten der Gruppen „Nur Frühling“, „Nur Sommer“ und der Kombination „Frühling, Sommer, Winter“ festgestellt (Abbildung 1.45).

Im Umfragejahr 2020/21 wurden die Online-TeilnehmerInnen auch zur verwendeten Methode der Varroa Diagnose befragt. Zur Auswahl standen sechs Kategorien und ein offenes Textfeld für mögliche von uns nicht bedachte Methoden (Tabelle 1.34). Die mit Abstand häufigste Methode war hierbei die Befallserhebung mittels einer Bodeneinlage. Innerhalb der Methoden und auch zur kleinen Gruppe der TeilnehmerInnen die keine Kontrolle durchgeführt hat, zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied in den Verlustraten (Abbildung 1.46).

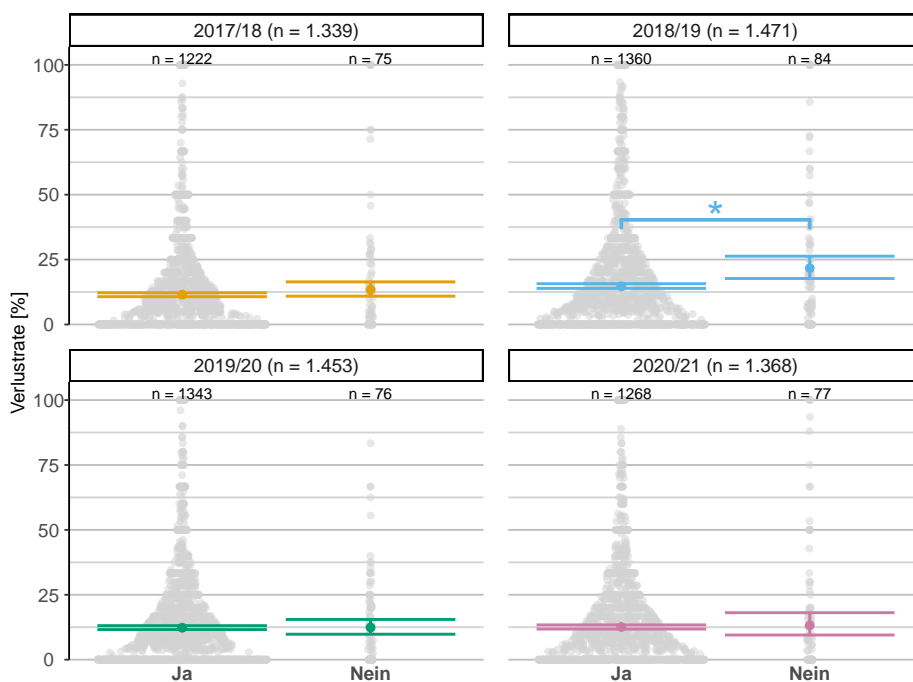


Abbildung 1.43: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit, ob eine Varroabefalls Kontrolle durchgeführt wurde oder nicht über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21. ImkerInnen die „Unsicher“ bei Varroakontrolle angegeben haben wurden aus dieser Analyse ausgenommen. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

Tabelle 1.33: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten ob eine Varroa Milben Kontrolle durchgeführt wurde oder nicht über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Ja	1.222	91,3	11,5	(10,7 - 12,2)
Nein	75	5,6	13,4	(10,9 - 16,4)
Unsicher	20	1,5	16,6	(10,4 - 25,4)
keine Angaben	22	1,6	10,2	(5,9 - 17,2)
<b>18/19</b>				
Ja	1.360	92,5	14,7	(13,9 - 15,7)
Nein	84	5,7	21,7	(17,7 - 26,3)
Unsicher	21	1,4	16,4	(10,6 - 24,6)
keine Angaben	6	0,4	25,5	(15,1 - 39,7)
<b>19/20</b>				
Ja	1.343	92,4	12,3	(11,6 - 13,1)
Nein	76	5,2	12,4	(9,8 - 15,5)
Unsicher	20	1,4	14,4	(8,0 - 24,5)
keine Angaben	14	1,0	11,6	(4,4 - 27,2)
<b>20/21</b>				
Ja	1.268	92,7	12,6	(11,8 - 13,4)
Nein	77	5,6	13,2	(9,5 - 18,1)
Unsicher	12	0,9	10,1	(3,1 - 28,4)
keine Angaben	11	0,8	11,1	(5,5 - 21,1)



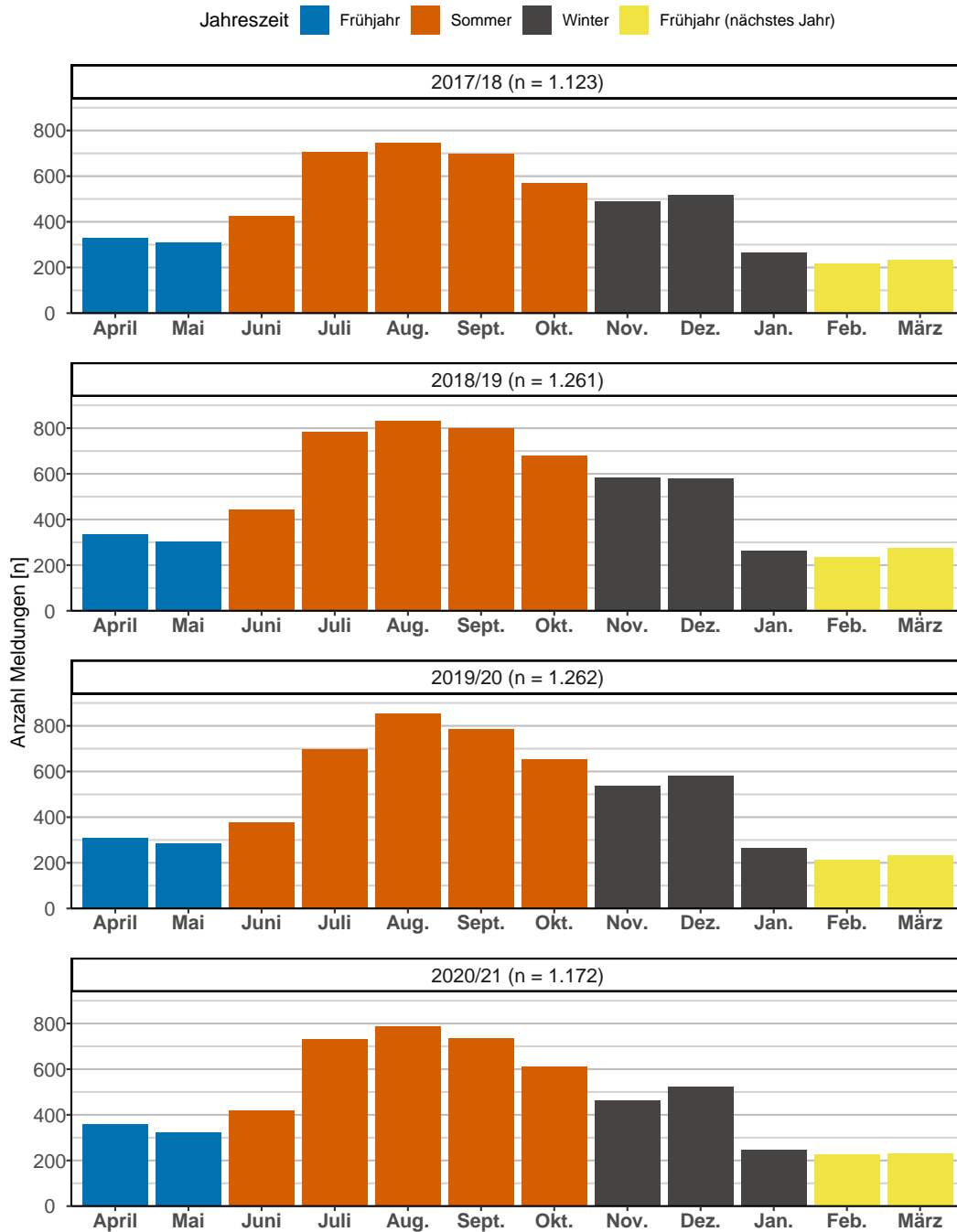


Abbildung 1.44: Häufigkeiten der Bestimmung des Varroabefalls für die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21 vom April des Einwinterungsjahres bis März des Auswinterungsjahres. April-Mai wurde als Frühjahr definiert (blau), Juni-Oktober als Sommer (rot) und November-Jänner als Herbst/Winter (schwarz), Frühjahr des Folgejahres Februar-März (gelb).

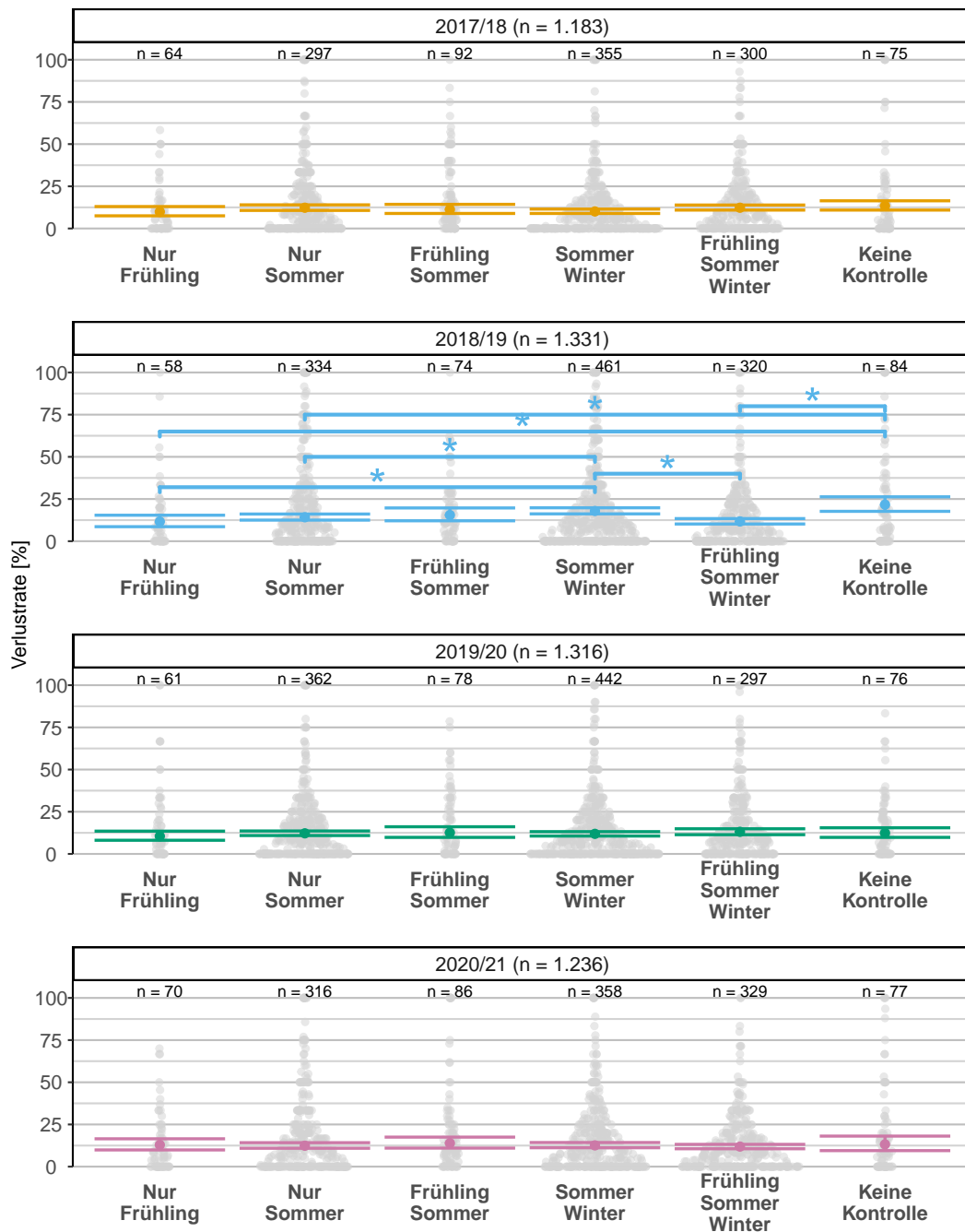


Abbildung 1.45: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Bestimmung des Varroa-Befallsgrades zu den jeweiligen Jahreszeiten über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21. Einzelne Monate zusammengefasst Frühjahr (April-Mai), Sommer (Juni-Oktober), Winter (November-Jänner), exkl. Frühjahr Folgejahr. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene. Nur Gruppen mit zumindest  $n=15$  in einem Jahr wurden ausgewertet.

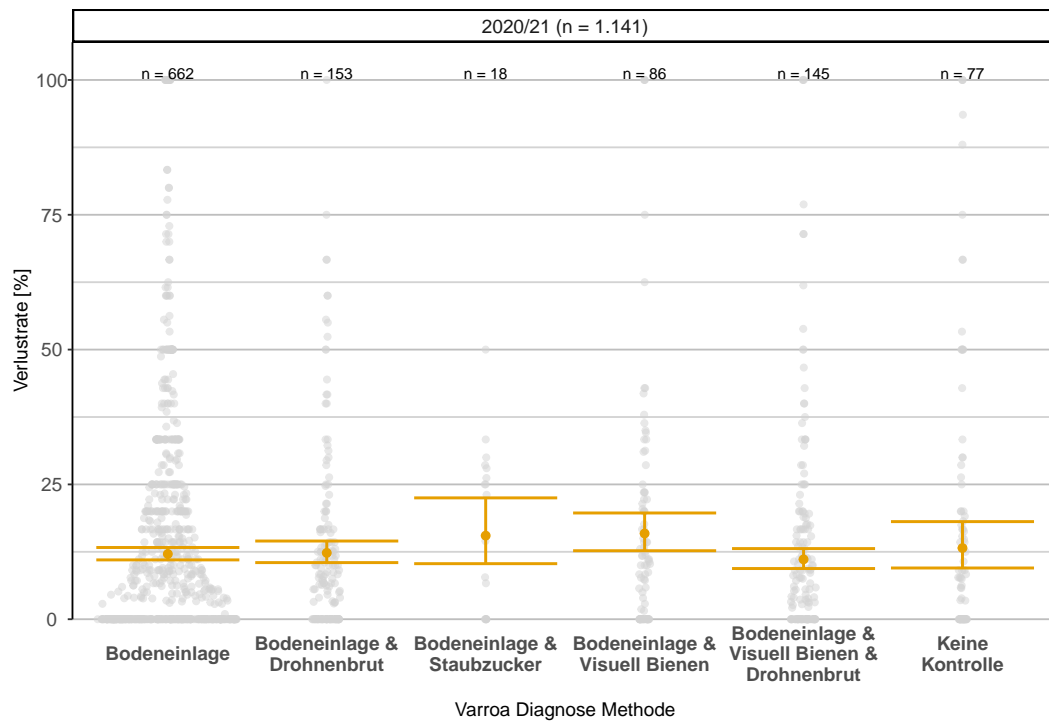


Abbildung 1.46: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der angewandten Methode zur Bestimmung des Varroa-Befallsgrades im Umfragejahr 2020/21. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Nur Kombinationen mit zumindest  $n > 10$  wurden ausgewertet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

Tabelle 1.34: Anzahl der Antworten zu den verwendeten Methoden zur Bestimmung des Varroabefalls, im Umfragejahr 2020/21. Insgesamt gaben 1.134 TeilnehmerInnen eine Antwort zu dieser Frage ab. Mehrfachantworten waren möglich.

Methode	Meldungen	Prozent
Bodeneinlage	1.109	97,8
Visuelle Inspektion Drohnenbrut	337	29,7
Visuelle Inspektion erwachsener Bienen	267	23,5
Staubzuckermethode	50	4,4
Laboranalyse eingesandter Proben	14	1,2
Sonstiges	9	0,8
Auswaschmethode	6	0,5

### 1.3.5.6.2 Ameisensäure - Kurzzeit

Die Ameisensäure Kurzzeitbehandlung wird etwas weniger häufig als die Langzeitbehandlung angewendet. Es ist ein abnehmender Trend in der Anwendungshäufigkeit über die letzten vier Jahre zu erkennen (Tabelle 1.32). Die Anwendung erfolgt hauptsächlich von Juli bis September als Hauptentmilbung nach der letzten Ernte, aber wird auch im Frühjahr und Herbst (November, Dezember) praktiziert (Abbildung 1.47). Ein signifikanter Unterschied zwischen Ameisensäure Kurzzeitbehandlung und keiner Anwendung dieser Methode konnte in keinem Jahr festgestellt werden (Abbildung 1.48, Tabelle 1.35).

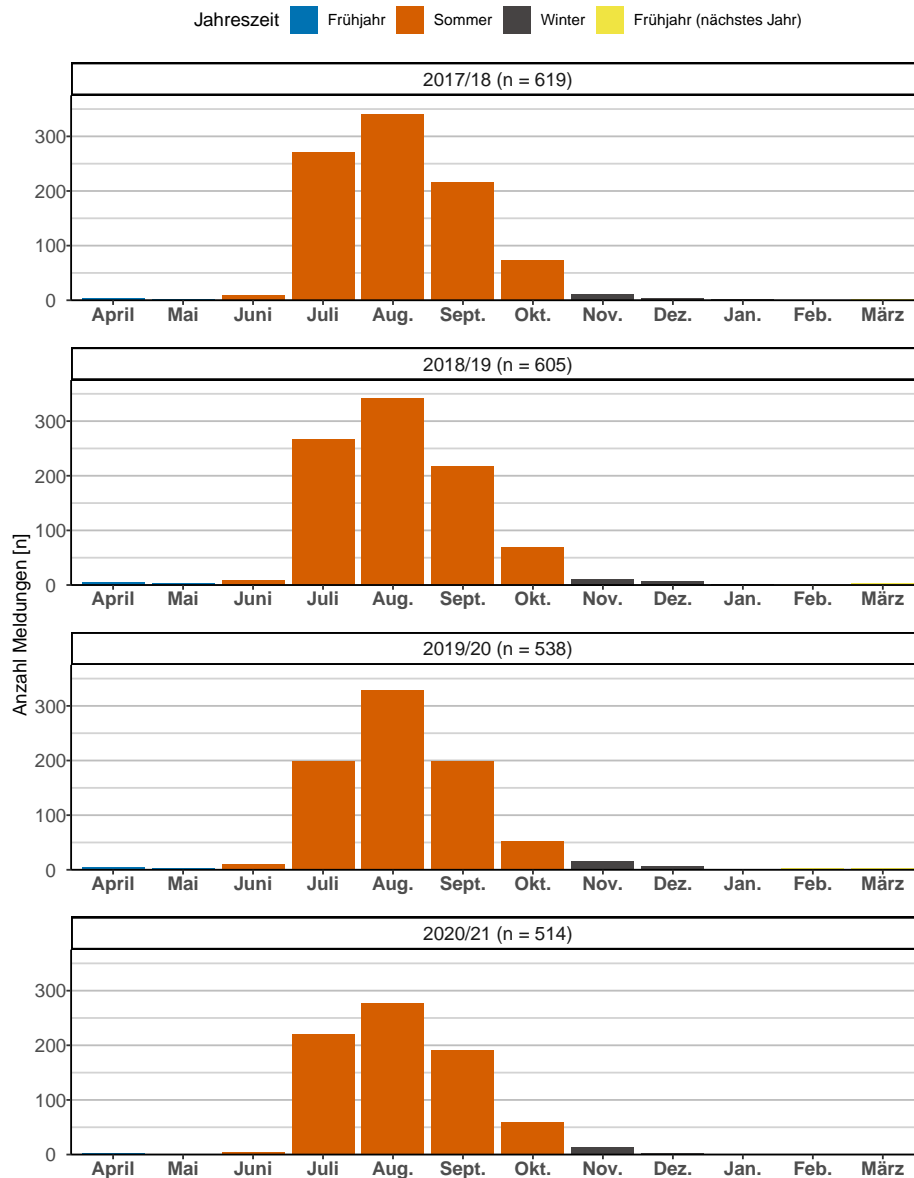


Abbildung 1.47: Häufigkeiten der Ameisensäure Kurzzeitbehandlung für die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21 vom April des Einwinterungsjahres bis März des Auswinterungsjahres. April-Mai wurde als Frühjahr definiert (blau), Juni-Oktober als Sommer (rot) und November-Jänner als Herbst/Winter (schwarz), Frühjahr des Folgejahres Februar-März (gelb).

Tabelle 1.35: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten ob und wann eine Ameisensäure - Kurzzeitbehandlung durchgeführt wurde oder nicht, über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Nur Frühling	3	0,2	6,5	(0,5 - 46,9)
Nur Sommer	602	45,0	11,7	(10,7 - 12,8)
Nur Winter	1	0,1	100,0	
Frühling Sommer	1	0,1	10,0	
Sommer Winter	11	0,8	24,0	(10,8 - 45,1)
Frühling Sommer Winter	1	0,1	0,0	
Keine AS-KZ	720	53,8	11,5	(10,6 - 12,5)
<b>18/19</b>				
Nur Frühling	3	0,2	0,0	(0,0 - 0,0)
Nur Sommer	582	39,6	15,2	(13,9 - 16,6)
Nur Winter	3	0,2	14,3	(0,0 - 99,9)
Frühling Sommer	3	0,2	11,8	(0,5 - 77,5)
Sommer Winter	13	0,9	20,0	(11,8 - 31,8)
Keine AS-KZ	868	59,0	15,4	(14,3 - 16,7)
<b>19/20</b>				
Nur Frühling	4	0,3	32,0	(6,9 - 74,8)
Nur Sommer	510	35,1	12,6	(11,5 - 13,9)
Nur Winter	4	0,3	34,6	(14,1 - 63,1)
Frühling Sommer	3	0,2	28,6	(19,9 - 39,2)
Sommer Winter	16	1,1	22,1	(12,6 - 35,8)
Frühling Sommer Winter	1	0,1	0,0	
Keine AS-KZ	916	63,0	12,0	(11,1 - 13,0)
<b>20/21</b>				
Nur Frühling	2	0,1	16,7	(0,0 - 100,0)
Nur Sommer	497	36,3	13,2	(12,0 - 14,5)
Sommer Winter	14	1,0	18,3	(7,8 - 37,3)
Frühling Sommer Winter	1	0,1	0,0	
Keine AS-KZ	854	62,4	12,2	(11,3 - 13,2)

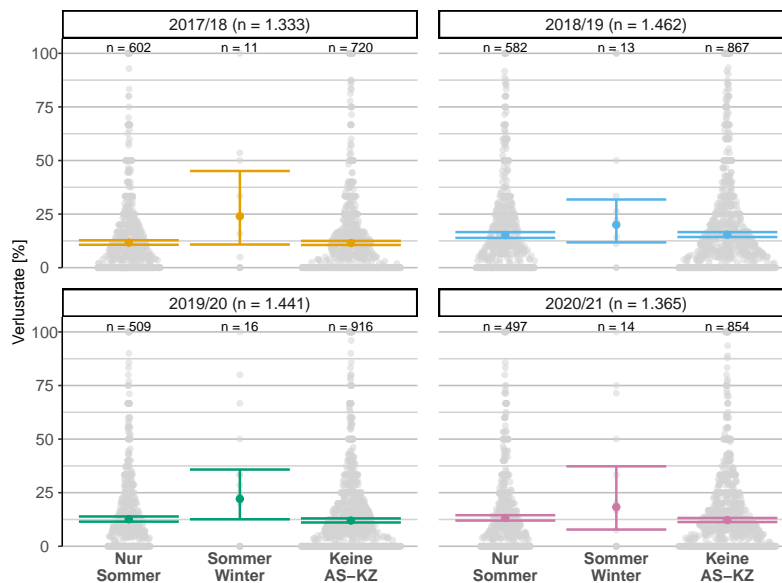


Abbildung 1.48: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Ameisensäure Kurzzeitbehandlung“ und Zeitpunkt der Durchführung. Einzelne Monate zusammengefasst Frühjahr (April-Mai), Sommer (Juni-Oktober), Winter (November-Jänner), exklusive Frühjahr Folgejahr. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene. Nur Gruppen mit zumindest einer Stichprobengröße von n=15 in einem Jahr wurden ausgewertet.

### 1.3.5.6.3 Ameisensäure - Langzeit

Die Ameisensäure als Langzeitbehandlung wird zur Bekämpfung der Varroa Milbe in Österreich häufig eingesetzt aber zeigt einen leichten Trend abwärts über die letzten vier Umfragejahre (Tabelle 1.32). Die Anwendung erfolgt hauptsächlich von Juli bis September als Hauptentmilbung nach der letzten Ernte (Abbildung 1.49). Ein signifikanter Unterschied zwischen einer Anwendung im Sommer und keiner Anwendung konnte in keinem Jahr festgestellt werden (Abbildung 1.50, Tabelle 1.36).

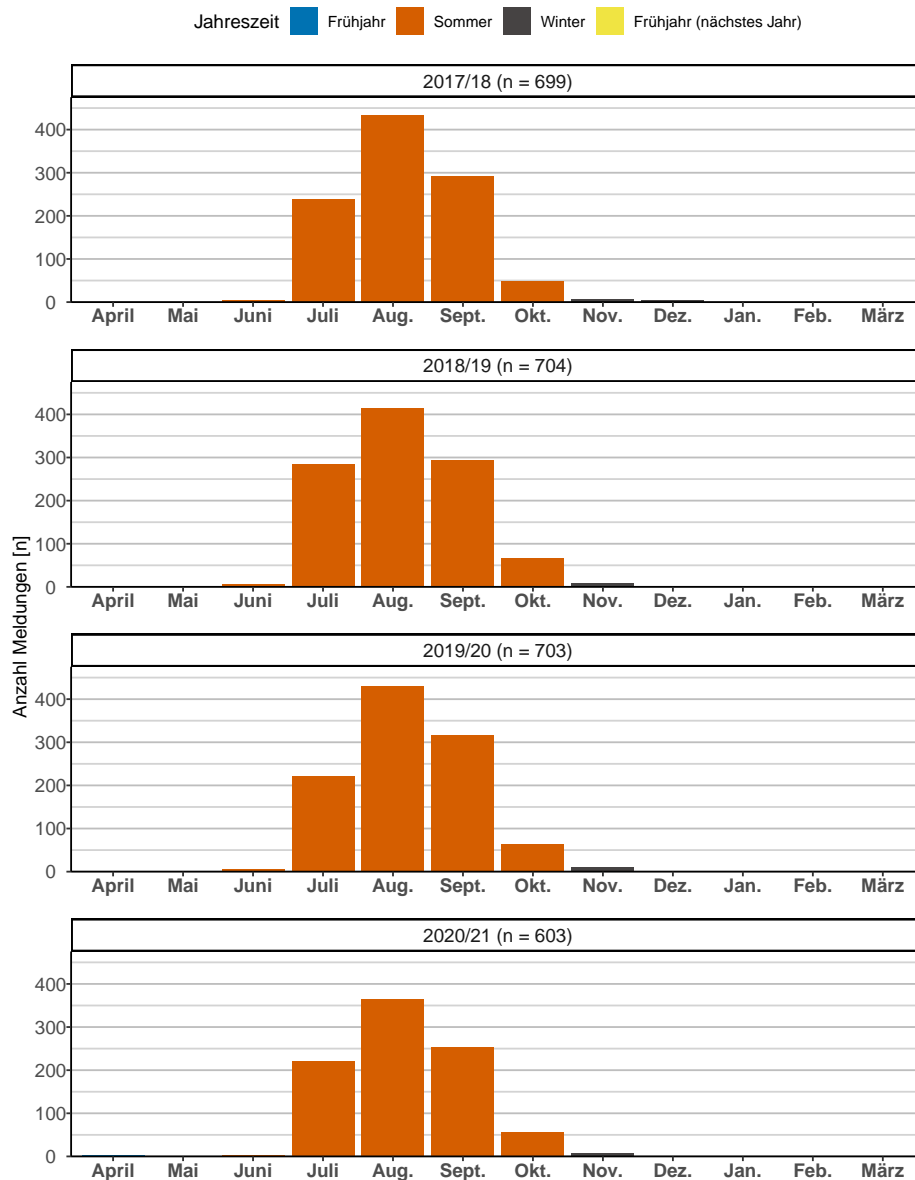


Abbildung 1.49: Häufigkeiten der Ameisensäure Langzeitbehandlung für die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21 vom April des Einwinterungsjahres bis März des Auswinterungsjahres. April-Mai wurde als Frühjah definiert (blau), Juni-Oktober als Sommer (rot) und November-Jänner als Herbst/Winter (schwarz), Frühjah des Folgejahres Februar-März (gelb).

Tabelle 1.36: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten ob und wann eine Ameisensäure - Langzeitbehandlung durchgeführt wurde oder nicht über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Nur Sommer	689	51,5	11,1	(10,2 - 12,1)
Nur Winter	4	0,3	14,3	(0,3 - 89,0)
Sommer Winter	6	0,4	19,5	(8,6 - 38,4)
Keine AS-LZ	640	47,8	12,2	(11,2 - 13,3)
<b>18/19</b>				
Nur Frühling	1	0,1	40,0	
Nur Sommer	693	47,1	13,9	(12,8 - 15,1)
Sommer Winter	10	0,7	30,3	(19,4 - 43,9)
Keine AS-LZ	767	52,1	16,1	(14,8 - 17,4)
<b>19/20</b>				
Nur Sommer	689	47,4	11,2	(10,3 - 12,1)
Nur Winter	3	0,2	31,0	(1,2 - 94,1)
Sommer Winter	11	0,8	34,8	(17,4 - 57,4)
Keine AS-LZ	751	51,7	13,1	(12,1 - 14,2)
<b>20/21</b>				
Nur Frühling	2	0,1	18,2	(0,0 - 100,0)
Nur Sommer	593	43,3	11,6	(10,6 - 12,7)
Frühling Sommer	1	0,1	100,0	
Sommer Winter	7	0,5	30,4	(9,7 - 63,9)
Keine AS-LZ	765	55,9	13,3	(12,3 - 14,5)

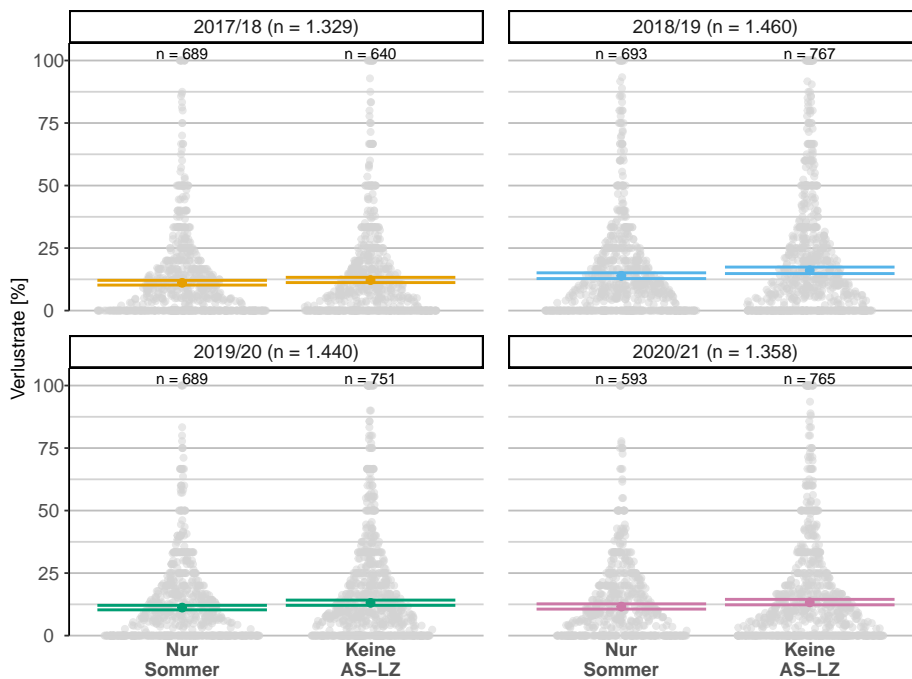


Abbildung 1.50: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Ameisensäure Langzeitbehandlung“ und Zeitpunkt der Durchführung. Einzelne Monate zusammengefasst Frühjahr (April-Mai), Sommer (Juni-Oktober), Winter (November-Jänner), exkl. Frühjahr Folgejahr. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene. Nur Gruppen mit zumindest einer Stichprobengröße von  $n=15$  in einem Jahr wurden ausgewertet.

### 1.3.5.6.4 Andere biotechnische Methoden

„Andere biotechnische Methoden“ sind exklusive Drohnenbrutentnahme und Wärmebehandlung (Hyperthermie). Diese Methoden finden über die Umfragejahre eine leichte Zunahme an TeilnehmerInnen, im Jahr 2017/18 mit 20,2% und im Jahr 2020/21 mit 22,6% (Tabelle 1.32). Die Methode wird von den ImkerInnen hauptsächlich im Sommer und vermehrt auch im Frühjahr eingesetzt (Abbildung 1.51). Im Untersuchungsjahr 2018/19 wurde eine signifikant niedrigere Verlustrate für TeilnehmerInnen die diese Methode im Sommer eingesetzt haben im Vergleich zu Personen die keine „Andere biotechnische Methode“ verwendet haben festgestellt. In den anderen Umfragejahre wurde kein signifikanter Unterschied beobachtet (Abbildung 1.52).

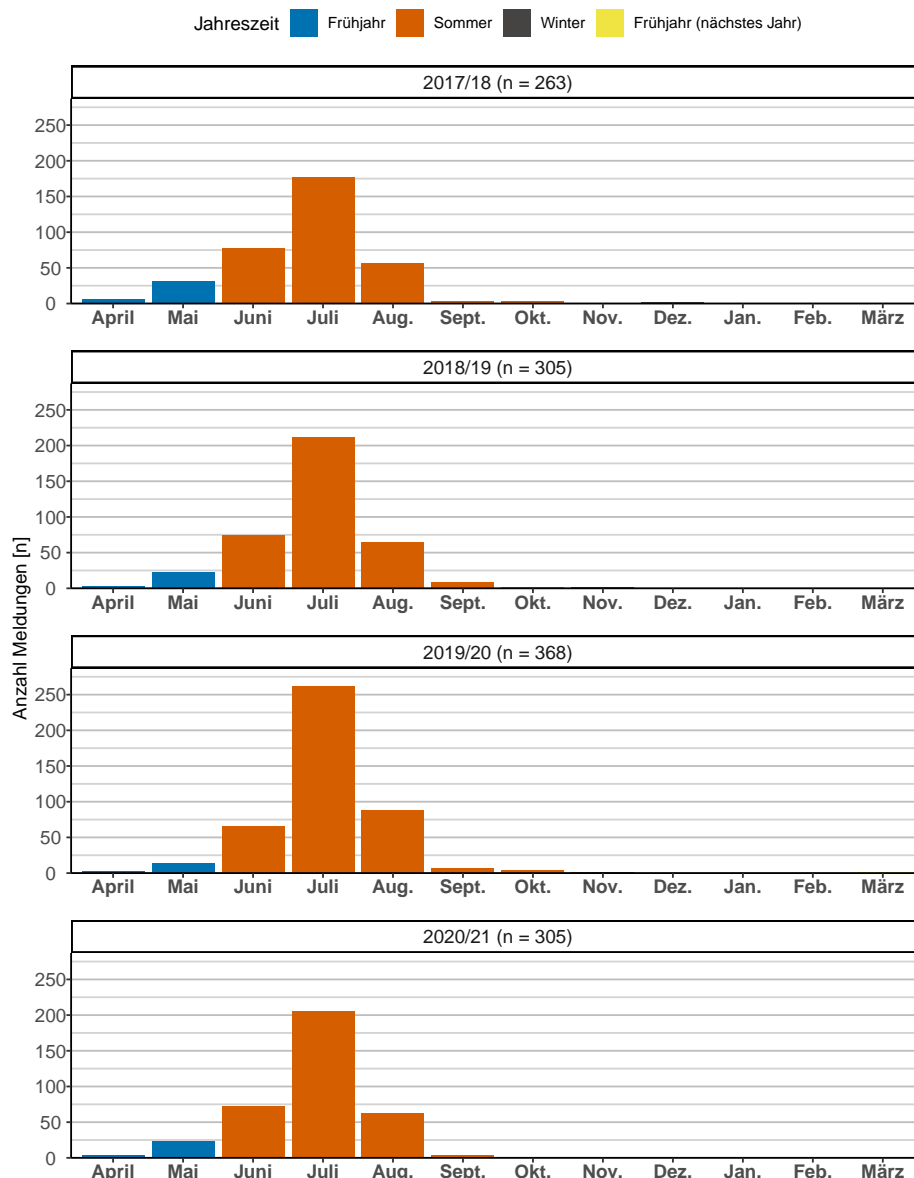


Abbildung 1.51: Häufigkeiten der Behandlungsmethode „andere biotechnische Methode“ für die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21 vom April des Einwinterungsjahres bis März des Auswinterungsjahres. April-Mai wurde als Frühjah definiert (blau), Juni-Oktober als Sommer (rot) und November-Jänner als Herbst/Winter (schwarz), Frühjah des Folgejahres Februar-März (gelb).



Tabelle 1.37: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten ob und wann eine „Andere biotechnische Methode“ durchgeführt wurde oder nicht über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Nur Frühling	10	0,7	7,9	(3,9 - 15,2)
Nur Sommer	226	16,9	11,4	(10,0 - 12,9)
Nur Winter	2	0,1	5,5	(0,0 - 100,0)
Frühling Sommer	24	1,8	10,8	(7,7 - 15,1)
Sommer Winter	1	0,1	15,0	
Keine Biot.	1.076	80,4	11,9	(11,1 - 12,8)
<b>18/19</b>				
Nur Frühling	10	0,7	9,9	(4,9 - 18,9)
Nur Sommer	282	19,2	12,6	(11,0 - 14,3)
Frühling Sommer	12	0,8	22,4	(10,9 - 40,5)
Sommer Winter	1	0,1	7,5	
Keine Biot.	1.166	79,3	16,3	(15,3 - 17,4)
<b>19/20</b>				
Nur Frühling	8	0,6	15,4	(7,1 - 30,1)
Nur Sommer	351	24,2	11,3	(10,1 - 12,5)
Frühling Sommer	7	0,5	8,7	(3,4 - 20,6)
Sommer Winter	1	0,1	2,6	
Keine Biot.	1.086	74,7	13,0	(12,2 - 14,0)
<b>20/21</b>				
Nur Frühling	8	0,6	11,8	(5,2 - 24,9)
Nur Sommer	280	20,5	11,4	(10,2 - 12,9)
Frühling Sommer	16	1,2	15,4	(10,5 - 22,1)
Keine Biot.	1.064	77,8	13,0	(12,1 - 14,0)

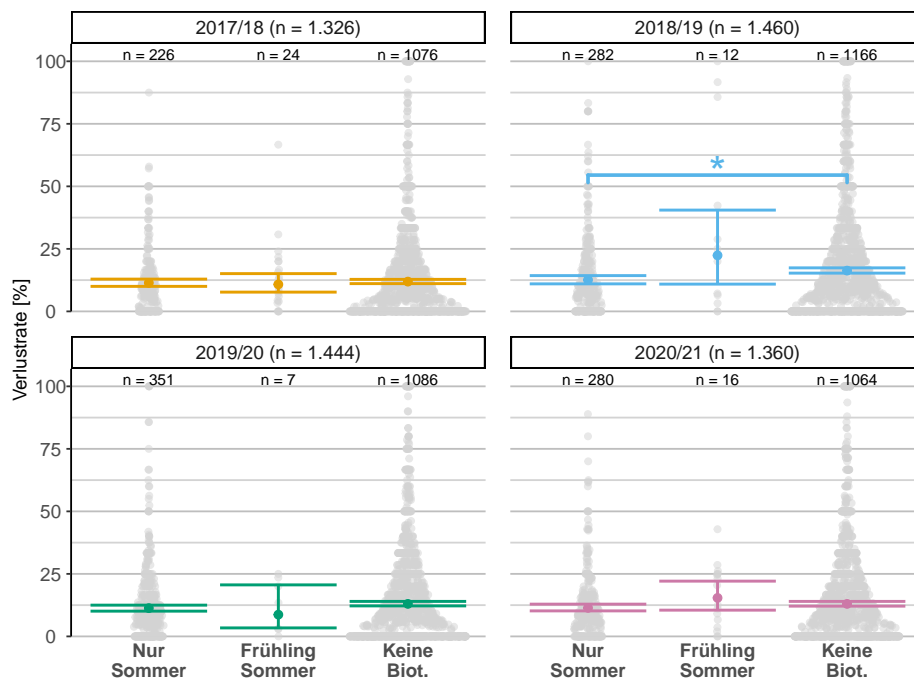


Abbildung 1.52: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „andere biotechnische Methode“ und Zeitpunkt der Durchführung. Einzelne Monate zusammengefasst Frühjahr (April-Mai), Sommer (Juni-Oktober), Winter (November-Jänner), exkl. Frühjahr Folgejahr. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene. Nur Gruppen mit zumindest einer Stichprobengröße von  $n=15$  in einem Jahr wurden ausgewertet.

### 1.3.5.6.5 Synthetisch Chemische Methode

Synthetisch chemische Akarizide (Pestizide gegen Milben) wie zum Beispiel Amitraz (Verdampfen und in Streifen, Apivar, Apitraz), Coumaphos (Checkmite+, Perizin), Flumethrin (Bayvarol), Tau-fluvalinat (Apistan) oder andere chemische Produkte, wurden wegen der Vielzahl an Produkten und geringen Stichprobengröße in „Chemische Methode“ zusammengefasst. Bei dieser Methode ist eine geringe Zunahme über die Umfragejahre zu erkennen von 2017/18 mit 1,9% auf 2,5% in 2020/21 (Tabelle 1.32). Die Anwendung findet hauptsächlich im Sommer statt (Abbildung 1.53). Im Jahr 2018/19 und 2020/21 wurde eine signifikante geringere Verlustrate festgestellt, im Vergleich zu TeilnehmerInnen ohne Einsatz von diesen Produkten (Abbildung 1.54).

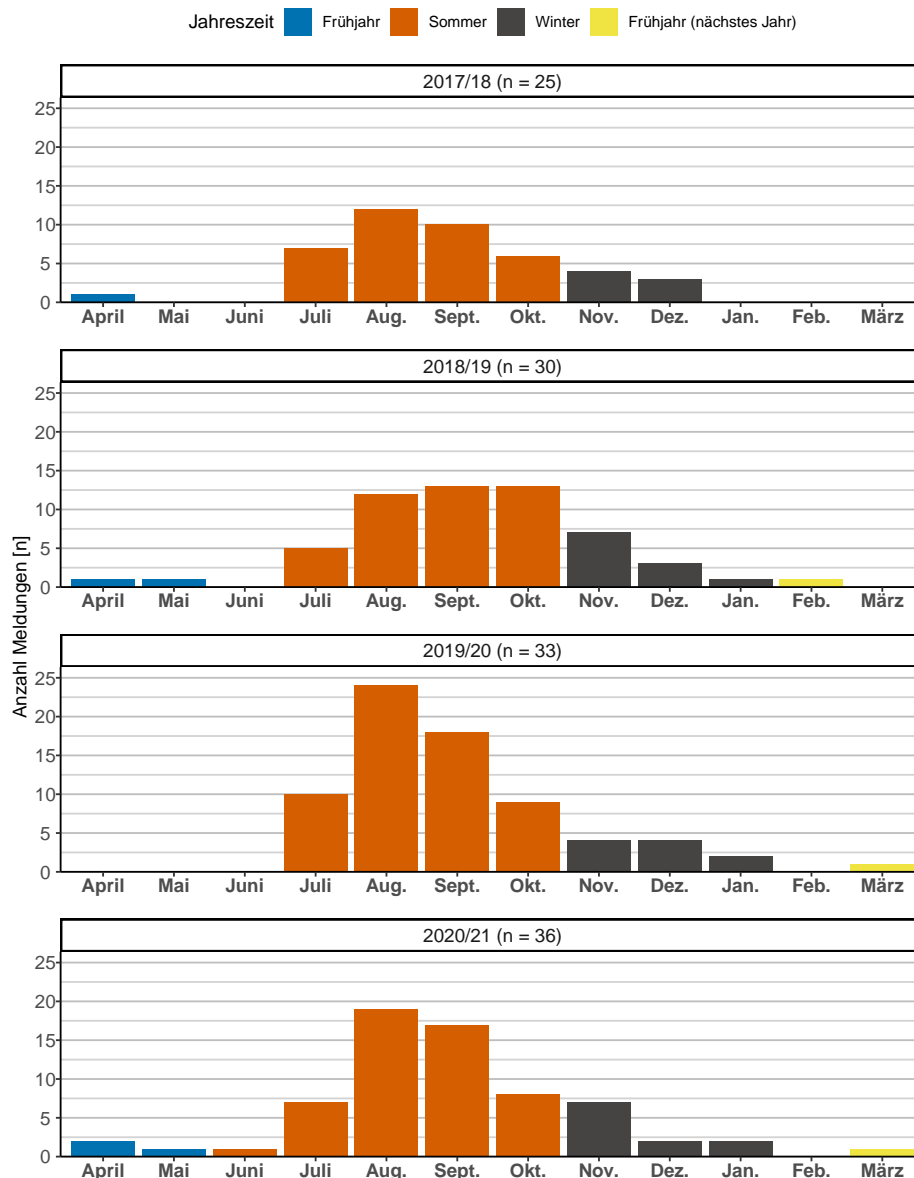


Abbildung 1.53: Häufigkeiten der Behandlungsmethode „Chemische Methode“ (Amitraz (Verdampfen und in Streifen, Apivar, Apitraz), Coumaphos (Checkmite+, Perizin), Flumethrin (Bayvarol), Tau-fluvalinat (Apistan) oder andere chemische Produkte) für die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21 vom April des Einwinterungsjahres bis März des Auswinterungsjahres. April-Mai wurde als Frühjahr definiert (blau), Juni-Oktober als Sommer (rot) und November-Jänner als Herbst/Winter (schwarz), Frühjahr des Folgejahres Februar-März (gelb).

Tabelle 1.38: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten ob und wann eine „Chemische Methode“ durchgeführt wurde oder nicht über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Nur Frühling	1	0,1	26,3	
Nur Sommer	18	1,3	10,1	(5,3 - 18,3)
Nur Winter	2	0,1	19,4	(7,6 - 41,2)
Sommer Winter	4	0,3	7,9	(2,5 - 21,9)
Keine chem. Meth.	1.314	98,1	11,7	(11,0 - 12,4)
<b>18/19</b>				
Nur Frühling	2	0,1	8,3	(0,0 - 99,6)
Nur Sommer	19	1,3	6,3	(3,0 - 12,7)
Nur Winter	3	0,2	14,6	(3,9 - 41,7)
Sommer Winter	8	0,6	4,1	(2,2 - 7,5)
Keine chem. Meth.	1.441	98,0	15,4	(14,5 - 16,3)
<b>19/20</b>				
Nur Sommer	24	1,7	12,4	(6,3 - 22,9)
Nur Winter	1	0,1	8,3	
Sommer Winter	7	0,5	4,2	(2,1 - 8,0)
Keine chem. Meth.	1.421	97,8	12,4	(11,7 - 13,2)
<b>20/21</b>				
Nur Frühling	2	0,1	4,8	(0,0 - 100,0)
Nur Sommer	24	1,8	6,9	(5,2 - 9,1)
Nur Winter	4	0,3	28,1	(5,4 - 72,9)
Frühling Sommer	1	0,1	88,0	
Sommer Winter	7	0,5	8,9	(1,8 - 34,9)
Keine chem. Meth.	1.332	97,4	12,7	(11,9 - 13,5)

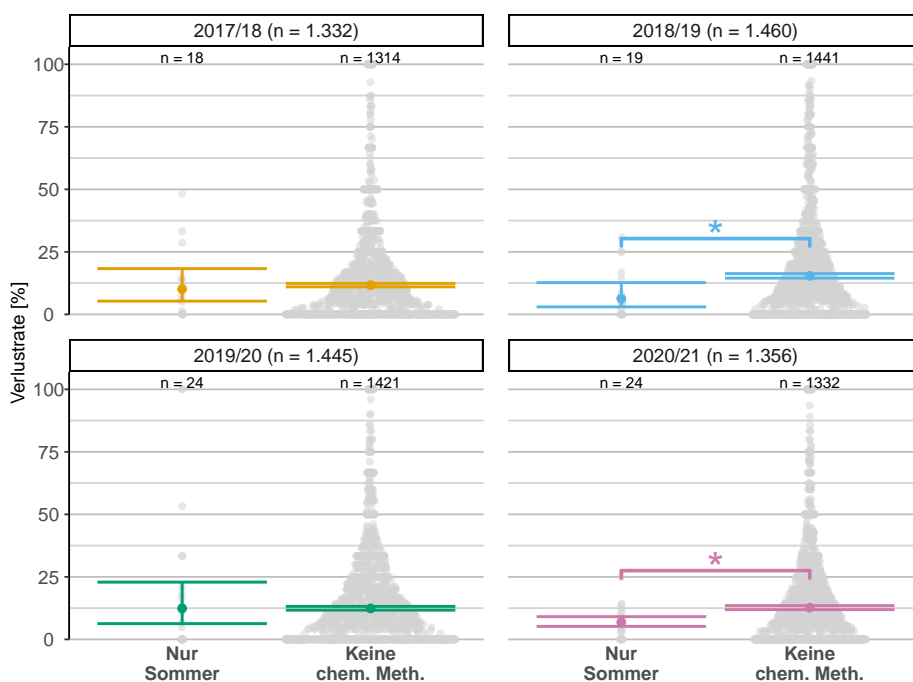


Abbildung 1.54: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Chemische Methode“ und Zeitpunkt der Durchführung. Einzelne Monate zusammengefasst Frühjahr (April-Mai), Sommer (Juni-Oktober), Winter (November-Jänner), exkl. Frühjahr Folgejahr. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene. Nur Gruppen mit zumindest einer Stichprobengröße von  $n=15$  in einem Jahr wurden ausgewertet.

### 1.3.5.6.6 Drogenbrutentnahme

Eine der am häufigsten angewandten Methoden zur Verringerung des Varroabefalls ist die Drogenbrutentnahme. Von den teilnehmenden Imkereien haben über 54% diese Methode in zumindest einem Monat angewandt (Tabelle 1.32). Am häufigsten wird die Entnahme der Drogenbrut in den Monaten Mai und Juni durchgeführt (Abbildung 1.55). Die Anzahl der TeilnehmerInnen die eine Drogenbrutentnahme durchführen war im ersten Umfragejahr 2017/18 noch um etwa 10% höher als in den folgenden (Tabelle 1.32). Statistisch signifikant höhere Verlustraten wurden in drei von vier Umfragejahren für TeilnehmerInnen festgestellt die diese Methode „Nur im Sommer“ durchgeführt haben im Vergleich zur Kombination „Frühling und Sommer“ (Abbildung 1.56). Zur Gruppe die keine Drogenbrutentnahme praktiziert hat, wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. Die Kombination der Drogenbrutentnahme im „Frühling und Sommer“ wurde von den meisten TeilnehmerInnen durchgeführt (Abbildung 1.56).

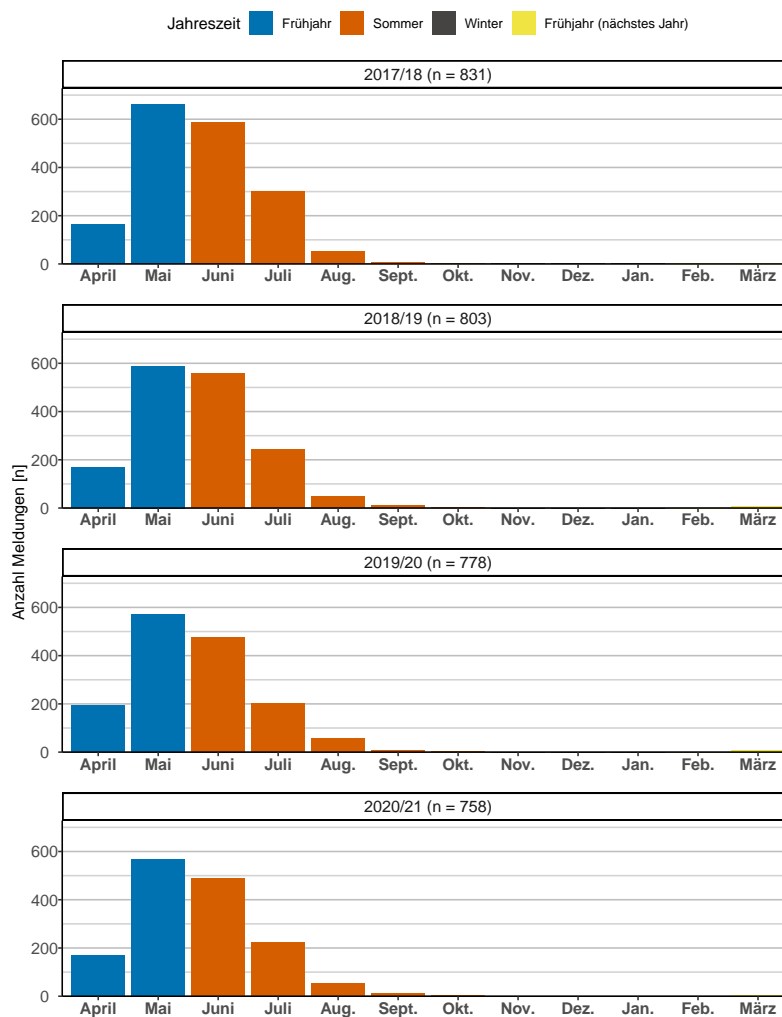


Abbildung 1.55: Häufigkeiten der Drogenbrutentnahme für die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21 vom April des Einwinterungsjahres bis März des Auswinterungsjahres. April-Mai wurde als Frühjah definiert (blau), Juni-Oktober als Sommer (rot) und November-Jänner als Herbst/Winter (schwarz), Frühjah des Folgejahres Februar-März (gelb).

Tabelle 1.39: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten ob und wann eine Drohnenbrutentnahme durchgeführt wurde oder nicht über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Nur Frühling	209	15,6	11,7	(10,1 - 13,6)
Nur Sommer	140	10,5	15,0	(12,3 - 18,2)
Frühling Sommer	478	35,7	11,0	(10,0 - 12,1)
Sommer Winter	1	0,1	0,0	
Keine Drohnenb.	511	38,2	11,6	(10,5 - 12,8)
<b>18/19</b>				
Nur Frühling	211	14,3	15,6	(13,6 - 17,9)
Nur Sommer	185	12,6	17,6	(15,3 - 20,3)
Frühling Sommer	406	27,6	13,3	(11,8 - 15,0)
Keine Drohnenb.	669	45,5	16,0	(14,7 - 17,4)
<b>19/20</b>				
Nur Frühling	254	17,5	11,4	(9,9 - 13,1)
Nur Sommer	163	11,2	15,2	(12,8 - 18,0)
Frühling Sommer	358	24,6	11,3	(10,1 - 12,7)
Keine Drohnenb.	678	46,7	12,8	(11,7 - 13,9)
<b>20/21</b>				
Nur Frühling	230	16,8	11,8	(10,3 - 13,4)
Nur Sommer	152	11,1	11,3	(9,4 - 13,5)
Frühling Sommer	373	27,3	12,2	(10,9 - 13,7)
Frühling Sommer Winter	1	0,1	20,0	
Keine Drohnenb.	612	44,7	13,4	(12,2 - 14,7)

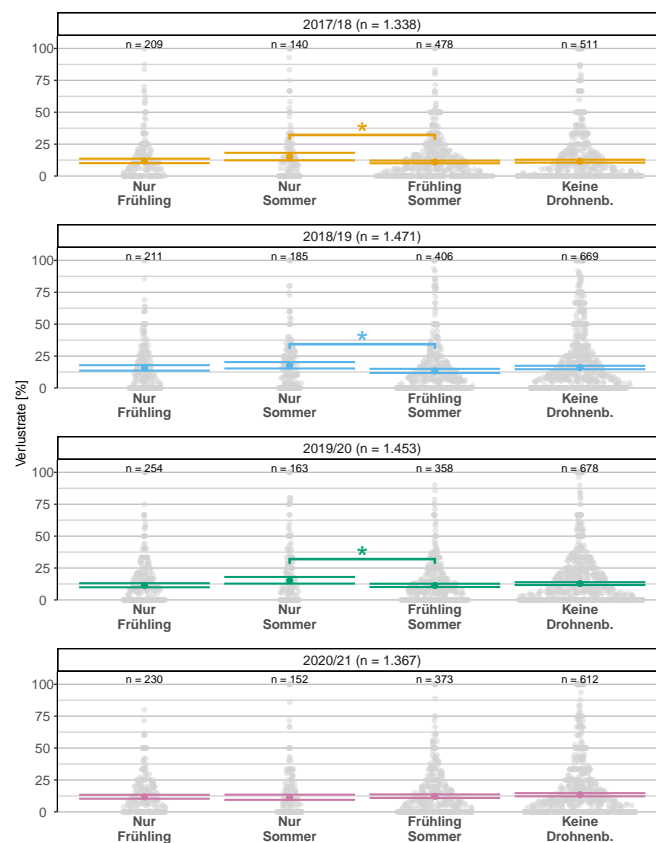


Abbildung 1.56: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Drohnenbrutentnahme“ und Zeitpunkt der Durchführung. Einzelne Monate zusammengefasst Frühjahr (April-Mai), Sommer (Juni-Oktober), Winter (November-Jänner), exkl. Frühjahr Folgejahr. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene. Nur Gruppen mit zumindest einer Stichprobengröße von  $n=15$  in einem Jahr wurden ausgewertet.

### 1.3.5.6.7 Hyperthermie

Die Hyperthermie (Wärmebehandlung) wird von circa 3,7 bis 4,6% der TeilnehmerInnen praktiziert (Tabelle 1.32). Die Methode wird vor allem im Frühjahr und Sommer angewandt (Abbildung 1.57). Ein signifikanter Unterschied in den Verlustraten zwischen unterschiedlicher Anwendung und auch im Vergleich zu TeilnehmerInnen die keine Hyperthermie durchführen konnte in keinem Jahr festgestellt werden (Abbildung 1.58).

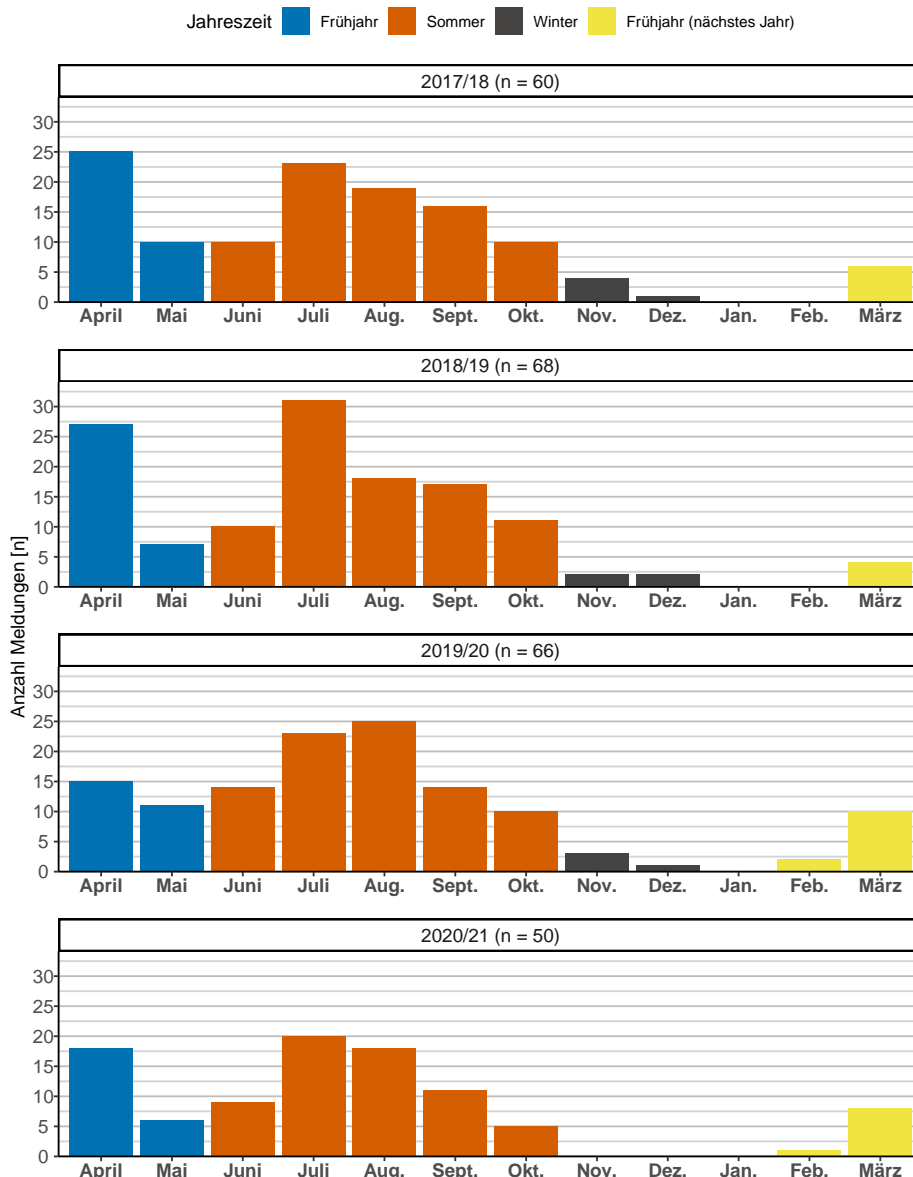


Abbildung 1.57: Häufigkeiten der Behandlung mittels Hyperthermie für die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21 vom April des Einwinterungsjahres bis März des Auswinterungsjahres. April-Mai wurde als Frühjahrs definiert (blau), Juni-Oktober als Sommer (rot) und November-Jänner als Herbst/Winter (schwarz), Frühjahrs des Folgejahres Februar-März (gelb).

Tabelle 1.40: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten ob und wann eine Hyperthermie durchgeführt wurde oder nicht über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Nur Frühling	8	0,6	10,2	(2,9 - 29,8)
Nur Sommer	24	1,8	8,9	(5,0 - 15,3)
Frühling Sommer	21	1,6	7,4	(3,7 - 14,1)
Frühling Winter	1	0,1	57,1	
Frühling Sommer Winter	3	0,2	22,2	(0,6 - 92,8)
Keine Hyp.	1.282	95,7	11,8	(11,1 - 12,5)
<b>18/19</b>				
Nur Frühling	7	0,5	8,4	(1,6 - 34,4)
Nur Sommer	33	2,2	11,4	(6,9 - 18,3)
Nur Winter	1	0,1	25,0	
Frühling Sommer	24	1,6	13,0	(7,2 - 22,5)
Frühling Sommer Winter	3	0,2	46,2	(1,1 - 98,5)
Keine Hyp.	1.403	95,4	15,4	(14,6 - 16,4)
<b>19/20</b>				
Nur Frühling	5	0,3	3,3	(0,6 - 15,2)
Nur Sommer	37	2,5	10,0	(5,9 - 16,5)
Frühling Sommer	16	1,1	13,1	(8,1 - 20,7)
Sommer Winter	2	0,1	17,4	(0,0 - 100,0)
Frühling Sommer Winter	2	0,1	41,7	(0,0 - 100,0)
Keine Hyp.	1.391	95,7	12,4	(11,7 - 13,2)
<b>20/21</b>				
Nur Frühling	6	0,4	15,4	(6,4 - 32,5)
Nur Sommer	25	1,8	13,9	(10,4 - 18,4)
Frühling Sommer	18	1,3	10,2	(6,6 - 15,4)
Keine Hyp.	1.319	96,4	12,6	(11,9 - 13,4)

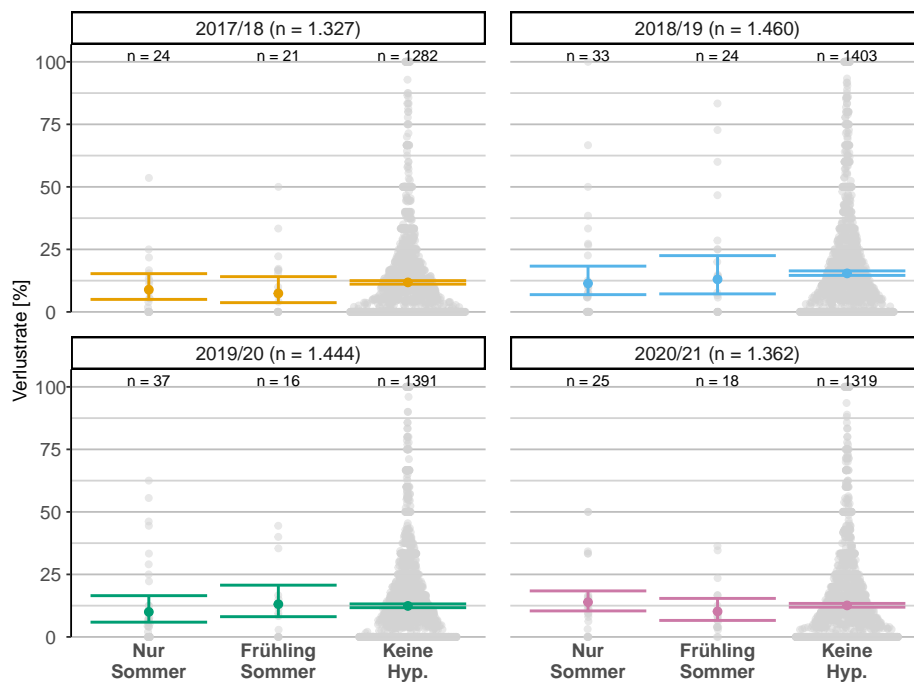


Abbildung 1.58: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Hyperthermie“ und Zeitpunkt der Durchführung. Einzelne Monate zusammengefasst Frühjahr (April-Mai), Sommer (Juni-Oktober), Winter (November-Jänner), exkl. Frühjahr Folgejahr. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene. Nur Gruppen mit zumindest einer Stichprobengröße von  $n=15$  in einem Jahr wurden ausgewertet.

### 1.3.5.6.8 Milchsäure

Eine Behandlung mittels Milchsäure wurde im Untersuchungsjahr 2020/21 nur mehr von 2,7% der TeilnehmerInnen zur Bekämpfung der Varroa Milbe verwendet (Tabelle 1.32). Die Häufigkeit der Anwendung verteilt sich über die ganze Saison (Abbildung 1.59). Im Jahr 2017/18 konnte ein signifikant höhere Verlustrate bei Anwendung der Milchsäure im Sommer im Vergleich zu keiner Anwendung festgestellt werden (Abbildung 1.60).

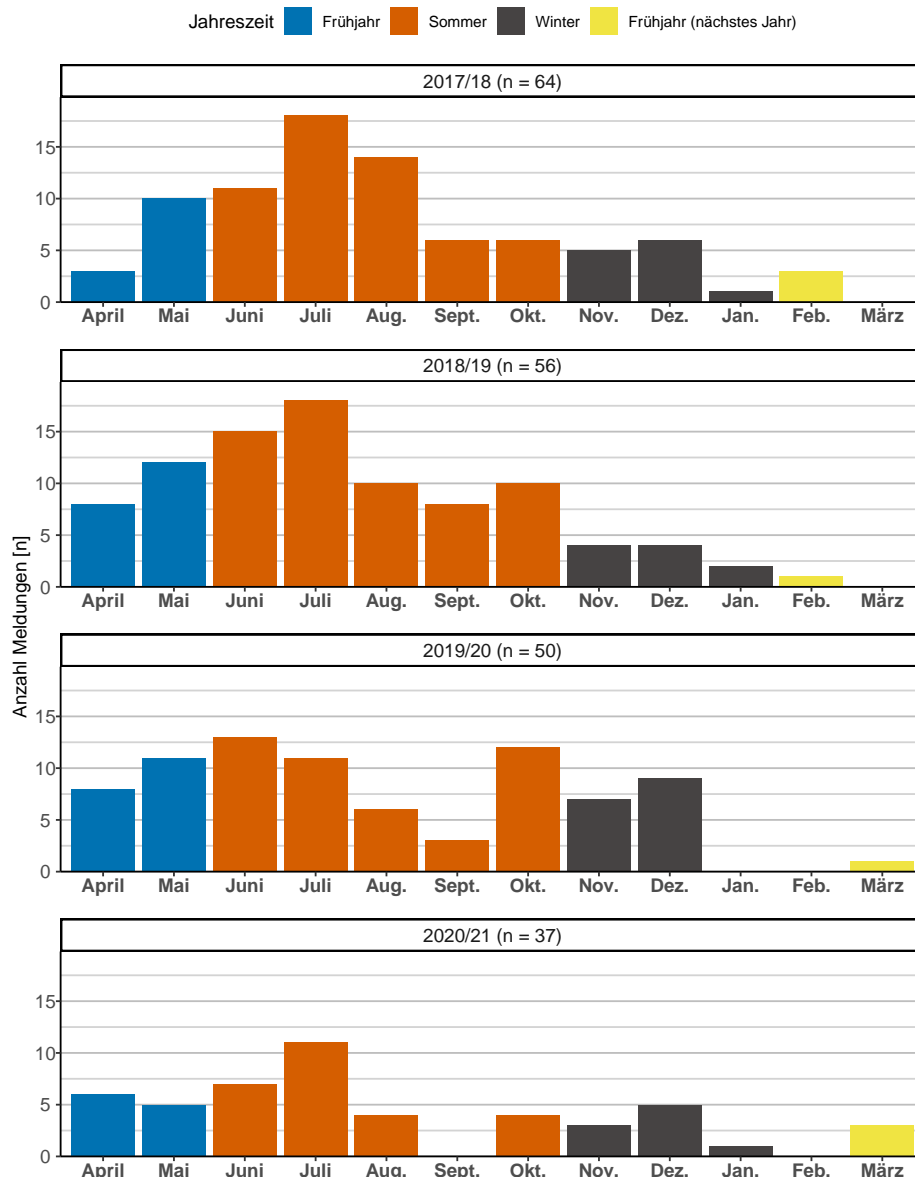


Abbildung 1.59: Häufigkeiten der Behandlung mittels Milchsäure für die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21 vom April des Einwinterungsjahres bis März des Auswinterungsjahres. April-Mai wurde als Frühjah definiert (blau), Juni-Oktober als Sommer (rot) und November-Jänner als Herbst/Winter (schwarz), Frühjah des Folgejahres Februar-März (gelb).



Tabelle 1.41: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten ob und wann eine Milchsäurebehandlung durchgeführt wurde oder nicht über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Nur Frühling	9	0,7	22,1	(9,5 - 43,3)
Nur Sommer	37	2,8	20,1	(14,2 - 27,7)
Nur Winter	10	0,7	16,9	(6,8 - 36,3)
Frühling Sommer	4	0,3	3,4	(1,2 - 9,6)
Sommer Winter	2	0,1	4,0	(0,0 - 96,9)
Keine Milchs.	1.278	95,4	11,4	(10,7 - 12,1)
<b>18/19</b>				
Nur Frühling	10	0,7	7,1	(3,8 - 13,0)
Nur Sommer	30	2,0	15,2	(9,8 - 23,0)
Nur Winter	6	0,4	12,5	(1,5 - 58,1)
Frühling Sommer	7	0,5	7,2	(2,7 - 18,0)
Sommer Winter	4	0,3	4,8	(2,3 - 9,5)
Keine Milchs.	1.416	96,3	15,5	(14,6 - 16,4)
<b>19/20</b>				
Nur Frühling	8	0,6	6,1	(2,5 - 14,0)
Nur Sommer	17	1,2	13,9	(7,7 - 23,9)
Nur Winter	11	0,8	16,2	(8,6 - 28,4)
Frühling Sommer	10	0,7	10,7	(3,5 - 28,4)
Sommer Winter	4	0,3	35,2	(15,2 - 62,1)
Keine Milchs.	1.403	96,6	12,3	(11,6 - 13,1)
<b>20/21</b>				
Nur Frühling	7	0,5	15,0	(4,0 - 42,7)
Nur Sommer	16	1,2	11,0	(4,1 - 26,2)
Nur Winter	8	0,6	16,7	(4,4 - 46,4)
Frühling Sommer	4	0,3	2,4	(0,0 - 88,5)
Sommer Winter	1	0,1	6,3	
Keine Milchs.	1.333	97,4	12,6	(11,9 - 13,4)

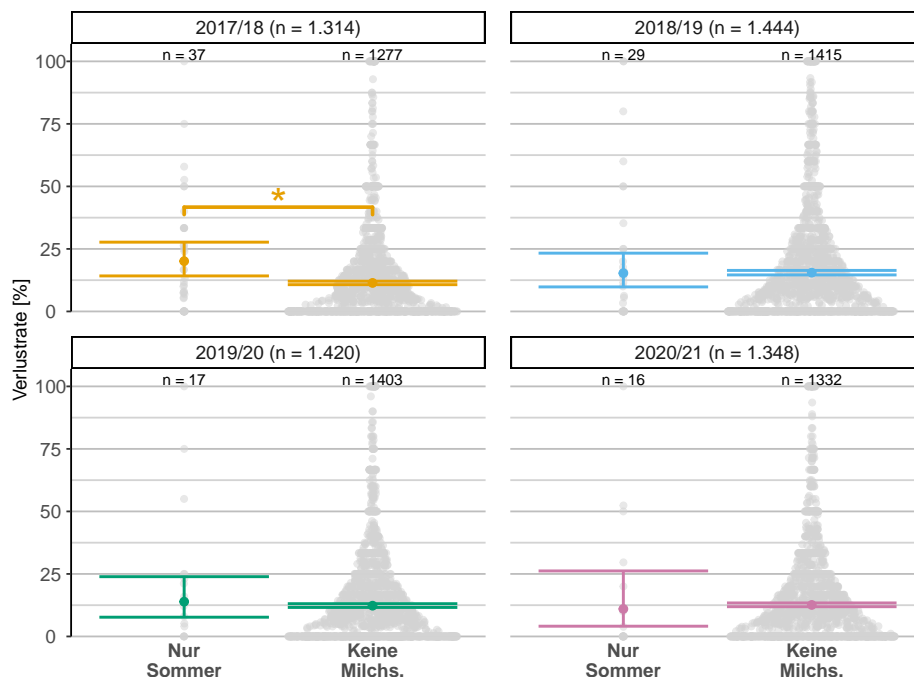


Abbildung 1.60: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Milchsäure“ und Zeitpunkt der Durchführung. Einzelne Monate zusammengefasst Frühjahr (April-Mai), Sommer (Juni-Oktober), Winter (November-Jänner), exkl. Frühjahr Folgejahr. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene. Nur Gruppen mit zumindest einer Stichprobengröße von  $n=15$  in einem Jahr wurden ausgewertet.

### 1.3.5.6.9 Oxalsäure - Trüpfeln (Mischung)

Eine Oxalsäurebehandlung mit einem fertigen Produkt, zum Beispiel Hiveclean, Bienenwohl, Varromed, wird von circa 27% der teilnehmenden ImkerInnen verwendet (Tabelle 1.32). Hauptsächlich, wie auch die zwei anderen Oxalsäurebehandlungsmethoden, findet eine Verwendung im Winter statt. Die Methode findet aber auch Anwendung im Frühjahr des Folgejahres (nicht weiter ausgewertet) und über den Sommer verteilt (Abbildung 1.61). Im Untersuchungsjahr 2019/20 und 2020/21 konnte eine signifikant höhere Verlustrate für die Gruppe „Sommer und Winter“ festgestellt werden im Vergleich zu den anderen Gruppen sowie zu TeilnehmerInnen die keine Behandlung mit einer Oxalsäure Mischung durchgeführt haben (Abbildung 1.62).

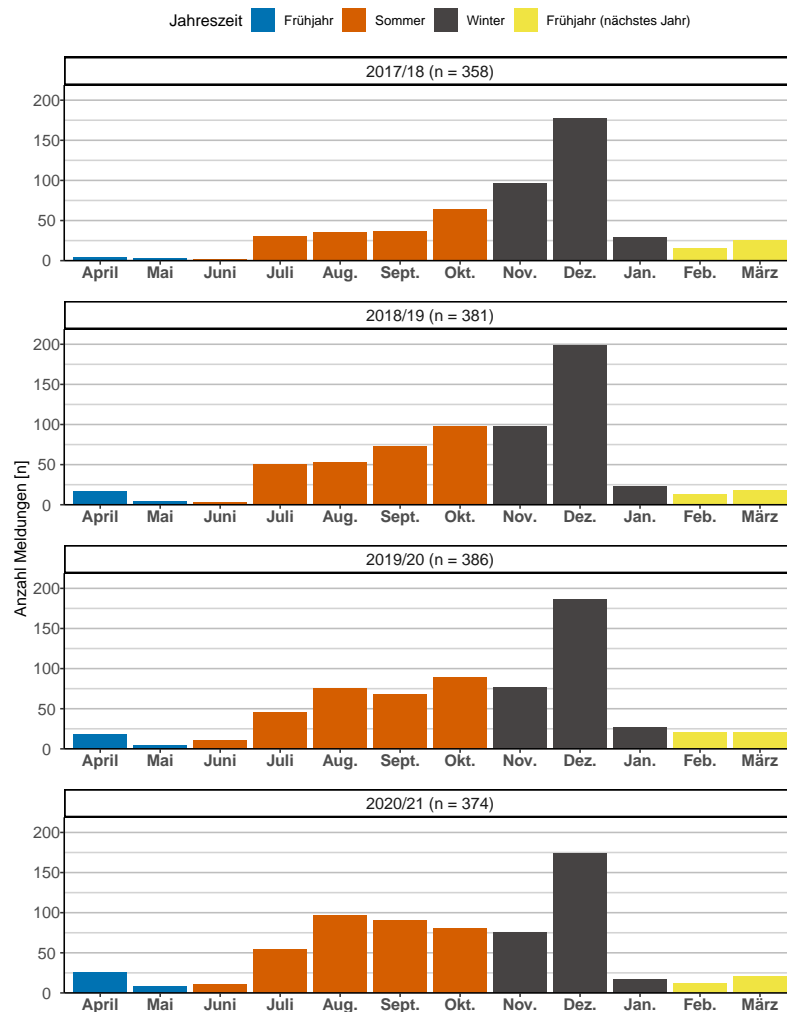


Abbildung 1.61: Häufigkeiten der Oxalsäure Behandlung mittels einer fertigen kommerziellen Mischung für die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21 vom April des Einwinterungsjahres bis März des Auswinterungsjahres. April-Mai wurde als Frühjahr definiert (blau), Juni-Oktober als Sommer (rot) und November-Jänner als Herbst/Winter (schwarz), Frühjahr des Folgejahres Februar-März (gelb).

Tabelle 1.42: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten ob und wann eine Behandlung mit Oxalsäure „Mischung“ durchgeführt wurde oder nicht über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Nur Frühling	3	0,2	3,7	(0,0 - 88,9)
Nur Sommer	60	4,5	11,9	(8,7 - 16,1)
Nur Winter	213	15,9	12,5	(11,0 - 14,2)
Frühling Sommer	2	0,1	0,0	(0,0 - 0,0)
Sommer Winter	54	4,0	10,8	(7,9 - 14,5)
Frühling Winter	1	0,1	0,0	
Frühling Sommer Winter	1	0,1	3,5	
Keine Ox-Mix	1.005	75,1	11,6	(10,8 - 12,5)
<b>18/19</b>				
Nur Frühling	10	0,7	13,7	(9,0 - 20,3)
Nur Sommer	84	5,7	18,1	(14,3 - 22,6)
Nur Winter	186	12,6	13,7	(11,6 - 16,2)
Frühling Sommer	4	0,3	8,7	(0,6 - 59,3)
Sommer Winter	80	5,4	14,2	(10,7 - 18,6)
Frühling Winter	2	0,1	17,9	(0,0 - 100,0)
Frühling Sommer Winter	5	0,3	35,3	(6,1 - 82,0)
Keine Ox-Mix	1.100	74,8	15,5	(14,5 - 16,5)
<b>19/20</b>				
Nur Frühling	9	0,6	9,6	(1,8 - 37,4)
Nur Sommer	101	7,0	10,2	(8,1 - 12,9)
Nur Winter	175	12,0	11,8	(9,9 - 14,1)
Frühling Sommer	2	0,1	20,7	(0,0 - 100,0)
Sommer Winter	75	5,2	19,9	(15,5 - 25,3)
Frühling Winter	3	0,2	5,0	(0,1 - 80,5)
Frühling Sommer Winter	7	0,5	15,9	(6,3 - 34,8)
Keine Ox-Mix	1.081	74,4	12,3	(11,5 - 13,1)
<b>20/21</b>				
Nur Frühling	7	0,5	7,6	(4,2 - 13,4)
Nur Sommer	112	8,2	11,6	(9,5 - 14,2)
Nur Winter	149	10,9	9,5	(7,7 - 11,7)
Frühling Sommer	11	0,8	12,7	(4,1 - 32,9)
Sommer Winter	73	5,3	17,1	(13,8 - 21,1)
Frühling Winter	7	0,5	11,9	(7,7 - 18,0)
Frühling Sommer Winter	6	0,4	3,9	(0,5 - 25,4)
Keine Ox-Mix	1.003	73,3	12,9	(12,0 - 13,8)

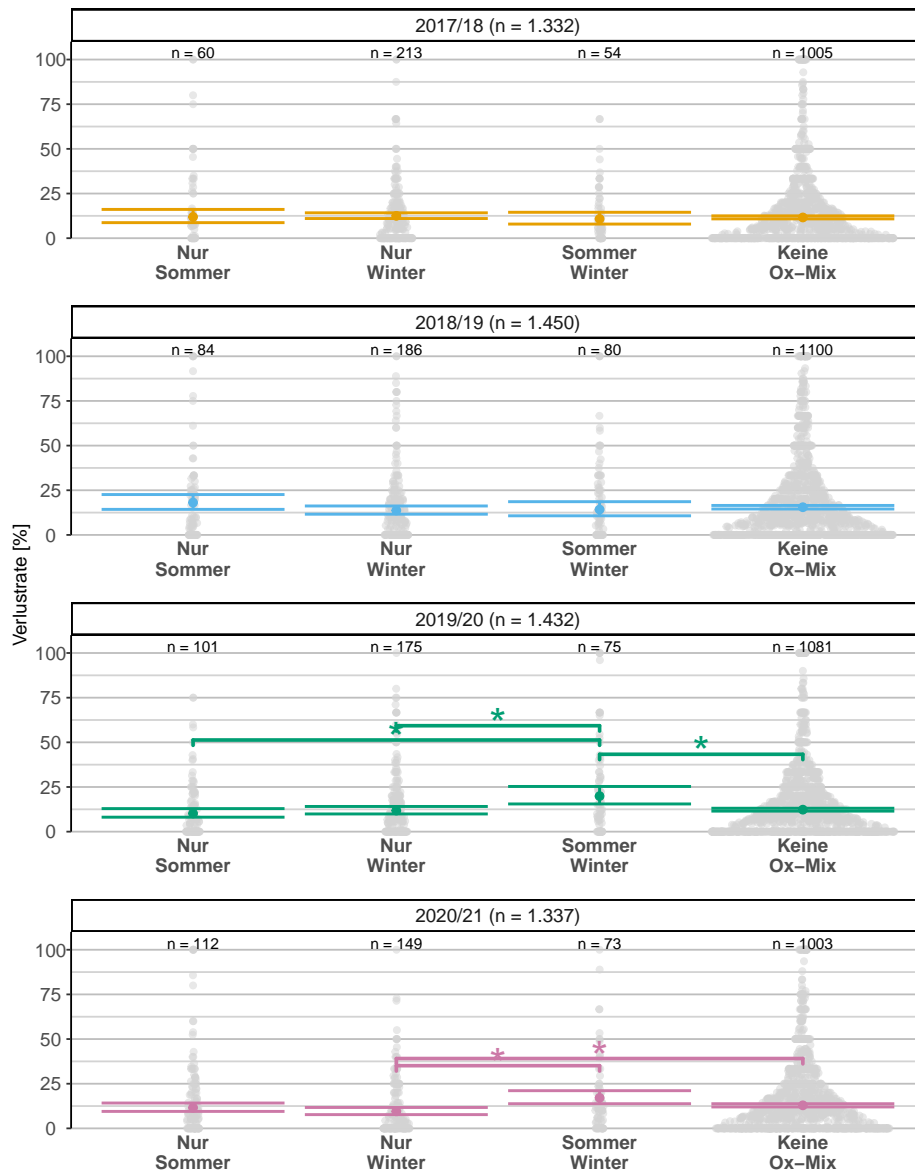


Abbildung 1.62: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Oxalsäure Mischung“ und Zeitpunkt der Durchführung. Einzelne Monate zusammengefasst Frühjahr (April-Mai), Sommer (Juni-Oktober), Winter (November-Jänner), exkl. Frühjahr Folgejahr. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene. Nur Gruppen mit zumindest einer Stichprobengröße von  $n=15$  in einem Jahr wurden ausgewertet.

### 1.3.5.6.10 Oxalsäure - Sprühen/Träufeln

Die Oxalsäure Behandlungsmethode mittels Sprühen oder Träufeln (ohne fertiger Mischungen) wurde im Umfragejahr 2017/18 noch von circa 40% der TeilnehmerInnen angegeben, im Jahr 2020/21 waren es nur mehr 35,6% (Tabelle 1.32). Die Methode wird hauptsächlich im Monat Dezember als Winterbehandlung durchgeführt, aber es ist eine Anwendung über das ganze Jahr verteilt ersichtlich (Abbildung 1.63). Im Jahr 2017/18 hatte TeilnehmerInnen die kein Träufeln oder Sprühen durchgeführt haben eine statistisch signifikante geringere Verlustrate als ImkerInnen die diese Methode nur als Winterbehandlung durchgeführt haben (Abbildung 1.64). In den folgenden Jahre konnte kein statistisch signifikanter Unterschied mehr festgestellt werden.

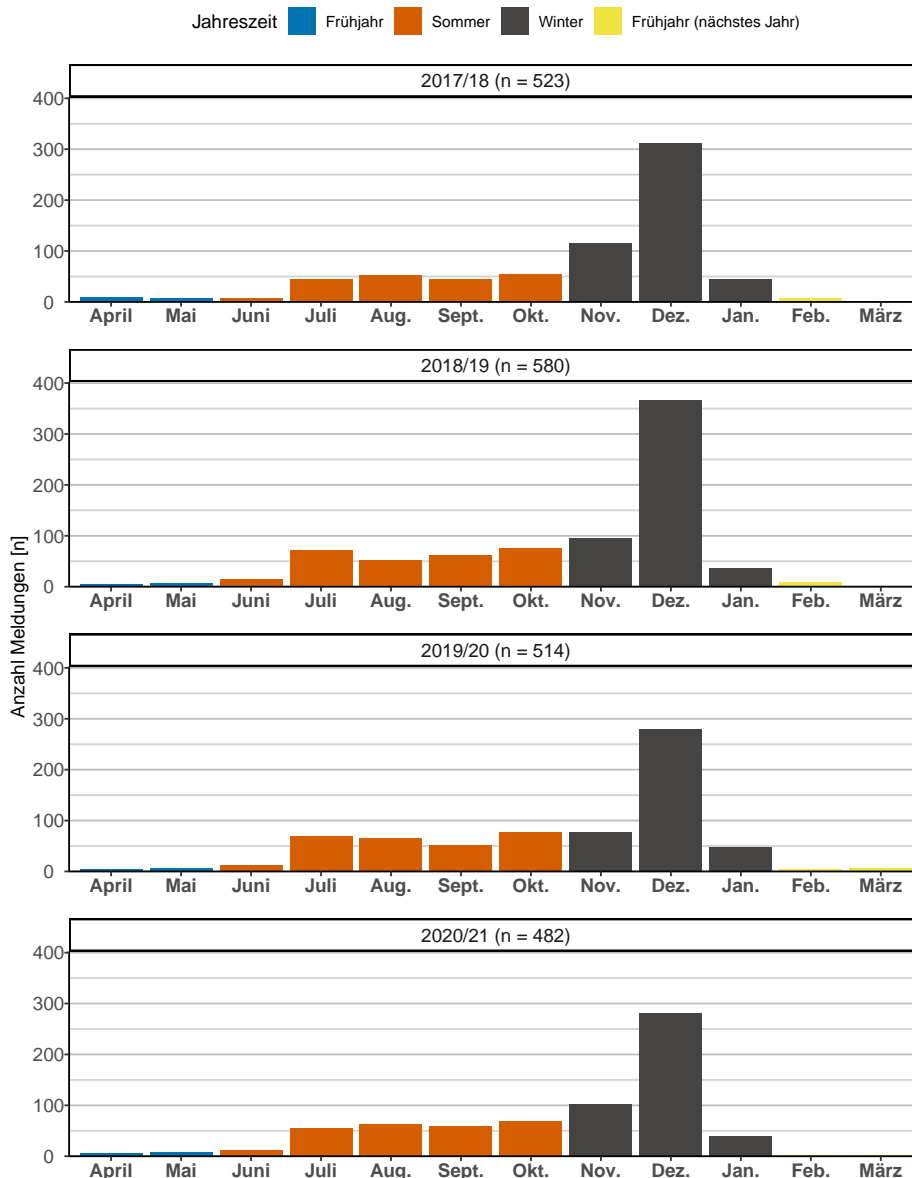


Abbildung 1.63: Häufigkeiten der Oxalsäure Behandlung mittels Träufeln oder Sprühen für die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21 vom April des Einwinterungsjahres bis März des Auswinterungsjahres. April-Mai wurde als Frühjah definiert (blau), Juni-Oktober als Sommer (rot) und November-Jänner als Herbst/Winter (schwarz), Frühjah des Folgejahres Februar-März (gelb).

Tabelle 1.43: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten ob und wann eine Oxalsäurebehandlung mittels Träufeln oder Sprühen durchgeführt wurde oder nicht über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Nur Frühling	6	0,4	6,3	(0,9 - 33,4)
Nur Sommer	88	6,6	10,3	(7,7 - 13,6)
Nur Winter	355	26,5	13,4	(12,1 - 14,8)
Frühling Sommer	2	0,1	0,0	(0,0 - 0,0)
Sommer Winter	66	4,9	11,7	(9,0 - 15,2)
Frühling Winter	4	0,3	13,3	(0,2 - 91,3)
Frühling Sommer Winter	1	0,1	0,0	
Keine Ox-Träu.	817	61,0	11,0	(10,1 - 11,9)
<b>18/19</b>				
Nur Frühling	7	0,5	16,7	(7,6 - 32,6)
Nur Sommer	108	7,3	16,5	(13,3 - 20,2)
Nur Winter	366	24,9	15,3	(13,7 - 17,0)
Frühling Sommer	1	0,1	19,0	
Sommer Winter	93	6,3	18,6	(14,6 - 23,4)
Frühling Winter	1	0,1	66,7	
Frühling Sommer Winter	1	0,1	30,0	
Keine Ox-Träu.	894	60,8	14,7	(13,6 - 15,9)
<b>19/20</b>				
Nur Frühling	3	0,2	8,3	(0,0 - 100,0)
Nur Sommer	125	8,6	12,5	(10,2 - 15,4)
Nur Winter	303	20,9	13,1	(11,7 - 14,5)
Frühling Sommer	5	0,3	10,2	(1,9 - 40,6)
Sommer Winter	72	5,0	11,6	(8,8 - 15,2)
Frühling Sommer Winter	2	0,1	9,5	(0,0 - 100,0)
Keine Ox-Träu.	943	64,9	12,2	(11,3 - 13,2)
<b>20/21</b>				
Nur Frühling	2	0,1	0,0	(0,0 - 0,0)
Nur Sommer	91	6,7	13,6	(10,5 - 17,4)
Nur Winter	303	22,1	14,1	(12,5 - 15,8)
Frühling Sommer	9	0,7	7,3	(3,1 - 16,4)
Sommer Winter	74	5,4	11,3	(8,9 - 14,3)
Frühling Winter	1	0,1	0,0	
Frühling Sommer Winter	1	0,1	75,0	
Keine Ox-Träu.	887	64,8	12,2	(11,2 - 13,2)

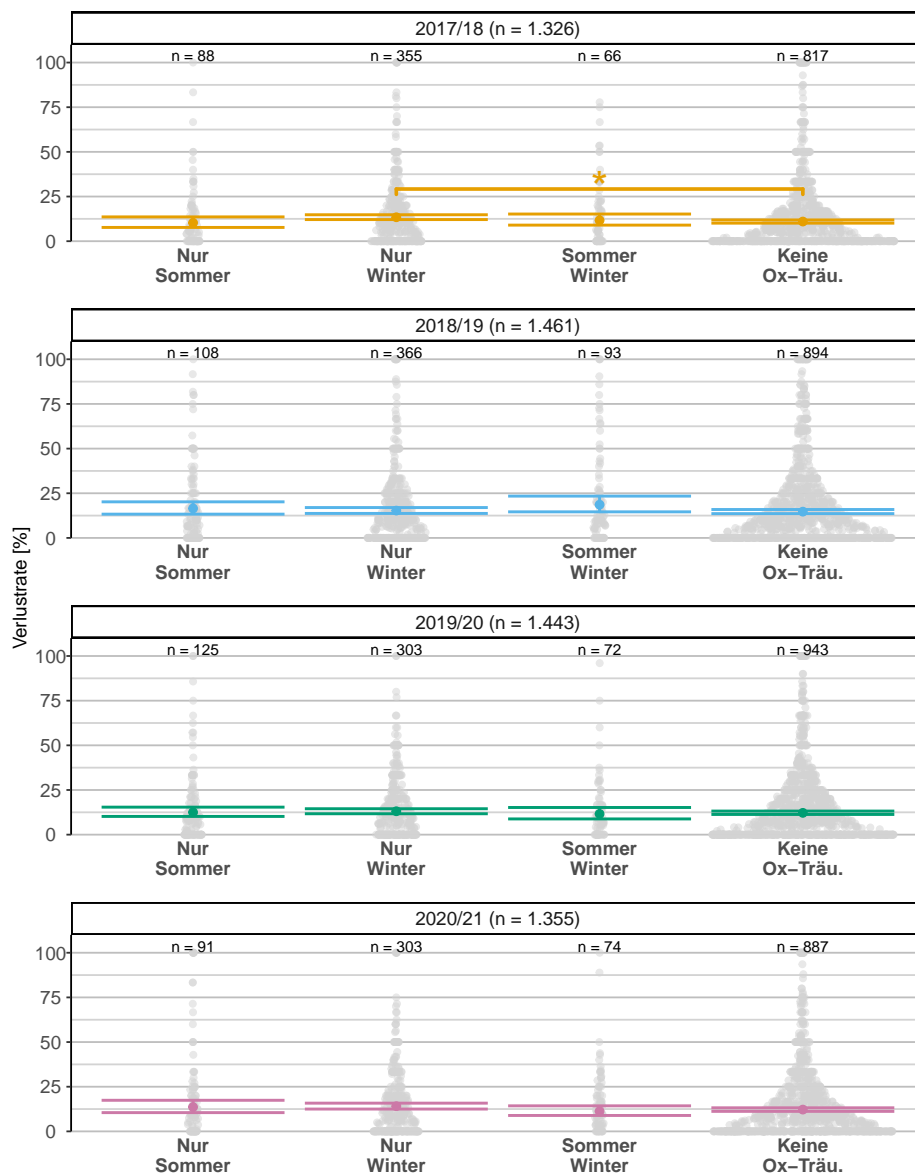


Abbildung 1.64: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Oxalsäure Träufeln oder Sprühen“ und Zeitpunkt der Durchführung. Einzelne Monate zusammengefasst Frühjahr (April-Mai), Sommer (Juni-Oktober), Winter (November-Jänner), exkl. Frühjahr Folgejahr. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene. Nur Gruppen mit zumindest einer Stichprobengröße von  $n=15$  in einem Jahr wurden ausgewertet.

### 1.3.5.6.11 Oxalsäure - Verdampfen

Eine Anwendung der Behandlung mittels Verdampfung von Oxalsäure ist von 45,3% auf 53,8% der TeilnehmerInnen über die Umfragejahre gestiegen (Tabelle 1.32). Der Großteil der TeilnehmerInnen verwendet diese Behandlungsmethode als Winterbehandlung zwischen November bis Januar, es wird aber auch häufig im Sommer eingesetzt (Abbildung 1.65). Im Jahr 2017/18 zeigte sich eine signifikant niedrigere Verlustrate für die Gruppe welche die Methode im „Sommer und Winter“ eingesetzt hat, im Vergleich zur Gruppe die eine Verdampfung „nur im Sommer“ oder „keine Verdampfung“ durchgeführt hat (Abbildung 1.66). Im letzten Untersuchungsjahr 2020/21 konnte eine signifikant geringere Verlustrate für die TeilnehmerInnen die diese Methode „nur im Sommer“ und im „Sommer und Winter“ eingesetzt haben festgestellt werden, im Vergleich zur Gruppe die „keine Verdampfung“ durchgeführt hat (Abbildung 1.66).

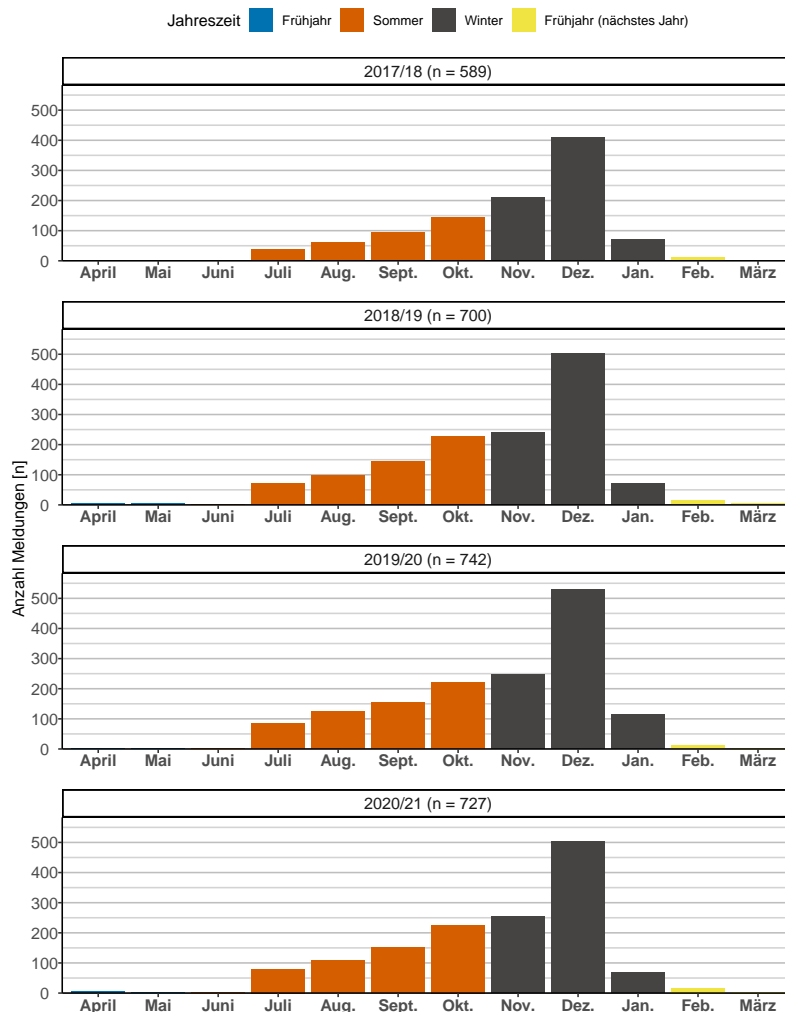


Abbildung 1.65: Häufigkeiten der Oxalsäure Verdampfung für die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21 vom April des Einwinterungsjahres bis März des Auswinterungsjahres. April-Mai wurde als Frühjahr definiert (blau), Juni-Oktober als Sommer (rot) und November-Jänner als Herbst/Winter (schwarz), Frühjahr des Folgejahres Februar-März (gelb).



Tabelle 1.44: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten ob und wann eine Oxalsäurebehandlung mittels Verdampfen durchgeführt wurde oder nicht über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Nur Sommer	42	3,1	12,3	(8,8 - 16,9)
Nur Winter	369	27,6	12,0	(10,7 - 13,4)
Sommer Winter	174	13,0	8,1	(6,8 - 9,6)
Keine Ox-Sub.	754	56,3	12,4	(11,5 - 13,5)
<b>18/19</b>				
Nur Frühling	2	0,1	30,3	(0,0 - 100,0)
Nur Sommer	60	4,1	13,7	(10,1 - 18,2)
Nur Winter	377	25,6	13,9	(12,3 - 15,7)
Frühling Sommer	1	0,1	0,0	
Sommer Winter	251	17,1	17,4	(15,4 - 19,7)
Frühling Winter	1	0,1	87,5	
Frühling Sommer Winter	5	0,3	6,6	(0,7 - 42,5)
Keine Ox-Sub.	774	52,6	15,3	(14,1 - 16,6)
<b>19/20</b>				
Nur Sommer	63	4,3	14,0	(10,9 - 17,8)
Nur Winter	405	27,9	11,6	(10,3 - 13,1)
Sommer Winter	270	18,6	11,3	(10,0 - 12,8)
Frühling Winter	2	0,1	10,5	(0,1 - 93,9)
Frühling Sommer Winter	1	0,1	33,3	
Keine Ox-Sub.	712	49,0	13,2	(12,1 - 14,3)
<b>20/21</b>				
Nur Frühling	2	0,1	6,7	(0,1 - 89,8)
Nur Sommer	78	5,7	9,2	(7,0 - 11,9)
Nur Winter	380	27,8	12,9	(11,6 - 14,4)
Frühling Sommer	2	0,1	3,8	(0,0 - 100,0)
Sommer Winter	261	19,1	10,8	(9,3 - 12,4)
Frühling Sommer Winter	2	0,1	8,4	(0,8 - 50,4)
Keine Ox-Sub.	643	47,0	13,9	(12,7 - 15,2)

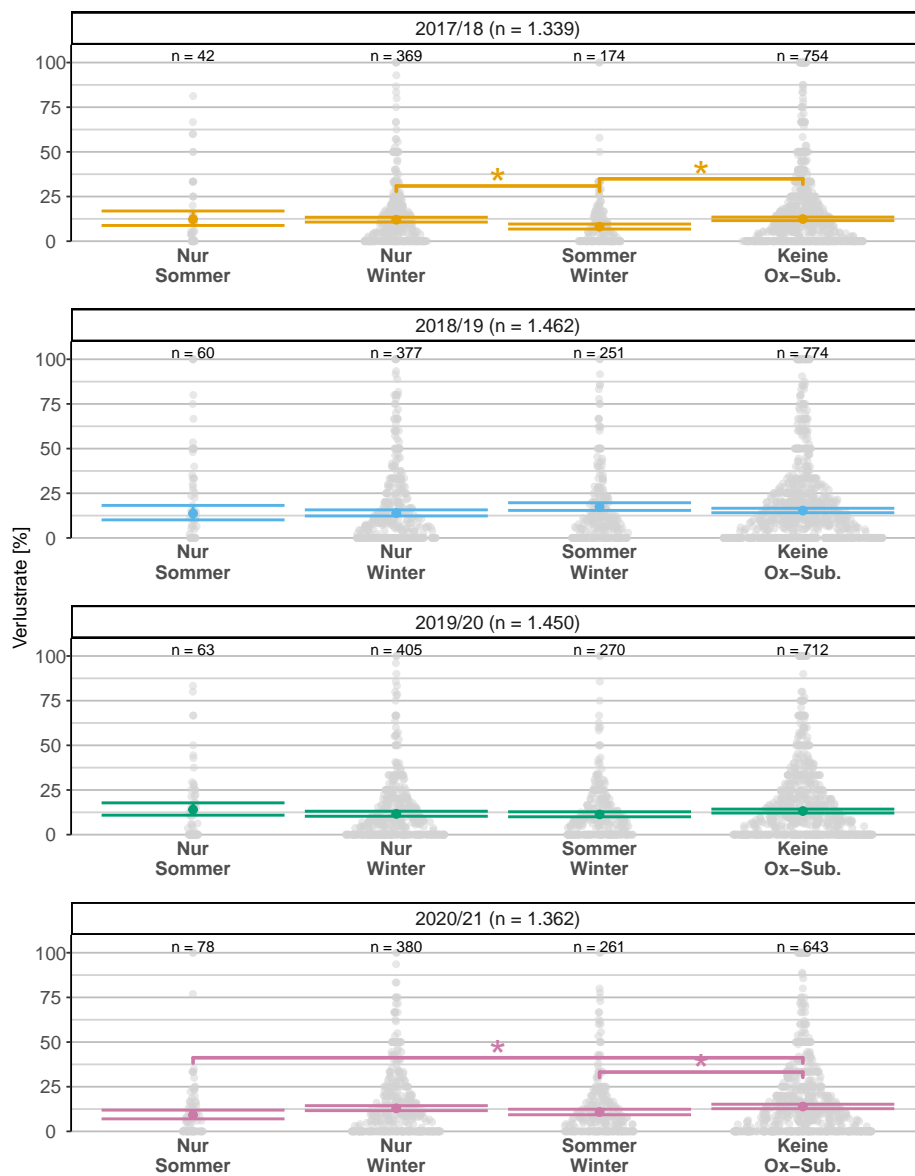


Abbildung 1.66: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Oxalsäure Verdampfung“ und Zeitpunkt der Durchführung. Einzelne Monate zusammengefasst Frühjahr (April-Mai), Sommer (Juni-Oktober), Winter (November-Jänner), exkl. Frühjahr Folgejahr. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene. Nur Gruppen mit zumindest einer Stichprobengröße von  $n=15$  in einem Jahr wurden ausgewertet.

### 1.3.5.6.12 Thymol

Eine Behandlung mit Thymol, zum Beispiel mit den Produkten Thymovar, Apiguard etc., wurde im Umfragejahr 2017/18 noch von ca. 11% als Bekämpfungsmethode gegen die Varroa Milbe verwendet. Mittlerweile ist die Häufigkeit in der Winterverlustumfrage auf 8,1% gesunken (Tabelle 1.32). Die Methode wird von der Mehrheit der ImkerInnen im Sommer angewendet (Abbildung 1.67). Im Jahr 2019/20 und 2020/21 konnte eine signifikante höhere Verlustrate für eine Anwendung „im Sommer“ im Vergleich zur Gruppe, die „keine Thymolbehandlung“ durchführt festgestellt werden (Abbildung 1.52).

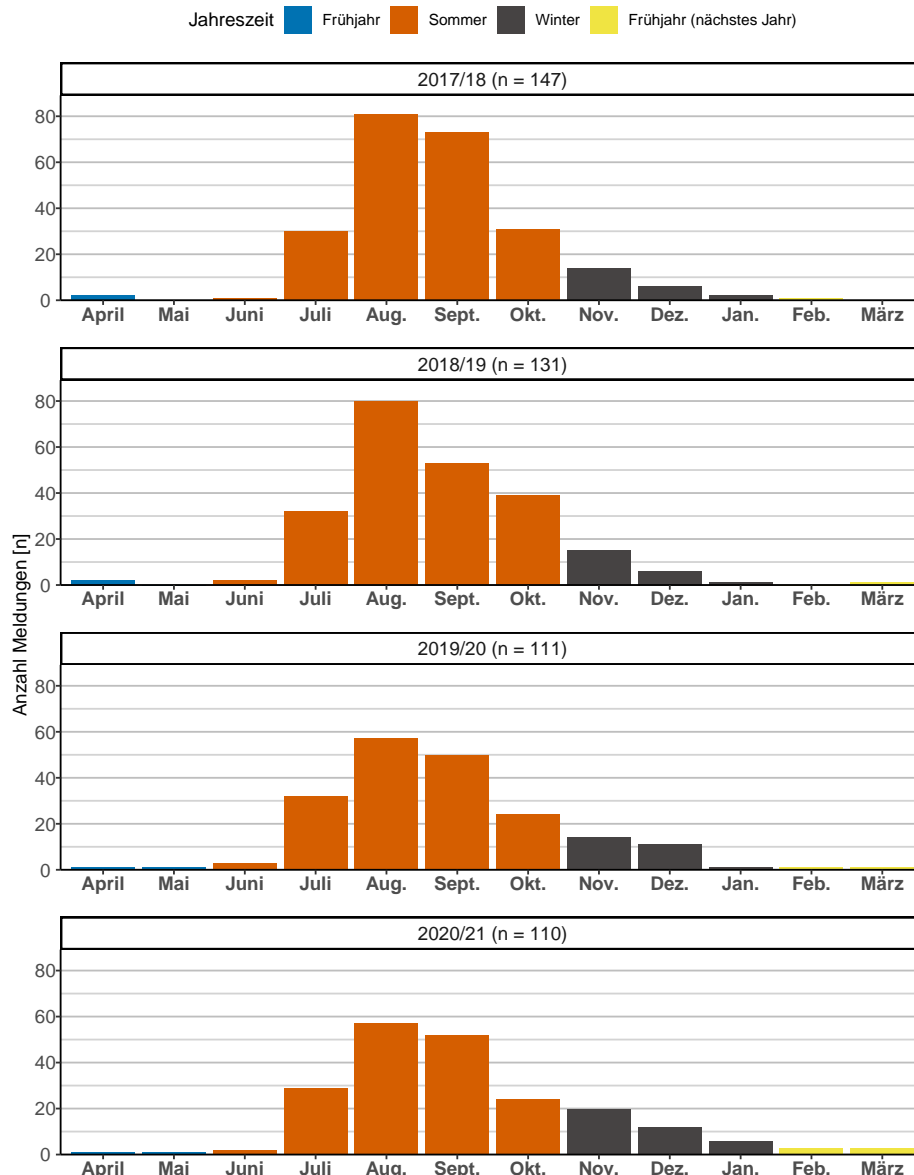


Abbildung 1.67: Häufigkeiten der Thymol Behandlung für die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21 vom April des Einwinterungsjahres bis März des Auswinterungsjahres. April-Mai wurde als Frühjah definiert (blau), Juni-Oktober als Sommer (rot) und November-Jänner als Herbst/Winter (schwarz), Frühjah des Folgejahres Februar-März (gelb).

Tabelle 1.45: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten ob und wann eine Thymolbehandlung durchgeführt wurde oder nicht über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Nur Frühling	1	0,1	1,5	
Nur Sommer	128	9,6	13,4	(11,0 - 16,1)
Nur Winter	8	0,6	7,6	(3,5 - 15,6)
Sommer Winter	8	0,6	19,2	(6,5 - 44,9)
Frühling Sommer Winter	1	0,1	12,5	
Kein Thymol	1.193	89,1	11,5	(10,8 - 12,3)
<b>18/19</b>				
Nur Sommer	112	7,6	17,0	(13,3 - 21,3)
Nur Winter	6	0,4	22,1	(7,3 - 50,4)
Frühling Sommer	2	0,1	0,0	(0,0 - 0,0)
Sommer Winter	10	0,7	16,7	(7,7 - 32,4)
Kein Thymol	1.341	91,2	15,2	(14,4 - 16,2)
<b>19/20</b>				
Nur Sommer	92	6,3	18,3	(14,8 - 22,4)
Nur Winter	7	0,5	17,6	(6,1 - 41,6)
Sommer Winter	11	0,8	20,3	(8,6 - 41,1)
Frühling Sommer Winter	1	0,1	0,0	
Kein Thymol	1.342	92,4	12,0	(11,3 - 12,8)
<b>20/21</b>				
Nur Frühling	1	0,1	0,0	
Nur Sommer	83	6,1	18,0	(13,9 - 23,0)
Nur Winter	9	0,7	20,5	(14,1 - 28,9)
Frühling Sommer	1	0,1	50,0	
Sommer Winter	16	1,2	21,3	(10,6 - 38,3)
Kein Thymol	1.258	92,0	12,3	(11,6 - 13,1)

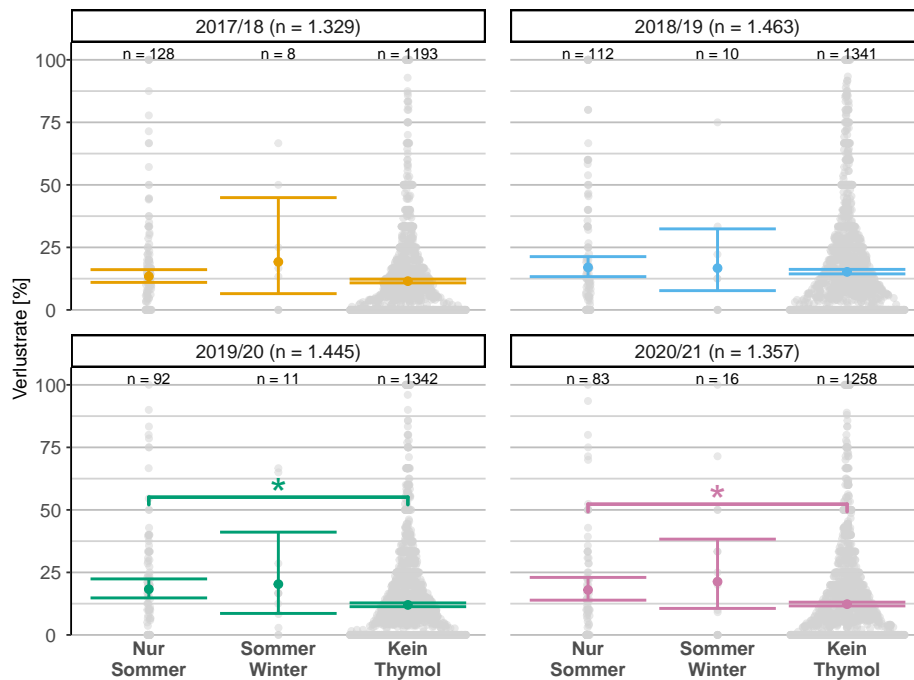


Abbildung 1.68: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Thymol“ und Zeitpunkt der Durchführung. Einzelne Monate zusammengefasst Frühjahr (April-Mai), Sommer (Juni-Oktober), Winter (November-Jänner), exkl. Frühjahr Folgejahr. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene. Nur Gruppen mit zumindest einer Stichprobengröße von  $n=15$  in einem Jahr wurden ausgewertet.

### 1.3.5.6.13 Andere Methode / Sonstiges

Andere Methoden, die nicht in unserem Fragebogen angeführt sind, wurden nur von einem kleinen Prozentsatz in der Umfrage angegeben (Tabelle 1.32). Eine genauere Auswertung wurde nicht durchgeführt, da keine Informationen zu den verwendeten Behandlungsmethoden vorhanden sind. Die Kategorie ist wichtig, um eventuell fehlende, aber häufige Methoden zu erkennen und um dann gegebenenfalls den Fragenkatalog der Behandlungsmethoden zu adaptieren.

### 1.3.5.6.14 Behandlungskombinationen

Die abgebildeten Kombinationen (Abbildung 1.69, Tabelle 1.46) beinhalten alle möglichen Kombinationen der Behandlungen nach Jahreszeiten mit mindestens 15 ImkerInnen in einem Jahr, ohne Drohnenbrutentnahme. Zusätzlich wurden die Behandlungsmethoden Oxalsäure Träufeln oder Sprühen und Oxalsäure Mischung zusammengefasst. Die Filterung der Daten ergab 21 verschiedene Kombinationen mit den jeweiligen Verlustraten. Diese sind alphabetisch sortiert nach der Häufigkeit der Anwendung im ersten Untersuchungsjahr 2017/18 angeführt (Abbildung 1.69). Hierbei sei bei den Kombinationen mit kleineren Stichproben auf die breiten Konfidenzintervalle hingewiesen und die damit einhergehende Ungenauigkeit in der Schätzung.

Die häufigste Kombination war über alle vier Jahre eine „(A) Ameisensäure Langzeitbehandlung mit Oxalsäure Träufeln oder Mischung im Winter“ mit im Jahr 2018/19 einer signifikant geringeren Verlustrate als die österreichische Gesamtverlustrate. Im ersten Untersuchungsjahr 2017/18 überlappen sich die Konfidenzintervalle von allen analysierten Behandlungskombinationen und kein statistisch signifikanter Unterschied konnte festgestellt werden. Im Untersuchungsjahr 2018/19 zeigte die Behandlungskombination „(I) Ameisensäure Kurzzeitbehandlung im Sommer und Oxalsäure Träufeln oder Mischung im Sommer und Winter“ eine signifikant höhere Verlustrate als die österreichische Gesamtverlustrate. Im Jahr 2019/20 wurde für die Kombination „(J) Ameisensäure Kurzzeitbehandlung im Sommer“ eine signifikant höhere Verlustrate als bei der österreichischen Gesamtverlustrate festgestellt. Im letzten Untersuchungsjahr 2020/21 zeigte die Kombination „(B) Ameisensäure - Kurzzeit im Sommer gefolgt von Oxalsäure Mischung oder Träufeln im Winter“ und die Methode „(T) Oxalsäure Mischung oder Träufeln im Sommer und Winter“ eine signifikant höhere Verlustrate als die österreichische Gesamtverlustrate. Über die Umfragejahre ist eine Zunahme der Häufigkeit von Kombinationen mit der Behandlungsmethode „andere biotechnische Methode“ (N, O, P, S, U) festzustellen.

Tabelle 1.46: Erklärung zu den abgekürzten Kombinationen. Einzelne Monate sind nach Saison zusammengefasst S = Sommer (Juni-Oktober), W = Winter (November-Jänner). Die Behandlungsmethoden Oxalsäure Träufeln oder Sprühen und Oxalsäure Mischung wurden zusammengefasst.

Abkürzung	Beschreibung
(A) S-AS-LZ & W-Ox-Träu*	S Ameisensäure - Langzeit & W Oxalsäure - Träufeln o. Mischung*
(B) S-AS-KZ & W-Ox-Träu*	S Ameisensäure - Kurzzeit & W Oxalsäure - Träufeln o. Mischung*
(C) S-AS-LZ & W-Ox-Sub.	S Ameisensäure - Langzeit & W Oxalsäure - Verdampfen
(D) S-AS-KZ & S-AS-LZ & W-Ox-Träu*	S Ameisensäure - Kurzzeit & S Ameisensäure - Langzeit & W Oxalsäure - Träufeln o. Mischung*
(E) S-AS-KZ & W-Ox-Sub.	S Ameisensäure - Kurzzeit & W Oxalsäure - Verdampfen
(F) S-AS-KZ & S-AS-LZ & W-Ox-Sub.	S Ameisensäure - Kurzzeit & S Ameisensäure - Langzeit & W Oxalsäure - Verdampfen
(G) S-AS-LZ & S-Ox-Sub. & W-Ox-Sub.	S Ameisensäure - Langzeit & S Oxalsäure - Verdampfen & W Oxalsäure - Verdampfen
(H) S-Ox-Sub. & W-Ox-Sub.	S Oxalsäure - Verdampfen & W Oxalsäure - Verdampfen
(I) S-AS-KZ & S-Ox-Träu* & W-Ox-Träu*	S Ameisensäure - Kurzzeit & S Oxalsäure - Träufeln o. Mischung* & W Oxalsäure - Träufeln o. Mischung*
(J) S-AS-KZ	S Ameisensäure - Kurzzeit
(K) S-AS-KZ & S-Ox-Sub. & W-Ox-Sub.	S Ameisensäure - Kurzzeit & S Oxalsäure - Verdampfen & W Oxalsäure - Verdampfen
(L) S-AS-LZ	S Ameisensäure - Langzeit
(M) S-AS-LZ & S-Ox-Träu* & W-Ox-Träu*	S Ameisensäure - Langzeit & S Oxalsäure - Träufeln o. Mischung* & W Oxalsäure - Träufeln o. Mischung*
(N) S-Biot. & S-AS-KZ & W-Ox-Träu*	S Andere Methode biot. Methode & S Ameisensäure - Kurzzeit & W Oxalsäure - Träufeln o. Mischung*
(O) S-Biot. & S-AS-LZ & W-Ox-Träu*	S Andere Methode biot. Methode & S Ameisensäure - Langzeit & W Oxalsäure - Träufeln o. Mischung*
(P) S-Biot. & S-Ox-Sub. & W-Ox-Sub.	S Andere Methode biot. Methode & S Oxalsäure - Verdampfen & W Oxalsäure - Verdampfen
(Q) S-AS-KZ & S-Ox-Träu* & W-Ox-Sub.	S Ameisensäure - Kurzzeit & S Oxalsäure - Träufeln o. Mischung* & W Oxalsäure - Verdampfen
(R) S-AS-LZ & S-Ox-Träu* & W-Ox-Sub.	S Ameisensäure - Langzeit & S Oxalsäure - Träufeln o. Mischung* & W Oxalsäure - Verdampfen
(S) S-Biot. & S-Ox-Träu* & W-Ox-Träu*	S Andere Methode biot. Methode & S Oxalsäure - Träufeln o. Mischung* & W Oxalsäure - Träufeln o. Mischung*
(T) S-Ox-Träu* & W-Ox-Träu*	S Oxalsäure - Träufeln o. Mischung* & W Oxalsäure - Träufeln o. Mischung*
(U) S-Biot. & S-Ox-Träu* & W-Ox-Sub.	S Andere Methode biot. Methode & S Oxalsäure - Träufeln o. Mischung* & W Oxalsäure - Verdampfen

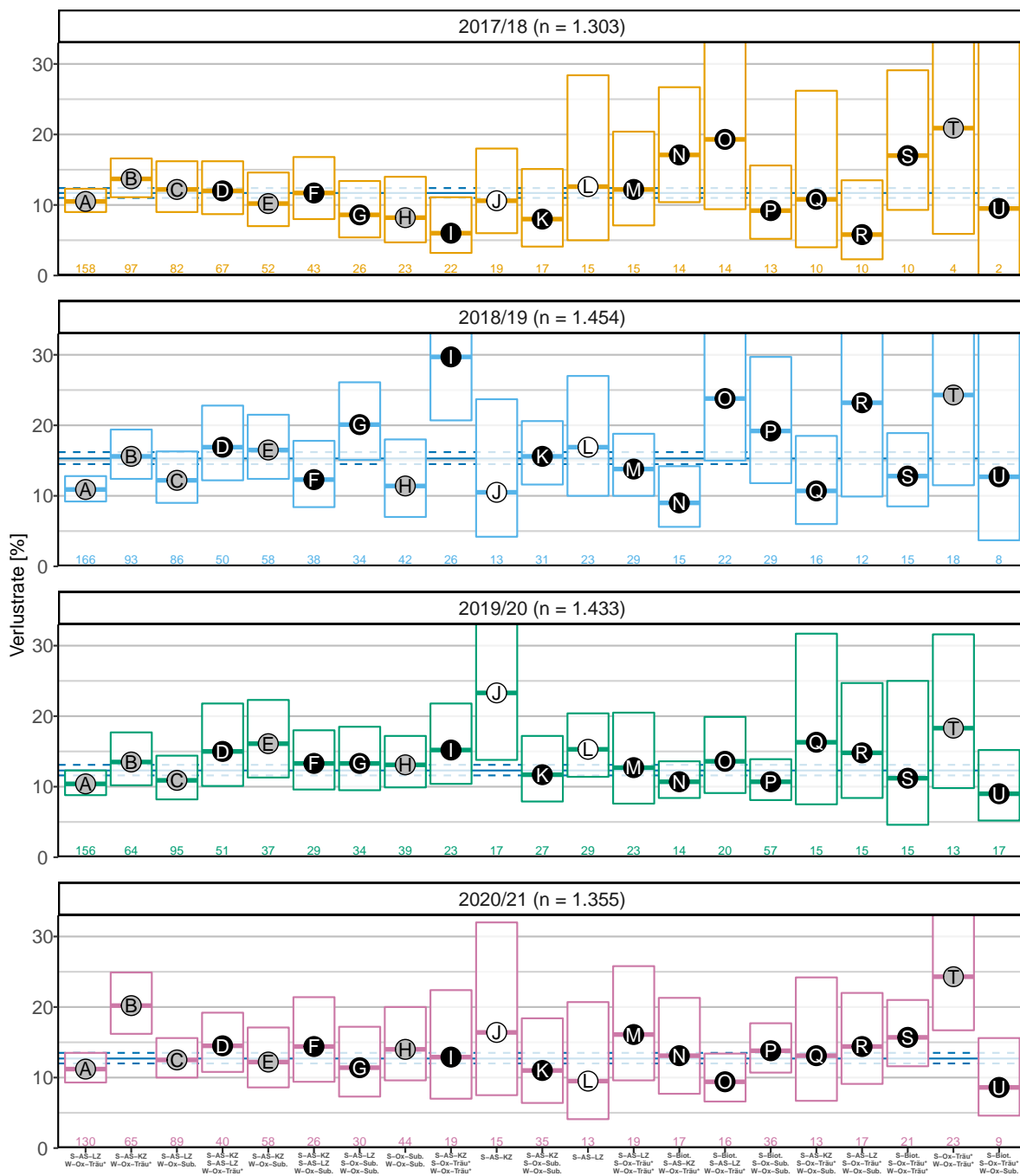


Abbildung 1.69: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethodenkombination und dem Zeitpunkt der Durchführung. Nur Kombinationen von Methoden mit mindestens 15 TeilnehmerInnen in einem Umfragejahr wurden ausgewertet. Maximal angezeigte Verlustrate ist auf 30% limitiert. Die Anzahl der unterschiedlichen Behandlungsmethoden ist farblich gekennzeichnet (weiß = 1, grau = 2, schwarz = 3). Die durchschnittliche österreichische Gesamtverlustrate (rote Linie) mit (und 95% CI) (gestrichelte Linie) ist vertikal eingezeichnet. Zahlen unter den Balken sind die jeweilige TeilnehmerInnen Anzahl (n). Abkürzungen der Behandlungsmethoden siehe Tabelle 1.46.

### 1.3.5.7 Königinnen-Verluste

Der Mittelwert der Winterverlustrate durch „Unlösbare Königinnenprobleme“ für ganz Österreich beträgt über die vier Umfragejahre 3,6%. Von der österreichischen Gesamtverlustrate weicht kein Bundesland statistisch signifikant ab, dennoch gibt es unterschiedliche Verlustraten zwischen den Bundesländern. Im Jahr 2017/18 zeigt Niederösterreich eine signifikant höhere Verlustrate als Kärnten und Salzburg. Im darauf folgenden Jahr 2018/19 zeigte Niederösterreich eine signifikant höhere Verlustrate im Vergleich zu Vorarlberg, Steiermark, Kärnten und Tirol und auch im Jahr 2019/20 war die Verlustrate in Niederösterreich höher als in Vorarlberg. Niederösterreich und Oberösterreich hatten im letzten Umfragejahr 2020/21 eine signifikant höhere Verlustrate als Kärnten (Abbildung 1.70 und Tabelle 1.47).

Tabelle 1.47: Höhe der Winterverluste durch unlösbare Königinnenprobleme in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten für die einzelnen Bundesländer sowie Österreich gesamt über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21.

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Österreich	1.391	100,0	3,2	(2,9 - 3,4)
Burgenland	35	2,5	1,3	(0,5 - 3,1)
Kärnten	144	10,4	2,3	(1,7 - 3,0)
Niederösterreich	409	29,4	3,6	(3,1 - 4,1)
Oberösterreich	253	18,2	3,5	(2,9 - 4,1)
Salzburg	58	4,2	4,9	(3,4 - 7,0)
Steiermark	207	14,9	2,9	(2,4 - 3,6)
Tirol	120	8,6	2,5	(1,7 - 3,7)
Vorarlberg	105	7,5	3,9	(3,0 - 5,1)
Wien	60	4,3	2,5	(1,5 - 4,0)
<b>18/19</b>				
Österreich	1.534	100,0	3,9	(3,6 - 4,1)
Burgenland	35	2,3	3,4	(2,2 - 5,2)
Kärnten	147	9,6	3,3	(2,7 - 4,1)
Niederösterreich	387	25,2	4,8	(4,2 - 5,5)
Oberösterreich	276	18,0	3,9	(3,3 - 4,5)
Salzburg	74	4,8	3,4	(2,6 - 4,5)
Steiermark	218	14,2	3,3	(2,8 - 3,9)
Tirol	141	9,2	3,1	(2,5 - 4,0)
Vorarlberg	178	11,6	3,1	(2,5 - 3,9)
Wien	78	5,1	4,9	(3,7 - 6,4)
<b>19/20</b>				
Österreich	1.539	100,0	4,3	(4,1 - 4,6)
Burgenland	33	2,1	4,4	(2,9 - 6,7)
Kärnten	151	9,8	3,7	(3,1 - 4,5)
Niederösterreich	389	25,3	5,0	(4,5 - 5,7)
Oberösterreich	285	18,5	4,6	(4,0 - 5,3)
Salzburg	78	5,1	4,4	(3,3 - 5,7)
Steiermark	222	14,4	3,9	(3,3 - 4,6)
Tirol	153	9,9	4,0	(3,3 - 4,9)
Vorarlberg	136	8,8	3,1	(2,3 - 4,2)
Wien	92	6,0	4,5	(3,2 - 6,3)
<b>20/21</b>				
Österreich	1.406	100,0	3,0	(2,8 - 3,2)
Burgenland	43	3,1	3,5	(2,1 - 5,5)
Kärnten	154	11,0	2,2	(1,7 - 2,8)
Niederösterreich	310	22,0	3,4	(2,9 - 3,9)
Oberösterreich	294	20,9	3,4	(3,0 - 4,0)
Salzburg	74	5,3	2,3	(1,6 - 3,3)
Steiermark	216	15,4	2,9	(2,4 - 3,7)
Tirol	147	10,5	2,5	(2,0 - 3,3)
Vorarlberg	109	7,8	3,5	(2,4 - 5,1)
Wien	59	4,2	2,0	(1,2 - 3,1)



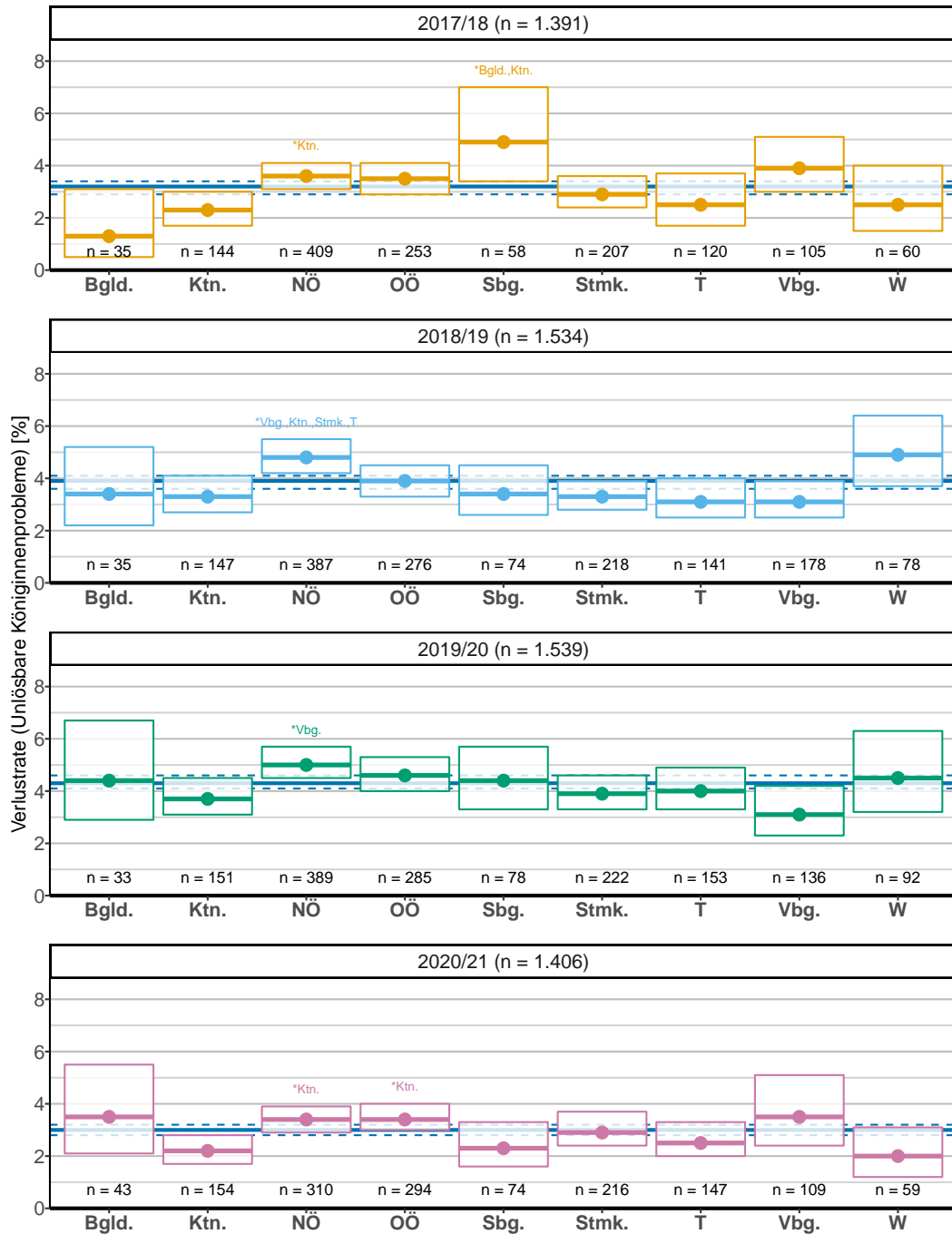


Abbildung 1.70: Höhe der Winterverluste durch unlösbare Königinnenprobleme verursacht für die einzelnen Bundesländer und Österreich gesamt (blaue horizontale Linie) in Prozent (und 95% CI) über die Umfragejahre 2017/18 bis 2020/21.

### 1.3.5.7.1 Königinnenprobleme

Die Überlebenschance der Völker hängt in großem Maße auch von der Gesundheit der Königin ab. Die TeilnehmerInnen wurden deshalb auch über das Auftreten von Königinnenproblemen befragt und konnten zwischen den vier Antworten „Häufiger“, „Normal“, „Seltener“ und „Weiß nicht“ (im Vergleich zu den Vorjahren) entscheiden. Tabelle 1.48 zeigt die Angaben der TeilnehmerInnen seit der Umfrage 2013/14.

TeilnehmerInnen die diese Probleme „Häufiger“ beobachteten zeigten signifikant höhere Verlustraten (exklusive Unlösbare Königinnenprobleme) im Jahr 2017/18 im Vergleich zur Gruppe „Normal“ und im Jahr 2019/20 im Vergleich zu „Normal“ und „Seltener“. ImkerInnen die diese Frage mit „Weiß nicht“ beantwortet haben zeigten höhere Verlustraten im Jahr 2017/18 und 2019/20 im Vergleich zur Gruppe „Normal“. Im letzten Untersuchungsjahr 2020/21 zeigte die Gruppe „Häufiger“ eine signifikant höhere Verlustrate als die Gruppe „Seltener“ (Abbildung 1.71 und Tabelle 1.49).

Betrachtet man Verluste nur anhand der „Unlösbare Königinnenprobleme“, zeigt sich in jedem Umfragejahr eine höhere Verlustrate für die TeilnehmerInnen die „Häufiger“ angaben im Vergleich zu „Seltener“ und zweimal im Vergleich zu „Weiß nicht“ (Abbildung 1.72 und Tabelle 1.50).

Tabelle 1.48: Relative und absolute Häufigkeit der Antworten zu den Königinnenproblemen von 2013/14 bis 2020/21 (Anzahl TeilnehmerInnen (n, %)).

Jahr	Häufiger		Normal		Seltener		Weiß nicht	
	n	%	n	%	n	%	n	%
2013/14	76	8,0	458	48,1	212	22,2	207	21,7
2014/15	194	16,6	513	44,0	181	15,5	279	23,9
2015/16	63	5,2	491	40,7	399	33,1	253	21,0
2016/17	160	10,2	743	47,4	396	25,2	272	17,3
<b>2017/18</b>	73	6,5	539	48,1	342	30,5	167	14,9
<b>2018/19</b>	95	7,8	587	48,2	389	31,9	463	12,1
<b>2019/20</b>	127	10,4	570	46,9	354	29,1	165	13,6
<b>2020/21</b>	143	12,2	567	48,3	324	27,6	141	12,0

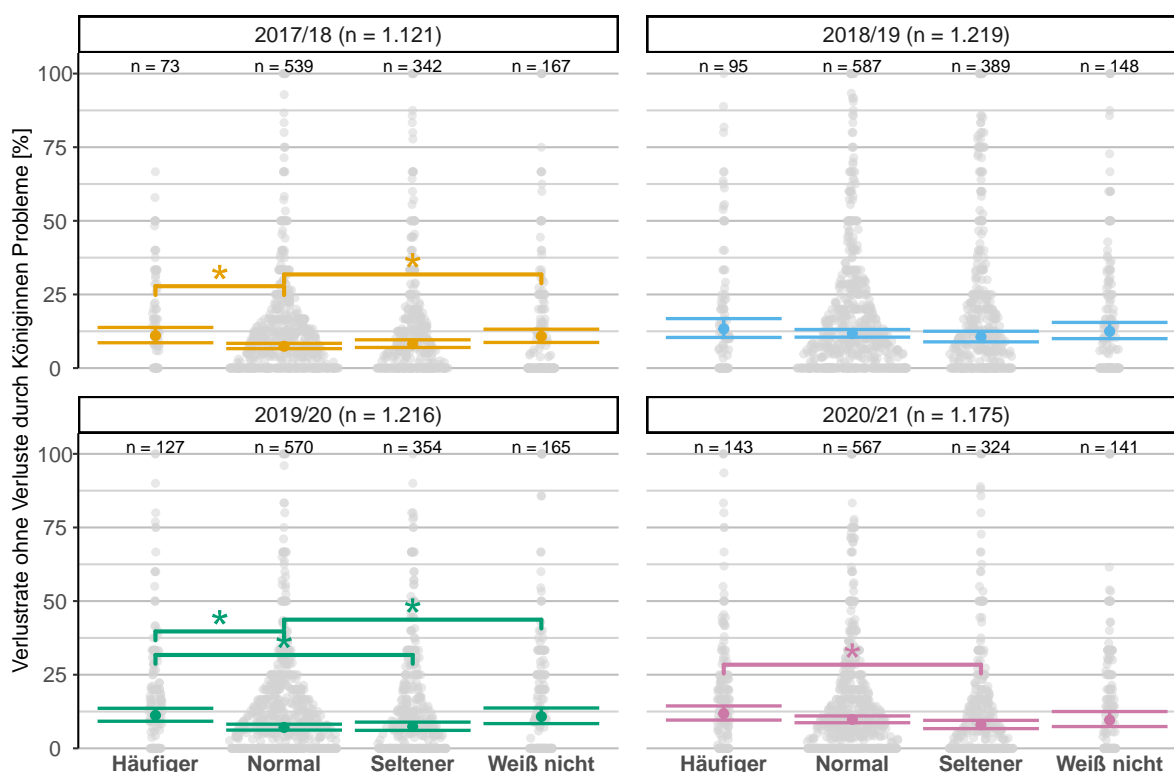


Abbildung 1.71: Höhe der Winterverluste, exklusive den Verlusten durch unlösbare Königinnenprobleme, im Zusammenhang mit den beobachteten Königinnenproblemen in Prozent (und 95% CI). Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

Tabelle 1.49: Höhe der Winterverluste (exklusive den Verlusten durch unlösbare Königinnenprobleme.) in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten im Zusammenhang mit den beobachteten Königinnenproblemen über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21.

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Häufiger	73	6,5	11,0	(8,6 - 13,8)
Normal	539	48,1	7,4	(6,6 - 8,4)
Seltener	342	30,5	8,2	(7,0 - 9,6)
Weiß nicht	167	14,9	10,8	(8,7 - 13,2)
<b>18/19</b>				
Häufiger	95	7,8	13,3	(10,4 - 16,8)
Normal	587	48,2	11,7	(10,5 - 13,1)
Seltener	389	31,9	10,6	(8,9 - 12,5)
Weiß nicht	148	12,1	12,5	(10,0 - 15,5)
<b>19/20</b>				
Häufiger	127	10,4	11,2	(9,2 - 13,6)
Normal	570	46,9	7,1	(6,2 - 8,2)
Seltener	354	29,1	7,4	(6,1 - 8,9)
Weiß nicht	165	13,6	10,8	(8,4 - 13,7)
<b>20/21</b>				
Häufiger	143	12,2	11,8	(9,6 - 14,4)
Normal	567	48,3	9,8	(8,7 - 11,0)
Seltener	324	27,6	8,0	(6,7 - 9,5)
Weiß nicht	141	12,0	9,6	(7,4 - 12,5)

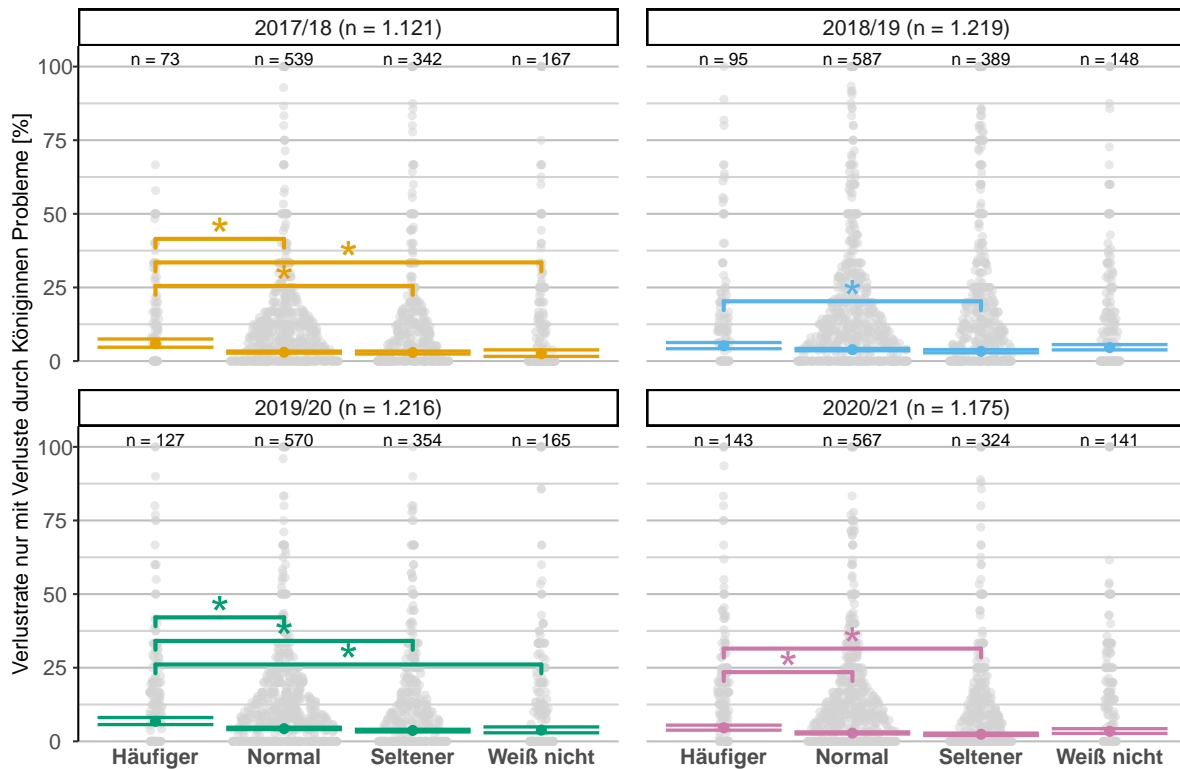


Abbildung 1.72: Höhe der Winterverluste, nur Verluste durch unlösbare Königinnenprobleme, im Zusammenhang mit den beobachteten Königinnenproblemen in Prozent (und 95% CI). Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

Tabelle 1.50: Höhe der Winterverluste (nur Verluste durch unlösbare Königinnenprobleme) in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten im Zusammenhang mit den beobachteten Königinnenproblemen über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21.

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Häufiger	73	6,5	5,9	(4,7 - 7,5)
Normal	539	48,1	3,0	(2,7 - 3,4)
Seltener	342	30,5	2,9	(2,4 - 3,4)
Weiß nicht	167	14,9	2,5	(1,6 - 3,8)
<b>18/19</b>				
Häufiger	95	7,8	5,2	(4,2 - 6,3)
Normal	587	48,2	3,9	(3,5 - 4,3)
Seltener	389	31,9	3,3	(2,8 - 3,9)
Weiß nicht	148	12,1	4,6	(3,8 - 5,6)
<b>19/20</b>				
Häufiger	127	10,4	6,8	(5,7 - 8,1)
Normal	570	46,9	4,3	(4,0 - 4,8)
Seltener	354	29,1	3,7	(3,2 - 4,1)
Weiß nicht	165	13,6	3,8	(2,9 - 4,9)
<b>20/21</b>				
Häufiger	143	12,2	4,6	(3,8 - 5,5)
Normal	567	48,3	2,8	(2,5 - 3,2)
Seltener	324	27,6	2,4	(2,0 - 2,8)
Weiß nicht	141	12,0	3,4	(2,7 - 4,3)

### 1.3.5.7.2 Im Einwinterungsjahr begattete Königin („junge Königin“)

Die ImkerInnen wurden nach der Anzahl ihrer Völker mit junger Königin befragt, um zu sehen, ob sich die Überlebenschancen von Völkern mit einer jungen, das heißt in der Saison vor dem Einwintern begatteten Königin, im Vergleich zu Völkern mit einer älteren Königin unterscheiden.

Über die Umfragejahre ist der Anteil an jungen Königinnen beim Einwintern in Österreich konstant bei etwas über 50% (Tabelle 1.51).

Tabelle 1.51: Anteil an jungen Bienen Königinnen in Österreich. Zur Berechnung des Anteils an jungen Königinnen wurden nur TeilnehmerInnen herangezogen welche die Frage „Wie viele Ihrer eingewinterten Völker hatten eine im Jahr (2017, 2018, 2019, 2020) begattete („junge“) Königin?“ beantwortet haben.

Jahr	Völker [n]	Junge Königinnen [n]	Junge Königinnen [%]
2017/18	26.822	14.539	54,2
2018/19	32.748	17.119	52,3
2019/20	29.807	15.826	53,1
2020/21	28.828	15.534	53,9

Beim Vergleich der Austauschraten zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Jahr 2017/18 für Verlustaten ohne Königinnen Verluste. Im folgenden Jahr 2018/19 wurde eine signifikante höhere Verlustrate für die erste Prozentquartile 0-25% im Vergleich zur Gruppe 51-75% und 76-100% festgestellt. Zusätzlich gibt es im Jahr 2018/19 eine signifikant höhere Verlustrate für die Gruppe 26-50% im Vergleich zur Gruppe 76-100%. Im Jahr 2019/20 und 2020/21 ist die erste Gruppe 0-25% mit einer signifikant höheren Verlustrate als alle anderen Gruppen. Zusätzlich zeigt sich im Jahr 2019/20 die Gruppe 26-50% mit signifikant höherer Verlustrate als die Gruppe 51-75% (Abbildung 1.73 und Tabelle 1.52).

Betrachtet man Verluste nur anhand der „Unlösaren Königinnenprobleme“, ist eine signifikant höhere Verlustrate für die erste Gruppe mit 0-25% im Vergleich zu allen anderen Gruppen im Jahr 2018/19 festgestellt worden. Die anderen Umfragejahre zeigten keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 1.74 und Tabelle 1.53).

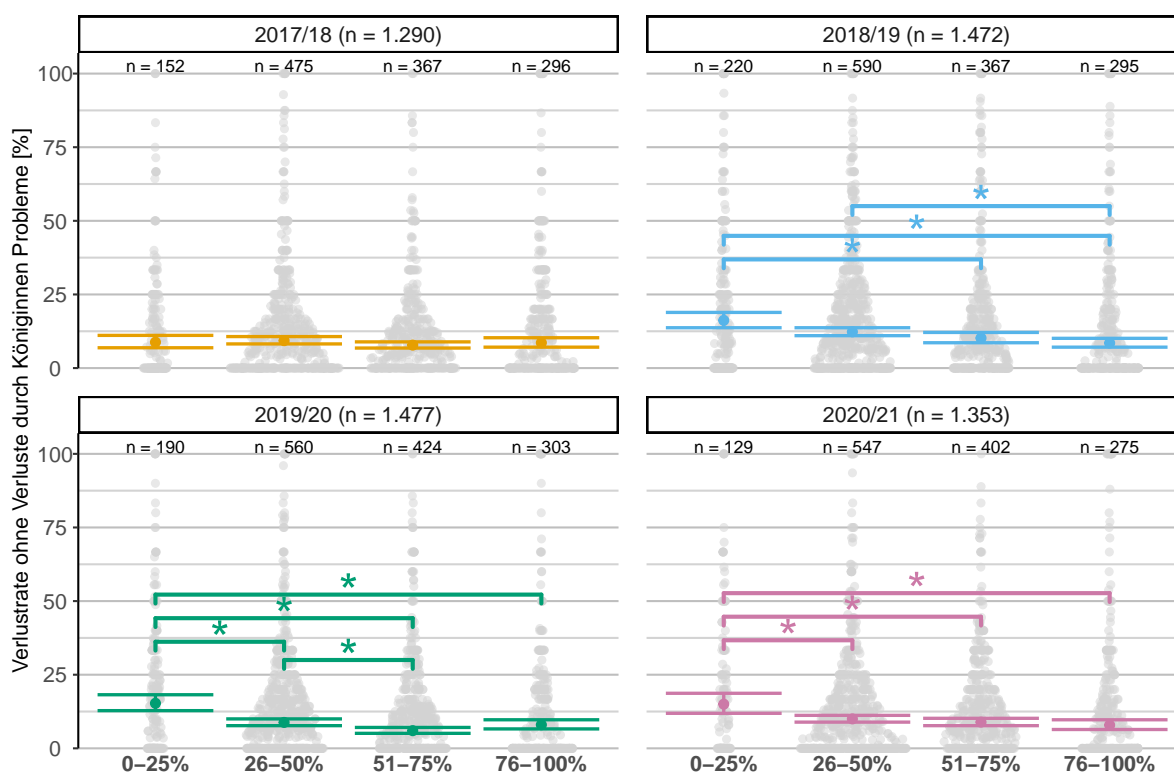


Abbildung 1.73: Höhe der Winterverluste, exklusive den Verlusten durch unlösbare Königinnenprobleme, in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit vom Prozentsatz „junger Königinnen“ pro Imkerei. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

Tabelle 1.52: Höhe der Winterverluste (exklusive den Verlusten durch unlösbare Königinnenprobleme.) in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten in Abhängigkeit vom Prozentsatz junger Königinnen pro Imkerei über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21.

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
0-25%	152	11,8	8,8	(6,9 - 11,1)
26-50%	475	36,8	9,3	(8,2 - 10,7)
51-75%	367	28,4	7,8	(6,8 - 8,9)
76-100%	296	22,9	8,6	(7,1 - 10,3)
<b>18/19</b>				
0-25%	220	14,9	16,2	(13,7 - 18,9)
26-50%	590	40,1	12,3	(11,0 - 13,7)
51-75%	367	24,9	10,2	(8,6 - 12,1)
76-100%	295	20,0	8,5	(7,1 - 10,1)
<b>19/20</b>				
0-25%	190	12,9	15,3	(12,8 - 18,2)
26-50%	560	37,9	8,8	(7,7 - 10,0)
51-75%	424	28,7	6,0	(5,1 - 7,1)
76-100%	303	20,5	8,0	(6,6 - 9,7)
<b>20/21</b>				
0-25%	129	9,5	15,0	(11,9 - 18,7)
26-50%	547	40,4	10,0	(8,9 - 11,2)
51-75%	402	29,7	8,9	(7,7 - 10,2)
76-100%	275	20,3	7,9	(6,4 - 9,7)

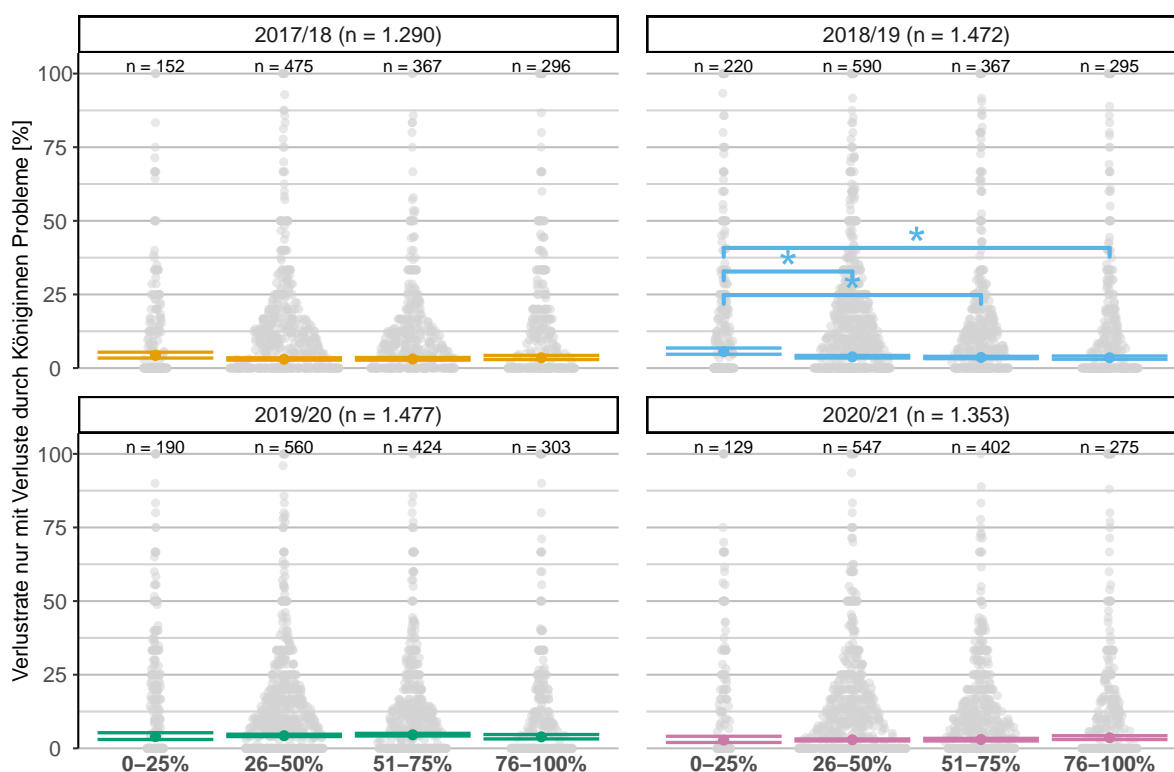


Abbildung 1.74: Höhe der Winterverluste, nur Verluste durch unlösbare Königinnenprobleme, in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit vom Prozentsatz „junger Königinnen“. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

Tabelle 1.53: Höhe der Winterverluste (nur Verluste durch unlösbare Königinnenprobleme) in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten in Abhängigkeit vom Prozentsatz junger Königinnen pro Imkerei über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21.

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
0-25%	152	11,8	4,3	(3,4 - 5,4)
26-50%	475	36,8	3,0	(2,7 - 3,5)
51-75%	367	28,4	3,1	(2,7 - 3,6)
76-100%	296	22,9	3,5	(2,9 - 4,3)
<b>18/19</b>				
0-25%	220	14,9	5,6	(4,7 - 6,8)
26-50%	590	40,1	3,8	(3,4 - 4,3)
51-75%	367	24,9	3,6	(3,2 - 4,0)
76-100%	295	20,0	3,5	(3,0 - 4,1)
<b>19/20</b>				
0-25%	190	12,9	4,0	(3,0 - 5,3)
26-50%	560	37,9	4,3	(4,0 - 4,8)
51-75%	424	28,7	4,6	(4,2 - 5,1)
76-100%	303	20,5	3,9	(3,2 - 4,7)
<b>20/21</b>				
0-25%	129	9,5	2,8	(2,0 - 4,1)
26-50%	547	40,4	2,9	(2,5 - 3,2)
51-75%	402	29,7	3,0	(2,5 - 3,4)
76-100%	275	20,3	3,6	(3,0 - 4,3)

### 1.3.5.8 Verkrüppelte Flügel

In der Erhebung wurde nach dem Auftreten von Bienen mit verkrüppelten Flügeln während der Sammelsaison gefragt. Nur eine geringe Anzahl an TeilnehmerInnen (1,3-2,2%) beobachteten diese „Häufig“ in den Umfragejahren von 2017/18 bis 2020/21. ImkerInnen die „Häufig“ angaben zeigten im Jahr 2017/18 eine signifikant höhere Verlustrate als die Gruppen „Wenig“, „Überhaupt nicht“ und „Weiß nicht“ und im selben Jahr hatten TeilnehmerInnen der Gruppe „Wenig“ eine signifikant höhere Verlustrate als die Gruppe „Überhaupt nicht“. Im Jahr 2019/20 wurde eine signifikant höhere Verlustrate für die Gruppe „Häufig“ im Vergleich zur Gruppe „Überhaupt nicht“ festgestellt. Die Gruppe „Weiß nicht“ zeigte im Vergleich zur Gruppe „Überhaupt nicht“ signifikant höhere Verlustraten in den Jahren 2017/18, 2019/20 und 2020/21 als die (Abbildung 1.75 und Tabelle 1.54).

Tabelle 1.54: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) und Anzahl der Antworten in Abhängigkeit von der Angabe wie häufig während der Sammelsaison Bienen mit verkrüppelten Flügeln in den Völkern bemerkt wurden über die Umfragejahre 2017/18 - 2020/21.

	Imkereien [n]	[%]	Verlustrate [%]	95% CI [%]
<b>17/18</b>				
Häufig	17	1,3	14,0	(7,8 - 23,8)
Wenig	415	31,0	12,5	(11,3 - 13,8)
Überhaupt nicht	802	59,9	10,7	(9,8 - 11,6)
Weiß nicht	66	4,9	16,5	(12,3 - 21,6)
keine Angaben	39	2,9	10,8	(7,3 - 15,5)
<b>18/19</b>				
Häufig	32	2,2	36,3	(26,7 - 47,0)
Wenig	448	30,5	16,8	(15,3 - 18,5)
Überhaupt nicht	898	61,0	13,5	(12,5 - 14,6)
Weiß nicht	67	4,6	17,6	(12,6 - 24,1)
keine Angaben	26	1,8	15,5	(9,0 - 25,4)
<b>19/20</b>				
Häufig	29	2,0	19,4	(12,9 - 28,2)
Wenig	431	29,7	12,6	(11,4 - 13,9)
Überhaupt nicht	898	61,8	11,5	(10,6 - 12,4)
Weiß nicht	55	3,8	17,3	(13,2 - 22,2)
keine Angaben	40	2,8	14,0	(8,4 - 22,3)
<b>20/21</b>				
Häufig	21	1,5	19,0	(11,1 - 30,5)
Wenig	460	33,6	13,6	(12,4 - 15,0)
Überhaupt nicht	814	59,5	11,4	(10,4 - 12,4)
Weiß nicht	55	4,0	19,4	(14,0 - 26,3)
keine Angaben	18	1,3	14,0	(7,5 - 24,5)



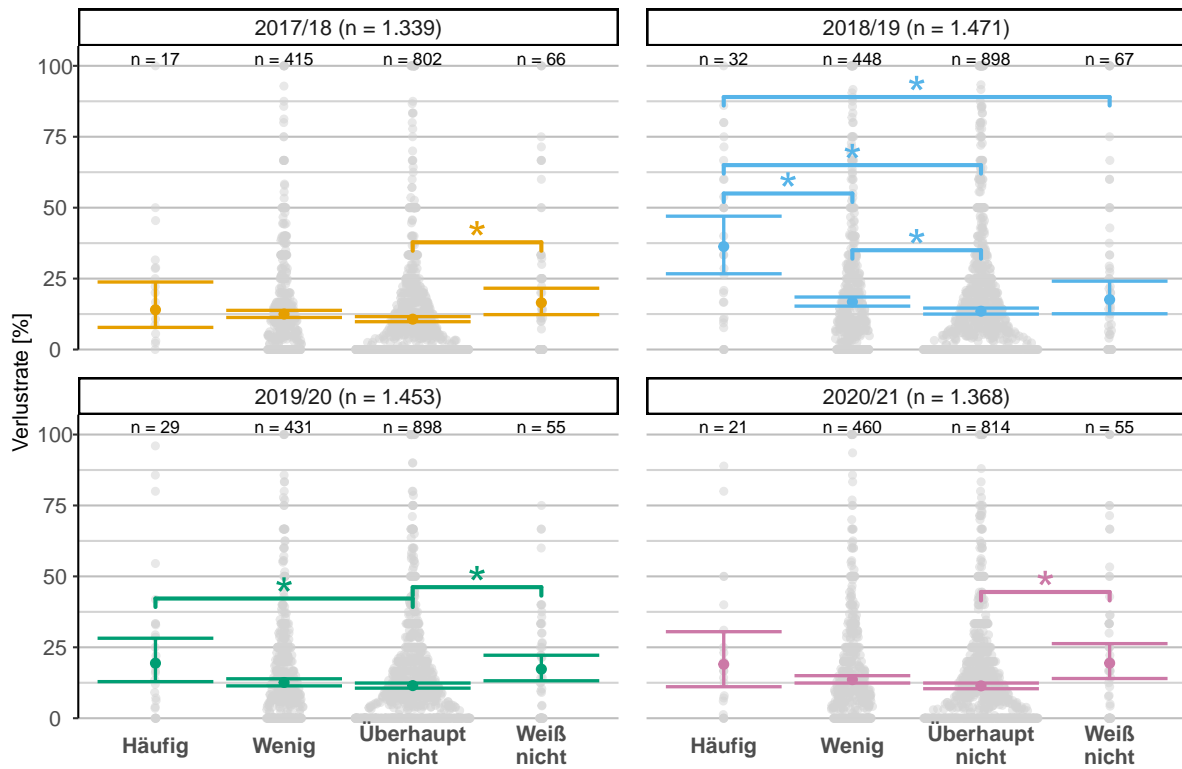


Abbildung 1.75: Höhe der Winterverluste in Prozent (und 95% CI) in Abhängigkeit von der Angabe wie häufig während der Sammelsaison Bienen mit verkrüppelten Flügeln in den Völkern bemerkt wurden. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Graue Punkte kennzeichnen Verlustrate auf Betriebsebene.

### 1.3.6 Möglichen Risikofaktoren im Überblick

Sich wiederholende signifikante Unterschiede über mehrere Jahre sind statistisch höher gewichtet zu betrachten, aber auch einmalige Ergebnisse könnten in Zusammenhang mit nicht untersuchten jährlichen abiotischen oder biotischen Faktoren stehen. In der folgenden Übersicht, siehe Tabelle 1.55, sind die Ergebnisse in einer Tabelle zusammengefasst. Im Jahr 2018/19 wurden die meisten signifikanten Ergebnisse festgestellt und dieses Jahr zeigte auch die höchste Verlustrate über die Untersuchungsjahre (Abbildung 1.7).

Tabelle 1.55: Übersicht der analysierten Risikofaktoren auf die Wintersterblichkeit. Symbole kennzeichnen statistische Ergebnisse: ▲ - signifikanter Unterschied festgestellt, ○ - kein signifikanter Unterschied.

Faktor	Umfragejahr				Kurzbeschreibung	Abb.
	17/18	18/19	19/20	20/21		
Anonymität	○	▲	○	○	„Anonyme“ TeilnehmerInnen höhere Verlustrate	1.3
Teilnahmeart	○	○	▲	○	Teilnahmeart „Zeitschrift“ höhere Verlustrate	1.4
Seehöhe	○	▲	▲	○	Unterschiede zwischen Seehöhe des Überwinterungsstandes	1.15
Betriebsgröße	▲	▲	▲	▲	Kleinere Betriebe höhere Verlustraten	1.16
<b>Betriebsweise</b>						
Zert. Bio Imkerei	○	○	○	○		1.18
Wanderimkerei	○	▲	▲	○	„WanderimkerInnen“ geringere Verlustraten	1.19
Zucht aus Varroa-Toleranz	○	○	○	○		1.20
Kunststoff-Beuten	○	○	○	○		1.21
Isolierte Beuten	○	○	○	○		1.22
Offener Gitterboden	○	○	○	○		1.23
Fremdwachs	○	▲	▲	▲	Höhere Verlustraten wenn „Fremdwachs“ eingesetzt wurde	1.24
Naturwabenbau	○	○	○	○		1.25
Kleine Brutzellen	○	○	▲	○		1.26
Vereinigung Völker	-	-	○	○		1.27
Wabenhygiene	○	○	○	○		1.28
<b>Trachtangebot</b>						
Raps	▲	○	○	○	Höhere Verlustraten bei Tracht	1.30
Sonnenblume	▲	○	○	○	Höhere Verlustraten bei Tracht	1.32
Mais	▲	▲	▲	○	Höhere Verlustraten bei Tracht	1.34
Spätblühende Zwischenfr.	○	○	○	○		1.36
Waldtracht	▲	○	▲	○	Geringere Verlustraten bei Tracht	1.38
Melezitose	○	○	○	○		1.40
<b>Behandlungsmethoden</b>						
Bestimmung Varroabefall	○	▲	○	○	Geringere Verlustraten bei Bestimmung	1.43
Ameisensäure - Kurzzeit	○	○	○	○		1.48
Ameisensäure - Langzeit	○	○	○	○		1.50
Biotechn. Methoden	○	▲	○	○	Geringere Verlustraten bei Verwendung	1.52
Chemische Methoden <sup>1</sup>	○	▲	○	▲	Geringere Verlustraten bei Verwendung	1.54
Drohnenbrutentnahme	▲	▲	▲	○	Unterschiede zwischen den Anwendungen	1.56
Hyperthermie	○	○	○	○		1.58
Milchsäure	▲	○	○	○	Höhere Verlustraten bei Verwendung	1.60
Oxalsäure - Mischung	○	○	▲	▲	Unterschiede zwischen den Anwendungen	1.62
Oxalsäure - Träufeln	▲	○	○	○	Höhere Verlustraten bei Verwendung	1.64
Oxalsäure - Verdampfen	▲	○	○	▲	Geringere Verlustraten bei Verwendung	1.66
Thymol	○	○	▲	▲	Höhere Verlustraten bei Verwendung	1.68
Königinnenprobleme <sup>2</sup>	▲	▲	○	▲	Unterschiede in den Verlustraten	1.71
Königinnenprobleme <sup>3</sup>	▲	▲	▲	▲	„Häufiger“ mit höherer Verlustrate	1.72
Junge Königinnen <sup>2</sup>	○	▲	▲	▲	Geringerer Anteil mit höheren Verlustraten	1.73
Junge Königinnen <sup>3</sup>	○	▲	○	○	Geringerer Anteil mit höheren Verlustraten	1.74
Verkrüppelte Flügel	▲	▲	▲	▲	Unterschiede in den Verlustraten	1.75

<sup>1</sup> Amitraz (Verdampfen und in Streifen, Apivar, Apitraz), Coumaphos (Checkmite+), Coumaphos (Perizin), Flumethrin (Bayvarol), Tau-fluvalinat (Apistan) oder andere chemische Produkte

<sup>2</sup> Verlustrate ohne Verluste durch Königinnen Probleme

<sup>3</sup> Verlustrate nur mit Verluste durch Königinnen Probleme

## 1.4 Diskussion

Die Erhebung der Winterverluste von Bienenvölkern in Österreich wird seit 2008 vom Institut für Biologie (vormals: Zoologie) der Karl-Franzens-Universität Graz durchgeführt. In diesem Endbericht von „Zukunft Biene 2“ werden die Ergebnisse der Untersuchungsjahre 2017/18 bis 2020/21 im Detail dargestellt. Die laufende mittlere Verlustrate aller bisher in Österreich erhobenen Winterverlusten liegt bei 15,8%. Die letzten vier Jahre waren durchschnittlich bei einer mittleren Verlustrate von 13,0%. Im Jahr 2017/18 war die Verlustrate, in den Untersuchungsjahren, mit 11,8% am geringsten und im Folgejahr 2018/19 am höchsten mit 15,2%. Die durchschnittliche TeilnehmerInnen Anzahl lag über die vier Jahre bei 1.467, was einer prozentualen Beteiligung von circa 5% aller österreichischen Imkereibetriebe entspricht. Diese stellten insgesamt Information über 28.373-33.651 eingewinterte Bienenvölker zur Verfügung, was wiederum 7,0-9,0% aller in Österreich gehaltenen Bienenvölker entspricht. Die Anzahl an gemeldeten ImkerInnen und Bienenvölkern, siehe 1.2, ist annähernd dem beziehungsweise übersteigt sogar wieder den ursprünglichen Höchstwert vom Jahr 1990 mit 30.802 ImkerInnen und 457.061 Völkern. Somit ist der langjährige Rückgang an Imkereibetrieben (Brodschneider und Crailsheim, 2011), nicht mehr zu beobachten.

Die bisher niedrigste in dieser Erhebung gemessene Verlustrate lag bei 8,1% (95% CI: 7,4-8,8%) (im Winter 2015/16) und die bisher höchste gemessene Verlustrate bei 28,4% (95% CI: 27,0-29,9%) (im Winter 2014/15). Diese großen zeitlichen Schwankungen und lokalen Unterschiede in den Verlusten, deren genaue Ursachen größtenteils noch unverstanden sind, machen die große Bedeutung des Bienen-Monitorings und der anschließenden Ursachenforschung deutlich. Eine internationale Vergleichbarkeit der erhobenen Daten wird, durch die vom Forschungsnetzwerk COLOSS festgelegten Fragen ermöglicht (Zee et al., 2013; Brodschneider et al., 2016, 2018b). Diese Art der Untersuchung ist ein Hilfsmittel und eine Datenbasis, den Ursachen hoher Winterverluste auf den Grund zu gehen. Die temporären Trends und Erkenntnisse der freiwilligen Umfrage sollen zusätzlich durch gezielte Probenentnahmen beziehungsweise Untersuchungen ergänzt werden um aussagekräftige Ergebnisse zu erlangen (Zee et al., 2015).

### 1.4.1 Populationsdynamik in Österreich

Anhand der Modellparameter Völkerstand Frühjahr, Anzahl der eingewinterten Völker und Winterverlustrate wurde eine hypothetische Populationsdynamik der Bienenvölker vom Frühjahr 2013 bis zum Frühjahr 2021 simuliert (Abbildung 1.8). Dabei zeigt sich, dass eine Vermehrung über den Sommer, etwa durch eigene Nachschaffung oder Zukäufe, eine konstante, sogar steigende, Bienenpopulation in Österreich ermöglicht. Besonders die letzten vier Jahre zeigen einen kontinuierlichen linearen Anstieg der eingewinterten, aber auch ausgewinterten Völker. Dieser Anstieg ist dadurch zu erklären, dass die Zuwachsrate im Sommer jedes Jahr höher war als notwendig gewesen wäre für einen Ausgleich der Winterverluste und somit konnten die ImkerInnen auch eine größere Anzahl an Bienenvölkern im folgenden Herbst einwintern. Nur im Jahr 2014/15 mit sehr hohen Winterverlusten waren die ImkerInnen nicht in der Lage die verlorenen Bienenvölker über den Sommer wieder zu kompensieren.

Unser Modell ist aber nur begrenzt gültig, da in der Umfrage nur aktive ImkerInnen teilnehmen. TeilnehmerInnen die zum Beispiel durch hohe Winterverluste die Imkerei aufgegeben haben sind nicht einberechnet. Je nach Höhe der Winterverluste sind von den ImkerInnen dementsprechend Zeit und Geld zu investieren, um eine zum Vorjahr vergleichbare Population aufzubauen beziehungsweise zu erhalten. Eine Untersuchung anhand der Winterverlustdaten vom Umfragejahr 2016/17 berechnete den direkten ökonomischen Schaden durch schwache und verlorene Bienenvölker auf circa 32 Millionen Euro in Österreich, dieser Wert inkludiert nicht möglicher indirekte Kosten wie der Bestäubungsleistung (Popovska Stojanov et al., 2021). Die Arbeit und Kosten für die Nachschaffung werden dabei vorwiegend von Kleinimkereien, welche den Großteil der Bienenpopulation in Österreich betreuen, getragen. Die ökonomischen Abschätzungen dieser Leistungen

zum Erhalt einer starken Bienenpopulation und einer regionalen Versorgung von Lebensmitteln sollten für eine nachhaltige Entwicklung des Imkereisektors berücksichtigt werden.

### 1.4.2 Repräsentativität und Anonymität

Die in diesem Bericht präsentierten Ergebnisse beruhen auf den Angaben der österreichischen ImkerInnen. Um eine möglichst große Beteiligung der ImkerInnen zu erreichen, wurde sowohl online, in der Fachzeitschrift „Bienen Aktuell“, bei Veranstaltungen als auch über bereits bestehende Kontakte (zum Beispiel nicht anonyme Teilnehmer vorheriger Studien) zu einer Teilnahme an unserer Untersuchung aufgerufen. Diese über Jahre etablierten Kontakte helfen, eine nahezu vollständige Abdeckung an Rückmeldungen von einzelnen Gemeinden und Imkervereinen zu erhalten. Um möglichst klare und eindeutige Antworten zu erhalten, wurden die Fragen bewusst einfach gestaltet. Den Großteil der Antworten haben wir online erhalten, der Anteil ist in den letzten vier Jahren um circa 12% auf 91,3% gestiegen. Wohingegen der Anteil derer, die den Fragebogen aus der Zeitschrift „Bienen Aktuell“ retournieren oder mittels Papierfragebogen teilnehmen über die letzten Jahre immer geringer geworden ist. Im Untersuchungsjahr 2019/20 gab es vermehrt Rückmeldungen aus der Zeitschrift „Bienen Aktuell“. Eine mögliche Erklärung für die höhere Teilnahme mittels Zeitschrift in diesem Jahr könnte ein Nebeneffekt durch die Corona-bedingte Quarantäne im Frühjahr gewesen sein. TeilnehmerInnen hatten vielleicht mehr Interesse und Zeit für die Zeitschrift und dabei auch dem Fragebogen mehr Beachtung geschenkt.

Im Jahr 2019/20 gab es einmalig einen signifikanten Unterschied der Verlustraten zwischen den Erfassungsmodi, hierbei hatten TeilnehmerInnen mittels Kurzfragebogen aus der Zeitung eine erhöhte Wahrscheinlichkeit mehr Winterverluste zu erfahren verglichen mit den Online-TeilnehmerInnen. Da wir mit dem Umfragebogen in der Zeitschrift auch Personengruppen ohne Internetzugang ansprechen wollen, könnte dies auf ein Problem in der Repräsentativität hindeuten. Stichprobenuntersuchungen von anderen Studien, die ebenfalls die Winterverluste erhoben haben, zeigen aber, dass unsere jährlichen Verlustanalysen mit dem gewählten Konfidenzintervall bis dato immer repräsentativ waren (Crailsheim et al., 2018-Modul 3a, Morawetz et al., 2019). Trotz der mittlerweile sehr geringen Teilnahme mittels Zeitschriften-Fragebogen, ist unser Ziel diese Möglichkeit der Teilnahme beizubehalten. Der Zeitschriftenartikel dient parallel als Werbung für die Onlineumfrage um eine möglichst große Reichweite zu erzielen aber soll auch ImkerInnen ohne Internetzugang die Chance zur Teilnahme ermöglichen (Zee et al., 2013).

Grundlegend kann die Teilnahme entweder anonym oder nicht-anonym, durch das Hinterlassen von Kontaktdaten, erfolgen. Der Grund dafür ist nicht nur die Minimierung an gesammelten persönlichen Daten, sondern auch ImkerInnen zur Teilnahme zu motivieren die lieber anonym bleiben möchten, zum Beispiel wenn sie sehr hohe Verluste erfahren haben oder keine Details zu ihrem Betrieb preisgeben möchten. Über die vier Untersuchungsjahre zeigt sich, dass circa doppelt so viele ImkerInnen freiwillig Kontaktdaten hinterlassen im Vergleich zu TeilnehmerInnen die lieber anonym bleiben. Was zum einen von Vertrauen in die Untersuchung zeugt, uns aber auch die Möglichkeit gibt bei Unklarheiten nachzufragen. Signifikante Unterschiede in den Winterverlusten gab es einmalig im Jahr 2018/19. Hier hatten anonyme TeilnehmerInnen signifikant höhere Verlustraten (Abbildung 1.3).

Die durchschnittliche Völkeranzahl in den letzten vier Untersuchungsjahren der teilnehmenden Imkereien liegt zwischen 20 und 22 eingewinterten Völkern, was etwas mehr ist als der in Österreich, aufgrund der Angaben der „Biene Österreich“, erwartete Mittelwert (13 Völker/Imkerei). Dazu trägt die jährliche Teilnahme von 36-50 großen Imkereien mit jeweils über 100 eingewinterten Völkern bei. Der Median der eingewinterten Völkerzahlen liegt bei 10 bis 11 eingewinterten Völkern, was der erwarteten österreichischen Imkerei-Demographie durchaus entspricht. Auch daraus und durch die Verteilung der teilnehmenden

Imkereien über ganz Österreich (Abbildung 1.6) folgern wir, dass die dieser Auswertung zugrundeliegenden Daten einer durchmischten und annähernd repräsentativen Gruppe der österreichischen Imkereien entstammen.

### 1.4.3 Bundesländer und Bezirke

Über die Umfragejahre zeigte das Bundesland Niederösterreich in drei Untersuchungsjahren eine signifikant höhere Winterverlustrate als zumindest ein anderes Bundesland. Auch Wien zeigte in drei Jahren höhere Winterverlustraten als andere Bundesländer und im Jahr 2019/20 auch signifikant höhere Verlustraten als die österreichische Gesamtverlustrate. Auf der anderen Seite zeigte das Bundesland Steiermark meist geringere Verlustraten (Abbildung 1.9). Diese Variation zwischen den Bundesländern konnte auch in vorherigen Winterverlust-Analysen festgestellt werden (Crailsheim et al., 2018; Oberreiter und Brodschneider, 2020).

Hierbei handelt es sich nicht um ein österreichisches Phänomen es findet sich auch in anderen Ländern wie Tschechien oder den USA wieder, wo verschiedene Regionen abweichende Verlustraten zeigen (vanEngelsdorp et al., 2008; vanEngelsdorp et al., 2010; Brodschneider et al., 2019a). Eine mögliche Erklärung hierfür zeigen drei österreichische Studien in denen ein Zusammenhang zwischen Wetter (Switanek et al., 2017; Becsi et al., 2021) bzw. Landnutzung (Kuchling et al., 2018) und Winterverlusten festgestellt wurde. Die Landnutzung betreffend wurde festgestellt, dass semi-natürliche Regionen, Weiden und Nadelwälder einen positiven Effekt auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Bienenvölker hatten. Auch die Dichte an Bienenvölkern in einem Gebiet könnte hier eine Rolle spielen, hierbei zeigt eine hohe Dichte mehr Potential zur horizontalen Verbreitung von Krankheitserregern (Fries und Camazine, 2001; Seeley und Smith, 2015; Forfert et al., 2016; Dynes et al., 2019; Bartlett et al., 2021; Kulhanek et al., 2021).

Die Analyse der unterschiedlichen Bezirke zeige in manchen Gebieten ein Potenzial für hohe Winterverluste (Tabellen 1.56 bis 1.64). Aus Gründen des Datenschutzes und der Repräsentativität werden nur jene Bezirke aufgelistet, bei denen mindestens Daten von fünf Imkereien zur Verfügung stehen. Hierbei zeigt sich, dass Bezirke mit besonders hohen Verlusten meistens im Folgejahr keine auffällig höheren Verluste verzeichnen. Eine unrühmliche Ausnahme mit hoher Winterverlustrate in zwei aufeinander folgenden Jahren sind die Bezirke Amstetten im Jahr 2018/19 und 2019/20 und Neunkirchen im Jahr 2019/20 und 2020/21 in Niederösterreich. Einmalige hohe Verluste auf Bezirksebene waren im Jahr 2017/18 im Bezirk St. Johann im Pongau (Salzburg) festgestellt worden, im Jahr 2018/19 für Kirchdorf (Oberösterreich) und Hollabrunn (Niederösterreich). Im letzten Jahr 2020/21 zeigten die Stadtbezirke Graz (Steiermark), Klagenfurt Stadt (Kärnten) und Linz Stadt (Oberösterreich) höhere Verluste. Die Bezirksergebnisse sollten aber mit Vorsicht angesehen werden, da durch die geringe Stichprobenanzahl auch die Konfidenzintervalle sehr breit werden und unser Modell zur Berechnung hierfür nicht optimal ist. Anhand der Bezirkskarte (Abbildung 1.11) kann man aber Regionen erkennen in denen mehrere angrenzende Bezirke hohe beziehungsweise niedrige Verluste erfahren hatten. Dies könnte, wie bereits oben angeführt, unter anderem durch unterschiedliche Landnutzung erklärt werden (Kuchling et al., 2018).

#### 1.4.3.1 Seehöhe

Ein weiterer Faktor, der die Verlustraten in den unterschiedlichen Regionen widerspiegeln könnte, ist die Seehöhe. Hier konnte in zwei Umfragejahren (2018/19 und 2019/20) ein epidemiologischer Zusammenhang zwischen dem Überwinterungserfolg von Bienenvölkern und der Seehöhe des Haupt-Überwinterungsbienensandes nachgewiesen werden. Es zeigten sich signifikant höhere Verlustwahrscheinlichkeiten für TeilnehmerInnen im Bereich zwischen 201-400m verglichen mit ImkerInnen zwischen 401-600m und ImkerInnen die über 800m überwintert haben (Abbildung 1.15). Ein möglicher Grund könnten die klimatischen Unterschiede sein, wie auch eine österreichische Studie aufgezeigt hat, bei der geringere Überwinterungsverluste zu

erkennen waren je kälter die mittleren Temperaturen im September waren (Switanek et al., 2017). Kältere Temperaturen und Klima haben Auswirkungen auf die Vegetation und machen sich in höheren Lagen durch einen verspäteten Brutbeginn und früherer Brutfreiheit bemerkbar. Dadurch verkürzt sich die Zeitspanne, in der sich die Varroamilbe in der Brut vermehren kann. Weitere Gründe könnten die unterschiedliche Landnutzung sein (Kuchling et al., 2018) und die geringere Dichte an Bienenvölkern, was wiederum zu einer geringeren Verbreitung von Krankheitserregern führt (Fries und Camazine, 2001; Seeley und Smith, 2015; Forfert et al., 2016; Dynes et al., 2019).

#### 1.4.4 Symptome

Einen wichtigen Teil der Winterverlusterhebungen bildet die Auswertung der Symptome der in Österreich verstorbenen Bienenvölker, über die wir anhand dieser Untersuchung detaillierte Informationen erhalten haben (Abbildung 1.12). Durch diese Daten können die Ursachen für die Winterverluste, wenn auch nicht klar einer einzelnen Ursache zugeordnet, so zumindest doch eingegrenzt und näher erforscht werden. Der Symptomkatalog wurde dabei bewusst einfach gewählt, um den ImkerInnen eine eindeutige Zuordnung ohne Hilfsmittel wie Laboruntersuchungen zu erleichtern. Auch bei demselben Schadbild können noch immer unterschiedliche Gründe hinter einem Völkerverlust stecken. Außerdem gilt es zu berücksichtigen, dass zwischen dem Auftreten des Verlustes und der Symptombeschreibung durch ImkerInnen ein beträchtlicher Zeitraum liegen kann, in dem Spuren, wie tote Bienen vor dem Volk, verschwinden können und daher nicht mehr eindeutig zuordenbar sind.

Eines der eindeutig einer Ursache zuordenbare Symptom ist das Vorhandensein von toten Bienen, die mit dem Kopf voran in Zellen stecken. Bei gleichzeitigem Mangel an Futter im Volk kann dieses Schadbild als Verhungern gedeutet werden. Dabei gilt es zwei unterschiedliche Formen zu unterscheiden: Zum einen der bereits erwähnte Futtermangel, zum anderen aber auch noch verbliebene Futterreserven, die den Bienen von der Wintertraube aus, wegen widrigen Umständen, nicht zugänglich ist. Im Vergleich zeigt sich, dass im Winter 2017/18 und 2020/21 die Symptome für klassisches Verhungern „c) hatten tote Bienen in Zellen, und kein Futter im Stock (verhungert)“ und Futterabriss „d) hatten tote Bienen in Zellen, aber genug Futter im Stock (Futter nicht erreicht)“ zu den anderen Jahren häufiger war. Besonders das Symptom eines Futterabbrisses war im Jahr 2017/18 besonders hoch. Die vorangegangenen Untersuchungen zeigen ähnliche Ergebnisse und die relative Häufigkeit des Symptome für Verhungern anhand von Futtermangel liegt über die Jahre zwischen 5-10% (Crailsheim et al., 2018). Im Umfragejahr 2018/19 meldete ein Vergleichsweise hoher Anteil der TeilnehmerInnen das Symptom „a) hatten viele tote Bienen im oder vor dem Volk“ und in diesem Jahr wurden auch in absoluten Zahlen die meisten Symptome gemeldet. In allen Jahren war prozentual, dass am meisten angegeben Symptom „b) hatten keine oder nur wenige tote Bienen im oder vor dem Volk“, wobei besonders häufig dieses Symptom im Umfragejahr 2019/20 gemeldet wurde. Dieses Symptom war auch in den vorangegangenen Untersuchungen am häufigsten (Crailsheim et al., 2018). Dieses Symptom ist unspezifisch, und kann unterschiedlichste Ursachen haben. Dieses Schadbild wurde auch als charakteristisch für CCD beschrieben und in den USA aber auch in Europa (Dainat et al., 2012) in den letzten Jahren häufig beobachtet (vanEngelsdorp et al., 2008; vanEngelsdorp et al., 2009; Williams et al., 2010; Steinhauer et al., 2014). Nicht zuordenbare oder unbekannte Symptome wurden in den Untersuchungsjahren nur selten gemeldet (Crailsheim et al., 2018). Dadurch können wir erkennen, dass unser einfach gestaltete Symptomkatalog die meisten Fälle abdeckt und TeilnehmerInnen die Symptome leicht erkennen bzw. zuordnen können (Abbildung 1.12).

#### 1.4.5 Betriebsgröße

Der Großteil der ImkerInnen betreibt die Imkerei als reines Hobby mit durchschnittlich 1-50 Völkern. Es gibt aber auch eine geringe Anzahl an professionellen Betrieben, die einen großen Anteil der Völker in Österreich

besitzen (Abbildung 1.5), was sich auch in unserer Untersuchung in der Verteilung der Betriebsgrößen widerspiegelt. Der Faktor Betriebsgröße in der Risikoanalyse ist als Sammelfaktor zu verstehen, der unterschiedlichste, im Detail nicht näher abgefragte, Parameter wie Professionalität, Erfahrung in der Imkerei etc. beinhaltet. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in einer anderen Studie aus Österreich wider (Morawetz et al., 2019).

Über die Umfragejahre zeigen kleinere Betriebe mit 1 bis 20 Bienenvölker eine Wahrscheinlichkeit für signifikant höhere Verlustraten als größere Betriebe (Abbildung 1.16). Hierbei handelt es sich mittlerweile um konstante, wiederholt aufgetretene Ergebnisse in Österreich wie auch im internationalen Vergleich (Zee et al., 2014; Brodschneider et al., 2016, 2018b; Crailsheim et al., 2018; Gray et al., 2020). International, zum Beispiel in den USA, sind in bestimmten aber nicht allen Untersuchungsjahren bei steigender Betriebsgröße geringere Winterverluste festgestellt worden. Die an der Untersuchung teilnehmenden ImkerInnen wurden dort anhand der Anzahl ihrer Völker in drei Kategorien eingeteilt: „backyard beekeepers“ (<50 Völker), „sideline beekeepers“ (51-500 Völker) und „commercial beekeepers“ (>500 Völker). Als Ursache für die Unterschiede in den Verlustraten werden mehrere Faktoren diskutiert. Es wird zum Beispiel ein Einfluss der Betriebsgröße auf die Betreuungsqualität der Völker angenommen: „Commercial beekeepers“ zeigen oft mehr technisches Wissen in der Krankheits- und Schädlingsbekämpfung — insbesondere bei der Bekämpfung der Varroamilbe — als „backyard beekeepers“, welche die Bienenhaltung nicht gewerbsmäßig betreiben (Lee et al., 2015). Auch die Wahl der Methode und die Qualität der verwendeten Bekämpfungsmaßnahmen könnte in Abhängigkeit von der Betriebsgröße eine andere sein (Thoms et al., 2019; Underwood et al., 2019). Diese Argumente lassen sich möglicherweise eingeschränkt auch auf die österreichischen Imkereien übertragen, auch wenn hier Betriebe mit über 500 Völkern eher die Ausnahme bilden.

#### 1.4.6 Betriebsweisen

Seit 2016/17 wird auch der Einfluss der verschiedenen Betriebsweisen, zum Beispiel: Bio-Imkerei, kleine Brutzellen, Beutenisolierung und neu seit 2019/20 ob schwache (weiselrichtige) Völker vor dem Winter vereinigt wurden, auf die Winterverlustrate getestet (Kapitel: 1.3.5.3.1-1.3.5.3.10). Mögliche Antwortmöglichkeiten zu den verschiedenen Betriebsweisen waren: „Ja“, „Nein“, „Unsicher“, „keine Angaben“. In der Analyse der Verlustraten wurde hierbei nur auf die Antworten „Ja“ und „Nein“ eingegangen. Es ist auch zu beachten, dass es mögliche Abhängigkeiten zwischen den Kategorien und der Betriebsgröße gibt, die in der Verlustratenanalyse nicht beachtet wurde (Abbildung 1.17).

##### 1.4.6.1 Zertifizierte Bio-Imkerei

Ob ein Imkereibetrieb in unserer Umfrage eine „Zertifizierte Bio-Imkerei“ war oder nicht hatte keinen statistischen Einfluss auf den Überwinterungserfolg (Abbildung 1.18). Im Vergleich dazu zeigte die Umfrage von „Zukunft Biene 1“ im Jahr 2016/17 eine signifikant geringere Verlustrate für zertifizierte Bio-Imkereien (Crailsheim et al., 2018). Der prozentuelle Anteil an Bio-Imkereien war recht konstant bei circa 12% über die Umfragejahre (Tabelle 1.15).

Als „Zertifizierte Bio-Imkerei“ verstehen wir Imkereien die zumindest laut den Mindeststandards der EU (European Organic Regulation, EC No. 834/2007, 889/2008) für Biokontrollstellen zertifiziert sind. Die Hauptunterschiede für Bio-Imkereien sind die Verpflichtung nur bio-zertifizierten Zucker/Sirup zum Füttern einzusetzen, das Verbot des Einsatzes von synthetischen Mitteln zur Schädlingsbekämpfung (zum Beispiel Varroamilbe) sowie die Verpflichtung zum Einsatz von bio-zertifiziertem Wachs (Thrasyvoulou et al., 2015). Die Umwelt und Landnutzung im Einzugsgebiet der Bienenstände könnte, wie bereits im Punkt Bundesländer und Bezirke erwähnt, einen Einfluss auf die Winterverluste haben (Kuchling et al., 2018). Diese Vorgabe ist aber nur unzureichend in der Regulierung ausgeführt und kann von den Biokontrollstellen

unterschiedlich interpretiert werden. Das gleiche gilt für Kontamination von Wachs (Thrasylvoulou et al., 2015). Anhand dieser Ausführungen, und da nur ein geringer Teil an TeilnehmerInnen angegeben hat synthetische Mittel gegen die Varroamilbe einzusetzen (Tabelle 1.32), können wir schlussfolgern, dass der Hauptunterschied zwischen „Zertifizierter Bio-Imkerei“ und „Imkerei ohne Zertifikat“ in unserer Umfrage die Fütterung und die Qualität des Wachses betrifft. Eine Zertifizierung könnte vielleicht auch auf eine gewisse Professionalität hinweisen, da die Zertifizierung selbst mit einem mehr an Arbeitszeitaufwand und auch Kosten verursacht.

#### 1.4.6.2 Wanderimkerei

Die an unserer Studie teilnehmenden ImkerInnen wurden gefragt, ob sie ihre Bienen zu Trachtquellen oder Bestäubungseinsätzen transportieren (Verbringungen im Zuge der Zucht oder Ablegerbildung sind damit exkludiert). In den Jahren 2018/19 und 2019/20 hatten ImkerInnen die mit ihren Völkern zu Trachtangeboten wanderten signifikant geringere Winterverluste (Abbildung 1.19). Dieses Phänomen der unterschiedlichen Winterverlusten bei WanderimkerInnen über die Jahre wurde schon öfters beobachtet, auch im internationalen Vergleich (Brodschneider et al., 2010, 2018b; Crailsheim et al., 2018; Gray et al., 2020). Der geringere Verlust könnte mit der besseren Erfahrung der WanderimkerInnen im Gegensatz zu StandimkerInnen erklärt werden. Aber auch durch eine verbesserte Nahrungsversorgung über das Jahr oder bei Trachtlücken, obwohl der Transport von Bienenvölkern durchaus Stress für die Bienen bedeuten könnte (Zee et al., 2014). Da dieser Faktor nicht jedes Jahr einen statistischen Unterschied ausmacht, wäre es denkbar, dass hier auch andere Faktoren in Kombination mit Wanderimkerei eine Wirkung zeigen.

#### 1.4.6.3 Bienen aus Zuchtprogramm für Varroatoleranz

ImkerInnen mit Königinnen aus einer „Zucht auf Varroa-Toleranz“ zeigten keinen signifikanten Unterschied in den Verlusten zu denen ohne einer speziellen Zuchtlinie. Hierbei muss man erwähnen, dass die Anzahl der TeilnehmerInnen mit „Bienen aus Zuchtprogramm für Varroatoleranz“ aber äußerst gering ist mit circa 5,0 bis 6,4%. Natürliche Abwehrmechanismen von westlichen Honigbienen gegen die parasitierende Varroamilbe wurden bereits sehr früh gefunden (Ruttner et al., 1984). Mondet et al., 2020a konnten in einer europäischen Studie an 414 Bienenvölkern, verteilt auf 13 Ländern, im Jahr 2015 und 2016 bei mehreren Völkern eine verringerte Reproduktionsrate der Varroamilben finden. Besonders ausgeprägt war dieses Phänomen, was auch als SMR (Suppressed Mite Reproduction) bezeichnet wird, bei Völkern die selektiv auf VSH (Varroa Sensitive Hygiene) gezüchtet wurden. Erfolgreiche Feldversuche von solchen Zuchtlinien zeigen die Möglichkeit der selektiven Züchtung auf dieses Verhalten (Ibrahim et al., 2007; Le Conte et al., 2020; Mondet et al., 2020a). Der große Erfolg ist aber bis jetzt ausgeblieben, was mit einer komplizierten und mitunter unbekanntem Ausbildung und Vererbung dieses Verhaltens, Populationsdynamiken und einer Interaktion mit ökologischen Umgebungsfaktoren sowie anderen noch unerforschte Faktoren zusammenhängen könnte (Guichard et al., 2020; Mondet et al., 2020a,b). Kontraproduktiv in diesem Zusammenhang ist die in Europa häufig hohe Dichte an Bienenvölkern auf einzelnen Ständen und in einzelnen Regionen, welche wahrscheinlich zu einer erhöhten Übertragung von Krankheiten und Varroa führt (Fries und Camazine, 2001; Seeley und Smith, 2015; Forfert et al., 2016; Dynes et al., 2019; Kulhanek et al., 2021). Um das fehlende Gleichgewicht zwischen Wirt und Parasit herzustellen, wie es unter natürlichen Umständen und in unberührten Regionen herrscht (Seeley, 2007), wird von verschiedenen Autoren ein darwinistisches Prinzip propagiert, um eine natürliche gerichtete Selektion wieder in den Vordergrund rücken zu lassen (Locke, 2016; Neumann und Blacquièrre, 2017; Büchler et al., 2020; Oddie und Dahle, 2021). Dieses Konzept muss aber je nach Region und Bedingungen angepasst werden, um erfolgreich zu sein (Le Conte et al., 2020). Mondet et al., 2020a zeigen in ihrer Studie, dass es in Europa bereits mehrere Honigbienen-Populationen gibt, die durch ihr Verhalten die Varroamilbe in ihrer Entwicklung aktiv behindern. Diese zumeist wilden,



unbetreten Bienenvölker sind Wichtig, um einen möglichst Menschen unbeeinflussten Zustand festzustellen, auch in Österreich könnte solche Völker existieren (Oberreiter et al., 2021).

#### 1.4.6.4 Bauart des Bienenstockes (Kunststoff-Beuten, Isolierte Beuten, offener Gitterboden)

Die Ausführung des Bienenstockes (Kunststoff-Beuten, Isolierte Beuten im Winter, offener Gitterboden im Winter) hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Winterverlusten (Abbildungen 1.21 bis 1.23). Die gleichen Ergebnisse sind auch in vorangegangenen Umfragen festgestellt worden (Crailsheim et al., 2018). Bei der Anzahl der TeilnehmerInnen mit Kunststoff-Beuten und/oder isolierten Beuten im Winter ist ein zunehmender Trend in den letzten vier Jahren festzustellen (Tabellen 1.18 und 1.19). Ein offener Gitterboden im Winter wird von mehr als 50% der TeilnehmerInnen eingesetzt (Tabelle 1.20).

#### 1.4.6.5 Fremdwachs und Naturwabenbau

Ein großer Anteil unserer TeilnehmerInnen (42,0-53,7%) setzt Fremdwachs im Imkereibetrieb ein, hier ist aber ein abwärts Trend also hin zum eigenen Wachskreislauf festzustellen (Tabelle 1.21). In den letzten drei Umfragejahren 2018/19-2020/21 zeigten Imkereien die Wachs zukaufen signifikant höhere Winterverluste als Imkereien mit einem eigenen Wachskreislauf (Abbildung 1.24). Die Durchführung eines eigenen Wachskreislaufes kann für Professionalität des Imkereibetriebes sprechen. Hierbei zeigt sich, dass Imkereien mit weniger Bienenvölkern relative gesehen häufiger Fremdwachs einsetzen als größere Betriebe (Abbildung 1.17). Zusätzlich ermöglicht das Verfahren aber auch eine bessere Kontrolle über Inhaltsstoffe des Wachses wie zum Beispiel Pestizidrückstände, welche in eingelagerte Pollen gelangen können und so wiederum einen negativen Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit des Bienenvolkes haben können, da Wachs die am höchsten belastete Matrix im Bienenstock ist (Harriet et al., 2017; Calatayud-Vernich et al., 2018; El Agrebi et al., 2020). Der Imkereibetrieb wird aber nur selten sein Wachs auf diese Rückstände untersuchen und ein Entfernen von Pestizidrückständen aus dem Wachs ist mit einfachem Einschmelzen nicht möglich (Calatayud-Vernich et al., 2018). Eine Verringerung der Kontamination und Belastung des Wachses ist durch den Einsatz von Entdeckelungswachs zu erreichen und sollte forciert werden (Harriet et al., 2017; El Agrebi et al., 2020). Versuche mit künstlich kontaminiertem Bienenwachs führten aber zu keiner erhöhten Sterblichkeitsrate in den Bienenvölkern (Payne et al., 2019). Dennoch könnte es in Kombination mit anderen Faktoren zu negativen Auswirkungen führen. El Agrebi et al., 2020 haben ein frei zugängliches Online Tool veröffentlicht um einen „Hazard Quotienten“ für untersuchtes Bienenwachs zu berechnen <https://www.beetools.uliege.be/beetoxwax/>. Wilmart et al., 2021 haben eine Risikobewertung für Pestizide und Behandlungsmittel durchgeführt, welche häufig im Bienenwachs als Rückstände zu finden sind. Kontaminationen von Bienenwachs mit einer Vielzahl an unterschiedlichen Rückständen und möglichen Synergieeffekten wurden dabei aber nicht betrachtet (Wilmart et al., 2021).

Ein weiteres Problem beim Zukauf könnte verfälschtes Bienenwachs sein, wie auch eine kürzlich erschienene belgische Studie zeigt (El Agrebi et al., 2021). Wachsmittelwände mit einem relativen Anteil von 10 bis 20% Stearin führt zu vermehrten Larvensterben, atypische Brutzyklen sowie geringere Populationsgrößen (Alkassab et al., 2020; Chęć et al., 2021). Eine Verfälschung mit Paraffin zeigt keine negativen Auswirkungen auf die Sterblichkeit der Brut aber vermindert die Stabilität der Waben und führte zu deformierten Zellen (Chęć et al., 2021). Um die Situation von verfälschten Bienenwachs in Österreich festzustellen herrscht dringender Bedarf an weiteren Untersuchungen.

Hierbei ist zu erwähnen, dass zwischen ImkerInnen die Naturwabenbau eingesetzt haben oder jenen die das nicht machten in keinem Umfragejahr ein signifikanter Unterschied auftrat (Abbildung 1.25). Der Naturwabenbau wird aber nur von einer kleinen Anzahl an TeilnehmerInnen (weniger als 8%) praktiziert (Tabelle 1.22).

#### 1.4.6.6 Kleine Brutzellen (5,1 mm oder weniger)

Einmalig im Untersuchungsjahr 2019/20 zeigten TeilnehmerInnen die Angaben „kleine Brutzellen“ verwendet zu haben eine Wahrscheinlichkeit signifikant weniger Winterverluste zu erfahren (Abbildung 1.26). Dieser Unterschied konnte aber in keinem anderen Untersuchungsjahr festgestellt werden. In der Umfrage werden Mittelwände mit „kleinen Brutzellen (5,1 mm oder weniger)“ nur von circa 3% bis 4,5% der TeilnehmerInnen verwendet (Tabelle 1.23). Eine verminderte Zellgröße könnte einen negativen Einfluss auf die Vermehrungsrate der Varroamilbe haben, die wissenschaftlichen Erkenntnisse dazu sind aber nicht konsistent und wurde nicht in wilden, überlebenden Bienenvölkern beobachtet (Oddie et al., 2019; Le Conte et al., 2020).

#### 1.4.6.7 Vereinigung von Völkern

Eine neue Betriebsweisen-Frage in unserer Umfrage seit 2019/20 war die Frage ob, weiselrichtige aber schwache Völker bereits vor dem Winter vereinigt wurden. Insgesamt haben 13,7% im Jahr 2019/20 und 17,0% im Jahr 2020/21 der TeilnehmerInnen diese Praxis durchgeführt (Tabelle 1.24). Sie führte aber in beiden Jahren zu keinen statistisch signifikanten Unterschieden in den Winterverlusten (Abbildung 1.27). Diese Praxis schützt demzufolge nicht vor Völkerverlusten im Winter, stellt aber durch die Reduktion der Völker, einen „vorweggenommenen“ Verlust dar.

#### 1.4.7 Wabenhygiene

Die relative Anzahl an ausgetauschten Waben zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildung 1.28). Insgesamt über alle Untersuchungsjahre zeigt sich hier kein klares Bild (Crailsheim et al., 2018). Die meisten ImkerInnen mit 35-40% erneuern zwischen 31-50% der Brutwaben und mehr als 50% werden von 30% der TeilnehmerInnen ausgetauscht (Tabelle 1.25). Berry und Delaplane, 2001 konnten zeigen, dass das Alter der Waben Einfluss auf das Wachstum und die Überlebensrate eines Bienenvolkes haben kann: Völker mit neuen Waben produzierten im Durchschnitt größere Bereiche mit Brut, größere Bereiche mit eingedeckelter Brut sowie Jungbienen mit höherem Individualgewicht. Die Überlebensrate der Brut war in diesen Versuchen allerdings in Völkern mit älteren Waben signifikant höher, was an der Regulation des Mikroklimas in der Zelle liegen könnte. Eine weitere Studie, zeigte ähnliche Ergebnisse im direkten Vergleich zwischen jungen Brutwaben (1 bis 3 Jahre) zu alten Brutwaben (4 - 6 Jahre) (Abd Al-Fattah et al., 2021). Koenig et al., 1986 zeigten in ihrer Arbeit den Einfluss von verschiedenen Brutwabentypen auf das Vorkommen von Kalkbrut in Honigbienenvölkern, wobei hier alte Brutwaben die Entwicklung von Kalkbrut im Volk förderten. Generell können Ansammlungen von Pestizidrückständen, wie auch von Krankheitserregern im Wachs, die Überlebensrate von Bienenvölkern vermindern, diese Rückstände werden durch Einschmelzen der Altwaben aber nicht entfernt (Calatayud-Vernich et al., 2018). Ein Austausch von alten Brutwaben mit Mittelwänden aus Entdeckelungswachs kann aber die Belastung vermindert (Harriet et al., 2017; El Agrebi et al., 2020). Eine Rückstandsfreiheit des neuen Wabenmaterials kann in unserer Untersuchung bei dieser Frage mangels Überprüfung allerdings nicht als gegeben angenommen werden.

#### 1.4.8 Trachtangebot

Trachtquellen besonders Monokulturen stehen immer wieder im Fokus von Untersuchungen als mögliche Risikotrachtquellen für die Honigbienen. Hierbei wird zum Beispiel der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln und eine einseitige Ernährung als mögliche Risikofaktoren diskutiert (Brodtschneider und Crailsheim, 2013; Zee et al., 2014; Di Pasquale et al., 2016; Requier et al., 2017). Die Auswirkungen und Erforschung

von Pflanzenschutzmitteln auf Bienenvölkern sind noch immer ein sehr aktuelles Thema (Di Noi et al., 2021; Fine und Corby-Harris, 2021). Hierbei sei erwähnt, dass nicht nur Insektizide, sondern auch Herbizide und Fungizide negative Auswirkungen auf die Honigbiene zeigen (Castelli et al., 2021; Fisher et al., 2021). Zusätzlich sind Bienenvölker durch ihre Sammelaktivität ein wichtiger Bioindikator für die Umwelt (Murcia-Morales et al., 2020; Bergero et al., 2021; Gratzer und Brodschneider, 2021). Aus epidemiologischer Sicht konnten der vorangegangene Bericht „Zukunft Biene“ bereits einen signifikanten Zusammenhang mit bestimmten Trachtquellen festhalten (Crailsheim et al., 2018). In diesem wurden die Trachtquellen Raps, Mais, Sonnenblume, Senf, Buchweizen, Japanischer Staudenknöterich und Drüsiges Springkraut in der Winterverlustumfrage untersucht (Crailsheim et al., 2018). Auch im aktuellen Bericht von „Zukunft Biene 2“ wurden die teilnehmenden ImkerInnen nach spezifischen Trachtquellen gefragt, die von ihren Bienen befliegen wurden. Zur Auswahl standen diesmal: Raps (*Brassica napus*), Mais (*Zea mays*), Sonnenblume (*Helianthus annuus*), spätblühende Zwischenfrüchte, Waldtracht sowie Waldtracht mit Melezitose. Wobei die Trachtquellen in der Winterverlustumfrage auch stellvertretend für andere (nicht abgefragte oder bisher unbekannte) abträgliche Standortverhältnisse stehen können. Somit können keine kausalen Gründe für die erhöhten Verluste beim Vorhandensein bestimmter Trachten genannt werden. Die Trachten können aber als Indikator von für Bienenvölker nicht idealen Standorten gesehen werden, wie auch in der Untersuchung zum Einfluss der Landnutzung auf die Wintersterblichkeit des Vorläuferprojekts diskutiert wird (Kuchling et al., 2018).

Für kausale Aussagen zur Rückstandsbelastung oder mögliche Defizite im Nährwert braucht es separate Studien, die Umfrage ist aber ein einfacher Weg als Vorstudie mögliche Problemtrachten herauszufinden.

#### 1.4.8.1 Raps (*Brassica napus*)

Der Anteil an TeilnehmerInnen mit Rapstracht ist von 22,5% im Untersuchungsjahr 2017/18 auf 16,4% im Jahr 2020/21 gesunken. Geographisch kommen die meisten Meldungen aus Oberösterreich und Niederösterreich (Abbildung 1.31). Ein signifikante höhere Verlustrate für ImkerInnen mit einer Rapstracht wurde nur im Jahr 2017/18 festgestellt (Abbildung 1.30). Im vorangegangenen Bericht wurde bei Raps in zwei Umfragejahren ein negativer Einfluss auf die Wintersterblichkeit festgestellt (Crailsheim et al., 2018). Auch in internationalen Studien finden sich zu Raps in Zusammenhang mit den Winterverlusten widersprüchliche Ergebnisse (Zee et al., 2014; Gray et al., 2019), da in verschiedenen Länder sowohl positive wie auch negative Effekte beobachtet worden sind. Raps (*Brassica napus*) liefert Nektar und Pollen in sehr hohen Mengen, aber potenziell vorkommende Pflanzenschutzmittel könnten einen negativen Effekt auf die Entwicklung der Honigbienenvölker haben (Goulson et al., 2015; Rundlöf et al., 2015; Rolke et al., 2016). Da die Rapstracht allgemein sehr früh in der Honigsaison stattfindet, könnten neben der Tracht noch andere Faktoren für den negativen Effekt verantwortlich sein. Als weitere Ursache für hohe Winterverluste in Zusammenhang mit Trachtpflanzen wird eine einseitige Ernährung durch mangelndes Trachtangebot, welches durch Monokulturen zustande kommt, angenommen (Brodschneider und Crailsheim, 2013; Requier et al., 2017).

#### 1.4.8.2 Sonnenblume (*Helianthus annuus*)

Wie auch bereits bei der Rapstracht wurde für eine Sonnenblume Tracht im Untersuchungsjahr 2017/18 eine signifikant höhere Verlustrate festgestellt (Abbildung 1.32). Die Anzahl der Meldungen ist über die Umfragejahre in etwa gleich geblieben mit circa 14,5% und die meisten Meldungen kommen aus Niederösterreich (Abbildung 1.33). Als Gründe für eine erhöhte Winterverlustrate können dieselben wie auch schon bei Raps diskutiert wurden genannt werden. Bei Pflanzenschutzmitteln sei noch zu erwähnen, dass nicht nur Insektizide negative Auswirkungen haben können, sondern auch Herbizide zur Bekämpfung

von Beikräutern wie zum Beispiel Glyphosat, welches unter Laborbedingungen das Darmmikrobiota von Honigbienen verändert und zu einer Verkürzung der Lebenszeit führt (Castelli et al., 2021).

#### 1.4.8.3 Mais (*Zea mays*)

In drei von vier Umfragejahren wurde ein negativen Effekt auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Bienenvölker über den Winter festgestellt, wenn die Trachtpflanze Mais befliegen wurde (Abbildung 1.34). Die Meldungen kommen hauptsächlich aus Oberösterreich aber auch vermehrt aus der Steiermark und Kärnten (Abbildung 1.35). Obwohl Mais keinen Nektar produziert, kann der Pollen von Honigbienen gesammelt werden. Auch in Österreich zeigten Untersuchungen, dass der Pollen aktiv von Bienen gesammelt wird (Brodtschneider et al., 2019c). Es ist aber keine bevorzugte Quelle für Bienen (Höcherl et al., 2012; Urbanowicz et al., 2019). Als Ursachen für die negativen Auswirkungen, wie bereits bei den diskutierten Trachtpflanzen zuvor, werden der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln und eine einseitige Ernährung diskutiert (Brodtschneider und Crailsheim, 2013; Zee et al., 2014; Di Pasquale et al., 2016). Höcherl et al., 2012 konnten zeigen, dass im Pollen von Maispflanzen zwar nur sehr geringe Mengen Histidin vorhanden sind, jedoch alle anderen essenziellen Aminosäuren in größerer Menge als in gemischten Pollen vorkommen. Dennoch hatten in dieser Studie Bienen, die mit einer ausschließlichen Mais-Pollen Diät gefüttert wurden, eine auffällig niedrigere Lebenserwartung als Bienen, die mit einem Pollengemisch gefüttert wurden. Bienen könnten auch indirekt über Guttationswasser mögliche Pestizide aufnehmen, was negative Auswirkungen auf das gesamte Volk haben könnte (Schmolke et al., 2018). Die Auswirkungen von Pestiziden sind aber nicht immer leicht zu untersuchen und eine Langzeitstudie aus Spanien an Sonnenblumenkulturen mit aus Neonicotinoiden behandelten Samen zeigt keine negativen Langzeitfolgen auf die Entwicklung und das Überleben der Bienenvölker, aber es wurden geringe Rückstände im Bienenbrot gefunden (Flores et al., 2020). Rundlöf et al., 2015 zeigen in ihrer Studie aus Schweden negative Effekte von mit Neonicotinoiden behandelten Kulturen auf Wildbienen (solitäre Bienen, Hummeln). Die Untersuchung konnte aber auch keinen signifikanten Einfluss auf die Überwinterung von Honigbienenvölkern nachweisen. Ein solcher Beweis wurde von Woodcock et al., 2017 in einer groß angelegten Feldstudie zumindest teilweise erbracht.

#### 1.4.8.4 Spätblühende Zwischenfrüchte

Die spätblühenden Zwischenfrüchte befinden sich seit 2018 im COLOSS Fragebogen. Gemeldet wird das Vorkommen einer solchen Tracht in ganz Österreich (Abbildung 1.37). Ein signifikanter Einfluss auf die Winterverlustrate wurde in keinem Jahr festgestellt (Abbildung 1.36). Zwischenfrüchte bezeichnet eine Vielzahl an unterschiedlichen Kulturen am Feld, wie zum Beispiel Buchweizen, Phacelia, Senf oder Klee. Diese Kulturen werden nicht geerntet, sondern angepflanzt um die Bodenqualität und Nährstoffhaushalt zu verbessern um dadurch auf natürliche und nachhaltige Weise den Ertrag der Hauptkultur zu verbessern. Für Bienenvölker könnte eine zu späte Massentracht negative Folgen für die Einwinterung haben, da die Tracht stimuliert und möglicherweise die Bruttätigkeit verlängern sowie die Winterbienen vermehrt kräftezehrende Sammelaktivität durchführen müssen. Ein möglicher positiver Effekt könnte der Eintrag von qualitativ hochwertigen Nektar für die Überwinterung sein. Zumindest in der Winterverlustumfrage konnte aber kein solcher negativer oder positiver Effekt festgestellt werden.

#### 1.4.8.5 Waldtracht und Waldtracht mit Melezitose

Die Anzahl der Meldungen von einer Waldtracht und auch Melezitose variiert stark zwischen den Jahren (Abbildungen 1.39 und 1.41). Bei der Waldtracht waren die meisten Meldungen im Jahr 2017/18 mit 61% und im Jahr 2019/20 mit 50,7% der TeilnehmerInnen (Tabelle 1.30). Melezitose war am häufigsten im Jahr 2019/20 mit 36,4% (Tabelle 1.31).

Bei der Waldtracht wurde im Jahr 2017/18 und 2019/20, wo auch die meisten Meldungen erfolgten, eine signifikant niedrigere Winterverlustwahrscheinlichkeit festgestellt im Vergleich zu ImkerInnen ohne dieser Trachtquelle (Abbildung 1.38). Der Hauptteil der Meldungen kommt geographisch aus in den Alpen gelegenen Bezirken, welche eine durchschnittlich höhere Seehöhe vorweisen. Somit könnten dieselben Erklärungen wie bereits bei der Seehöhe vom Überwinterungsstandes zutreffen, wie zum Beispiel kältere mittlere Temperaturen im September (Switanek et al., 2017), Landnutzung (Kuchling et al., 2018) und die geringere Dichte an Bienenvölkern (Fries und Camazine, 2001; Seeley und Smith, 2015; Forfert et al., 2016; Dynes et al., 2019). Da dieser positive Effekt aber nicht jedes Jahr ist, könnte vielleicht der eingetragene Honigtau positive Eigenschaften für das Überwintern bieten, obwohl der hohe Anteil an Mineralstoffen als schwer verdaulich für die Bienen angesehen wird.

Bei einer Waldtracht mit Melezitose wurde kein signifikanter Unterschied in den Verlustaten über die Untersuchungsjahre festgestellt. Wann und ob Melezitose in erhöhter Menge vorkommt ist von der Hemipteren Spezies und ihrer Wirtspflanze sowie von abiotischen Faktoren wie zum Beispiel erhöhter Temperatur mit Trockenheit und Wasserverfügbarkeit der Wirtspflanze abhängig (Seeburger et al., 2021). Diese Tracht kennzeichnet sich durch sogenannten Zementhonig, welcher die Brut- und Honigwaben mit schwerverdaulichem, kristallinem Honig füllt (Pechhacker et al., 1990). In der Umfrage hätten wir eine negative Auswirkung auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Völker in Zusammenhang mit Melezitose über den Winter erwartet, dass dies nicht der Fall ist, könnte durch den Zeitpunkt der Tracht erklärt werden. Eine frühe Waldtracht mit Melezitose könnte wahrscheinlich weniger Einfluss auf das Volk haben als eine Tracht spät im Bienenjahr, da eine Überwinterung auf Melezitose zur Ruhr und erhöhter Sterblichkeit in den Völkern führen kann (Imdorf et al., 1985; Seeburger et al., 2020). Eine weitere Erklärung wäre, dass ImkerInnen in diesen Gebieten bereits routiniert im Umgang mit Melezitose Trachten sind und früh genug mit Gegenmaßnahmen entgegenwirken.

#### 1.4.9 Bekämpfung der Varroamilbe

Im Kampf gegen hohe Winterverluste spielt die Behandlung der Völker gegen die Varroamilbe eine wichtige, wenn nicht sogar die zentrale Rolle. In einer weltweiten Imkerei Umfrage zwischen 2015 und 2017 war der mit Abstand häufigste Tierarzneimittel Einsatz gegen die Varroamilbe gerichtet und nur ein sehr kleiner Prozentsatz an TeilnehmerInnen behandelt seine Völker nicht gegen die Milbe (Mezher et al., 2021). Der Einfluss des Parasiten auf den Überwinterungserfolg kann in Österreich nur unzulänglich untersucht werden, da es keine Referenzen gibt von betreuten Bienenvölkern ohne Varroamilben. Dahle, 2010 konnte in der Umfrage zu Winterverlusten in Norwegen einen negativen Einfluss auf den Überwinterungserfolg im direkten Vergleich zwischen Imkereien mit und ohne Varroamilbe feststellen. Der negative Einfluss kommt insbesondere auch dadurch, dass die Milbe als Vektor für andere Pathogene, wie Viren, dient (Rosenkranz et al., 2010; Noël et al., 2020). Um eine möglichst detaillierte Erfassung und Darstellung zu bieten, ist in der Winterverlustumfrage nicht nur die Erhebungen über die verschiedenen Behandlungsmethoden, sondern auch über die Häufigkeit und den Zeitpunkt der Behandlungen wichtiger Bestandteil. Für die Risikoanalyse wurden die Behandlungsmethoden in Frühling, Sommer und Winter unterteilt und nur Kombinationen an Behandlungsmethoden von denen auch genügend Datensätzen vorhanden sind verglichen.

##### 1.4.9.1 Bestimmung des Varroabefalls

Der Großteil der teilnehmenden ImkerInnen (>90%) hat eine Varroabefallskontrolle durchgeführt und am häufigsten war die Kontrolle in den Monaten Juli, August und September (Abbildung 1.44). Gruppieren nach Jahreszeit hat der Großteil im Sommer und Winter kontrolliert (Abbildung 1.45). Nur in einem Umfragejahre, im Winter 2018/19, zeigten TeilnehmerInnen, die eine Bestimmung durchgeführt haben, eine Wahrscheinlichkeit signifikant weniger Völker über den Winter zu verlieren (Abbildungen 1.43 und 1.45).

Obwohl die Kontrolle ansich die Varroamilbe nicht vermindert, lässt sich dieser Effekt möglicherweise dadurch erklären, dass ImkerInnen die über den Varroabefall ihrer Völker Bescheid wissen einerseits besser über den Gesundheitszustand ihrer Völker informiert sind, andererseits auch dementsprechend besser auf den Befall reagieren können. Bei den verwendeten Methoden ist die Erhebung des Milbenbefalls mit einer Bodeneinlage die Häufigste, gefolgt von einer visuellen Inspektion der Drohnenbrut (Tabelle 1.34). Die dritthäufigste Methode, eine Inspektion der adulten Bienen, wird hauptsächlich nur in Kombination durchgeführt. Diese einfache visuelle Kontrollmethode gibt aber nur unzureichend den wahren Befall wieder (R. J. Hall et al., 2021). Die Befallskontrolle ist ein grundlegender Bestandteil einer erfolgreichen integrierten Schädlingsbekämpfung, im Englischen auch als „Integrated pest management (IPM)“ bezeichnet (Roth et al., 2020). Deswegen sollte diese Praxis, welche bereits von der großen Mehrheit in unserer Umfrage praktiziert wird, weiterhin beworben werden.

#### 1.4.9.2 Behandlungsmethoden

In Österreich sind im internationalen Vergleich verhältnismäßig nur wenige Akarizide zugelassen (Brod-schneider et al., 2019a). In den vier Jahren der Umfragen folgt der Großteil der Empfehlung der AGES (Moosbeckhofer et al., 2015) (Tabelle 1.32). Die Empfehlung ist eine Verdunstung von Ameisensäure im Sommer und eine Nachbehandlung im Winter bei Brutfreiheit mit Oxalsäure. Die Anwendung einer Ameisensäurebehandlung und die weit verbreitete biotechnische Maßnahme der Drohnenbrutentnahme zeigen einen leichten Trend abwärts über die vier Umfragejahr. Im Gegensatz dazu erfahren „andere biotechnische Methoden“ in ihrer Anwendungshäufigkeit eine Zunahme (Tabelle 1.32). Um die Effektivität und Unterschiede zwischen den Behandlungsmethoden besser zu veranschaulichen, wurden die Behandlungsmethoden auch in deren Kombinationen der Anwendung verglichen, siehe Abbildung 1.69. Die einzelnen Methoden und deren Anwendung je nach Jahreszeit werden in weiterer Folge näher betrachtet. Auf den Einsatz von Milchsäure und die Auswahl „andere Methoden“ wird nicht näher eingegangen, weil die Stichproben in diesen Gruppen für eine sinnvolle, statistische Auswertung zu klein waren. Die Kategorie „andere Methoden“ ist für uns deswegen wichtig, um eventuelle fehlende aber häufige Methoden zu erkennen und damit gegebenen falls den Fragenkatalog der Behandlungsmethoden neu zu evaluieren.

##### 1.4.9.2.1 Ameisensäure

Ameisensäure ist nach der Drohnenbrutentnahme die meistverbreitete Behandlungsmethode in unserer Umfrage. Wir unterscheiden in unserer Umfrage zwischen Kurzzeit- und Langzeitbehandlung, beide Varianten werden immer seltener von unseren TeilnehmerInnen der Umfrage verwendet, siehe Tabelle 1.32. Mit großer Mehrheit wird eine Ameisensäure Behandlung nur im Sommer durchgeführt, vereinzelt besonders die Kurzzeitbehandlung auch noch im Winter (November-Jänner) (Abbildungen 1.47 und 1.49). Ein statistischer Unterschied zwischen den Winterverlustraten konnte in keinem Jahr festgestellt werden (Abbildungen 1.48 und 1.50). Der direkter Vergleich zwischen den zwei Varianten, von TeilnehmerInnen die nur eine Ameisensäurebehandlung im Sommer durchgeführt haben, zeigt im Umfragejahr 2019/20 eine signifikant höhere Winterverlustrate für die Kurzzeitbehandlung im Vergleich zu Langzeitbehandlung (Abbildung 1.69-J,L). Die Vorteile beim Einsatz der Ameisensäure (und anderer organischer Säuren) ist das geringe Risiko von Resistenzbildung, das geringere Risiko der Belastung mit Rückständen und eine bewiesene Effektivität gegen die Varroamilbe (Rosenkranz et al., 2010; Noël et al., 2020). Negativ kann die Abhängigkeit von Umgebungsparametern wie der Temperatur angesehen werden und die Ameisensäure Dämpfe schädigen nicht nur die Milbe, sondern auch die adulte Honigbienen (Underwood und Currie, 2003). Bei höheren Konzentrationen der Dämpfe und einer längeren Dauer der Behandlung wird die Atmung von Larven und adulten Bienen gehemmt, sowie die Brutpflege unterbrochen (Bolli et al., 1993). Sowie

unter Laborbedingungen wurde ein negativer Einfluss auf die Expression von Genen, zuständig für das Gedächtnis, in adulten Bienen festgestellt (Gashout et al., 2020).

#### 1.4.9.2.2 Synthetisch Chemische Methode

Unter „Chemische Methoden“ fassen wir die abgefragten synthetischen Akarizide (zum Beispiel Apivar, Apistan, Checkmite) als Gesamtes zusammen. Durch die geringe Anzahl an TeilnehmerInnen die diese Methode verwenden wäre hier eine Aufschlüsselung der Methoden nicht sinnvoll. Es zeigt sich über die Umfragejahre eine leichte Zunahme der Anwendung, aber absolut handelt es sich nur um 24 TeilnehmerInnen im Jahr 2017/18 und 35 TeilnehmerInnen im Jahr 2020/21 (Tabelle 1.32). Eine Anwendung im Sommer zeigte in zwei Untersuchungsjahren (2018/19 und 2020/21) eine signifikante Wahrscheinlichkeit für weniger Winterverluste im Vergleich zur Gruppe, die diese Methode nicht verwendet hat (Abbildung 1.54). Der Vorteil dieser Akarizide ist die hohe spezifische Wirksamkeit gegen die Varroamilbe und einfache Handhabung. Resistenzbildung und Akkumulation der Substanzen im Bienenwachs stellen aber ein schwerwiegendes Problem dar (Rosenkranz et al., 2010; Noël et al., 2020). Solche Rückstände im Bienenwachs können sich über Jahrzehnte im Bienenwachs halten, wie auch in einer Schweizer Studie festgestellt wurde (Kast et al., 2021).

Zumindest die Resistenzbildung kann durch den abwechselnden Einsatz von unterschiedlichen Produkten minimiert werden (Noël et al., 2020). Ein wirksames synthetisches Mittel mit weniger Nebenwirkungen soll Lithiumchlorid versprechen, die Untersuchungen hierzu sind aber noch nicht abgeschlossen (Ziegelmann et al., 2018).

#### 1.4.9.2.3 Drogenbrutentnahme

Die biotechnische Varroa Bekämpfung mittels Drogenbrutentnahme ist die häufigste Behandlungsmethode in unserer Umfrage (Tabelle 1.32). Der Großteil setzt die Methode im Frühling und im Sommer ein gefolgt von einer Anwendung nur im Frühjahr (Abbildung 1.55). In drei Jahren zeigt eine Entfernung nur im Sommer statistisch signifikant höhere Verlustraten als eine Kombination aus Frühling und Sommer (Abbildung 1.56), im Vergleich zur Gruppe die gar keine Drogenbrutentnahme macht ist kein Unterschied in den Verlustraten festgestellt worden. Eine Annahme für diese Ergebnisse wäre, dass TeilnehmerInnen, die im Sommer eine hohe Milben Belastung feststellen mit sofort Maßnahmen wie der Drogenbrutentnahme versuchen entgegenzuwirken. Diese aber zu diesem Zeitpunkt nicht mehr effektiv genug ist. Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass sich eine Drogenbrutentnahme im Frühjahr positiv auf den Überwinterungserfolg auswirkt (Brodschneider und Crailsheim, 2013; Crailsheim et al., 2018; Oberreiter und Brodschneider, 2020). Feldexperimente in den USA, mit mehrmaligen Entfernen der Drogenbrut, und der Schweiz, mit einmaligen Entfernen im Frühjahr, haben eine Verminderung der Varroabelastung gezeigt ohne Einfluss auf Volksstärke und Honigertrag (Charrière et al., 1998; Calderone, 2005). Da die Drogenbrutentnahme keine alleinige Behandlungsmethode darstellt, sei an dieser Stelle auf die oftmalige Verwendung mehrerer unterschiedlicher Bekämpfungsmaßnahmen in Kombination hingewiesen. Deswegen wurde diese Methode bewusst in den Behandlungskombinationen nicht beachtet, weil dadurch eine Vielzahl an neuen Kombinationsmöglichkeiten entstehen würden.

#### 1.4.9.2.4 Hyperthermie

Die Hyperthermie beruht auf dem Prinzip der unterschiedlichen Toleranzen von *V. destructor* und der Honigbienenbrut. In den meisten Fällen werden hierbei verdeckelte Brutwaben aus dem Bienenvolk entnommen und einer Wärmebehandlung unterzogen. Die Anzahl der TeilnehmerInnen die diese Methode

verwendet ist äußerst gering (Tabelle 1.32). Am häufigsten findet die Anwendung in Kombination über mehrere Jahreszeiten statt (Abbildung 1.57). Dieser recht flexible Anwendungszeitpunkt unabhängig von der Honigsaison und auch die Möglichkeit bereits recht früh im Jahr eine Behandlung durchzuführen wären ein großer Vorteil für diese Behandlungsmethode. In den Winterverlusten zeigt sich aber kein signifikanter Unterschied (Abbildung 1.58). Die Dauer und die richtige Temperatur während der Hyperthermie ist ausschlaggebend für eine effiziente Bekämpfung der Varroamilbe mit möglichst wenig Nebenwirkungen für die Bienenbrut, Abweichungen davon können zu Brutschäden oder bei Drohnen zur Unfruchtbarkeit führen (Kablau et al., 2020).

#### 1.4.9.2.5 Biotechnische Maßnahmen

Wurde eine „andere biotechnische Maßnahme“ (exklusive Hyperthermie und Drohnenbrutentnahme) im Sommer durchgeführt, zeigte sich im Jahr 2018/19 eine Wahrscheinlichkeit signifikant weniger Winterverluste zu erleiden (Abbildung 1.52). Diese Maßnahmen werden von dem meisten TeilnehmerInnen im Sommer eingesetzt (Abbildung 1.51). Die Häufigkeit der Anwendung ist über die Umfragejahre gestiegen obwohl im letzten Untersuchungsjahr es wieder um 3% weniger waren als im Jahr davor (Tabelle 1.32). Diese Zunahme sieht man auch in absoluten Zahlen in den verschiedenen Kombinationen, siehe Tabelle 1.46-N,O,P,S,U. Solche biotechnische Maßnahmen zeigten bereits in den Wintern mit hohen Verlusten positive Effekte (Crailsheim et al., 2018). Hierbei handelt es sich aber oft um sehr arbeitsaufwendige Methoden (Rosenkranz et al., 2010; Büchler et al., 2020). Eine zweijährige Feldstudie in Europa mit biotechnischen Maßnahmen im Sommer zur Brutunterbrechung sowie in Kombination mit Oxalsäure zeigt eine hohe Effektivität gegen die Varroamilbe (Büchler et al., 2020). Auch eine Untersuchung aus Italien (Reggio Emilia, Po-Ebene) zeigt, dass solche Methoden ebenso im Frühjahr zu einer Verminderung der Varroabelastung führen ohne negativen Einfluss auf die Honigernte zu haben (Lodesani et al., 2019). Besonders in Hinsicht auf die immer häufiger werdenden warmen Winter und somit verlängerte Brutperioden sind solche Methoden interessant und könnten auch in Österreich zu positiven Ergebnissen führen. Dies könnte auch für ImkerInnen die späte Trachten anstreben, welche sie ansonsten wegen zu starker Varroabelastung nicht ausnützen könnten, interessant sein.

#### 1.4.9.2.6 Oxalsäure

Die Oxalsäure, in den Varianten Verdampfen, Träufeln oder als Fertigmischung (Hiveclean, Varroamed etc.), wird hauptsächlich zur sogenannten Restentmilbung im Winter von unseren TeilnehmerInnen eingesetzt (Abbildungen 1.61, 1.63 und 1.65). Eine Häufigkeit der Anwendung mittels Verdampfung beziehungsweise Sublimation hat über die Umfragejahre zugenommen und wird auch im Sommer immer öfter eingesetzt (Abbildung 1.65, Tabelle 1.32). Die Variante zeige im Jahr 2017/18 und im Jahr 2020/21 eine statistisch signifikante Wahrscheinlichkeit für geringere Winterverluste, als wenn keine Sublimation erfolgte (Abbildung 1.66). Al Toufalia et al., 2015 zeigen, dass Verdampfen bereits bei einer geringen Menge an Oxalsäure äußerst effektiv gegen die Varroamilbe ist, im Frühjahr zeigten diese Bienenvölker auch größere Brutnester im Gegensatz zur Oxalsäurebehandlung mittels Träufeln oder Sprühen und auch im Vergleich zur Kontrolle (keine Behandlung). Die Bezeichnung Verdampfen und Sublimation wird oft synonym verwendet, obwohl es sich dabei um zwei unterschiedliche physikalische Reaktionen handelt. Bei der Erhitzung von Oxalsäuredihydrat entsteht aus dem gebundenen Wasser eine flüssige Phase, welche in weiterer Folge verdampft (Flüssig zu Gas). Die reine Oxalsäure geht von der kristallinen Struktur direkt in die Gasform (Sublimation).

Die Träufelung von fertigen Oxalsäureprodukten, zum Beispiel Hiveclean, Bienenwohl, Varroamed zeigte einmalig im Jahr 2019/20 und 2020/21 bei einer Anwendung im Sommer und Winter signifikant höhere Verlust als die Gruppe ohne diese Behandlungsmethode (Abbildung 1.62). Träufeln oder Sprühen (ohne



fertiger Mischung) zeigte im ersten Umfragejahr 2017/18 bei einer Anwendung nur im Winter signifikant höhere Winterverluste im Vergleich zur Gruppe ohne diese Behandlungsmethode (Abbildung 1.64).

Durch die geringe Auswahl an Behandlungsmethoden im Winter gibt es keine verlässliche Kontrollgruppe von Imkereien, die nicht mit Oxalsäure arbeiten. Das unterstreicht die Bedeutung der Oxalsäure und die derzeitige Alternativlosigkeit in der Winterbehandlung. Oxalsäure wirkt ausschließlich auf die auf Bienen sitzenden Varroamilben, und ist damit nur bei Brutfreiheit der Völker effektiv (Rosenkranz et al., 2010). Über das tatsächliche Vorherrschen von Brutfreiheit bei Anwendung der Oxalsäure kann im Rahmen dieser Untersuchung keine Aussage getroffen werden. Im Sommer kann solch eine Brutfreiheit nur in Kombination mit biotechnischen Maßnahmen erreicht werden, als mögliche Alternative wird von ImkerInnen eine mehrmalige Verdampfung im Sommer durchgeführt zu dieser wir aber keine wissenschaftlichen Erkenntnisse haben. Eine weitere Alternative, die verspricht auch während der Brut hohe Effizienz vorzuweisen, ist eine Oxalsäuremischung aufgebracht auf einem Trägermaterial, welche im Volk über längere Zeit verbleibt (Maggi et al., 2016). Hierbei handelt es sich aber um kein zugelassenes Produkt in Österreich und Untersuchungen in der Schweiz zeigten eine nur geringe Wirksamkeit als Sommerbehandlung (Charrière et al., 2020).

Bei der Anwendung im Winter zur Restentmilbung zielt eine Behandlung mit Oxalsäure auf eine Reduktion der Milbenpopulation für das Folgejahr ab. Deswegen ist eine direkte Auswirkung auf die Winterverluste im Umfragejahr nur bedingt zu erklären, da wir auch nicht wissen ob TeilnehmerInnen die zum Beispiel Verdampfen wählten, diese Methode auch im letzten Jahr eingesetzt haben.

#### 1.4.9.2.7 Thymol

Eine Behandlung mittels Produkten auf Thymolbasis wie zum Beispiel Thymovar, Apiguard etc. wird nur von einer geringen Anzahl von ImkerInnen in unserer Umfrage angewendet und zeigt einen Abwärtstrend in der Anwendungshäufigkeit (Tabelle 1.32). Hauptsächlich findet eine Anwendung im Sommer oder Sommer und Winter statt (Abbildung 1.67). Im Jahr 2019/20 und 2020/21 zeigte eine Anwendung „nur im Sommer“ eine statistisch höhere Wahrscheinlichkeit für Winterverluste im Vergleich zur Gruppe welche kein Thymolpräparat eingesetzt hat (Abbildung 1.68). Somit erscheint eine Sommerbehandlung mittels Thymol als unzureichend, ob diese Gruppe aber nur eine Thymol Behandlung durchgeführt hat oder in Kombination mit einer anderen Methode wurde nicht analysiert, da die TeilnehmerInnen Anzahl mit dieser Methode zu gering für eine sinnvolle statistische Analyse ist. Bei einer weltweiten Imkerei Umfrage zwischen 2015 und 2017 gaben auch viele TeilnehmerInnen an, dass eine Thymolbehandlung in ihren Augen nur unzureichend effektiv ist (Mezher et al., 2021). Eine australische Studie, die sich mit der Thymolbehandlung näher beschäftigt hat, zeigt teilweise einen vorteilhaften Effekt auf das Hygiene-Verhalten der Bienen (T. Colin et al., 2019), aber vermutlich spielen für den erfolgreichen Einsatz von Thymol zusätzlich noch andere Faktoren eine Rolle, wie zum Beispiel verschiedene Umweltbedingungen und genetische Unterschiede.

#### 1.4.9.2.8 Kombinationen

Um einen besseren Einblick in die angewandten Behandlungsmethoden in Kombination zu geben, haben wir zusätzlich verschiedene Behandlungskonzepte in Kombination direkt verglichen (Abbildung 1.69). Durch die Aufteilung ergeben sich sehr viele unterschiedliche Gruppen wobei hier nur Kombinationen mit mindestens 15 TeilnehmerInnen, in einem Jahr, analysiert wurden. Durch diese geringe Stichprobenanzahl und unterschiedliche Verlustergebnisse ergibt sich ein hohes Konfidenzintervall. Um die Stichprobenanzahl weiter zu erhöhen wurde die Drohnenbrutentnahme in dieser Auswertung nicht berücksichtigt, das heißt TeilnehmerInnen könnten noch zusätzlich eine Drohnenbrutentnahme gemacht haben und die Oxalsäurebehandlung mittels Träufeln inkludiert in dieser Auswertung auch die fertigen Mischprodukte.

Die mit Abstand am meisten genutzte Kombination in unserer Umfrage ist eine Ameisensäure-Langzeitbehandlung im Sommer gefolgt von Oxalsäure-Träufeln im Winter und zeigte im Jahr 2018/19 eine signifikant geringere Wahrscheinlichkeit für Völkerverluste (Abbildung 1.69-A). Es ist aber eine Abnahme der Häufigkeit von dieser Methode zu beobachten. Die Kombination der Ameisensäure-Kurzzeitbehandlung und Oxalsäure-Träufeln im Winter, zeigt eine starke Abnahme in der Häufigkeit und hatte im letzten Untersuchungsjahr 2020/21 eine signifikant höhere Verlustrate als die österreichische Gesamtverlustrate und im Vergleich zu anderen Kombinationen (Abbildung 1.69-B). Der alleinige Einsatz von Ameisensäure-Kurzzeitbehandlung im Sommer zeigte im Jahr 2019/20 eine signifikant höhere Verlustrate und im Jahr 2018/19 die Kombination mit Oxalsäure Träufeln im Sommer und Winter zeigte eine signifikant höhere Verlustrate als die österreichische Gesamtverlustrate (Abbildung 1.69-I,J). Allgemein zeigt im Vergleich zur Ameisensäure-Langzeitbehandlung die Kurzzeitbehandlung öfters höhere Winterverlusten als die österreichische Gesamtverlustrate. Auch die Kombination Träufeln von Oxalsäure im Sommer und Winter zeigt über alle Jahre ein potential für hohe Winterverluste und im letzten Umfragejahre 2020/21 auch eine statistisch höhere Wahrscheinlichkeit für Verluste als die österreichische Gesamtverlustrate (Abbildung 1.69-T).

Die geringe Stichprobenanzahl mancher Kombinationen und fehlen von Alternativen beziehungsweise einer Kontrollgruppe ohne Behandlung macht die Aussage der Kombinationsanalyse schwierig. Alle hier dargestellten Kombinationen beinhalten die zwei organische Säuren (Oxalsäure und/oder Ameisensäure), somit sind diese Behandlungsmethoden auch sehr ähnlich. Dadurch können wir zumindest feststellen, dass die angeführten Kombinationen einen ähnlichen Behandlungserfolg vorweisen. Dennoch gibt es einzelne Abweichungen, meist jedoch nur in einem Jahr. Die Behandlungsmethoden die in einem Jahr schlechter abschneiden könnten zum Beispiel stärker von äußeren Umwelteinflüssen abhängig sein. Konstante Ergebnisse mit im Mittel unter der österreichischen Gesamtverlustrate zeigen die Kombinationen mit einer Ameisensäure-Langzeitbehandlung aber auch die Oxalsäurebehandlung mittels Verdampfung im Sommer und Winter zeigt konstante Ergebnisse bei steigender Popularität (Abbildung 1.69-H). Zusätzlich zeigt die Analyse Behandlungstrends und deren Kombinationen wie zum Beispiel die Zunahme der Häufigkeit an biotechnischen Maßnahmen (exklusive Drohnenbrut und Hyperthermie) (Abbildung 1.69-N,O,P,S,U).

#### 1.4.10 Königinnen-Verluste

Die Verlustrate von Bienenvölkern über den Winter durch „unlösbare Königinnenprobleme“ macht weniger als die Hälfte der Gesamtverluste aus und beträgt im laufenden Mittel über die vier Umfragejahre 3,6%, mit geringsten im Umfragejahr 2020/21 mit 3,0% (95% CI: 2,8-3,2%) und die höchsten 2019/20 mit 4,3% (95% CI: 4,1-4,6%) (Tabelle 1.47). Diese Verlustrate scheint recht konstant über die Jahre sowohl in Österreich als auch International zwischen circa 3 und 5% zu liegen (Brodschneider et al., 2019a; Gray et al., 2019, 2020).

Betrachtet man die Bundesländer im direkten Vergleich zeigt Niederösterreich in jedem Umfragejahre, zumindest gegenüber einem anderen Bundesland, statistisch signifikant höhere Verlusten durch „unlösbare Königinnenprobleme“. Im Gegensatz dazu zeigt das Bundesland Kärnten konstant niedrige Verlusten. Kein Bundesland war über oder unter der österreichischen Gesamtverlustrate über die vier Umfragejahre (Abbildung 1.70).

Die Unterschiede zwischen den Bundesländern bei Verlustrate durch „unlösbare Königinnenprobleme“ sind subtiler als die Gesamtverlusten (1.4.3 Bundesländer und Bezirke). Interessanterweise decken sich hier auch nicht unbedingt die Resultate, da im Gegensatz Wien mit besonders hohen Gesamtverlusten nur geringe Verluste durch „unlösbare Königinnenprobleme“ zeigt.

#### 1.4.10.1 Königinnenprobleme

Die Überlebenschance der Völker hängt in großem Maße auch von der Gesundheit der Königin ab. Die Imkereien wurden deshalb auch über das Auftreten von Königinnenproblemen befragt und konnten zwischen den vier Antworten „Häufiger“, „Normal“, „Seltener“ und „Weiß nicht“ (im Vergleich zu den jeweiligen Vorjahren) entscheiden. Über die Umfragejahre ist die Anzahl der Meldungen „Häufiger“ von 6,5% auf 12,2% gestiegen. Die Gruppe „Normal“ blieb in etwa gleich und „Seltener“ und „Weiß nicht“ sind gesunken (Tabelle 1.48). Somit scheinen die Königinnenprobleme über die Umfragejahre zugenommen zu haben aber eine Zunahme der Winterverluste durch „unlösbare Königinnenprobleme“ wurde nicht festgestellt. TeilnehmerInnen die „Häufiger“ melden zeigten eine signifikante Wahrscheinlichkeit für höhere Winterverluste, wenn man A) nur Verluste ohne „unlösbare Königinnenprobleme“ und B) wenn man nur Verluste durch „unlösbare Königinnenprobleme“ betrachtet (Abbildungen 1.71 und 1.72). Dadurch kann man feststellen, dass wenn man subjektiv mehr Königinnenprobleme im Jahr beobachtet die Chancen für einen erhöhten Winterverlust steigen. Auch eine internationale Untersuchungen von COLOSS wo mehrere Risikofaktoren mithilfe eines Modells auf deren Signifikanz untersucht worden sind kamen zum selben Schluss (Zee et al., 2014). Königinnenprobleme sind auch in den USA ein signifikanter negativer Faktor für das Überleben der Bienenvölker (vanEngelsdorp et al., 2013).

#### 1.4.10.2 Im Einwinterungsjahr begattete Königin („junge Königin“)

TeilnehmerInnen konnten angeben wie viele Völker mit einer jungen Königin („Nulljährigen“) eingewintert wurden. Zur weiteren Analyse in Zusammenhang mit den Winterverlusten wurde mit dieser Anzahl die Imkereibetriebe in die relativen Quartilen (0-25%, 26-50%, 51-75% und 76-100%) eingeteilt. Allgemein zeigt sich über die Umfragejahre, dass der Anteil an jungen Königinnen beim Einwintern konstant bei etwas über 50% liegt (Tabelle 1.51). Eine Langzeitstudie von 1980 bis 2018 aus Polen zeigt, dass der Anteil an ausgewechselten Königinnen relativ stabil über die Jahre bei 50% liegt aber die Anzahl der ImkerInnen die Königinnen zukaufen ist von 50% auf 66,3% gestiegen (Bieńkowska et al., 2020). Zum Zukauf an Königinnen gibt es in Österreich leider keine Daten.

Die Gruppe mit der geringsten Austauschrate „0-25%“ zeigte in drei von vier Jahren eine signifikante Wahrscheinlichkeit höhere Winterverluste ohne „unlösbare Königinnenprobleme“ zu erleiden (Abbildung 1.73). Betrachtet man nur die Verluste durch „unlösbare Königinnenprobleme“ ist der gleiche Effekt nur im Umfragejahr 2018/19 festzustellen (Abbildung 1.74). Mehrere internationale und nationale Studien kamen zum selben Ergebnis, dass junge Königinnen, genauer, das heißt im Vorjahr begattete Königinnen, einen positiven Einfluss auf die Überlebenschance der Völker haben (Genersch et al., 2010; Zee et al., 2014; Giacobino et al., 2016; Morawetz et al., 2019; Gray et al., 2020).

Die Ergebnisse zeigen die Wichtigkeit einer gesunden und jungen Königin für ein erfolgreiches Überwintern des Bienenvolkes. Als Grund für die positiven Auswirkungen wird unter anderem die größere Menge an Brut angenommen. Genauere Ursachen für den gesteigerten Überwinterungserfolg konnten jedoch noch nicht gefunden werden (Genersch et al., 2010; Amiri et al., 2017; Ricigliano et al., 2018). Eine weitere Ursache für einen verminderten Überwinterungserfolg von Völkern mit einer älteren Königin könnte in der gesundheitlichen Beeinträchtigung dieser Königin aufgrund von Neonicotinoiden (Williams et al., 2015) oder Viren (Amiri et al., 2020) liegen. Dass die Qualität von Königinnen wichtig ist und die Temperatur auch eine Rolle spielt, zeigte sich in Untersuchungen bei denen höhere Temperaturen, zum Beispiel beim Versand von Königinnen, zu Problemen führten (Withrow et al., 2019; Rousseau et al., 2020).

### 1.4.11 Verkrüppelte Flügel

Bienenviren stehen im Fokus des Projektes „Zukunft Biene 2“. Wir haben deshalb nach einem Merkmal gefragt, das mit dem Flügeldeformationsvirus (DWV = deformed wing virus) in Zusammenhang steht (siehe Modul A). Hierfür wurde das Auftreten von Arbeitsbienen mit verkrüppelten Flügeln abgefragt, dieses Symptom kann durch Kälteschaden aber auch durch die angeführte Virenschädigung entstehen. Folgende Kategorien standen zur Auswahl: „Häufig“, „Wenig“, „Überhaupt nicht“ und „Weiß nicht“.

Die Häufigkeit der Kategorien sind über die Umfragejahre in etwa gleichgeblieben, wobei die Kategorie „Häufig“ zwischen 1,3 und 2,2% liegt (Tabelle 1.54). ImkerInnen die „Häufig“ dieses Phänomen beobachtet haben, hatten eine signifikant höhere Winterverlustrate in den Umfragejahren 2018/19 und 2019/20 (Abbildung 1.75). Daraus kann man schlussfolgern, dass ein vermehrtes Vorkommen von Bienen mit verkrüppelten Flügeln als Alarmsignal für hohe Winterverluste betrachtet werden kann (Dainat und Neumann, 2013; Morawetz et al., 2019). TeilnehmerInnen die „Weiß nicht“ angaben hatten ebenfalls eine signifikante Wahrscheinlichkeit höherer Winterverluste als die Gruppe „Überhaupt nicht“, in drei von vier Umfragejahren (Abbildung 1.75). Dies könnte bedeuten, dass es sich hierbei um eher unerfahrene Imkereibetriebe handelt, die noch keine Vergleich haben und hier keine Antwort geben konnten.

### 1.4.12 Zusammenfassung

Die mittlere Verlustrate über die vier Umfragejahre mit 13,0% kann als durchschnittliches Ergebnis seit dem Beginn der Winterverlusterhebung gesehen werden. Die Verluste von Bienenvölkern über den Winter bedeutet aber nicht nur einen möglichen individuellen Verlust für den/die ImkerIn, sondern summieren sich auch National ökonomisch auf erhebliche Summen (Popovska Stojanov et al., 2021). Vor einigen Jahren gab es noch einen starken Rückgang an Imkereien in Österreich, seit 2014 ist dieser Rückgang aber gebrochen und eine starke Zunahme ist festzustellen. Dennoch durch die geringe Anzahl an Erwerbsimkereien und die ungleiche Verteilung der Betriebsgrößen, welche sich auch in unserer Umfrage widerspiegelt, ist eine Bestäubungssicherheit der kommerziellen Landwirtschaft noch immer ein mögliches Thema (Brodtschneider und Crailsheim, 2011).

Auf Bundeslandebene und auch Bezirksebene zeigen sich über die Umfragejahre deutliche Unterschiede in den Winterverlusten. Das Bundesland Wien und Niederösterreich zeigt in drei von vier Umfragejahren höhere Winterverluste. Ein Grund könnte die unterschiedliche Landnutzung im Vergleich zu anderen Bundesländern sein (Kuchling et al., 2018). In Korrelation dazu ist die analysierte Seehöhe, wo höhere Überwinterungsstandorte tendenziell weniger Verluste zeigen. Natürlich spielt im Bundesland Wien auch wieder die Struktur und Größe der Betriebe eine Rolle, die eine Verzerrung der Ergebnisse verursachen kann. Da kleinere Imkereibetriebe in allen Umfragejahren höhere Winterverlusten zeigten. Diese Ungleichheit könnte man durch bekannte Kovariablen in einem Model etwas ausgleichen, würde aber je nach Fragestellung zu einer anderen Aussage führen.

Weiterhin nicht vollständig geklärt bleibt die Frage, warum in manchen Jahren sehr viele und in anderen Jahren sehr wenige Bienenvölker den Winter nicht überleben. Der Vergleich der gemeldeten Symptome über die Jahre mit recht großen Abweichungen könnten hier im Zusammenhang stehen. Diese Abweichungen der Verlustraten und Symptomen könnte in Ansätzen auf betriebsweise-unabhängige Faktoren wie das Wetter (Switanek et al., 2017; Becsi et al., 2021) zurückzuführen sein. Fest steht, dass Bienenvölkerverluste nicht durch einen einzelnen Faktor alleine verursacht werden, sondern eine Kombination an abiotischen und biotischen Faktoren ist (Neov et al., 2019).

Die meisten analysierten Betriebsweisen zeigen im großen und ganzen keinen Einfluss auf die Winterverluste. Nur zwei abgefragte Betriebsweisen zeigen deutliche Effekte, die geringere Verluste für WanderimkerInnen und der negative Effekt bei Verwendung von Fremdwachs. Beide Betriebsweisen könnten auf eine gewisse

Professionalität hinweisen, aber besonders der negative Effekt vom Fremdwachs könnte auch auf andere Probleme deuten. Hier würde Folgeuntersuchungen sehr wichtig sein, um genauere Erkenntnisse zu bekommen. Die Frage zu den Betriebsweisen zeigt uns aber auch Trends bei unseren TeilnehmerInnen auf, wie zum Beispiel die Zunahme an isolierten Beuten im Winter und der Einsatz von Kunststoff-Beuten.

Temporäre Trends zeigen sich auch bei der Frage zu Trachtquellen. Hier spiegelt unsere Umfrage gut die guten Waldtrachten im Jahr 2017 und 2019 in vielen österreichischen Gebieten wider. Auch zeigt sich, dass ImkerInnen mit einer Waldtracht öfters auch geringere Winterverluste erfahren. Dies könnte wieder mit der Landnutzung aber auch mit Wetterphänomenen zusammen hängen (Switaneck et al., 2017; Kuchling et al., 2018; Becsi et al., 2021). Sammelnde Bienen auf Maispflanzen zeigen eine erhöhte Wintersterblichkeit von Völkern und kann als Risikotrachtquelle bezeichnet werden. In diesem Zusammenhang könnte eine einseitige Ernährung durch mangelndes Trachtangebot, welches durch Monokulturen zustande kommt, stehen (Brodtschneider und Crailsheim, 2013; Requier et al., 2017).

Die Analyse der Behandlungsmethoden erweist sich als schwierig, da es praktisch keine direkte Vergleichsgruppe gibt und die am Häufigsten eingesetzten Methoden in Österreich sehr ähnlich sind. Es zeigen sich aber imkerliche Trends wie eine Abnahme von Ameisensäurebehandlungen und eine Zunahme von biotechnischen Maßnahmen. Auch zeigten biotechnische Maßnahmen potenzial für geringere Winterverluste und auch synthetische chemische Akarizide zeigen gute Ergebnisse, obwohl diese Gruppe sehr klein in der Umfrage vertreten ist. Negativ über die Umfragejahre ist eine Behandlung mit Thymol aufgefallen und die Anwendung einer Oxalsäure Fertigmischung im Sommer und Winter, hier zeigten sich zumindest in zwei Jahren höhere Winterverlusten im Vergleich zu keiner Anwendung.

Geringe Königinnenprobleme und junge Königinnen haben einen positiven Einfluss auf die Überwinterung. Die Winterverluste durch „unlösbare Königinnenprobleme“ war konstant über die Umfragejahre. Im Bundesland Niederösterreich zeigen sich über alle Umfragejahre tendenziell und statisch mehr „unlösbare Königinnenprobleme“, aber nur im direkten Vergleich zu anderen Bundesländern. Die Wichtigkeit von vitalen und fitten Königinnen wird von mehreren Studien bestätigt (Genersch et al., 2010; Zee et al., 2014; Giacobino et al., 2016; Ricigliano et al., 2018; Morawetz et al., 2019; Gray et al., 2020).

Die Belastung der Bienenvölker variiert von Jahr zu Jahr, wobei es in manchen Jahren schwieriger ist, die Völker erfolgreich zu überwintern als in anderen. Gerade aus Wintern mit hohen Verlusten können wir wissenschaftlich belegte Empfehlungen über Anpassungen der Betriebsweisen (inklusive Varroa-Bekämpfungsstrategien) ablesen, wohingegen uns ein Winter mit geringen Verlusten wenig Gelegenheit bietet, die Spreu vom Weizen der Betriebsweisen zu trennen. Ein weiteres Argument bei der Interpretation stark schwankender Verlusten ist der mögliche Einfluss von betrieblich bis überregional auftretenden Mehrjahresdynamiken, der noch weiterer Untersuchungen bedarf.

Unsere Studie zeigt wie divers die einzelnen Faktoren, welche die Völkerverluste beeinflussen, sind. Es zeigt sich auch wie schwierig es ist nur anhand eines einzelnen Faktors einen möglichen Rückschluss zu ziehen. Wichtig ist es hierbei im Hintergedanken zu haben, dass es zu gewissen Korrelationen innerhalb der Gruppen kommen kann, so sind zum Beispiel größere Imkereien wahrscheinlicher auch Wanderimkereien. Auch sind die Anzahl der Meldungen innerhalb der verglichenen Gruppen oft sehr unterschiedlich, was wiederum bei hoher Varianz in den Gruppen zu hohen Konfidenzintervallen führt und somit eine gewisse Unsicherheit darstellt. Deswegen ist es wichtig diese Studien jährlich zu wiederholen, um Trends zu erkennen und diese auch mit Zahlen zu belegen und statistische Aussagen können besser getätigt werden, obwohl es natürlich auch einen temporalen Einfluss geben könnte. Diese Trends und Ergebnisse sollten dabei helfen ImkerInnen zu unterstützen gewisse Entscheidungen auf der Grundlage von erhobenen Citizen Science-Daten zu treffen und aus langjährigen Trends zu lernen. Ein deutlicherer Trend über unsere Umfragejahre ist, dass mutmaßliche „professionellere Imkereien“, das heißt größere Imkereien, eigener Wachskreislauf, Wanderimkerei und so weiter eine statistisch signifikante Wahrscheinlichkeit haben weniger Völker über den Winter zu verlieren.

## 1.5 Anhang

Tabelle 1.56: Burgenland - Jahresvergleich der Verlustraten in den Bezirken. Verlustrate in %, (TeilnehmerInnen; eingewinterte Völker). -: weniger als fünf TeilnehmerInnen.

Burgenland - Verlustrate % (Teilnehmer, eingewinterte Völker)						
Jahre	Eisenstadt	Eisenstadt-Umgebung	Güssing	Jennersdorf	Mattersburg	
2013/24	-	-	-	-	-	
2014/15	-	40,30% (6; 67)	42,24% (13; 161)	42,71% (8; 96)	-	
2015/16	-	-	-	23,53% (5; 85)	-	
2016/17	-	-	31,46% (6; 89)	-	28,93% (9; 121)	-
2017/18	-	-	-	-	9,49% (8; 137)	-
2018/19	-	-	-	-	16,30% (8; 135)	-
2019/20	-	-	-	-	8,05% (5; 87)	-
2020/21	-	-	-	-	15,28% (7; 72)	-
Jahre	Neusiedl am See	Oberpullendorf	Oberwart	Rust		
2013/14	-	-	31,82% (5; 88)	-		
2014/15	24,72% (7; 178)	53,72% (12; 376)	30,08% (17; 256)	-		
2015/16	3,55% (5; 169)	20,51% (7; 78)	4,17% (9; 144)	-		
2016/17	12,22% (8; 311)	20,95% (12; 253)	27,57% (15; 185)	-		
2017/18	6,45% (5; 62)	5,00% (5; 60)	11,96% (7; 92)	-		
2018/19	8,16% (7; 147)	-	5,58% (9; 269)	-		
2019/20	-	15,09% (7; 53)	13,11% (10; 183)	-		
2020/21	19,39% (7; 165)	12,46% (7; 289)	4,10% (11; 122)	-		

Tabelle 1.57: Kärnten - Jahresvergleich der Verlustraten in den Bezirken. Verlustrate in %, (TeilnehmerInnen; eingewinterte Völker). -: weniger als fünf TeilnehmerInnen.

Kärnten - Verlustrate % (Teilnehmer, eingewinterte Völker)							
Jahre	Feldkirchen	Hermagor	Klagenfurt am Wörthersee	Klagenfurt-Land	Sankt Veit an der Glan		
2013/14	11,39% (7; 202)	5,48% (20; 365)	12,66% (5; 79)	6,76% (10; 281)	15,32% (15; 385)		
2014/15	32,46% (6; 191)	56,41% (11; 195)	54,55% (10; 77)	34,55% (18; 330)	26,45% (25; 881)		
2015/16	3,86% (5; 233)	5,93% (17; 337)	12,10% (9; 124)	4,98% (15; 301)	7,28% (12; 604)		
2016/17	40,11% (7; 187)	19,95% (19; 436)	52,43% (9; 103)	15,34% (10; 189)	41,05% (16; 592)		
2017/18	13,99% (5; 193)	14,51% (22; 448)	25,79% (8; 159)	6,16% (9; 276)	20,48% (16; 420)		
2018/19	7,06% (6; 354)	12,03% (18; 316)	13,54% (10; 192)	11,22% (16; 401)	7,22% (16; 568)		
2019/20	8,81% (8; 318)	11,24% (20; 436)	8,86% (5; 79)	13,52% (21; 355)	18,58% (13; 366)		
2020/21	-	12,54% (8; 303)	31,17% (9; 77)	20,95% (16; 296)	13,35% (12; 322)		
Jahre	Spittal an der Drau	Villach	Villach-Land	Völkermarkt	Wolfsberg		
2013/14	7,09% (35; 705)	12,32% (14; 138)	-	7,47% (13; 482)	-		
2014/15	28,75% (33; 574)	25,84% (13; 178)	32,36% (50; 615)	21,78% (20; 652)	-		
2015/16	5,81% (56; 1.445)	11,32% (5; 106)	5,60% (30; 393)	6,60% (12; 303)	-		
2016/17	17,34% (67; 1.632)	19,05% (5; 63)	20,64% (22; 344)	11,76% (13; 561)	8,37% (9; 203)		
2017/18	12,11% (35; 950)	12,82% (5; 78)	15,12% (25; 324)	6,51% (15; 538)	-		
2018/19	11,96% (36; 836)	12,17% (9; 115)	23,28% (20; 262)	12,32% (11; 682)	-		
2019/20	17,54% (25; 593)	6,08% (9; 148)	15,38% (28; 364)	10,25% (17; 1.015)	-		
2020/21	14,82% (35; 850)	12,88% (9; 132)	20,86% (27; 350)	13,85% (13; 397)	7,05% (16; 397)		

Tabelle 1.58: Niederösterreich - Jahresvergleich der Verlustraten in den Bezirken. Verlustrate in %, (TeilnehmerInnen; eingewinterte Völker). -: weniger als fünf TeilnehmerInnen. \*\*: Bezirksauflösung Wien-Umgebung 2017.

Niederösterreich - Verlustrate % (Teilnehmer, eingewinterte Völker)										
Jahre	Amstetten		Baden		Bruck an der Leitha		Gänserndorf		Gmünd	
2013/24	15,75%	(22; 419)	7,92%	(8; 101)	-	-	27,78%	(20; 198)	7,66%	(29; 444)
2014/15	19,76%	(24; 506)	31,63%	(12; 98)	47,78%	(8; 90)	28,33%	(23; 300)	26,32%	(6; 133)
2015/16	9,35%	(38; 631)	0,00%	(6; 54)	-	-	16,83%	(23; 208)	14,24%	(24; 316)
2016/17	37,09%	(47; 647)	16,36%	(6; 55)	8,86%	(8; 158)	19,53%	(13; 379)	21,04%	(22; 461)
2017/18	13,86%	(39; 635)	-	-	16,42%	(10; 67)	17,48%	(25; 286)	21,45%	(18; 275)
2018/19	24,74%	(44; 663)	8,43%	(8; 83)	18,42%	(7; 76)	10,84%	(27; 821)	11,43%	(17; 420)
2019/20	25,59%	(35; 590)	15,15%	(7; 66)	13,59%	(11; 103)	11,52%	(21; 903)	11,62%	(11; 198)
2020/21	13,89%	(29; 619)	14,29%	(9; 49)	8,00%	(6; 50)	17,47%	(25; 521)	13,89%	(11; 252)
Jahre	Hollabrunn		Horn		Korneuburg		Krems an der Donau		Krems-Land	
2013/14	33,46%	(7; 254)	18,15%	(17; 325)	14,06%	(14; 192)	-	-	-	-
2014/15	31,07%	(12; 280)	34,38%	(17; 349)	43,64%	(19; 236)	-	-	25,19%	(9; 135)
2015/16	12,00%	(8; 200)	8,32%	(17; 505)	8,42%	(17; 95)	-	-	2,13%	(7; 47)
2016/17	12,05%	(8; 83)	14,57%	(22; 597)	21,77%	(22; 372)	-	-	13,41%	(9; 179)
2017/18	5,45%	(8; 110)	19,07%	(19; 708)	16,47%	(18; 334)	-	-	15,97%	(12; 119)
2018/19	28,69%	(7; 237)	13,44%	(13; 491)	11,95%	(20; 728)	-	-	14,59%	(13; 233)
2019/20	8,26%	(13; 121)	13,12%	(55; 1.151)	14,62%	(16; 513)	-	-	19,71%	(15; 279)
2020/21	7,21%	(10; 208)	14,49%	(13; 214)	11,49%	(15; 496)	-	-	17,28%	(14; 191)
Jahre	Lilienfeld		Melk		Mistelbach		Mödling		Neunkirchen	
2013/14	14,89%	(5; 47)	7,64%	(16; 157)	17,85%	(43; 521)	16,56%	(14; 151)	11,34%	(9; 97)
2014/15	10,58%	(5; 104)	32,53%	(26; 332)	22,35%	(27; 671)	29,08%	(17; 141)	44,83%	(14; 145)
2015/16	-	-	15,17%	(34; 422)	9,47%	(29; 581)	15,15%	(9; 66)	29,38%	(13; 160)
2016/17	6,13%	(15; 212)	29,30%	(19; 314)	26,84%	(38; 991)	25,23%	(13; 107)	25,41%	(17; 303)
2017/18	10,98%	(11; 246)	12,29%	(21; 301)	11,58%	(41; 1.408)	14,50%	(18; 262)	10,19%	(14; 157)
2018/19	13,25%	(15; 166)	17,89%	(33; 598)	15,63%	(26; 416)	15,24%	(11; 164)	17,24%	(17; 174)
2019/20	13,64%	(9; 132)	16,32%	(13; 190)	15,20%	(19; 454)	16,18%	(12; 136)	29,22%	(16; 154)
2020/21	13,39%	(10; 127)	17,98%	(10; 178)	14,84%	(22; 411)	13,29%	(13; 143)	21,90%	(15; 105)
Jahre	Scheibbs		St. Pölten		St. Pölten-Land		Tulln		Waidhofen an der Ybbs	
2013/14	7,74%	(18; 594)	-	-	12,15%	(32; 288)	18,71%	(9; 465)	-	-
2014/15	14,48%	(41; 808)	-	-	24,62%	(21; 260)	12,63%	(13; 372)	-	-
2015/16	10,46%	(29; 526)	-	-	-	-	7,53%	(5; 93)	-	-
2016/17	44,31%	(42; 686)	-	-	25,55%	(26; 274)	13,07%	(20; 153)	-	-
2017/18	8,38%	(37; 752)	-	-	13,38%	(25; 284)	13,83%	(10; 94)	-	-
2018/19	19,65%	(27; 692)	-	-	8,14%	(25; 258)	20,86%	(13; 465)	65,33%	(7; 150)
2019/20	9,2%	(21; 424)	-	-	12,95%	(34; 533)	12,71%	(14; 118)	-	-
2020/21	11,85%	(17; 498)	-	-	10,42%	(22; 240)	24,83%	(11; 149)	-	-
Jahre	Waidhofen an der Thaya		Wiener Neustadt		Wiener Neustadt-Land		Wien-Umgebung		Zwettl	
2013/14	19,61%	(20; 311)	-	-	10,08%	(8; 129)	20,63%	(14; 160)	2,17%	(7; 138)
2014/15	-	-	-	-	46,37%	(12; 317)	31,99%	(20; 372)	20,93%	(9; 172)
2015/16	13,45%	(36; 394)	-	-	17,93%	(9; 184)	28,99%	(14; 69)	8,77%	(11; 171)
2016/17	28,21%	(34; 560)	-	-	13,66%	(10; 205)	**	-	30,96%	(15; 239)
2017/18	21,39%	(35; 561)	-	-	12,36%	(11; 259)	**	-	16,51%	(9; 109)
2018/19	11,82%	(8; 330)	-	-	11,49%	(14; 348)	**	-	17,97%	(11; 217)
2019/20	12,50%	(10; 192)	-	-	12,73%	(13; 330)	**	-	13,04%	(14; 514)
2020/21	-	-	-	-	12,58%	(14; 310)	**	-	15,88%	(17; 340)

Tabelle 1.59: Oberösterreich - Jahresvergleich der Verlustraten in den Bezirken. Verlustrate in %, (TeilnehmerInnen; eingewinterte Völker). -: weniger als fünf TeilnehmerInnen.

Oberösterreich - Verlustrate % (Teilnehmer, eingewinterte Völker)										
Jahre	Braunau am Inn		Eferding		Freistadt		Gmunden		Grieskirchen	
2013/14	10,31%	(11; 151)	-	-	3,97%	(11; 151)	5,21%	(6; 96)	6,85%	(5; 219)
2014/15	13,72%	(19; 277)	-	-	34,72%	(10; 144)	32,14%	(10; 168)	44,79%	(8; 96)
2015/16	10,68%	(22; 468)	-	-	3,79%	(13; 211)	5,88%	(7; 85)	5,77%	(8; 104)
2016/17	13,21%	(24; 613)	19,64%	(5; 168)	27,13%	(21; 328)	16,88%	(17; 154)	34,85%	(7; 66)
2017/18	7,17%	(20; 502)	13,33%	(6; 75)	8,11%	(19; 296)	6,80%	(8; 103)	10,30%	(9; 165)
2018/19	8,09%	(30; 618)	-	-	7,28%	(18; 261)	16,13%	(12; 155)	23,95%	(8; 167)
2019/20	7,08%	(21; 466)	17,86%	(9; 112)	9,59%	(17; 271)	10,89%	(21; 202)	13,33%	(13; 300)
2020/21	10,19%	(32; 579)	-	-	18,92%	(33; 502)	11,83%	(7; 93)	15,24%	(15; 210)
Jahre	Kirchdorf an der Krems		Linz		Linz-Land		Perg		Ried im Innkreis	
2013/14	-	-	-	-	13,31%	(24; 248)	7,29%	(8; 96)	-	-
2014/15	34,74%	(7; 95)	-	-	25,37%	(12; 205)	39,39%	(7; 66)	21,43%	(6; 182)
2015/16	6,94%	(10; 620)	5,26%	(5; 38)	8,04%	(24; 311)	4,75%	(14; 316)	5,80%	(10; 207)
2016/17	18,27%	(10; 646)	21,93%	(12; 114)	23,72%	(21; 253)	15,79%	(17; 288)	8,99%	(11; 278)
2017/18	9,16%	(9; 262)	11,81%	(13; 127)	7,56%	(26; 344)	9,00%	(14; 289)	7,24%	(7; 152)
2018/19	36,36%	(8; 627)	10,10%	(7; 99)	20,60%	(21; 267)	18,08%	(22; 448)	10,86%	(13; 359)
2019/20	10,40%	(9; 202)	11,54%	(6; 52)	19,09%	(25; 309)	14,38%	(18; 452)	12,63%	(11; 293)
2020/21	7,56%	(9; 741)	31,71%	(5; 41)	16,99%	(19; 612)	7,88%	(16; 368)	15,18%	(13; 191)
Jahre	Rohrbach		Schärding		Steyr		Steyr-Land		Urfahr-Umgebung	
2013/14	10,16%	(23; 256)	15,84%	(13; 202)	-	-	8,33%	(20; 252)	26,29%	(18; 251)
2014/15	-	-	26,44%	(14; 174)	-	-	22,56%	(15; 266)	14,70%	(16; 279)
2015/16	8,48%	(16; 165)	2,48%	(26; 807)	-	-	7,73%	(13; 233)	5,18%	(21; 560)
2016/17	19,25%	(10; 187)	14,95%	(15; 388)	-	-	20,13%	(18; 313)	19,48%	(31; 775)
2017/18	-	-	14,21%	(17; 570)	-	-	18,22%	(14; 236)	9,88%	(46; 688)
2018/19	7,43%	(6; 202)	17,82%	(28; 606)	-	-	15,19%	(13; 283)	19,40%	(37; 866)
2019/20	7,48%	(12; 254)	6,26%	(22; 591)	-	-	11,29%	(16; 248)	14,37%	(28; 494)
2020/21	13,27%	(12; 226)	13,16%	(17; 433)	-	-	9,35%	(18; 246)	10,80%	(30; 639)
Jahre	Vöcklabruck		Wels		Wels-Land					
2013/14	8,57%	(14; 245)	-	-	9,47%	(8; 190)				
2014/15	32,67%	(23; 300)	-	-	45,07%	(9; 213)				
2015/16	5,68%	(19; 176)	-	-	21,14%	(11; 246)				
2016/17	21,39%	(34; 631)	-	-	24,10%	(8; 83)				
2017/18	7,14%	(25; 350)	-	-	19,80%	(11; 202)				
2018/19	12,28%	(31; 505)	-	-	19,08%	(15; 325)				
2019/20	11,52%	(35; 651)	-	-	21,43%	(14; 308)				
2020/21	11,08%	(37; 641)	-	-	17,55%	(18; 604)				

Tabelle 1.60: Salzburg - Jahresvergleich der Verlustraten in den Bezirken. Verlustrate in %, (TeilnehmerInnen; eingewinterte Völker). -: weniger als fünf TeilnehmerInnen.

Salzburg - Verlustrate % (Teilnehmer, eingewinterte Völker)												
Jahre	Hallein		Salzburg		Salzburg-Umgebung		Sankt Johann im Pongau		Tamsweg		Zell am See	
2013/14	-	-	-	-	24,62%	(12; 260)	17,48%	(15; 143)	6,35%	(5; 63)	11,89%	(11; 143)
2014/15	55,77%	(6; 407)	13,64%	(5; 44)	24,51%	(17; 408)	37,80%	(12; 127)	24,00%	(6; 100)	17,46%	(18; 252)
2015/16	-	-	-	-	13,52%	(16; 244)	6,07%	(15; 428)	2,55%	(10; 157)	2,74%	(22; 402)
2016/17	8,01%	(6; 287)	-	-	32,89%	(20; 152)	31,31%	(18; 198)	18,64%	(7; 118)	9,98%	(23; 601)
2017/18	10,16%	(5; 256)	-	-	8,61%	(20; 267)	30,26%	(9; 228)	9,43%	(6; 53)	6,09%	(15; 345)
2018/19	5,16%	(5; 252)	48,94%	(7; 235)	12,53%	(20; 415)	8,18%	(12; 159)	0,00%	(6; 75)	12,26%	(23; 367)
2019/20	13,10%	(6; 84)	5,88%	(5; 68)	16,06%	(18; 330)	12,84%	(14; 257)	10,74%	(10; 121)	8,03%	(23; 361)
2020/21	-	-	32,18%	(5; 87)	11,25%	(17; 391)	8,02%	(16; 237)	12,50%	(9; 160)	9,27%	(23; 572)



Tabelle 1.61: Steiermark - Jahresvergleich der Verlustraten in den Bezirken. Verlustrate in %, (TeilnehmerInnen; eingewinterte Völker). -: weniger als fünf TeilnehmerInnen. \*: Bezirksfusionen in der Steiermark 2013 (Bruck und Mürzzuschlag -> Bruck-Mürzzuschlag, Fürstenfeld und Hartberg -> Hartberg-Fürstenfeld, Feldbach und Radkersburg -> Südoststeiermark).

Steiermark - Verlustrate % (Teilnehmer, eingewinterte Völker)						
Jahre	Bruck	Bruck-Mürzzuschlag	Deutschlandsberg	Feldbach	Fürstenfeld	
2013/14	3,97% (12; 126)	*	13,46% (5; 52)	7,57% (12; 383)	-	-
2014/15	*	21,23% (25; 405)	14,15% (9; 205)	*	*	*
2015/16	*	12,93% (21; 263)	9,09% (8; 154)	*	*	*
2016/17	*	24,94% (23; 405)	24,70% (12; 247)	*	*	*
2017/18	*	10,95% (20; 210)	4,99% (13; 341)	*	*	*
2018/19	*	13,59% (19; 390)	17,60% (20; 392)	*	*	*
2019/20	*	11,63% (25; 301)	9,47% (10; 169)	*	*	*
2020/21	*	13,62% (21; 257)	9,68% (11; 248)	*	*	*
Jahre	Graz	Graz-Umgebung	Hartberg	Hartberg-Fürstenfeld	Leibnitz	
2013/14	23,81% (8; 42)	10,06% (19; 318)	10,44% (6; 249)	*	10,18% (14; 285)	
2014/15	18,97% (11; 195)	29,59% (22; 365)	*	43,97% (11; 614)	27,04% (18; 196)	
2015/16	22,41% (11; 58)	6,61% (28; 363)	*	5,92% (16; 608)	11,28% (23; 390)	
2016/17	20,69% (13; 145)	21,73% (41; 543)	*	13,51% (13; 259)	17,52% (21; 314)	
2017/18	10,61% (16; 179)	9,47% (32; 486)	*	8,33% (12; 396)	10,93% (24; 549)	
2018/19	5,34% (6; 131)	6,65% (34; 722)	*	6,42% (12; 654)	14,85% (17; 303)	
2019/20	16,67% (12; 168)	14,69% (32; 708)	*	5,96% (16; 923)	9,14% (21; 339)	
2020/21	21,79% (11; 78)	6,89% (30; 697)	*	7,68% (19; 898)	12,53% (15; 439)	
Jahre	Leoben	Liezen	Murau	Murtal	Mürzzuschlag	
2013/14	-	16,30% (7; 184)	6,19% (17; 452)	-	5,48% (6; 73)	
2014/15	-	10,59% (9; 255)	10,36% (8; 193)	8,40% (10; 119)	*	
2015/16	-	9,41% (18; 372)	5,96% (10; 235)	6,25% (6; 64)	*	
2016/17	26,98% (8; 441)	16,45% (24; 614)	13,14% (8; 312)	8,82% (11; 170)	*	
2017/18	5,09% (7; 216)	7,69% (16; 351)	6,50% (9; 323)	13,07% (11; 176)	*	
2018/19	18,84% (10; 207)	14,37% (21; 508)	22,48% (14; 347)	22,90% (5; 131)	*	
2019/20	12,09% (7; 273)	10,86% (26; 534)	11,16% (7; 251)	9,77% (9; 133)	*	
2020/21	16,72% (12; 329)	11,85% (28; 439)	3,80% (7; 158)	15,47% (9; 278)	*	
Jahre	Radkersburg	Südoststmk.	Voitsberg	Weiz		
2013/14	-	*	-	7,47% (17; 522)		
2014/15	*	19,60% (17; 352)	-	28,42% (15; 366)		
2015/16	*	15,71% (18; 350)	-	3,89% (13; 386)		
2016/17	*	12,95% (23; 448)	38,97% (10; 195)	13,65% (18; 740)		
2017/18	*	8,22% (15; 304)	12,00% (7; 150)	7,50% (19; 533)		
2018/19	*	12,04% (20; 382)	10,00% (10; 190)	8,56% (23; 841)		
2019/20	*	16,63% (24; 457)	6,92% (10; 159)	11,68% (21; 334)		
2020/21	*	9,89% (21; 435)	8,06% (13; 186)	17,46% (15; 315)		

Tabelle 1.62: Tirol - Jahresvergleich der Verlustraten in den Bezirken. Verlustrate in %, (TeilnehmerInnen; eingewinterte Völker). -: weniger als fünf TeilnehmerInnen.

Tirol - Verlustrate % (Teilnehmer, eingewinterte Völker)						
Jahre	Imst	Innsbruck	Innsbruck Land	Kitzbühel	Kufstein	
2013/14	-	17,24% (5; 29)	7,81% (20; 320)	5,76% (9; 243)	22,26% (27; 539)	
2014/15	-	24,53% (7; 53)	28,07% (17; 171)	24,00% (5; 75)	40,30% (26; 335)	
2015/16	5,43% (10; 184)	5,07% (16; 296)	6,10% (31; 426)	2,88% (14; 208)	3,85% (14; 260)	
2016/17	40,58% (9; 313)	-	17,85% (33; 521)	10,26% (18; 273)	31,85% (12; 248)	
2017/18	9,84% (9; 244)	6,29% (7; 159)	12,27% (35; 481)	6,55% (13; 168)	5,58% (15; 215)	
2018/19	4,87% (7; 226)	7,79% (8; 77)	13,67% (34; 490)	8,15% (21; 270)	13,81% (20; 572)	
2019/20	9,52% (13; 420)	8,54% (11; 82)	10,17% (38; 885)	7,16% (16; 447)	17,99% (22; 289)	
2020/21	14,66% (8; 191)	15,65% (11; 115)	11,34% (41; 1.102)	7,95% (18; 390)	8,15% (15; 184)	
Jahre	Landeck	Lienz	Reutte	Schwaz		
2013/14	-	3,05% (7; 262)	-	21,07% (7; 261)		
2014/15	20,62% (7; 97)	19,56% (12; 409)	-	32,10% (17; 486)		
2015/16	5,08% (12; 177)	4,62% (9; 238)	9,56% (20; 272)	3,80% (22; 526)		
2016/17	11,43% (10; 175)	9,42% (12; 276)	23,29% (13; 249)	46,85% (18; 444)		
2017/18	18,87% (8; 106)	15,98% (8; 338)	14,38% (14; 313)	10,36% (11; 251)		
2018/19	19,69% (10; 127)	11,33% (11; 450)	8,62% (14; 290)	10,86% (15; 442)		
2019/20	15,83% (6; 120)	23,48% (9; 328)	15,03% (20; 386)	11,05% (18; 742)		
2020/21	6,04% (7; 149)	4,63% (5; 216)	8,98% (27; 501)	8,61% (15; 337)		

Tabelle 1.63: Vorarlberg - Jahresvergleich der Verlustraten in den Bezirken. Verlustrate in %, (TeilnehmerInnen; eingewinterte Völker). -: weniger als fünf TeilnehmerInnen.

Vorarlberg - Verlustrate % (Teilnehmer, eingewinterte Völker)								
Jahre	Bludenz		Bregenz		Dornbirn		Feldkirch	
2013/14	9,42%	(9; 138)	16,16%	(20; 359)	31,52%	(6; 92)	23,44%	(14; 128)
2014/15	20,65%	(12; 155)	20,35%	(27; 285)	39,62%	(9; 106)	40,37%	(19; 161)
2015/16	6,80%	(16; 147)	4,86%	(14; 288)	3,39%	(8; 59)	8,57%	(12; 105)
2016/17	30,13%	(62; 707)	22,01%	(69; 977)	61,92%	(23; 239)	48,07%	(52; 491)
2017/18	4,24%	(29; 377)	11,54%	(38; 797)	12,10%	(14; 124)	12,86%	(24; 280)
2018/19	16,39%	(49; 659)	17,86%	(69; 980)	23,20%	(22; 250)	16,71%	(37; 431)
2019/20	10,73%	(52; 578)	8,35%	(39; 491)	10,74%	(13; 121)	9,39%	(30; 309)
2020/21	11,74%	(39; 494)	11,38%	(29; 413)	16,18%	(14; 173)	12,01%	(27; 283)

Tabelle 1.64: Wien - Jahresvergleich der Verlustraten. Verlustrate in %, (TeilnehmerInnen; eingewinterte Völker). -: weniger als fünf TeilnehmerInnen.

Jahre	Wien - Verlustrate % (Teilnehmer, eingewinterte Völker)	
2013/14	19,18%	(32; 318)
2014/15	51,53%	(66; 458)
2015/16	11,48%	(41; 479)
2016/17	24,76%	(70; 832)
2017/18	12,59%	(59; 945)
2018/19	19,58%	(78; 1.083)
2019/20	20,07%	(92; 1.196)
2020/21	17,09%	(59; 819)

## 2 (A) Virenmonitoring

### 2.1 Einleitung

Bienenviren gelten gemeinsam mit der Varroamilbe (*Varroa destructor*) als wichtige Faktoren für das Absterben von Bienenvölkern über den Winter (Norman L. Carreck et al., 2010; Genersch et al., 2010; Dainat et al., 2012). Vor allem die Viren ABPV (Akute Bienenparalyse-Virus), DWV (Flügeldeformationsvirus) und IAPV (Israelisches Akute Paralyse-Virus) stehen im Verdacht, Winterverluste zu verursachen (Cox-Foster et al., 2007; Berthoud et al., 2010; Genersch et al., 2010). Schwere Infektionen mit ABPV oder DWV gehen meist mit einem schweren Befall mit der Varroamilbe einher. Diese fungiert als Vektor und überträgt die Viren auf Bienen und Bienenbrut (Bowen-Walker et al., 1999; Y. P. Chen et al., 2004). Dadurch werden die Bienen doppelt geschädigt, sowohl direkt durch die Saugtätigkeit und den Nährstoffentzug durch die Milbe und ihre Nachkommen als auch durch die Funktion als Virusvektor (Amdam et al., 2004; Highfield et al., 2009). Auch während des Jahres können Virusinfektionen zu Ausfällen und Schwächungen von Bienenvölkern führen. In diesem Zusammenhang sind vor allem CBPV (Chronische Bienenparalyse-Virus), BQCV (Schwarzes Königinnenzellen-Virus) oder SBV (Sackbrutvirus) zu nennen (Y. P. Chen und Siede, 2007; Ribière et al., 2010; Roy et al., 2015).

Viele Bienenviren sind weit verbreitet und kommen in Bienenvölkern vor, ohne dass diese Völker in ihrem Erscheinungsbild oder ihrer Entwicklung auffallen. Solche Infektionen werden als verdeckte Infektionen bezeichnet (covert infection) und sind durch eine geringe Viruskonzentration sowie ein Fehlen der Symptome definiert (Miranda und Genersch, 2010). Der Gegensatz dazu ist die offene oder akute Virusinfektion (overt infection), in der die typischen Krankheitssymptome im Volk zu sehen sind und gleichzeitig ein hoher Virustiter messbar ist (Miranda und Genersch, 2010; Schurr et al., 2019). Dieses Phänomen macht es schwierig, die Auswirkung von Bienenviren auf die Bienengesundheit zu beurteilen. Denn der Nachweis eines Virus lässt nicht automatisch darauf schließen, dass sein Vorhandensein die Ursache von Bienenschäden oder eines Völkerverlustes war. Der Nachweis eines Virus zeigt nur, dass in dem Volk generell die Möglichkeit eines Ausbruchs einer akuten Infektion mit dem entsprechenden Virus gegeben ist. Daher ist es sehr wichtig, nicht nur das Auftreten, sondern auch die Viruskonzentration (=Virustiter) zu bestimmen und so zwischen den beiden Situationen zu entscheiden.

#### 2.1.1 Pathologie der untersuchten Viren

Das **Akute Bienenparalyse-Virus (ABPV)** ist ein Virus, das in erster Linie adulte Honigbienen befällt, aber auch in Brut zu finden ist (Bailey et al., 1963; Tentcheva et al., 2004). Wie der Name schon impliziert, löst es Paralyse-Symptome wie Zittern und Flugunfähigkeit bei den erkrankten Bienen aus (Bailey und Gibbs, 1964). Die erkrankten Bienen sterben innerhalb von wenigen Tagen ab und daher sind die Symptome im Volk selten sichtbar (Bailey et al., 1963). Gut sichtbar sind hingegen der stark erhöhte Totenfall und die abnehmende Volksstärke. Bei einer akuten Infektion kann es auch zu Völkerverlusten kommen. Das Virus kann sowohl zwischen Bienen (Trophallaxis, Faeces) als auch über die Varroamilbe übertragen werden (Bailey und Gibbs, 1964; Beaurepaire et al., 2020). Dabei gilt die Übertragung durch die Varroamilbe als besonders gefährlich, da bei einer intravenösen Injektion schon wenige hundert Viruspartikel ausreichen können, um eine Infektion auszulösen (Bailey und Gibbs, 1964). Das Auftreten von ABPV wurde sowohl in Deutschland als auch in der Schweiz mit erhöhtem Winterverlust korreliert (Berthoud et al., 2010; Genersch et al., 2010), was in einer detaillierten Nachfolgestudie jedoch nicht bestätigt werden konnte (Dainat et al., 2012). In den letzten Jahren wurde ABPV mit dem Israelischen Akuten Bienenvirus und dem Kashmir-Bienenvirus zu dem ABPV-Komplex zusammengefasst, da diese Virusspezies nah verwandt

sind (De Miranda et al., 2010). Überdies werden sowohl auf Ebene der individuellen Biene als auch auf Volksebene die gleichen Symptome ausgelöst (De Miranda et al., 2010). Sie treten alle weltweit auf, unterscheiden sich aber in ihren Verbreitungsschwerpunkten (De Miranda et al., 2010; Beaufrepaire et al., 2020).

Das **Schwarze Königinnenzellenvirus (BQCV)** ist zwar weit verbreitet, es wird jedoch sehr selten von Symptomen berichtet (Tentcheva et al., 2004; Beaufrepaire et al., 2020). Daher ist anzunehmen, dass dieses Virus in erster Linie als versteckte Infektion ohne Symptome auftritt. Kommt es zu einer Infektion, befällt es vor allem Larven und Puppen von Königinnen, die durch die Infektion absterben und sich zersetzen (Bailey und Woods, 1977). Im Laufe des Vorgangs verfärbt sich die Königinnenzelle schwarz, was das namensgebende Symptom darstellt. Interessanterweise können auch erwachsene Bienen erkranken und absterben, wenn ihnen BQCV künstlich injiziert wird (Al Naggar und Paxton, 2020). Dies wird als Hinweis gesehen, dass BQCV das Potential hat, auch für erwachsene Bienen gefährlich zu werden, sollte es sich nach dem Muster von DWV an eine Übertragung durch die Varroamilbe anpassen (Martin et al., 2012).

Das **Chronische Bienenparalyse-Virus (CBPV)** befällt adulte Honigbienen und hat zum Teil sehr ähnliche Symptome wie ABPV (Bailey et al., 1963). Es ist jedoch nicht näher mit den Viren des ABPV-Komplexes verwandt und wird als eigene Gruppe systematisiert (Ribièrè et al., 2010). Die erkrankten Bienen zeigen ebenfalls Paralyse-Symptome, sie bleiben jedoch über eine Woche am Leben und daher sind die Symptome gut im Volk zu beobachten (Ribièrè et al., 2007). Es ist jedoch noch ein zweites, sehr auffälliges Symptom mit der Krankheit verbunden: die schwarz-glänzenden Bienen oder „ansteckende Schwarzsucht“ (Pohl, 2005). Sie verlieren aufgrund der Erkrankung all ihre Körperbehaarung, was sie dunkelglänzend und kleiner als andere Bienen erscheinen lässt (Ribièrè et al., 2010). Zusätzlich kann ihr Hinterleib aufgebläht erscheinen (Ritter, 2012). Das Virus kann zwischen adulten Bienen sowohl durch Trophallaxis und Feces als auch über Körperkontakt übertragen werden (Bailey et al., 1983; Ribièrè et al., 2007; Toplak et al., 2013; Beaufrepaire et al., 2020).

Das **Flügelverkrüppelungsvirus (DWV)** ist das derzeit bekannteste Bienenvirus. Es galt lange Zeit, vor der Einschleppung der Varroamilbe, als nicht relevant für die Bienengesundheit. Mit der Verbreitung der Varroamilbe fand jedoch eine starke Selektion des Virus statt (Martin et al., 2012; Mondet et al., 2014), die in einer Anpassung an die Varroamilbe als Vektor endete (Bowen-Walker et al., 1999). Dabei dient die Varroamilbe nicht nur als Überträger sondern auch als Zwischenwirt, in dem das Virus sich weiter vervielfältigt (Gisder et al., 2009). Die Schwächung der Bienenvölker durch die Kombination von Varroamilbe und DWV ist derzeit einer der Hauptfaktoren für hohe Winterverluste in Europa und Nordamerika (Genersch et al., 2010; Dainat et al., 2012; vanEngelsdorp et al., 2013; Morawetz et al., 2018). Es ist sowohl eine Krankheit der Bienenbrut als auch der erwachsenen Bienen. Puppen, die durch die Varroamilbe mit DWV angesteckt werden, entwickeln verkrüppelte Flügel, einen verkürzten Hinterleib, ein aufgeblähtes Abdomen und Verfärbungen (Bowen-Walker et al., 1999; Yue und Genersch, 2005; Y. P. Chen und Siede, 2007). Sie sterben entweder noch vor dem Schlüpfen oder in ersten Tagen als adulte Biene ab. Bienen, die als Adulte mit DWV infiziert wurden, können nicht anhand von morphologischen Symptomen erkannt werden, sind aber in ihrer Lernleistung eingeschränkt (Iqbal und Mueller, 2007). Für DWV wurden zwei Mastervarianten mit gleicher Symptomatik beschrieben: Typ A (DWV-A) und Typ B (DWV-B), wobei Typ B ident mit VDV-1 ist (Ongus et al., 2005; Martin et al., 2012). Kürzlich wurde noch eine dritte Mastervariante, DWV Typ C beschrieben, die aber nur selten aufzutreten scheint (Mordecai et al., 2016).

Das **Sackbrutvirus (SBV)** wurde vor mehr als hundert Jahren als erstes Bienenvirus beschrieben (White, 1917; Bailey et al., 1964). Es ist eine Krankheit der Bienenlarven, die durch den Futtersaft von den verdeckt infizierten Ammenbienen angesteckt werden (Bailey, 1969). Die Larven sterben im Zuge der ersten Puppenhäutung ab, dabei füllt sich der Hohlraum unter der alten Larvenhaut mit Flüssigkeit und die Larven bekommen ein sackförmiges Aussehen (White, 1917; Roy et al., 2015). Diese färben sich dann gelblich, später bräunlich und trocknen ein. Dabei krümmt sich die Kopfgegend nach oben und das

sogenannte „Sackbrut-Schiffchen“ entsteht, das locker in der Zelle sitzt und daher leicht zu entfernen ist (White, 1917; Pohl, 2005). Üblicherweise sind nur wenige Brutzellen betroffen und die Auswirkungen der Infektion auf das Volk sind daher minimal (McMenamin und Genersch, 2015). Es kann jedoch auch zu schweren SBV-Infektionen mit großflächigen Brutaussfällen und starken Schwächungen der Völker kommen, wobei meist nur ein Teil des Standes betroffen ist (Roy et al., 2015). Dies kommt daher, dass Sackbrut eine Faktorenkrankheit ist, die durch das Zusammentreffen ungünstiger Bedingungen im Volk ausgelöst oder verstärkt wird (Futtermangel der Larven, schwaches Volk, alte Königin, Varroose; Pohl, 2005; Ritter, 2012; Roy et al., 2015).

### 2.1.2 Auftreten von Bienenviren in Österreich

Zahlreiche internationale Studien zeigen, dass es bezüglich der Prävalenz von Bienenviren zwischen den Regionen und den Erhebungsjahren beträchtliche Unterschiede gibt (Tentcheva et al., 2004; Genersch et al., 2010; Traynor et al., 2016). Es sind daher entsprechende eigene Untersuchungen erforderlich, um Informationen zur Situation in Österreich zu erhalten.

Trotz der Bedeutung der Bienenviren für die Bienengesundheit ist über das Vorkommen von Viren in Österreichs Bienenvölkern bisher nur begrenztes Wissen vorhanden. In den meisten Vorgängerprojekten wurden Bienen- und Brutproben aus abgestorbenen, kranken und zusammenbrechenden Völkern und von Völkern mit Vergiftungssymptomen untersucht (Berényi et al., 2006; Köglberger et al., 2009; Girsch und Rudolf Moosbeckhofer, 2012; Rudolf Moosbeckhofer und Mayr, 2014). In Proben aus erkrankten Völkern wurde am häufigsten DWV (91% der Proben) und ABPV (68% der Proben) gefunden; SBV und BQCV trat hingegen nur in 40% bzw. 30% der Proben auf (Berényi et al., 2006). In toten, geschwächten und erkrankten Völkern ist jedoch mit einem anderen Virenspektrum zu rechnen als in gesunden Völkern (Amiri et al., 2015; Morawetz et al., 2018). Dies zeigt auch eine Studie aus dem Jahr 2009, in der 43 unauffällige Bienenvölker aus ganz Österreich auf sechs Viren untersucht wurden und eine abweichende Virushäufigkeit gemessen wurde. ABPV und SBV waren häufig zu finden (ca. 50%), BQCV und DWV kam hingegen nur in einem Drittel der Völker vor (Köglberger et al., 2009). Ähnlich waren die Ergebnisse der Posthoc-Studie des Vorgängerprojektes, in der vor allem ABPV in den Völkern gefunden wurde (ca. 60%), jedoch seltener DWV und CBPV (Morawetz et al., 2018).

Die Ergebnisse der Vorprojekte erlauben keine gesicherten Aussagen zur generellen Prävalenz der untersuchten Bienenviren in Österreich. Auch kann mit den vorhandenen Daten nicht unterschieden werden, welche Viren allgemein häufig in Bienenvölkern auftreten und welche tendenziell bei Völkern mit Problemen zu finden sind.

Im vorliegenden Projekt wird daher die Prävalenz von sieben Bienenviren in Österreich über mehrere Jahre erhoben (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV [Kashmir-Bienenvirus], SBV). Vom DWV-Virus wurden in den letzten Jahren mehrere Typen beschrieben (Martin et al., 2012; Mordecai et al., 2016). Im vorliegenden Projekt werden bei DWV die zwei Typen A und B unterschieden (Martin et al., 2012). DWV Typ B wird in der Literatur auch als *Varroa destructor virus-1* (= VDV-1) bezeichnet. Daher werden im Projekt de facto acht Bienenviren erfasst und es wird im weiteren Bericht auf acht Bienenviren Bezug genommen.

Die Bienenviren ABPV, BQCV, CBPV, DWV und SBV wurden regelmäßig in österreichischen Bienenvölkern nachgewiesen (Berényi et al., 2006; Köglberger et al., 2009; Girsch und Rudolf Moosbeckhofer, 2012; Morawetz et al., 2018). IAPV und KBV wurden nur in wenigen Einzelvölkern nachgewiesen (Girsch und Rudolf Moosbeckhofer, 2012).

### 2.1.3 Ziel des Projektmoduls

Primäres Ziel des Virenmonitorings im Projekt „Zukunft Biene 2“ ist die Klärung folgender Fragen bezüglich der Virenprävalenz:

- Wie hoch ist die Prävalenz der acht genannten Bienenviren in Österreich?
- Gibt es Schwankungen in der Virusprävalenz zwischen den drei Untersuchungsjahren?

Das sekundäre Ziel ist es, den möglichen Einfluss der in den Bienenvölkern nachgewiesenen Viren in Bezug auf Winterverluste zu untersuchen. Dabei können mit dem zu erwartenden Datensatz folgende Fragen behandelt werden:

- Gibt es eine Korrelation zwischen dem Auftreten von einzelnen Bienenviren vor der Einwinterung und den Winterverlusten bei den Probenvölkern/dem beprobten Bienenstand im darauffolgenden Winter?
- Gibt es eine Korrelation zwischen der Höhe des Virustiters der unterschiedlichen Bienenviren vor der Einwinterung und den Winterverlusten bei den Probenvölkern/dem beprobten Bienenstand im darauffolgenden Winter?

Die zu erwartenden Gesamtergebnisse werden es möglich machen abzuschätzen, welche der untersuchten Bienenviren für die Bienengesundheit – und damit für den Bienenbestand und die Imkereiwirtschaft in Österreich – von hoher Relevanz sind. Gleichzeitig werden Viren und deren kritische Titerwerte identifiziert, die im Untersuchungszeitraum einen negativen Einfluss auf die Überwinterung der Bienenvölker haben.

## 2.2 Material und Methoden

### 2.2.1 Zeitablauf

Im Modul A – „Virenmonitoring“ wurde im September die Prävalenz von acht Bienenviren in drei aufeinander folgenden Jahren erhoben (2018-2020). Der September wurde als Beprobungsmonat gewählt, weil die meisten Viren zu diesem Zeitpunkt die höchste Prävalenz aufweisen (De Miranda et al., 2013). Die dreijährige Laufzeit erlaubt es, die Prävalenz der Viren zwischen den Jahren zu vergleichen. Vor Beginn des ersten Versuchsjahres wurden interessierte Imkerinnen und Imker für eine Teilnahme gewonnen (Februar - Mai 2018, Abschnitt 2.2.2). Aus diesen wurden mittels einer stratifizierten Zufallsauswahl die 200 Teilnehmerinnen und Teilnehmer für die Studie ausgesucht und ihre Teilnahme fixiert (Abbildung 2.1, Abschnitt 2.2.3). Die jährlichen Ausfälle wurden im Frühsommer des jeweiligen Jahres durch Interessentinnen und Interessenten von der Warteliste ersetzt. Insgesamt nahmen 211 Teilnehmerinnen und Teilnehmer an dem Projekt teil, davon 176 über den gesamten Zeitraum von drei Jahren.

Das Virenmonitoring lief in allen drei Jahren ident ab (Abbildung 2.1). Ende August wurden die Materialien zur Durchführung der Probenahme von der Abteilung Bienenkunde und Bienenschutz (BIEN) an die Teilnehmerinnen und Teilnehmer verschickt. In den ersten Septemberwochen führten die Teilnehmerinnen und Teilnehmer die Probenahme gemäß der beigelegten Arbeitsanleitung durch (siehe Abschnitt 2.2.4) und verschickten die Bienen danach lebend in Königinnenversandkäfigen an die Abteilung BIEN. Sofort nach Eintreffen wurden die Proben bei -18°C tiefgekühlt und gelagert (siehe Abschnitt 2.2.5). Im weiteren Verlauf wurden die Proben für die Virusanalytik vorbereitet.

Die Probenanalyse auf die acht zu untersuchenden Bienenviren wurde an der AGES, Abteilung Molekularbiologie (MOBI) des Instituts für veterinärmedizinische Untersuchungen Mödling (IVet-Mödling), mittels quantitativer real time RT-PCR im jeweils der Probenahme folgenden Winter durchgeführt (siehe

Abschnitt 2.2.7). Die Teilnehmerinnen und Teilnehmer wurden jedes Jahr im auf die Probenahme folgenden März über die Ergebnisse der Virusanalyse informiert. In den nächsten Frühlingsmonaten meldeten die teilnehmenden Imkerinnen und Imker die Überwinterungsergebnisse für die Probenvölker sowie für den gesamten beprobten Bienenstand an die Abteilung BIEN zurück (siehe Abschnitt 2.2.6). Diese Daten wurden für die Prüfung möglicher statistischer Zusammenhänge zwischen der Virusprävalenz / der Höhe der Virusbelastung (Virustiter) und Winterausfällen verwendet.

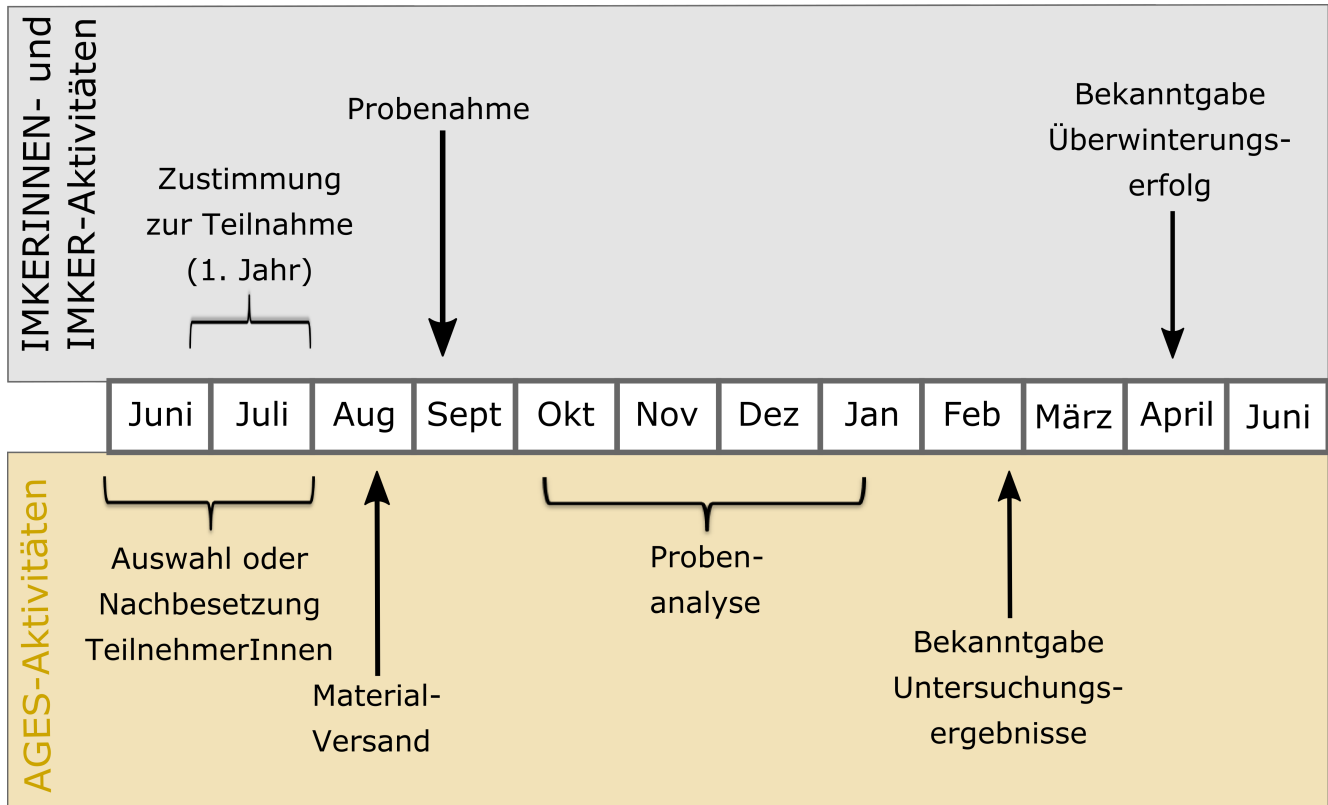


Abbildung 2.1: Schematischer Ablauf des Virenmonitorings pro Versuchsjahr.

## 2.2.2 Anwerbung und Auswahl der TeilnehmerInnen

Eine Stichprobe sollte repräsentativ für die Grundgesamtheit sein, damit ihre Ergebnisse deren Eigenschaften wahrheitsgemäß wiedergeben. Eine repräsentative Stichprobe lässt sich unter anderem dadurch erstellen, dass die Elemente der Stichprobe zufällig aus der Grundgesamtheit ausgewählt werden (Zee et al., 2013). Dies hieße im Falle des Virenmonitorings, dass die teilnehmenden Bienenstände zufällig aus einer Liste aller in Österreich vorhandenen Bienenstände gezogen werden. Ein solches Bienenstandregister liegt in Österreich seit dem Jahr 2017 im Rahmen des Veterinärinformationssystems (VIS) vor. Diese VIS-Aufzeichnungen dürfen jedoch ausschließlich zum Zwecke der Überwachung und Bekämpfung von Tierseuchen und der Überwachung der Lebensmittelsicherheit verwendet werden (TSG § 8 Abs. 6). Daher war es nicht möglich, diese Daten zur Auswahl der Teilnehmerinnen und Teilnehmer des Virenmonitorings heranzuziehen. Stattdessen wurde in der Imkerschaft für die Teilnahme am „Virenmonitoring“ geworben.



Abbildung 2.2: Beispiele der Werbung für das Virenmonitoring auf Facebook und Twitter.

Bei der Teilnehmerwerbung wurde eine Vielzahl an Informationskanälen verwendet, um eine möglichst weite Bandbreite an Imkerinnen und Imkern zu erreichen und einen systematischen Auswahlfehler zu vermeiden. Wir informierten die Imkerinnen und Imker über die Möglichkeit zur Teilnahme sowohl über die Verbandstrukturen (Werbung auf Jahreshauptversammlungen, E-Mail-Aufruf an die Landesverbände, etc.) und die österreichische Imkerzeitschrift „Bienen aktuell“ als auch über alternative Kanäle wie den AGES Facebook- und Twitter-Account (Tabelle 2.1, Abbildung 2.2). Dabei wurden zur Verstärkung der Botschaft „Wir machen den Viren-Check“ auch Imker und Imkerinnen, die sich dazu bereit erklärt hatten, als aktive Vorbilder präsentiert. Außerdem wurden Teilnehmerinnen und Teilnehmer aus der Beobachtungsstudie und der COLOSS-Studie des Vorprojektes „Zukunft Biene“, die einer weiteren Kontaktaufnahme schriftlich zugestimmt hatten, gezielt angeschrieben. Die Anmeldung zur Teilnahme erfolgte sowohl über ein Online-Formular als auch per Papierformular, das in der Imkerzeitschrift „Bienen aktuell“ abgedruckt war sowie auf Imkerveranstaltungen ausgelegt wurde.



**Tabelle 2.1: Maßnahmen zur TeilnehmerInnenwerbung für das Virenmonitoring im Zeitraum Februar bis Mai 2018**
**Internet**

Februar 2018	Aufruf auf <a href="http://www.zukunft-biene.at">www.zukunft-biene.at</a>
Februar 2018	Aufruf auf <a href="http://www.imkerbund.at">www.imkerbund.at</a>
Februar 2018	Aufruf auf <a href="http://www.biene-oesterreich.at">www.biene-oesterreich.at</a>
Mai 2018	Facebook und Twitter Kampagne (6 Postings)

**Bienen aktuell**

März 2018	Artikel in „Bienen aktuell“
Mai 2018	Erinnerung in „Bienen aktuell“

**Vortrag/Werbung**

27.Jänner 2018	Jahreshauptversammlung des Imkervereins Oberes Feistritztal
17.Februar 2018	Jahreshauptversammlung des Wiener Landesverbandes für Bienenzucht
24.Februar 2018	Österreichische Erwerbsimkertagung
24.März 2018	Jahreshauptversammlung des NÖ Landesverbandes für Bienenzucht
21.April 2018	Bundesversammlung des österreichischen Imkerbundes
25.April 2018	Gesundheitsreferententagung

**E-Mail-Aufrufe**

März, April 2018	E-Mail-Aufrufe an die Landesverbände mit der Bitte, auf den Generalversammlungen für die Teilnahme zu werben (sofern kein Vortrag über das Projekt Zukunft Biene 2 stattfand)
Februar 2018	E-Mail-Aufruf an 91 TeilnehmerInnen der Beobachtungsstudie von Zukunft Biene, die einer weiteren Kontaktaufnahme zugestimmt hatten
März 2018	E-Mail-Aufrufe an ca. 1.500 österreichische ImkerInnen der COLOSS-Studie, die einer weiteren Kontaktaufnahme zugestimmt hatten
April, Mai 2018	Zweiter E-Mailaufruf mit der Bitte um TeilnehmerInnen-Werbung an die Landesverbände der Bundesländer Kärnten, Salzburg, Oberösterreich und Vorarlberg aufgrund unterdurchschnittlicher Meldungsfrequenz in diesen Bundesländern

### 2.2.3 Stichprobengröße und Auswahl der TeilnehmerInnen

Als Stichprobengröße für das Virenmonitoring wurde die Anzahl von 200 Ständen gewählt. Bei einer Stichprobe dieser Höhe können wir davon ausgehen, dass die Prävalenz eines Virusaufkommens innerhalb eines 95% Konfidenzintervalls angegeben werden kann, das in etwa  $\pm 7\%$  Schwankungsbreite besitzt (Abbildung 2.3). Dies heißt, dass Prävalenzunterschiede von 14% zwischen den Versuchsjahren bei einer Stichprobengröße von 200 als signifikant erkannt werden können. Damit sich die Sensitivität des Monitorings derart erhöht, sodass Prävalenzunterschiede von 10% zwischen den Versuchsjahren erkannt werden können (Schwankungsbreite  $\pm 5\%$ ), müsste die Stichprobengröße auf fast das Doppelte erhöht werden (Abbildung 2.3) und wäre daher mit einem unverhältnismäßigen Aufwand an Kosten verbunden. Im vorliegenden Monitoring wird pro Stand eine Sammelprobe von fünf Völkern ausgewertet. Das erhöht die Wahrscheinlichkeit eines positiven Virusnachweises, da nur eines von fünf Völkern infiziert sein muss, um ein positives Ergebnis zu erhalten. Es ist daher zu erwarten, dass auf Standniveau tendenziell höhere Prävalenzen auftreten werden als dies bei der Auswertung von Einzelvölkern der Fall wäre.

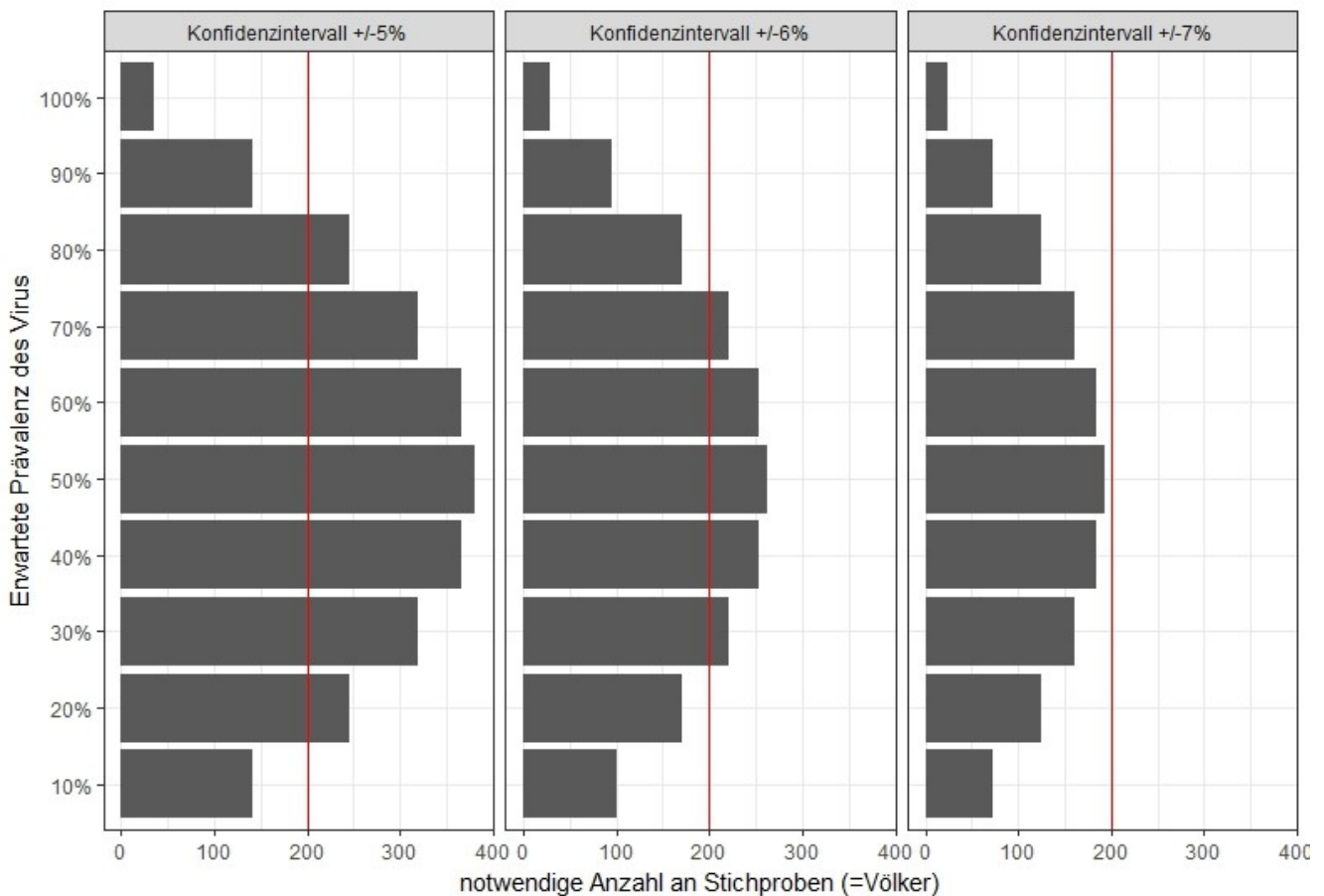


Abbildung 2.3: Berechnung der notwendigen Stichprobengröße, um bei einer binomialen Verteilung der unterschiedlichen zu erwartenden Prävalenzen ein 95% Konfidenzintervall von  $\pm 5\%$ ,  $\pm 6\%$  und  $\pm 7\%$  zu erreichen. Basis der Berechnung ist das Wilson-Konfidenzintervall, Berechnung durchgeführt in R mit der Version 3.4.1 (R Core Team, 2020) mit dem package „binomSamSize“ (Höhle, 2017). Die gewählte Stichprobengröße von 200 Ständen ist als rote Linie eingezeichnet. Überschreitet der graue Balken die rote Linie, wäre eine höhere Anzahl an Stichproben als die gewählten 200 notwendig um die gewünschte Schwankungsbreite des Konfidenzintervalls zu erreichen (fast immer bei  $\pm 5\%$ , nie bei  $\pm 7\%$ ).

Vor Durchführung der Auswahl wurde der Interessenten-Datensatz von Mehrfachmeldungen bereinigt (insgesamt 297 Interessenten meldeten 339 Standorte). Dies gewährleistete, dass Imkerinnen und Imker mit Einfachmeldungen eine gleich große Chance hatten ausgewählt zu werden, wie jene, die mit mehreren Standorten im Datensatz vertreten waren. Die Auswahl der Teilnehmerinnen und Teilnehmer erfolgte nach einer stratifizierten Zufallsauswahl. Die Stratifizierung betraf die geografische Verteilung der ausgewählten Bienenstände über Österreich. Das heißt, dass jedes Bundesland anteilig in dem Ausmaß vertreten war, der dem Anteil der im VIS gemeldeten Bienenstände des Bundeslandes an der Gesamtanzahl der österreichischen Bienenstände entsprach (Tabelle 2.2). Im zweiten und dritten Versuchsjahr mussten Ausfälle nachbesetzt werden. Auch die neuen Teilnehmerinnen und Teilnehmer wurden mittels beschriebener Zufallsauswahl aus dem Interessenten-Datensatz ausgewählt.

Tabelle 2.2: VIS-Angaben zur Verteilung der Bienenstände (Bienenst.) über die österreichischen Bundesländer (Quelle: BMASGK, Stichtag: 31.10.2017), sowie die Anzahl der freiwilligen Meldungen zur Projektteilnahme und die erhaltenen Proben im den drei Monitoringjahren. Für die Berechnungen anhand der VIS-Daten wurde nur auf Bienenstände zurückgegriffen, die mit mindestens einem Volk im VIS registriert waren.

Bundesländer	Bienenst. Ö Prozent	Meldungen Anzahl	Proben 2018 Anzahl (Prozent)	Proben 2019 Anzahl (Prozent)	Proben 2020 Anzahl (Prozent)
Burgenland	3%	13	6 (3,0%)	6 (3,1%)	6 (3,2%)
Kärnten	12%	38	23 (11,6%)	22 (11,4%)	22 (11,6%)
NÖ	20%	64	39 (19,7%)	35 (18,1%)	37 (19,5%)
OÖ	22%	60	42 (21,2%)	42 (21,8%)	38 (20,0%)
Salzburg	7%	21	16 (8,1%)	14 (7,3%)	14 (7,4%)
Steiermark	18%	37	35 (17,7%)	35 (18,1%)	32 (16,8%)
Tirol	10%	30	20 (10,1%)	20 (10,4%)	20 (10,5%)
Vorarlberg	6%	16	10 (5,1%)	10 (5,2%)	12 (6,3%)
Wien	3%	18	7 (3,5%)	9 (4,7%)	9 (4,7%)
Gesamt	100%	297	198 (100%)	193 (100%)	190 (100%)

## 2.2.4 Durchführung der Probenahme

Die Probenahme wurde jeweils im September der drei Versuchsjahre von den Imkerinnen und Imkern selbst durchgeführt (Abbildung 2.4). Dafür wurden sie von der Abteilung BIEN per Post mit allen notwendigen Materialien zur Durchführung ausgestattet (eine ausführliche bebilderte Arbeitsanleitung, Fragebogen, Plastiketiketten, Königinnenkäfige samt Futterteig, frankiertes Rücksendekuvert). Die Arbeitsanleitung zur Probenahme ist im Anhang I (Abschnitt 2.5.1) zu finden, der Fragebogen im Anhang II (Abschnitt 2.5.2).

Im ersten Versuchsjahr wählten die Imkerinnen und Imker die fünf Versuchsvölker nach einem vorgegebenen Schema aus und markierten sie mit Plastiketiketten. Sie wurden angewiesen, diese Etiketten die ganze Versuchsdauer an den jeweiligen Völkern zu belassen, um die Völker zweifelsfrei während der gesamten Studiendauer identifizieren zu können. Sollte im Laufe der drei Studienjahre ein Volk ausfallen, wurde es durch ein anderes Volk des Bienenstandes ersetzt.

Die Bienenproben wurden aus jener Zarge entnommen, in der sich die Brut befindet, oder aus der Zarge des Bienensitzes, falls keine Brut vorhanden ist. Sie wurde auf jener brutfreien Wabe genommen, die an die äußerste Brutwabe anschloss (Abbildung 2.4a). Falls keine Brut vorhanden war, wurde die Probe von einer äußeren Wabe des Bienensitzes genommen. Pro Probenvolk wurde ein Königinnenversandkäfig mit zehn Bienen gefüllt (Abbildung 2.4b). Als optionale Zusatzaufgabe baten wir die Imkerinnen und Imker ihre Völker auf folgende fünf Krankheitssymptome durchzusehen, die mit Virenbefall in Verbindung stehen können: erhöhter Bientotenfall vor dem Volk, Varroamilben auf Bienen, Bienen mit verkrüppelten Flügeln, schwarz glänzende Bienen, Sackbrutsymptome in der Brut. Diese Aufgaben waren optional, da zur Durchführung die bienenbesetzten Waben des gesamten Bienenvolks überprüft werden müssen, was sehr zeitaufwändig ist.



Abbildung 2.4: Ablauf der Probenahme. Die teilnehmenden Imkerinnen und Imker (a) identifizieren die Wabe zur Probenahme (hier: Wabe angrenzend an das Brutnest) und (b) füllen einen Königinnenversandkäfig mit zehn Bienen. (c) Käfige und Fragebogen werden in ein vorfrankiertes und adressiertes Kuvert gefüllt und schnellstmöglich an die AGES geschickt. Fotos aus der bebilderten Arbeitsanleitung.

Die fünf gefüllten Königinnenversandkäfige wurden gemeinsam mit dem ausgefüllten Fragebogen in das vorfrankierte Rücksende-Kuvert gegeben (Abbildung 2.4c). Das Kuvert war entsprechend dem PRIO-Tarif der österreichischen Post für Päckchen frankiert, der einen raschen Versand mit Zustellung am nächsten Tag verspricht. Das Kuvert wurde noch am selben oder am nächsten Tag bei der Post aufgegeben. Wir ersuchten die Imkerinnen und Imker das Kuvert zwischen Montag und Mittwoch aufzugeben, um zu verhindern, dass der Bienenversand über das Wochenende abläuft und damit unnötig verlängert wird. Sofort nach Eintreffen der Kuverts in der AGES wurden diese auf  $-18^{\circ}\text{C}$  gekühlt und die Bienen somit schnell abgetötet.

Zusätzlich wurden die Teilnehmerinnen und Teilnehmer ersucht den beigelegten Fragebogen aus zehn Fragen zu beantworten (Abschnitt 2.5.2). Dieser enthielt allgemeine Fragen zu Imkerbetrieb und Bienenstand, sowie Fragen zu Hygienemaßnahmen und Volksgesundheit. Zusätzlich wurde abgefragt, bei wie vielen der Probenvölker die definierten Krankheitssymptome beobachtet wurden (optional).

### 2.2.5 Probenbearbeitung

Nachdem die geschlossenen Proben-Kuverts mit den Bienenproben mindestens 24 Stunden bei  $-18^{\circ}\text{C}$  gelagert worden waren, wurden sie weiterbearbeitet. Der Fragebogen wurde entnommen, auf Angabe des Probenahmedatums überprüft und mit einem Etikett des Laborinformationssystems LISA versehen. Aus jedem der fünf Bienenkäfige wurden zehn Arbeiterinnen in ein „Extracting Bag“ (BIOREBA AG) überführt und 15 mL DEPC-behandeltem Wasser (Lifetech) dazupipettiert (3 mL pro 10 Bienen). Eventuell vorhandene Drohnen wurden aussortiert. Es waren in 19% der Proben zu wenige Arbeiterinnen in den Käfigen (durchschnittliche Anzahl Bienen:  $49,3 \pm 2,2$  Standardabweichung; minimale Anzahl Bienen: 39). Dies wurde vermerkt und die Menge an DEPC-Wasser angepasst. Zehn Einsendungen enthielten vier anstatt fünf Käfige (2019:  $n=4$ ; 2020:  $n=6$ ); in diesen Fällen wurden 40 Bienen entnommen und ebenfalls die Menge des DEPC-Wassers angepasst. Die Bienen wurden mit Hilfe eines Homogenisators (HOMEX 6, Bioreba) homogenisiert. Das Homogenat wurde bis zur Weiterverwendung bei  $-18^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.2.6 Abfrage Winterverluste

Es wurden die Winterverluste sowohl für die fünf Probenvölker als auch für den gesamten Bienenstand, auf dem das Monitoring durchgeführt wurde, abgefragt. Es wurde die Anzahl der eingewinterten Völker sowie

die Anzahl der Völker, die am Ende des Winters abgestorben waren (tote Völker, bienenleere Beuten), erhoben. Zusätzlich wurde abgefragt, wie viele der bei der Auswinterung lebenden Völker weisellos oder drohnenbrütig waren. Derartige Völker werden in der COLOSS-Studie ebenfalls zu den Winterverlusten gezählt und wurden erfasst, um eine Vergleichbarkeit zu erzielen (Brodtschneider et al., 2016, 2018b, 2019b). Die Winterverluste wurden bei den meisten TeilnehmerInnen online durch einen an die TeilnehmerInnen per E-Mail verschickten Link abgefragt. Auf Wunsch wurde auch ein Fragebogen auf Papier ausgeschildt. In Ausnahmefällen erfolgte die Abfrage per Telefon.

## 2.2.7 Virusanalytik

Die Bienenproben wurden an der AGES, Abteilung für Molekularbiologie (MOBI), Institut für veterinärmedizinische Untersuchungen Mödling (IVet-Mödling), mittels quantitativer real time RT-PCR (RT-qPCR) auf acht Bienenviren untersucht (ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A, DWV-B, IAPV, KBV, SBV). Für die Analyse wurden die Bienen aller fünf Bienenproben eines Standes zu einer Sammelprobe vereint. Dies hat den Vorteil, dass mit einer einzigen Probe kostengünstig ein Überblick über die vorkommenden Viren und die Virusbelastung am Bienenstand möglich ist. Allerdings ist als Folge der Sammelprobenbildung eine statistische Prüfung auf mögliche Korrelationen mit Winterverlusten ausschließlich auf der Ebene der Sammelprobe und nicht auf der Ebene des Einzelvolks möglich.

### 2.2.7.1 Plasmide und Bienenhomogenate zur Methodenetablierung und Validierung

Vom EU-Referenzlabor (EU-RL) für Bienengesundheit in Frankreich (Anses Sophia Antipolis) wurden die in der Tabelle 2.3 aufgelisteten Plasmide als Standards zur Methodenetablierung und zur absoluten Quantifizierung der entsprechenden Bienenviren zur Verfügung gestellt. Die fünf Viren ABPV, BQCV, CBPV, DWV und SBV werden in Folge mit ABCDS abgekürzt, wobei bei DWV die beiden Genotypen DWV-A und DWV-B, letzteres auch bekannt als Varroa destructor virus-1 (VDV-1), unterschieden werden. Alle Plasmide standen nur in sehr begrenzter Menge zur Verfügung, jeweils 12 µL der G9 Verdünnung ( $0,2 \times 10^9$  Kopien/µL). Zudem wurden sechzehn Bienenhomogenate vom EU-RL zur Methodenetablierung und im Rahmen eines Ringversuches für CBPV zur Verfügung gestellt (Tabelle 2.4).

Tabelle 2.3: Vom EU-RL im Jahr 2017 zu Etablierungs- und Validierungszwecken zum Nachweis von ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A, DWV-B und SBV zur Verfügung gestellte Plasmide.

Virus	Plasmid, Bezeichnung EU-RL	Größe in Basenpaaren (bp)
ABPV	pB2	4371
BQCV	pNC14	3716
CBPV	pAb1	3815
DWV-A	pC1	4393
DWV-B (VDV-1)	pFab1	4651
SBV	pD1	4442

Tabelle 2.4: Vom EU-RL zu Validierungs- und Ringversuchszwecken zum Nachweis von ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A und SBV (ABCDS) zur Verfügung gestellte Bienenhomogenate.

Probennummer MOBI (Jahr des Probeneingangs)	Probenbezeichnung EU-RL	Virus
3155-5 (2017)*	ABCDS Method adoption sample	ABPV, BQCV, CBPV, DWV, SBV
3155-6 (2017)*	ABCDS Method adoption sample	ABPV, BQCV, CBPV, DWV, SBV
3156-1 bis -10 (2017) (n=10)	ILPT (CBPV) samples	CBPV
913-1 (2018)	CBPV-5.58	CBPV
913-2 (2018)	CBPV-6.79	CBPV
913-3 (2018)	CBPV-8.02	CBPV
913-4 (2018)	CBPV-9.24	CBPV

\*Bei diesen Proben handelt es sich laut Auskunft vom EU-RL um Replikate

Von der Abteilung BIEN wurden zehn Proben (Bienenhomogenate, Nukleinsäureextrakte, cDNA bzw. Plasmide) für die Etablierung der Reverse Transkriptase quantitative PCR (RT-qPCR) für IAPV und KBV zur Verfügung gestellt (Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5: Von der Abteilung BIEN zu Etablierungs-, und Validierungszwecken zum Nachweis von IAPV und KBV zur Verfügung gestellte Proben, Virusnachweis erfolgte in der Abteilung BIEN mittels quantitativer RT-PCR. Zitate geben über die Arbeiten Auskunft, im Rahmen derer die jeweiligen Proben gewonnen worden waren.

Probennr. MOBI	Bezeichnung BIEN	Probenart	Virus-Nachweis Abteilung BIEN
856-1 (2018)	IT-1/730	RNA-Extrakt (verdünnt 1:30), 20 µL	SBV, IAPV
856-2 (2018)	IT-2/730	Bienenhomogenat, 500 µL	SBV, IAPV
856-3 (2018)	IT-3/733	Bienenhomogenat, 500 µL	BQCV, DWV, SBV, IAPV
856-4 (2018)	IT-4/IAPV- Plasmid	Plasmidischer Klon pTB-47 der publizierten Sequenz EF219380 aus Israel; ca. 2 mL	IAPV
856-5 (2018)	IT-5/ IAPV- Plasmid	Plasmidischer Klon A5; ca. 100 µL (Blanchard et al., 2008)	IAPV
856-6 (2018)	IT- IAPV- cDNA	cDNA aus Isolat 57-2; ca. 40 µL (Blanchard et al., 2008)	IAPV
856-7 (2018)	KT-1/1125	RNA-Extrakt, 20 µL	BQCV, SBV, KBV
856-8 (2018)	KT-2/1125	Bienenhomogenat, 500 µL	BQCV, SBV, KBV
856-9 (2018)	KT-3/1126	Bienenhomogenat, 500 µL	BQCV, SBV, KBV
856-10 (2018)	KT-4/KBV-cDNA	cDNA aus Deutschland, ca. 100 µL (Siede et al., 2005)	KBV

Da die vom EU-RL bereitgestellten ABCDS Plasmide nur in sehr begrenztem Umfang zur Verfügung standen, wurden diese nach Rücksprache mit dem EU-RL vermehrt. Dazu wurden Verdünnungen (1:10 in Wasser) dieser Plasmide in chemisch kompetente *Escherichia coli* Bakterien transformiert (MAX Efficiency<sup>®</sup> DH5α<sup>™</sup> Competent Cells; Invitrogen), auf Agarplatten mit Ampicillin (imMedia<sup>™</sup> Growth Medium, agar, ampicillin, X-gal/IPTG; ThermoFisher) ausplattiert und entsprechende Kolonien selektiert und in Liquid Broth plus Ampicillin (50 µg/mL) kultiviert. Aus diesen Flüssigkulturen wurden danach die in *E. coli* vermehrten Plasmide mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher) aufgereinigt und deren Reinheit und Menge mithilfe eines Photometers (SmartSpec<sup>™</sup> 3000 Spectrophotometer, BIORAD) bestimmt. Zusätzlich wurde die DNA-Menge noch mit Fluorimetrie (Qubit 3 Fluorometer und Qubit dsDNA BR Assay Kit; ThermoFisher) bestimmt. Sämtliche Plasmide zeigten eine hohe Reinheit (OD260/280 Ratio >1,7). Die beiden Quantifizierungsmethoden stimmten sehr gut überein (maximale Abweichung 25%).

Die Kopienanzahl wurde aus der bekannten Plasmidgröße (Tabelle 2.3) und der mittels Fluorimetrie bestimmten DNA-Konzentration der Plasmidlösung ( $c_{\text{Plasmidlösung}}$ ) mit folgender Formel berechnet:

$$c_{\text{Plasmidlösung}} = \frac{\text{DNA-Konzentration}}{\text{Molekulargewicht des Plasmids}} \quad (2.1)$$

$$\frac{\text{Anzahl Kopien}}{\mu\text{L}} = c_{\text{Plasmidlösung}} * 6,02 * 10^{23} \quad (2.2)$$

Entsprechende Verdünnungsreihen im Konzentrationsbereich von  $10^1$ – $10^8$  Kopien/5  $\mu\text{L}$  wurden für alle sechs Plasmide (Tabelle 2.3) in nukleasefreiem Wasser unter Zusatz von 30 ng/ $\mu\text{L}$  tRNA angefertigt. Ein mittels qPCR durchgeführter Vergleich der Ct-Werte aus Verdünnungsreihen, die einerseits anhand der in der Abteilung MOBI klonierten Plasmide, andererseits anhand der vom EU-RL zur Verfügung gestellten Plasmide hergestellt worden waren, ergab mit Ausnahme von CBPV eine nahezu perfekte Übereinstimmung der erhaltenen Ct-Werte. Bei CBPV ergab sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Plasmiden, die einerseits von der Abteilung MOBI, andererseits vom EU-RL hergestellt, bzw. quantifiziert worden waren. Nachdem die von der Abteilung MOBI erhaltenen Werte auch durch Wiederholung und Nachtestung mit einem weiteren CBPV-Klon reproduzierbar waren und alle Plasmide auf die gleiche Art hergestellt, quantifiziert und deren Konzentration berechnet worden war, wird davon ausgegangen, dass die seitens MOBI berechneten Werte korrekt sind und es wurden in der Folge sämtliche CBPV-Quantifizierungen der Projektproben basierend auf dem von der MOBI hergestellten CBPV-Plasmid durchgeführt. Der Unterschied zwischen dem CBPV-Plasmid der Abteilung MOBI und dem vom EU-RL wirkt sich in der absoluten Quantifizierung in einem etwa zehnfachen Unterschied in der berechneten Viruslast aus. Die anhand des EU-RL Plasmides berechneten Viruslasten wären etwa zehnmal höher. Eine vergleichende Quantifizierung der EU-RL ABCDS-Referenzproben, sowohl mit den vom EU-RL bereitgestellten Standardplasmiden als auch den an der Abteilung MOBI propagierten Plasmiden, ergab weitgehend übereinstimmende Werte für alle sechs Bienenviren. Dementsprechend konnten die neu hergestellten Plasmide, die nun in ausreichender Menge vorlagen, für die Quantifizierung von ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A, DWV-B und SBV im Rahmen dieses Projektes verwendet werden.

### 2.2.7.2 Nukleinsäureextraktion aus Bienenhomogenaten

Die Nukleinsäureextraktion aus Bienenhomogenat-Proben erfolgte semi-automatisiert mit dem LSI MagVet™ Universal Isolation Kit mit dem Protokoll „RNA purification from total blood & serum“ auf dem KingFisher™ Flex (beides ThermoFisher). Die Extraktion erfolgte aus 100  $\mu\text{L}$  Homogenat und die gereinigte Nukleinsäure wurde in 80  $\mu\text{L}$  Puffer eluiert und bis zur Analyse bei  $-20^\circ\text{C}$  (Langzeitlagerung bei  $-80^\circ\text{C}$ ) gelagert. Zu Vergleichszwecken wurden ausgewählte Bienenhomogenatproben manuell mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen), sowie automatisiert mit dem NucleoSpin® 96 Virus Core Kit (Macherey-Nagel) auf der Freedom EVO® 150 Plattform (Tecan) extrahiert. Die Extraktion erfolgte im Fall des QIAamp Viral RNA Mini Kit aus 140  $\mu\text{L}$  Homogenat und die gereinigte Nukleinsäure wurde in 60  $\mu\text{L}$  Puffer eluiert. Beim NucleoSpin® 96 Virus Core Kit erfolgte die Extraktion aus 100  $\mu\text{L}$  Homogenat und die Elution in 100  $\mu\text{L}$  Puffer. Diese unterschiedlichen Verhältnisse im Proben- zu Eluatvolumen wurden bei der Berechnung der Viruskopienanzahl/mL berücksichtigt.

### 2.2.7.3 Methodenetablierung und -validierung zum Nachweis und zur Quantifizierung von ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A, DWV-B und SBV

Für den Nachweis und die Quantifizierung von ABPV, BQCV, DWV-A, DWV-B und SBV mittels RT-qPCR existiert eine Standard operating procedure (SOP), die vom EU-Referenzlabor (EU-RL) für

Bienengesundheit in Frankreich (Anses Sophia Antipolis) zur Verfügung gestellt wurde. Die in der SOP beschriebene ABPV RT-qPCR basiert auf der Quantifizierung der Kapsidprotein-Gensequenz (Jamnikar Ciglencečki und Toplak, 2012); die BQCV RT-qPCR auf dem C-terminalen Bereich der Polyprotein Gen-Sequenz (Chantawannakul et al., 2006); die DWV-A und DWV-B RT-qPCR Methoden auf der Quantifizierung der jeweiligen VP3-Kodiersequenz (Schurr et al., 2019) und der SBV-Nachweis auf der Quantifizierung des N-terminalen Bereich der Polyprotein Gensequenz (Blanchard et al., 2014). Für den Nachweis und die Quantifizierung von CBPV stand eine weitere SOP zur Verfügung. Die Methode beruht auf der Quantifizierung der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (Rd-Rp) Gensequenz des CBPV-Genoms (Blanchard et al., 2007). Sämtliche Primer- und Sondensequenzen wurden anhand der oben zitierten Literatur bestellt (ThermoFisher bzw. Eurofins), mit der Ausnahme, dass die Sonden für ABPV, BQCV, DWV-A, DWV-B und CBPV – anstelle des vom in den SOPs empfohlenen TAMRA – mit dem Black Hole Quencher 1 (BHQ-1) versehen wurden.

In den beiden oben genannten SOPs erfolgt die Detektion und Quantifizierung der Bienenvirus RNAs als two-step RT-qPCR (=Reverse Transkription-qPCR) mit getrennter Reverser Transkription und darauffolgender qPCR Amplifikation der im Reverse Transkriptions-Schritt erzeugten cDNA. Demgegenüber erfolgte die RT-qPCR im Rahmen dieses Arbeitspaketes als one-step RT-qPCR, wobei RT und qPCR hintereinander im selben Reaktionsgefäß stattfinden. Hauptvorteil der one-step RT-qPCR ist, dass die Anzahl an Pipettierschritten und damit mögliche Fehlerquellen reduziert werden. Zudem wird weniger Zeit für das Probenhandling benötigt, was die one-step RT-qPCR besonders für einen höheren Probanddurchsatz, wie er in diesem Arbeitspaket gegeben ist, attraktiv macht. Ein weiterer Unterschied zu den in den beiden EU-RL SOPs angegebenen Protokollen besteht darin, dass hier keine parallele Amplifikation von interner Kontroll-DNA durchgeführt wurde. Im Gegensatz dazu wurde die Abwesenheit von PCR-Inhibitoren im Rahmen dieses Projektes durch den gesondert durchgeführten Nachweis der Apis-Actin mRNA in allen Proben bestätigt.

Die 25 µL Reaktionsmixes für die ABCDS one-step RT-qPCRs bestanden aus 12,5 µL 2x RT-PCR buffer, 1 µL 25x RT-PCR enzyme mix (AgPath-ID One-step RT-PCR kit, ThermoFisher), 5 µL Nukleinsäureextrakt und den jeweils spezifischen Primern und fluoreszenzmarkierten TaqMan-Sonden, sowie nukleasefreiem Wasser. Die Konzentrationen der verwendeten Primer und Sonden entsprachen den in den beiden EU-RL SOPs angegebenen Werten. Demnach wurden für die ABPV RT-qPCR die Primer ABPV1 und ABPVRn (je 800 nmol), sowie die Sonde ABPVnTaq (100 nmol) verwendet (Jamnikar Ciglencečki und Toplak, 2012). Für die BQCV RT-qPCR wurden die Primer BQV8195F und BQV8265R (je 320 nmol), sowie die Sonde BQCV8217T (200 nmol) eingesetzt (Chantawannakul et al., 2006). Für die CBPV RT-qPCR wurden die Primer qCBPV 9 und qCBPV 10 (je 500 nmol), sowie die Sonde CBPV 2 probe (200 nmol) verwendet (Blanchard et al., 2007). Für die DWV-A RT-qPCR wurden die Primer F-DWV\_4250 und R-DWV\_4321 (je 400 nmol), sowie die Sonde Pr-DWV\_4293 (100 nmol) verwendet, für die DWV-B RT-qPCR wurden die Primer F-VDV1\_4218 und R-VDV1\_4290 (je 1200 nmol), sowie die Sonde Pr-VDV1\_4266 (400 nmol) eingesetzt (Schurr et al., 2019). Für die SBV RT-qPCR wurden die Primer SBV-F434 und SBV-R503 (je 320 nmol), sowie die Sonde SBV-P460 (200 nmol) eingesetzt (Blanchard et al., 2014).

Zum Nachweis der erfolgreichen Nukleinsäureextraktion aus den Bienenhomogenaten, respektive zum Nachweis der Abwesenheit PCR-inhibitorischer Substanzen, wurde – wie schon im Vorgängerprojekt „Zukunft Biene“ – die Apis-Actin mRNA in den Bienenhomogenatproben semiquantitativ (d.h. ohne entsprechender Eichkurve) bestimmt (Morawetz et al., 2018). Für die Apis-Actin RT-qPCR wurden die Primer Apis-β-actin-F und Apis-β-actin-R (je 400 nmol), sowie die Sonde Apis-β-actin-Probe (200 nmol) verwendet (Y. P. Chen et al., 2005).

Das Temperaturprofil für die ABCDS-, sowie die Apis-Actin RT-qPCRs bestand aus einem RT-Schritt bei 45 °C/10 min, gefolgt von 95 °C/10 min zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase und Aktivierung der Taq-Polymerase und 42 Zyklen mit jeweils Denaturierung bei 95 °C/10s und Annealing/Extension bei 60 °C/1 min. Die RT-qPCRs wurden auf dem 7500 Fast Real-time PCR System (ThermoFisher) oder auf



dem Mx3005P (Agilent) durchgeführt, die Auswertung erfolgte mit der 7500 Software v2.3 (ThermoFisher), bzw. mit der MxPro – Mx3005P v4.10 Software (Agilent).

Die eigentliche Methodenetablierung lief in zwei Schritten ab. Im ersten Schritt wurden die RT-qPCR Parameter, wie Limit of detection ( $LOD_{PCR}$ ), Linearität der Quantifizierung, PCR-Effizienz und Limit of quantification ( $LOQ_{PCR}$ ), erhoben. Im zweiten Schritt wurde die komplette Methode von der Nukleinsäureextraktion bis zur RNA-Quantifizierung anhand der Erhebung von  $LOD_{Method}$  und  $LOQ_{Method}$  evaluiert. Für beide Schritte hatte das EU-RL anhand einer Französischen Norm (AFNOR, 2015) Referenzwerte definiert, anhand derer die Konformität der Methode mit den EU-RL Standards überprüft werden konnte.

$LOD_{PCR}$ , Linearität, PCR-Effizienz und  $LOQ_{PCR}$  waren bei ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A und SBV unter Verwendung von vom EU-RL zur Verfügung gestellten Berechnungsvorlagen konform mit den EU-RL Standards: die G2-Verdünnungsstufe (100 Kopien/Reaktion) wurde in allen fünf Tests positiv detektiert, die PCR-Effizienz war bei allen fünf Tests im Bereich von 95-104%, die Linearität der Quantifizierung wurde bei allen Tests im Bereich von  $10^2$ - $10^8$  Kopien/Reaktion bestätigt. Bei Anwendung derselben Vorlage für DWV-B wurde die Konformität der verwendeten RT-qPCR Methode auch für diesen Test bestätigt, hier lag die PCR-Effizienz etwas niedriger (87-90%).

Bei der Überprüfung der kompletten Methode von der Nukleinsäureextraktion bis zur RNA-Quantifizierung konnten hinsichtlich DWV-B keine Aussagen getroffen werden, da kein entsprechender Standard vom EU-RL verfügbar war. Die übrigen fünf Methoden waren im Hinblick auf das  $LOD_{Method}$  ebenfalls konform mit den EU-RL Standards. Beim  $LOQ_{Method}$  schreibt das EU-RL eine maximale Abweichung der erhobenen Viruslast von  $\pm$  einer  $\log_{10}$ -Stufe zum Erreichen der Konformität mit dem EU-RL Standard vor. Diese Konformität wurde für CBPV, DWV-A und SBV erreicht. Bei ABPV und BQCV lagen die Viruslasten/Biene aber um einen Faktor von durchschnittlich 1,78 (ABPV) bzw. 2,14  $\log_{10}$  (BQCV) über den EU-RL Referenzwerten. Diese Überschätzung der Viruslast bei den beiden genannten Bienenviren zeigte sich bei beiden verwendeten Extraktionsmethoden (zwei Methoden wurden hier anhand derselben Proben verglichen). Sie war jedoch bei Verwendung der semiautomatisierten Extraktion mit dem KingFisher<sup>TM</sup> Flex etwas niedriger, sodass diese Methodik hier bevorzugt wurde. Interessanterweise hat das EU-RL bei eigenen Untersuchungen eine systematische Überschätzung der ABPV und BQCV Viruslasten beobachtet und in der Folge die Werte rechnerisch korrigiert (Schurr et al., 2019). Eine derartige Korrektur wurde hier nicht durchgeführt. Die an derselben Stelle vom EU-RL beschriebene und rechnerisch korrigierte systematische Unterschätzung der DWV-B und SBV Viruslasten wurde bei unseren Untersuchungen nicht gesehen.

#### 2.2.7.4 CBPV-Ringversuch und Quantifizierung weiterer CBPV Referenzproben

Im Dezember 2017 nahm MOBI an einem Ringversuch des EU-RL für Bienengesundheit teil. Alle zehn Ringversuchsproben wurden qualitativ richtig erkannt. Bei der quantitativen Analyse der drei CBPV-positiven Ringtestproben wurden vergleichsweise niedrige Viruslasten erzielt (im Bereich von 6,31 bis 63,1-fach unter dem robusten Mittelwert/der robusten Standardabweichung aller Teilnehmer), jedoch waren die Ergebnisse im Hinblick auf Sensitivität, Spezifität, Präzision und Richtigkeit konform mit dem EU-RL Standard. Der Ringversuch wurde somit erfolgreich absolviert.

Vier weitere CBPV-Referenzproben (913-1 bis 913-4, Tabelle 2.4) mit unterschiedlicher CBPV-Last wurden ebenfalls vom EU-RL bezogen und mit der beschriebenen Methodik quantifiziert. Bei Verwendung der Extraktion mit dem KingFisher<sup>TM</sup> Flex wurden alle vier Proben mit einer Abweichung von unter einer  $\log_{10}$  Stufe richtig quantifiziert.

### 2.2.7.5 Methodenetablierung und -validierung zum Nachweis und zur Quantifizierung von IAPV und KBV

Für diese beiden RNA-Bienenviren standen keine Empfehlungen oder SOPs vom EU-RL für Bienengesundheit zur Verfügung. Die Methodenauswahl wurde daher anhand verfügbarer Literaturstellen (Stoltz et al., 1995; Chantawannakul et al., 2006; Cox-Foster et al., 2007; Maori et al., 2007; Palacios et al., 2008; De Miranda et al., 2010) oder von in der Abteilung BIEN vorhandenen Erfahrungen getroffen. Basierend auf De Miranda et al. (2010) wurden verschiedene IAPV und KBV-spezifische Primer und Sonden in silico evaluiert. Dazu wurden mithilfe des Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) des National Center for Biotechnology Information (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) Sequenzen mit entsprechender Homologie zu den von den jeweiligen Primern amplifizierten Genabschnitten gesucht und in der Folge mithilfe der Software BioEdit (T. A. Hall, 1999) die Anzahl an nicht-passenden Basenpaarungen zwischen den Primern und den entsprechenden Zielsequenzen analysiert. Basierend auf dieser Analyse erschienen die Primer KBV 6639F/6801R und IAPV 6627F/6792R (De Miranda et al., 2010) als am vielversprechendsten. Daher wurden diese Primer für eine SYBR-Green RT-qPCR synthetisiert (ThermoFisher). Zusätzlich wurden auch die Primer KBV 5425F/5800R (Stoltz et al., 1995) und IAPV 8880F/9336R (Maori et al., 2007) synthetisiert, da diese bereits in der Abt. BIEN verwendet worden waren und die Hintergrundinformation in Tabelle 2.5 teilweise auf der Verwendung dieser beiden Primersysteme basiert.

In Vorversuchen zeigte sich, dass die KBV und IAPV Primer nach De Miranda et al. (2010) jedoch bei den aus Österreich stammenden Proben 856-1 bis -3, sowie 856-7 bis -9 (2018) (Tabelle 2.5) kein positives Ergebnis erbrachten, sodass das in Österreich vorkommende IAPV und KBV damit möglicherweise nicht erfasst würden. Im Gegensatz wurden in konventionellen RT-PCRs mit den KBV und IAPV Primern nach Stoltz et al. (1995) und Maori et al. (2007) auch in den österreichischen Bienenproben (Tabelle 2.5) Amplifikate in den erwarteten Größen erhalten, die sich bei Sequenzierung (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit und 3130xl Genetic Analyzer; Thermo Fisher) und anschließender BLAST-Analyse zuerst als IAPV und KBV bestätigen ließen. In der Folge wurden zwei aus österreichischen Bienenproben stammende IAPV- und KBV-Amplifikate (aus den Proben 856-2 und 856-8; Tabelle 2.5) mithilfe des TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen) in ein Plasmid-Backbone inseriert und mit der in Abschnitt 2.2.7.1 bereits beschriebenen Methodik in *E. coli* vermehrt, die Plasmid-DNA daraus präpariert und quantifiziert. Zusätzlich wurde das Vorhandensein des IAPV- bzw. KBV Amplifikates in der gereinigten Plasmid-DNA mittels Sequenzierung bestätigt. Allerdings stellte sich bei weiteren Untersuchungen heraus, dass die mittels RT-PCR nach Maori et al. (2007) aus österreichischen Proben erhaltenen IAPV Sequenzen möglicherweise als Resultat einer Kreuzkontamination zu betrachten sind, während es sich bei den mittels RT-PCR nach Stoltz et al. (1995) aus österreichischen Proben erhaltenen Sequenzen nach phylogenetischer Analyse nicht um KBV, sondern um ein verwandtes, allerdings weder ABPV, IAPV oder KBV zuzuordnendes Virus handeln dürfte. In derselben phylogenetischen Analyse wurde gezeigt, dass die Proben 856-6 (2018) und 856-10 (2018) tatsächlich als IAPV bzw. KBV anzusprechen sind (Tabelle 2.5). Beide Proben wurden aus dem Ausland (Frankreich bzw. Deutschland) bezogen (Siede et al., 2005; Blanchard et al., 2008). Somit bestätigte sich die Darstellung von De Miranda et al. (2010), wonach die RT-PCR nach Stoltz et al. (1995) als nicht spezifisch für KBV anzusehen ist. In der Folge wurde daher beschlossen, in Abwesenheit anderer als geeignet erscheinender RT-PCR Protokolle für die weiteren Untersuchungen mit den Primern KBV 6639F/6801R und IAPV 6627F/6792R (De Miranda et al., 2010) weiterzuarbeiten. Bei den Reverse Primern KBV 6801R und IAPV 6792R handelt es sich um denselben Primer, der zu Vereinfachungszwecken hier auf KBV-IAPV-R umbenannt wurde.

Für die KBV, beziehungsweise die IAPV RT-qPCR, wurden somit jeweils die Primer KBV 6639F/ KBV-IAPV-R, beziehungsweise die Primer IAPV 6627F/KBV-IAPV-R (je 450 nmol), zusammen mit 1x POWER SYBR Green Master Mix und 1x RT Enzyme Mix (ThermoFisher), sowie nukleasefreiem Wasser und

5 µL Probe in einem Reaktionsvolumen von 20 µL angesetzt. Das Temperaturprofil bestand aus einem RT-Schritt bei 48 °C/30 min, gefolgt von 95 °C/10 min zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase und Aktivierung der Taq-Polymerase und 40 Zyklen mit jeweils Denaturierung bei 95 °C/10 s, Annealing bei 58 °C/30 s und Extension bei 72 °C/30 s. Auf die Amplifizierung folgte hier noch eine Schmelzkurvenanalyse, bei der die Schmelztemperatur (T<sub>M</sub>) der gebildeten RT-qPCR Produkte bestimmt wurde. Zur absoluten Quantifizierung wurden die aus den Proben 856-6 und 856-10 (2018) amplifizierten RT-qPCR Produkte auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und nach Ausschneiden der Banden und Aufreinigung der DNA (QIAquick Gel Extraction Kit; Qiagen) fluorimetrisch quantifiziert (Qubit 3 Fluorometer und Qubit dsDNA BR Assay Kit; ThermoFisher). Die Berechnung der Kopienanzahl erfolgte nach der unter Abschnitt 2.2.7.1 angegebenen Formel. RT-qPCRs wurden auf dem 7500Fast Real-time PCR System (ThermoFisher) oder auf dem CFX96 Touch Real-Time PCR System (Bio-Rad) durchgeführt, die Auswertung erfolgte mit der 7500 Software v2.3 (ThermoFisher), bzw. CFX Maestro 1.1 Software (Bio-Rad). Auf beiden Geräten lagen die Schmelztemperaturen für die IAPV bzw. KBV Amplifikationsprodukte bei ca. 79-80°C.

### 2.2.7.6 Testung und Quantifizierung der Projektproben

Zusätzlich zu den Projektproben wurden während der Homogenisierung der Bienenproben in der Abteilung BIEN Wasserproben als Prozesskontrollen für den gesamten Bearbeitungsprozess mitgeführt. Zudem wurde bei der Nukleinsäureextraktion in jeder zweiten Spalte einer 96-well Platte (also pro 14 Proben) eine PBS-Negativextraktionskontrolle zur Erkennung von Kreuzkontaminationen während der Extraktion mitgeführt. Alle Proben, Prozesskontrollen und Extraktionskontrollen wurden wie unter Abschnitt 2.2.7.2 beschrieben mit dem LSI MagVet<sup>TM</sup> Universal Isolation Kit auf dem KingFisher<sup>TM</sup> Flex (beides ThermoFisher) extrahiert und in der Folge im Einzelansatz auf Apis-Actin mRNA, sowie auf RNA der Viren ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A, DWV-B, SBV, IAPV und KBV getestet. Alle im Erstansatz positiven Proben wurden dann erneut extrahiert und unter Zuhilfenahme von externen Standardverdünnungsreihen mit bekannter Konzentration im Doppelansatz quantifiziert. Proben, die nach der Erstuntersuchung positiv, in der Wiederholungstestung im Doppelansatz aber negativ getestet wurden, wurden als negativ beurteilt. Ergab sich nach Wiederholungsextraktion und RT-qPCR Ansatz ein qualitativ und/oder semiquantitativ deutlich abweichendes Ergebnis wurde zur Verifikation erneut extrahiert und im Doppelansatz quantifiziert. Im zweiten und dritten Projektjahr wurden die Proben von Anfang an im Doppelansatz extrahiert und in der PCR im Duplikat mit der Standardkurve getestet. Es wurde also durchgängig im Projekt jede Probe zumindest 2x extrahiert und alle nicht zusammenpassenden Ergebnisse nachverfolgt bzw. erneut extrahiert und getestet.

Die Angabe der finalen Kopienanzahl für jedes Virus pro mL Bienenhomogenat ergab sich aus der Formel: Kopienanzahl/Reaktion (Mittelwert aus zwei Replikaten) x 160. Während der Extraktion ist es teilweise zu geringgradigen Verschleppungen von viruspositivem Material gekommen (positive Ergebnisse bei den Negativextraktionskontrollen, siehe Abschnitt 2.3.3.2). In allen Fällen blieben diese Nachweise in einem sehr niedrigen Konzentrationsbereich, unterhalb des vom EU-RL definierten LOD<sub>PCR</sub>/LOQ<sub>PCR</sub> von 100 Kopien/Reaktion (=1,6x10<sup>4</sup> Kopien/mL Homogenat). Daher wurde dieses als Grenze zwischen letztendlich als positiv bzw. negativ bewerteten Proben definiert, um falsch-positive Ergebnisse aufgrund von geringen Verunreinigungen weitgehend auszuschließen.

## 2.2.8 Statistik

### 2.2.8.1 Zusammenhang zwischen Prävalenz bzw. Virustiter und Standort- bzw. Volksfaktoren

Die gesamten Auswertungen wurden mit dem Statistikprogramm R Version 4.0.4 durchgeführt (R Core Team, 2020). Alle Abbildungen wurden mit R erstellt (package „ggplot2“: Wickham, 2016). Die 95% Konfidenzintervalle der Virusprävalenz wurden unter Verwendung der Wilson-Methode errechnet (package „binom“: Dorai-Raj, 2014). Auf Unterschiede in der Prävalenz zwischen den verschiedenen Faktoren (Bundesländer, Seehöhe, etc.) und den drei Versuchsjahren wurde mittels GLMM (General linear mixed model; package „lme4“: Bates et al., 2015) mit binominaler Verteilung getestet (random effect: Standortidentität). Zur Auswertung möglicher Zusammenhänge zwischen den genannten Faktoren und dem Virustiter von positiven Proben wurden LMM (Linear mixed models; package „lme4“; Bates et al., 2015) herangezogen (random effect: Standortidentität). Dafür wurde die Zielgröße Virustiter logarithmiert um die Rechtsschiefe der Daten auszugleichen. Waren aufgrund der geringen Stichprobenzahl zu wenige Standortidentitäten mehrfach im Datensatz vorhanden, wurde ein lineares Modell gerechnet.

GLMMs haben Probleme, wenn eine sogenannte „total separation“ auftritt, also wenn entweder alle Fälle positiv oder negativ sind. Bei derart verteilten Daten konnte kein aussagekräftiges Konfidenzintervall berechnet werden. Dies ist vor allem bei BQCV, DWV-B und CBPV ein Problem, da diese Viren entweder fast überall oder fast nie vorkamen. Daher wurde bei diesen Viren einige Male auf die statistische Berechnung verzichtet oder besonders problematische Faktoren entfernt. Darauf wird an den entsprechenden Stellen in Text und Abbildung hingewiesen. Aufgrund der häufig auftretenden „total separation“ unterscheidet sich die Berechnung des Konfidenzintervalls von der Berechnungsmethode im zweiten Zwischenbericht, in dem ein General Linear Model mit einer quasibinomialen Verteilung berechnet wurde (Zee et al., 2013). Die Wilson-Methode, die seit dem dritten Zwischenbericht angewandt wird, kommt mit dieser Art Daten besser zurecht.

Waren Variablen nicht normal verteilt wurden sie mittels Median beschrieben. Der Median stellt jenen Wert dar, unter dem die eine Hälfte aller Werte liegt, während die andere Hälfte der Werte darüber liegt. Um die Streuung darzustellen, wurde das untere Quartil (Q1, 25% der Werte liegen darunter) und das obere Quartil (Q3, 75% der Werte liegen darunter) angegeben.

Jeder Faktor wurde auf den Zusammenhang mit allen auftretenden Viren getestet, wenn es die Datenlage zuließ. Mehrfachtestungen erhöhen die Wahrscheinlichkeit eines falsch signifikanten Ergebnisses. Daher wurde der P-Wert in solchen Fällen nach Bonferroni-Holm korrigiert (Holm, 1979). Diese Methode ist weniger konservativ als die übliche Bonferroni-Korrektur, da sie sequentiell vorgeht.

Für die Winterverluste wurde auf die bewährte Berechnung der 95% Konfidenzintervalle mittels General Linear Model mit einer quasibinomialen Verteilung zurückgegriffen (Zee et al., 2013).

#### 2.2.8.2 Einflussfaktoren auf die Winterverluste

Ziel war es, die Winterverlustrate an den Bienenständen anhand verschiedener Einflussgrößen vorherzusagen. Im vorhergehenden Bericht wurden vier verschiedene statistische Verfahren getestet und in ihrer Eignung miteinander verglichen. Aufgrund der Ergebnisse dieser Tests wurden zwei Verfahren für die endgültige Auswertung ausgewählt. Diese werden in Folge kurz beschrieben.

Für alle statistischen Verfahren wurde der selbe Datensatz mit den Daten aus den Versuchsjahren 2018 bis 2020 verwendet (2018: n=198; 2019: n=192; 2020: n=187). Die Stichprobenzahl ist geringer als die Gesamtzahl der teilnehmenden Imkerinnen und Imker, da für vier Datensätze keine Winterverluste bekannt gegeben wurden (fehlend: 2019: n=1; 2020: n=3). Als potenzielle Prädiktoren (=Einflussvariablen) wurden

die Virustiter der nachgewiesenen Viren und acht weitere Kenngrößen der Volkergesundheit und des Betriebs ausgewählt. Die Ergebnisse von DWV-A wurden nicht miteinbezogen, da die Häufigkeit des Auftretens zu gering für eine statistische Aussage war (2018: zwei positive Fälle; 2019 und 2020: ein positiver Fall). Die weiteren Kenngrößen waren das Auftreten der Symptome „deformierte Flügel bei Bienen“ und „Varroamilben auf Bienen“, das Untersuchungsjahr, die Anzahl der als schwach klassifizierten Monitoringvölker, die Seehöhe des Bienenstandes, die Jahre an imkerlicher Erfahrung, das Vorhandensein einer Bio-Zertifizierung und die Gesamtanzahl der Bienenvölker in der Imkerei.

Der Virustiter in den Stichproben hatte einen Wertebereich von  $10^4$  bis  $10^{11}$  RNA-Kopien/mL Homogenat. Diese große Spannweite und die sehr hohen Werte machen bei klassischen statistischen Modellen Probleme. Daher wurden auch Modelle aus dem Bereich des maschinellen Lernens herangezogen, die alternative Ansätze bieten.

### *Logistische Regression*

Zur Berechnung wurde ein GLM mit binomialer Verteilung verwendet (package „lme4“: Bates et al., 2015). Diese verwendet als Zielgröße den Anteil an abgestorbenen Monitoringvölkern pro Bienenstand. Da die hohen Werte des Virustiters für klassische parametrische Modelle schwer zu handhaben sind, wurden sie in vier Kategorien eingeteilt. Die Kategorien wurden wie folgt festgelegt: „negativ“, „geringe Konzentration“ (unter  $10^7$  RNA-Kopien/mL Homogenat), „mittlere Konzentration“ ( $10^7 - 10^9$  RNA-Kopien/mL Homogenat) und „hohe Konzentration“ (über  $10^9$  RNA-Kopien/mL Homogenat). Zur Selektion relevanter Prädiktoren wurde eine Vorwärtsselektion durchgeführt. Dabei geht man von einem Grundmodell ohne Prädiktoren aus und fügt Schritt für Schritt relevante Prädiktoren hinzu, bis das Modell statistisch nicht mehr signifikant verbessert werden kann.

### *Regression Tree*

Die Methodik der Regression Trees fällt in die umfangreiche Methodenklasse des maschinellen Lernens und ist ein Spezialfall der Decision Trees. Ziel ist es, mit Variablen (sogenannten Features) das Ergebnis (=Outcome) eines Zufallsereignisses vorherzusagen. Diese Methode wurde für die folgenden Auswertungen nicht verwendet, die Erklärung wird aber im Bericht belassen, da die untenstehende Methode „Random-Forest“ darauf aufbaut.

Die Grundidee eines Regression Trees ist es, die Stichprobe zuerst in zwei Gruppen aufzuteilen und dann diese erhaltenen Gruppen schrittweise immer wieder in zwei Gruppen aufzuteilen, sodass jede neu gebildete Gruppe in sich möglichst homogen bezüglich des Outcomes ist. Dabei sollen diese sogenannten Splits, also die Unterteilungen in zwei Gruppen, immer anhand der Werte der Features durchgeführt werden. In diesem konkreten Fall könnte das bedeuten, dass die beobachteten Bienenstände eingeteilt werden in Bienenstände mit hohem und in Bienenstände mit niedrigem Titer bezüglich Virus A. Ziel ist es die Teilungsgrenze (=Cut Off Wert) bei den Messwerten von Virus A so zu optimieren, dass beispielsweise Bienenstände unter dieser Grenze eine tendenziell niedrigere Sterblichkeitsrate aufweisen und Bienenstände über dieser Grenze eine tendenziell höhere Sterblichkeitsrate. Nach einem ersten Split wird weiter untersucht, ob eine weitere Auftrennung nach anderen oder aber auch denselben Features die Vorhersage der Sterblichkeitsrate wesentlich verbessert. So entsteht nach und nach ein Regression Tree mit verschiedenen Ästen, die zum Schluss in möglichst homogenen Gruppen enden. Für jede dieser Gruppen wird zum Schluss ein Vorhersagewert für den Outcome berechnet, in dem alle beobachteten Outcomes aller Objekte einer Gruppe gemittelt werden. Ein detailliertes Beispiel eines Regression Trees wird in dem Kapitel 2.3.8.2 des 2. Zwischenbericht vorgestellt (Brodtschneider et al., 2019b).

Regression Trees weisen eine hohe Varianz auf, da im Algorithmus Zufallselemente vorhanden sind. Führt man den Algorithmus mehrmals hintereinander aus, so erhält man jedes Mal unterschiedliche Ergebnisse. Diese Varianz ist je nach Datensatz mehr oder weniger hoch. Dies ist einer der größten Nachteile dieser Methode (Breiman et al., 1984) und der Grund, warum sie nicht für die Auswertung verwendet wurde.

## Random-Forest

Random-Forest-Modelle gehören zu den sogenannten Ensemble Methoden. Das sind Methoden, die verschiedene Basismodelle kombinieren, um eine bessere Vorhersage zu erhalten als die Einzelmodelle (Smolyakov, 2017). Bei den Random-Forest-Modellen werden verschiedene Regression Trees kombiniert. Ziel dabei ist es, möglichst verschiedene unkorrelierte Bäume zu kombinieren, damit die hohe Varianz der Regression Trees reduziert werden kann. Für die Berechnung des Random-Forest-Modells wurde das package „ranger“ verwendet (Wright und Ziegler, 2017).

Random-Forest-Modelle reduzieren die Varianz von einzelnen Regression Trees, haben aber den Nachteil, dass das Endmodell nicht mehr so klar und übersichtlich darstellbar ist, wie bei den Regression Trees. Um dennoch zu bewerten, welche Features relevant für die Vorhersage der Wintersterblichkeit sind, können sogenannte Variable-Importance-Plots erstellt werden. Diese können entweder anhand des Total Decrease in Node Impurity oder anhand der Mean Decrease Accuracy berechnet werden. Beide Werte werden hier nicht näher diskutiert. Generell gilt, je höher die Werte, desto relevanter war die Variable für die Verbesserung der Vorhersagegüte des Modells. Diese Kenngrößen sagen jedoch nichts darüber aus, von welcher Art der Einfluss auf die Wintersterblichkeit ist, d.h. ob der Prädiktor eher zu einer hohen oder einer geringeren Wintersterblichkeit beiträgt.

Für die Berechnung der Kennwerte für die Bewertung der Variable Importance und deren grafische Darstellung wurden die packages „vip“ und „gridExtra“ verwendet (Auguie, 2017; Greenwell et al., 2020).

### Bewertung der Modell Performance

Um die Vorhersagekraft der einzelnen Modelle zu bewerten, wurde eine Kreuzvalidierung mit dem package „caret“ durchgeführt (Kuhn, 2020). Dazu werden nur 75% (zufällig ausgewählter „Trainingsdatensatz“) der Stichprobe für die Anpassung der Modelle herangezogen, die restlichen 25% („Testdatensatz“) werden dafür verwendet, die Vorhersagekraft der Modelle zu testen. Als Vergleichsmodell wurde das Basismodell festgelegt. Das ist jenes Modell, das pauschal unabhängig von jeglichen Einflussgrößen die durchschnittliche Wintersterblichkeit für alle Bienenstände vorhersagt. Um die Vorhersagegüte der einzelnen Modelle zu vergleichen, wird der RMSE (Root-Mean-Square Error) einerseits für den Trainings- andererseits auch für den Testdatensatz berechnet. Dafür werden die Differenzen der vorhergesagten und tatsächlich beobachteten Wintersterblichkeitsrate für jeden Bienenstand aus dem Trainings- bzw. Testdatensatz berechnet, quadriert und aufsummiert. Aus dieser Summe wird dann noch die Wurzel gezogen. Somit erhält man eine Art durchschnittlichen Vorhersagefehler. Je geringer der RMSE für ein Modell ist, desto akkurater konnte das Modell die Wintersterblichkeitsrate für die Bienenstände vorhersagen.

## 2.3 Ergebnisse

### 2.3.1 Kontakt mit den Projektteilnehmerinnen und Projektteilnehmern

#### *Projektbeteiligung der Imkerinnen und Imker*

Während der dreijährigen Laufzeit des Projektes haben 211 Imkerinnen und Imker am Virenmonitoring teilgenommen. Davon haben 176 Imkerinnen und Imker in allen drei Jahren aktiv an dem Projekt mitgearbeitet. Weitere 18 Imkerinnen und Imker haben in zwei Projektjahren teilgenommen (2018/2019: 12, 2018/2020: 1, 2019/2020: 5) und 17 waren in einem Jahr mit dabei (2018:9, 2019:0, 2020: 8). Damit blieb ein großer Prozentsatz der teilnehmenden Imkereibetriebe konstant und ermöglicht einen Vergleich der Virusergebnisse zwischen den Jahren.

In allen drei Jahren fand die Probenahme in September innerhalb eines Zeitraums von zwei Wochen statt (Tabelle 2.6). Ein Großteil der Proben traf im anvisierten Zeitraum ein. Im Jahr 2018 wurden 91% der

Proben im Probenahmezeitraum genommen, im Jahr 2019 waren es 85% der Proben und im Jahr 2020 83% der Proben. Die restlichen Proben trafen entweder kurz vorher (zw. 1- 3% der Proben) oder in den folgenden vier Wochen ein.

Tabelle 2.6: Eintreffen der Proben in den drei Versuchsjahren.

Jahr	Zeitraum Probenahme	Eintreffen Probe			Datum	
		zu früh	im Rahmen	zu spät	1. Probe	letzte Probe
2018	01.Sept.-16.Sept.	1	181	16	31.Aug.	08.Okt.
2019	31.Aug.-15.Sept.	1	165	27	28.Aug.	13.Okt.
2020	05.Sept.-20.Sept.	6	158	26	31.Aug.	10.Okt.

Im zweiten und dritten Probenjahr schickten insgesamt zehn Imkerinnen und Imker nur Proben von vier - statt wie geplant von fünf Völkern - Proben (2019: 4 Einsendungen, 2020: 6 Einsendungen). Wir entschieden, auch diese Proben in die Analyse aufzunehmen, um die Messreihe der drei Jahre nicht zu unterbrechen.

Die Fragebögen wurden in allen Versuchsjahren von allen Teilnehmerinnen und Teilnehmern ausgefüllt. Bei etwa einem Drittel der Fragebögen wurde aufgrund unlogischer oder fehlender Angaben seitens der TeilnehmerInnen noch bei den TeilnehmerInnen rückgefragt und die Angaben gegebenenfalls korrigiert. Die optionale Zusatzaufgabe einer Durchsicht auf ausgewählte Krankheitssymptome wurde in allen Versuchsjahren von über 80% der Imkerinnen und Imker vollständig durchgeführt (2018: 93% von 198; 2019: 83% von 193; 2020: 85% von 190). Weitere ImkerInnen gaben zu einem Teil der Symptome Beobachtungen an (2018: 2% von 198; 2019: 5% von 193; 2020: 5% von 190).

#### Mitteilung der Ergebnisse

Die teilnehmenden ImkerInnen erhielten jedes Jahr im März die individualisierten Ergebnisse der Virusuntersuchungen ihrer Sammelprobe per E-Mail oder per Brief (Abschnitt 2.5.3). Die Ergebnismitteilung enthielt folgende Information über die acht untersuchten Viren: den Nachweis (positiv/negativ), den Virustiter und dessen Beurteilung (niedrig, mittel, hoch). Die Beurteilung erfolgte als relative Einschätzung im Vergleich zu den in der gesamten Stichprobe gemessenen Titerwerten des jeweiligen Virus (niedrig: Titer im Bereich der niedrigsten 25%; mittel: Titer liegt zwischen 25% und 75%, hoch: Titer liegt im Bereich der 25% höchsten Werte).

Allen ImkerInnen, die das erste Mal an der Probenahme teilgenommen haben, wurde ein Informationsdokument mit Basiswissen zu den untersuchten Bienenviren zugeschickt (Abschnitt 2.5.4). Im letzten Versuchsjahr erhielten alle teilnehmenden ImkerInnen eine Zusammenfassung der Ergebnisse der drei Versuchsjahre.

#### Abfrage Winterverluste

Im Frühjahr der Jahre 2019, 2020 und 2021 wurden allen Imkerinnen und Imkern, die im September des Vorjahres Proben eingeschickt hatten, per E-Mail-Link oder Brief eine Umfrage zu den Winterverlusten übermittelt. Imker oder Imkerinnen, die noch keine Winterverluste gemeldet hatten, wurden im Monatsrhythmus per E-Mail oder Telefon daran erinnert, uns die Daten zukommen zu lassen. Für das 2. und das 3. Versuchsjahr konnten einige Imker und Imkerinnen nicht mehr per Telefon oder E-Mail erreicht werden und schieden aus dem Projekt aus (Frühling 2020: 1 Person, Frühling 2021: 3 Personen).

## 2.3.2 Kennwerte der teilnehmenden Imkereibetriebe

Die Betriebsgröße der 211 insgesamt teilnehmenden Imkereibetriebe bewegte sich zwischen fünf und 430 Völkern pro Betrieb. Im Mittel besaß ein teilnehmender Betrieb 41,5 Völker (Standardabweichung:  $\pm 61,8$  Völker). Dabei hatten in allen Jahren etwa 43% der Betriebe bis zu 20 Völker, weitere 41% zwischen 21 und 50 Völker und etwa 16% der Betriebe über 50 Völker (Tabelle 2.7). Es war kein statistische Unterschied in der Zusammensetzung der Betriebsgröße zwischen den Jahren feststellbar ( $\chi^2=0,03$ ;  $df=4$ ;  $P=0,999$ ).

Die 211 teilnehmenden ImkerInnen setzten sich sowohl aus sehr erfahrenen ImkerInnen mit maximal 58 Jahren Imkereierfahrung als auch aus NeueinsteigerInnen mit einem Jahr Imkereierfahrung zusammen. Der Mittelwert der Stichprobe betrug 16,7 Jahre Imkereierfahrung (Standardabweichung:  $\pm 15,1$  Jahre). Der Anteil der ImkerInnen mit wenigen Erfahrungsjahren überwog in allen drei Versuchsjahren. Rund 54% der ImkerInnen hatten bis zu 10 Erfahrungsjahre, weitere 27% zwischen 11 und 30 Jahre und die restlichen 19% der TeilnehmerInnen imkerten schon über 30 Jahre (Tabelle 2.7). Es war kein statistisch signifikanter Unterschied in der Zusammensetzung der Erfahrungsjahre zwischen den Versuchsjahren feststellbar ( $\chi^2=0,10$ ;  $df=4$ ;  $P=0,999$ ).

Etwa 72% der TeilnehmerInnen betrieben eine konventionelle Imkerei und in circa 25% der Fälle imkerten sie mit einem Bio-Zertifikat (Tabelle 2.7). Der Rest der Teilnehmenden hatte konventionelle Betriebe, die unter „in Umstellung“ geführt wurden, da sie angaben in Umstellung zum Biobetrieb zu sein. Diese Gruppe war im dritten Versuchsjahr im Vergleich sehr geschrumpft, wohl weil die betreffenden Imkereibetriebe ein Bio-Zertifikat erlangt hatten. Die Verteilung zwischen den drei Gruppen war dennoch zwischen den Jahren nicht signifikant unterschiedlich ( $\chi^2=6,366$ ;  $df=4$ ;  $P=0,173$ ).

Tabelle 2.7: Eigenschaften der ImkerInnen und Imkereibetriebe in den drei Versuchsjahren.

Eigenschaft	Kategorien	Anzahl (Prozent) Bienenstände		
		2018	2019	2020
Anzahl Völker	1-20	85 (42,9%)	84 (43,5%)	82 (43,2%)
	21-50	81 (40,9%)	79 (40,9%)	78 (41,1%)
	über 50	32 (16,2%)	30 (15,5%)	30 (15,8%)
Jahre Erfahrung	1-10	106 (53,5%)	105 (54,4%)	101 (53,2%)
	11-30	55 (27,8%)	52 (26,9%)	52 (27,4%)
	über 30	37 (18,7%)	36 (18,7%)	37 (19,5%)
Betriebsweise	konventionell	149 (75,3%)	138 (71,5%)	137 (72,1%)
	biologisch	42 (21,2%)	48 (24,9%)	52 (27,4%)
	Umstellung	7 (3,5%)	7 (3,6%)	1 (0,5%)

## 2.3.3 Ergebnisse Virusdiagnostik

### 2.3.3.1 Prozesskontrollen

Im Zuge der Probenaufarbeitung wurden insgesamt 25 Wasserproben als Prozesskontrollen mitgeführt (2018:  $n=7$ , 2019:  $n=11$ , 2020:  $n=7$ ). Für das Jahr 2018 waren alle sieben Prozesskontrollen negativ auf Apis-Actin mRNA, ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A, IAPV und KBV RNA (kein nachweisbarer Ct-Wert); bei einigen Proben wurden späte Ct-Werte ( $> Ct 34$ ) für DWV-B ( $n=1$ ) und SBV-RNA ( $n=5$ ) beobachtet. Nach Neuextraktion und wiederholter Testung dieser Proben waren alle Proben negativ auf SBV, während eine Probe eine Viruslast unter dem als Grenzwert definierten  $LOQ_{PCR}$  in der DWV-B RT-qPCR zeigte



(eine andere Probe als im ersten Durchlauf). In den Jahren 2019 und 2020 waren alle Prozesskontrollen negativ auf Apis-Actin mRNA, sowie auf alle getesteten viralen Erreger. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es während der Homogenisation der Proben zu keinen Verschleppungen viruspositiven Materials zwischen den Proben gekommen ist.

### 2.3.3.2 Negativextraktionskontrollen

Bei einem gewissen Anteil der Negativextraktionskontrollen wurden je nach Virus geringe Anteile an positiven Virusnachweisen beobachtet. Für ABPV und DWV-B wurden in allen Jahren positive Negativextraktionskontrollen gefunden (ABPV: 14-24%; DWV-B: 7-64%). Für CBPV und SBV wurden nur für das Versuchsjahr 2018 positive Negativextraktionskontrollen gefunden (CBPV: 25%; SBV: 17%). In allen Fällen blieben diese Nachweise in einem sehr niedrigen Konzentrationsbereich, unterhalb des LOQ<sub>PCR</sub>. Die anderen getesteten Viren (BQCV, DWV-A, IAPV, KBV) waren in keiner der Negativextraktionskontrollen nachweisbar. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es im Zuge der Extraktion, bzw. im Zuge der darauffolgenden wiederholten PCR-Untersuchungen ausgehend von denselben Extrakten nicht zu nennenswerten Kreuzkontaminationen der Proben gekommen ist. Ein geringes Ausmaß an Kreuzkontaminationen ist trotz sorgfältiger Aufarbeitung bei den im Rahmen dieses Projektes beobachteten Anteilen an viruspositiven Proben und den teilweise sehr hohen Viruslasten zu erwarten.

### 2.3.3.3 Semi-quantitativer Nachweis der Apis-Actin mRNA

Die Apis-Actin mRNA war in allen 581 Projektproben eindeutig nachweisbar. Die Ct-Werte beliefen sich für 2018 im Bereich von 16 bis 25, für 2019 im Bereich von 16 bis 24 und für 2020 im Bereich von 14 bis 31. Diese Werte weisen auf eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion und die Abwesenheit nennenswerter Anteile an inhibitorischen Substanzen in den Nukleinsäureextrakten hin.

### 2.3.4 Virusprävalenz und Viruskonzentration

Im Verlauf der Studie wurden sechs der acht untersuchten Viren in den insgesamt 581 untersuchten Proben nachgewiesen (Abbildung 2.5 und Tabelle 2.8). IAPV und KBV wurden in keiner Probe gefunden. Vier der Viren zeigten eine konstante Prävalenz über die drei Versuchsjahre (BQCV, CBPV, DWV-A, DWV-B). Dies ist daran ersichtlich, dass bei diesen Viren die Konfidenzintervalle der drei Jahresergebnisse überlappen. Bei ABPV und SBV gibt es signifikante Schwankungen.

Tabelle 2.8: Vergleich der Virusprävalenz [%] ( $\pm 95\%$  Konfidenzintervall) von den acht gemessenen Viren zwischen den drei Untersuchungsjahren 2018, 2019 und 2020. Im Jahr 2020 wurden IAPV und KBV nicht untersucht. 2018: n=198 Bienenstände, 2019: n=193 Bienenstände, 2020: n=190 Bienenstände.

Virus	2018		2019		2020	
ABPV	53,5	(46,6-60,3)	33,7	(27,4-40,6)	42,6	(35,8-49,7)
BQCV	96,5	(92,9-98,3)	99	(96,3-99,7)	97,9	(94,7-99,2)
CBPV	8,6	(5,4-13,3)	7,3	(4,4-11,8)	6,3	(3,6-10,7)
DWV-A	1,0	(0,3-3,6)	0,5	(0,1-2,9)	0,5	(0,1-2,9)
DWV-B	91,4	(86,7-94,6)	88,6	(83,3-92,4)	88,4	(83,1-92,2)
IAPV	0,0	(0,0-1,9)	0,0	(0,0-2,0)	—	—
KBV	0,0	(0,0-1,9)	0,0	(0,0-2,0)	—	—
SBV	62,1	(55,2-68,6)	80,8	(74,7-85,8)	74,7	(68,1-80,4)

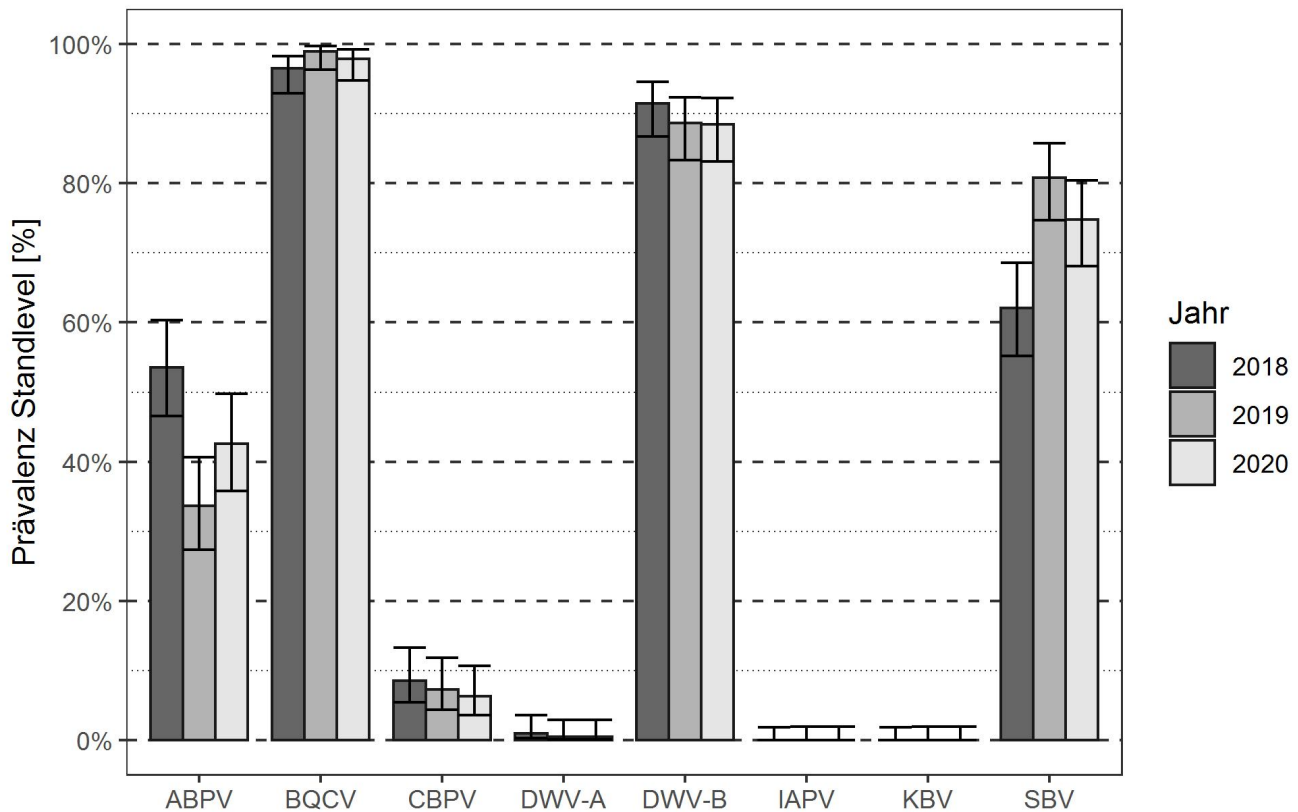


Abbildung 2.5: Prävalenz der acht untersuchten Viren im Herbst in Bienenproben für alle drei Untersuchungsjahre (inklusive 95% CI). Stichprobenumfang: 2018: 198 Proben; 2019: 193 Proben, 2020: 190 Proben.

In 99% der untersuchten Proben wurde zumindest ein Virus gefunden (576 von 581 Proben). Die maximale Anzahl an gemessenen Viren pro Probe waren fünf (3% der Proben). In den meisten Proben wurden entweder drei Viren (43% der Proben) oder vier Viren (32%) nachgewiesen. In 17% der Proben wurden zwei Viren nachgewiesen, sehr selten nur ein einziges Virus (4% der Proben). Im Mittel wurden 3,11 Viren (Standardabweichung:  $\pm 0,92$  Viren) in einer Probe gefunden.

Der Virustiter der positiven Proben variierte bei allen gemessenen Viren um mehrere Zehnerpotenzen. Der minimal gemessene Titer lag bei allen Viren zwischen  $10^4$  und  $10^8$  RNA-Kopien/mL Homogenat. Der maximal gemessene Wert lag zwischen  $10^7$  und  $10^{12}$  RNA-Kopien/mL Homogenat (Tabelle 2.9, Abbildung 2.5). Anders ausgedrückt, wurden in den Proben zwischen Zehntausenden und einer Milliarde RNA-Kopien/mL Homogenat gemessen. Bei drei der Viren ist der Titer der positiven Proben konstant zwischen den drei Untersuchungsjahren (ABPV, CBPV, DWV-B). Bei BQCV und SBV variiert der Titer signifikant zwischen den Untersuchungsjahren. Die statistischen Angaben zum Virus DWV-A sind aufgrund der geringen Stichprobenanzahl von jährlich ein bis zwei positiven Proben nicht aussagekräftig.

Tabelle 2.9: Virustiter der sechs Viren in den auf den entsprechenden Virus positiven Proben für alle drei Untersuchungsjahre, Anzahl = Anzahl positiver Proben.

Virus	Jahr	Anzahl	Median	unteres Quartil	oberes Quartil	Minimum	Maximum
ABPV	2018	106	$1,10 \times 10^5$	$3,84 \times 10^4$	$1,18 \times 10^7$	$1,60 \times 10^4$	$2,25 \times 10^{11}$
	2019	65	$4,46 \times 10^5$	$3,43 \times 10^4$	$2,24 \times 10^8$	$1,63 \times 10^4$	$2,73 \times 10^{10}$
	2020	81	$1,27 \times 10^5$	$3,68 \times 10^4$	$7,86 \times 10^6$	$1,63 \times 10^4$	$4,03 \times 10^{10}$
BQCV	2018	191	$7,09 \times 10^5$	$3,49 \times 10^5$	$2,89 \times 10^6$	$2,88 \times 10^4$	$2,77 \times 10^9$
	2019	191	$6,30 \times 10^5$	$2,72 \times 10^5$	$2,23 \times 10^6$	$1,80 \times 10^4$	$3,09 \times 10^9$
	2020	186	$3,61 \times 10^5$	$1,37 \times 10^5$	$1,30 \times 10^6$	$1,73 \times 10^4$	$5,40 \times 10^9$
CBPV	2018	17	$1,38 \times 10^8$	$1,64 \times 10^7$	$9,69 \times 10^8$	$1,94 \times 10^4$	$7,10 \times 10^9$
	2019	14	$8,81 \times 10^6$	$1,40 \times 10^5$	$9,27 \times 10^8$	$2,46 \times 10^4$	$2,56 \times 10^{10}$
	2020	12	$4,59 \times 10^7$	$6,76 \times 10^6$	$2,69 \times 10^9$	$3,96 \times 10^4$	$8,81 \times 10^9$
DWV-A	2018	2	$2,14 \times 10^8$	$1,07 \times 10^8$	$3,21 \times 10^8$	$2,48 \times 10^4$	$4,28 \times 10^8$
	2019	1	$3,30 \times 10^7$	$3,30 \times 10^7$	$3,30 \times 10^7$	$3,30 \times 10^7$	$3,30 \times 10^7$
	2020	1	$2,17 \times 10^6$	$2,17 \times 10^6$	$2,17 \times 10^6$	$2,17 \times 10^6$	$2,17 \times 10^6$
DWV-B	2018	181	$6,10 \times 10^7$	$1,61 \times 10^6$	$1,17 \times 10^9$	$1,62 \times 10^4$	$1,64 \times 10^{10}$
	2019	171	$1,03 \times 10^8$	$4,76 \times 10^6$	$5,81 \times 10^8$	$1,76 \times 10^4$	$2,18 \times 10^{10}$
	2020	168	$3,65 \times 10^7$	$5,50 \times 10^5$	$9,59 \times 10^8$	$1,62 \times 10^4$	$3,79 \times 10^{10}$
SBV	2018	123	$1,36 \times 10^5$	$3,95 \times 10^4$	$7,28 \times 10^5$	$1,65 \times 10^4$	$4,08 \times 10^{10}$
	2019	156	$4,19 \times 10^5$	$7,34 \times 10^4$	$3,58 \times 10^7$	$1,61 \times 10^4$	$2,54 \times 10^{10}$
	2020	142	$1,89 \times 10^5$	$6,70 \times 10^4$	$1,09 \times 10^7$	$1,62 \times 10^4$	$3,40 \times 10^{10}$

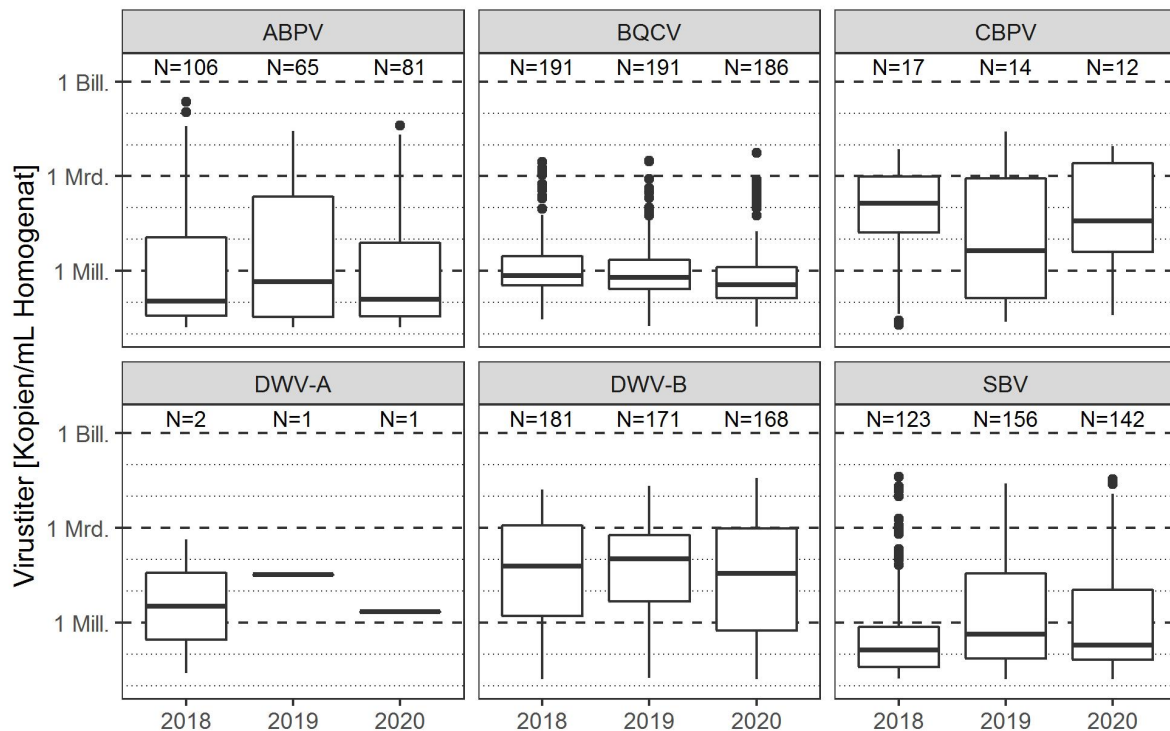


Abbildung 2.6: Virustiter der sechs nachgewiesenen Viren in den drei Versuchsjahren. Es sind nur die Werte der positiven Proben gezeigt (N= Anzahl der positiven Proben). „Mill.“ Million (=10<sup>6</sup>); „Mrd.“ Milliarde (=10<sup>9</sup>), „Bill.“ Billion (=10<sup>12</sup>). Darstellung als Boxplot Diagramm: dicker Mittelstrich: Median; untere/obere Grenze der Box: unteres/oberes Quartil; Antennen: maximal 1,5-facher Interquartilsabstand.

**ABPV** trat in etwas weniger als der Hälfte der Proben auf, 252 der 581 untersuchten Proben waren positiv. Die Prävalenz von ABPV unterschied sich signifikant zwischen den Untersuchungsjahren ( $\chi^2=16,41$ ;  $df=2$ ;  $P=0,001$ ; Abbildung 2.5 und Tabelle 2.8). Im Jahr 2018 gab es signifikant mehr ABPV-positive Proben als im Folgejahr 2019 (Posthoc-Vergleich 2018-2019:  $P<0,001$ ; Abbildung 2.5 und Tabelle 2.8). Beide Versuchsjahre unterschieden sich jedoch nicht signifikant vom Jahr 2020 (Posthoc-Vergleich: 2018-2020:  $P=0,069$ ; 2019-2020:  $P=0,139$ ). Die minimale Prävalenz wurde im Jahr 2019 mit 33,7% (95% CI: 27,4-40,6%) gemessen und die maximale Prävalenz im Jahr 2018 mit 53,5% (95% CI: 46,6-60,3%). Der Titer der ABPV-positiven Proben war in allen drei Jahren gering und betrug im Median immer unter  $10^6$  RNA-Kopien/mL Homogenat (Tabelle 2.9 und Abbildung 2.5). Es gab jedoch in allen drei Jahren Ausreißer nach oben hin, so wurde im Jahr 2018 der höchste Virustiter für die gesamte Studie gemessen ( $2,25 \times 10^{11}$  RNA-Kopien/mL Homogenat). Die gemessenen Titerwerte unterschieden sich nicht signifikant zwischen den drei Studienjahren ( $\chi^2=2,38$ ;  $df=2$ ;  $P=0,914$ ).

**BQCV** wurde in 568 von 581 untersuchten Proben gefunden und war damit das häufigste Virus in der Studie. In allen drei Untersuchungsjahren waren über 95% der untersuchten Proben positiv auf BQCV getestet worden (Abbildung 2.5 und Tabelle 2.8). Zwischen den Untersuchungsjahren wurde kein signifikanter Unterschied in der Prävalenz festgestellt ( $\chi^2=5,09$ ;  $df=2$ ;  $P=0,235$ ). Die Titerwerte der BQCV-positiven Proben waren in allen drei Jahren niedrig, der Median lag immer zwischen  $10^5$  und  $10^6$  RNA-Kopien/mL Homogenat. Die Viruskonzentration unterschied sich jedoch signifikant zwischen den Versuchsjahren ( $\chi^2=11,45$ ;  $df=2$ ;  $P=0,016$ ). Dabei war der Virustiter im Jahr 2020 signifikant geringer als im Jahr 2018 (Posthoc-Vergleich: 2018-2020:  $P=0,002$ ). Die beiden anderen Paarungen unterschieden sich nicht signifikant (Posthoc-Vergleich: 2018-2019:  $P=0,375$ ; 2019-2020:  $P=0,375$ ).

**CBPV** trat im Studienzeitraum sehr selten auf, insgesamt waren 43 von 581 Proben positiv auf dieses Virus. Die Prävalenz bewegte sich in allen drei Jahren zwischen 6% und 9% (Abbildung 2.5 und Tabelle 2.8). Die Prävalenzunterschiede zwischen den Jahren sind nicht signifikant ( $\chi^2=0,818$ ;  $df=2$ ;  $P=0,664$ ). Der Virustiter der CBPV-positiven Proben war vergleichbar mit den DWV-Werten, und damit im Vergleich zu den übrigen drei Viren sehr hoch (Tabelle 2.9 und Abbildung 2.5). Der Median der Messwerte lag zwischen  $10^5$  und  $10^8$  RNA-Kopien/mL Homogenat. In über 25% der positiven Proben war der Virustiter über  $9 \times 10^8$  RNA-Kopien/mL Homogenat, das heißt über knapp einer Milliarde RNA-Kopien/mL Homogenat. Die gemessenen Titerwerte unterschieden sich nicht signifikant zwischen den drei Studienjahren ( $F(2,40)=0,50$ ;  $P=0,610$ ). Hier wurde ein lineares Modell gerechnet, da nur fünf Bienenstände zweimal positiv auf CBPV getestet wurden (insgesamt 38 Bienenstände positiv auf CBPV) und daher der Random Factor „Standidentität“ nicht anwendbar war.

**DWV-B** trat im Untersuchungszeitraum am zweithäufigsten auf den untersuchten Bienenständen auf. Insgesamt 520 von 581 Proben waren positiv auf DWV-B (Abbildung 2.5 und Tabelle 2.8). Die Prävalenz bewegte sich zwischen 88% und 92% und unterschied sich nicht signifikant zwischen den Untersuchungsjahren ( $\chi^2=1,21$ ;  $df=2$ ;  $P=1,000$ ). Der Titer der DWV-positiven Proben war in allen drei Jahren im Vergleich zu den anderen gemessenen Viren hoch (Tabelle 2.9 und Abbildung 2.5). Der DWV-Titer lag im Median zwischen  $10^6$  und  $10^8$  RNA-Kopien/mL Homogenat. In über 25% der positiven Proben lag der Virustiter bei über  $5 \times 10^8$  RNA-Kopien/mL Homogenat, das heißt über einer halben Milliarde RNA-Kopien/mL Homogenat. Der DWV-Titer der positiven Proben unterschied sich nicht signifikant zwischen den drei Untersuchungsjahren ( $\chi^2=2,27$ ;  $df=2$ ;  $P=0,642$ ).

**DWV-A** kam extrem selten vor, es wurde in vier von 581 Proben nachgewiesen (Abbildung 2.5 und Tabelle 2.8). Damit überschreitet die Prävalenz in keinem der Jahre 1%. Es war kein signifikanter Prävalenzunterschied zwischen den Jahren feststellbar (Fisher's Exakt Test:  $P=1,000$ ). Die Titerwerte der positiven Proben bewegten sich zwischen  $10^4$  und  $10^9$  RNA-Kopien/mL Homogenat (Tabelle 2.9 und Abbildung 2.5). Aufgrund der geringen Stichprobe von vier Proben ist ein statistischer Vergleich zwischen den Jahren nicht möglich.

**SBV** war am dritthäufigsten und wurde in 421 von 581 Proben gefunden. Die Virusprävalenz unterschied sich signifikant zwischen den Versuchsjahren ( $\chi^2=21,58$ ;  $df=2$ ;  $P<0,001$ ; Abbildung 2.5 und Tabelle 2.8). Dabei kam das Virus im Jahr 2018 signifikant seltener vor als in den zwei folgenden Jahren (Posthoc-Vergleich: 2018-2019:  $P<0,001$ ; 2018-2020:  $P=0,008$ ). Im Jahr 2018 wurde die minimale Prävalenz von 62,1% (95% CI: 55,2-68,6%) gemessen und im Jahr 2019 die maximale Prävalenz von 80,8% (95% CI: 74,7-85,8%). Der Virustiter der SBV-positiven Proben war zumeist gering, der Median betrug immer unter  $10^6$  RNA-Kopien/mL Homogenat (Tabelle 2.9 und Abbildung 2.5). In den Jahren 2019 und 2020 wurden in den SBV-positiven Proben vermehrt hohe Titerwerte gemessen. Die Titermessungen unterschieden sich daher signifikant zwischen den Untersuchungsjahren ( $\chi^2=10,10$ ;  $df=2$ ;  $P=0,026$ ). Dabei waren die Titermessungen im Jahr 2018 signifikant geringer als die Messungen im Jahr 2019 (Posthoc-Vergleich: 2018-2019:  $P=0,004$ ). Die beiden anderen Paarungen unterschieden sich nicht signifikant (Posthoc-Vergleich: 2018-2020:  $P=0,226$ ; 2019-2020:  $P=0,266$ ).

## 2.3.5 Geographische Varianz in der Virusprävalenz und Viruskonzentration

### 2.3.5.1 Bundesländer

Die Virusprävalenz von vier der gefundenen Viren unterschied sich signifikant zwischen den einzelnen Bundesländern (ABPV, CBPV, DWV-B, SBV; Abbildung 2.7). Dabei war bei allen Viren die Tendenz zu einem Ost/West Gradienten festzustellen: ABPV, DWV-B und SBV kamen vermehrt im Osten des Landes vor (v.a. Burgenland, Wien), während CBPV häufiger in den westlichen Bundesländern zu finden war (v.a. Vorarlberg, Salzburg). Für BQCV und DWV-A wurde keine statistische Berechnung durchgeführt. Bei BQCV waren in fünf der Bundesländer 100% der Proben positiv („total separation“). DWV-A wurde aufgrund der geringen Stichprobe von vier positiven Werten nicht statistisch ausgewertet. Bei DWV-B variierte auch der Virustiter der positiven Proben zwischen den Bundesländern (Abbildung 2.8).

In den Grafiken und der statistischen Analyse wurden auch die statistischen Unterschiede zwischen den Versuchsjahren berechnet und angegeben. Diese werden im Abschnitt 2.3.4 besprochen und werden daher im aktuellen Abschnitt nicht weiter kommentiert.

Die Virusprävalenz von **ABPV** unterschied sich signifikant zwischen den neun Bundesländern ( $\chi^2=28,06$ ;  $df=8$ ;  $P=0,001$ ). ABPV ist am häufigsten im Burgenland aufgetreten und erreichte im Jahr 2018 die maximal gemessene Prävalenz von 83,3% (95% CI: 43,6-97,0%). In Tirol und Vorarlberg kam das Virus hingegen sehr selten vor und überschritt nie eine Prävalenz von 35%. Die minimal gemessene Prävalenz von 0% wurde zweimal gemessen (Wien 2018: 0,0% (95% CI: 0,0-35,4%), Tirol 2019: 0,0% (95% CI: 0,0-16,1%)). Der Virustiter von ABPV unterschied sich nicht zwischen den Bundesländern ( $\chi^2=11,12$ ;  $df=8$ ;  $P=0,390$ ).

**BQCV** trat extrem häufig auf, daher war ein statistischer Vergleich der Prävalenzen zwischen den Bundesländern nicht sinnvoll. In vier Bundesländer wurden vereinzelt BQCV-negative Proben gemessen (Kärnten, Niederösterreich, Steiermark, Tirol). Der Virustiter von BQCV unterschied sich nicht signifikant zwischen den Bundesländern ( $\chi^2=16,62$ ;  $df=8$ ;  $P=0,103$ ).

Die Prävalenz von **CBPV** unterschied sich signifikant zwischen den Bundesländern ( $\chi^2=16,23$ ;  $df=8$ ;  $P=0,039$ ). Die maximale Prävalenz wurde in Vorarlberg gemessen, wo in allen drei Jahren eine Prävalenz von mindestens 20% gemessen wurde (Maximum im Jahr 2020: 25,0% (95% CI: 8,9-53,2%)). Am geringsten war die Prävalenz von BQCV im Burgenland und Niederösterreich. In beiden Bundesländern wurden in zwei der drei Untersuchungsjahre keine positiven Proben gefunden. Aufgrund der geringen positiven Probenanzahl in den einzelnen Bundesländern wurde keine Auswertung des Virustiters durchgeführt (siehe Stichprobenzahlen in Abbildung 2.8).

**DWV-A** wurde aufgrund der geringen Stichprobe von insgesamt vier positiven Werten nicht statistisch ausgewertet.

Bei **DWV-B** unterschieden sich Prävalenz und Virustiter signifikant zwischen den Bundesländern (Prävalenz:  $\chi^2=25,92$ ;  $df=7$ ;  $P=0,001$ ; Titer:  $\chi^2=40,26$ ;  $df=8$ ;  $P<0,001$ ). Im Burgenland wurde die höchste Prävalenz gemessen, da alle burgenländischen Proben positiv auf DWV-B getestet wurden. Das Burgenland musste daher aus der statistischen Analyse ausgeschlossen werden, um das Problem der „total separation“ zu vermeiden. Das Bundesland mit der zweithöchsten Prävalenz (und damit der höchsten im Modell) war Oberösterreich. Sie betrug zwischen 97,4% (95% CI: 86,5-99,5%) und 100,0% (95% CI: 91,6-100,0%). Die geringste Prävalenz wurde in Tirol gemessen und bewegte sich zwischen 55,0% (95% CI: 34,2-74,2%) und 85,0% (95% CI: 64,0-94,8%). Der höchste mediane DWV-B Titer wurde im Burgenland gemessen und betrug  $2 \times 10^9$  RNA-Kopien/mL Homogenat. Aber auch in Wien erreichte der DWV-Titer in zwei Jahren über  $1 \times 10^9$  RNA-Kopien/mL Homogenat. Die geringsten Titerwerte wurden in Tirol gemessen, im Jahr 2020 betrug der mediane Titer  $2 \times 10^5$  RNA-Kopien/mL Homogenat. Die Spannweite der ermittelten Mediane umfassten daher die Spannweite von vier Zehnerpotenzen - zwischen Hundertausenden und mehreren Milliarden RNA-Kopien/mL Homogenat.

Die Prävalenz von **SBV** unterschied sich signifikant zwischen den neun Bundesländern ( $\chi^2=37,76$ ;  $df=8$ ;  $P<0,001$ ). Die höchste Prävalenz wurde in Wien erreicht, diese betrug alle drei Jahre über 88% (Maximum: 100,0% (95% CI: 70,1-100,0%)). Die geringste Prävalenz hatten die Proben aus Kärnten, sie lag zwischen 30,4% (95% CI: 15,6-50,9%) und 40,1% (95% CI: 23,3-61,3%). Der Virustiter unterschied sich nicht signifikant zwischen den Proben aus den unterschiedlichen Bundesländern ( $\chi^2=8,69$ ;  $df=8$ ;  $P=0,369$ ).

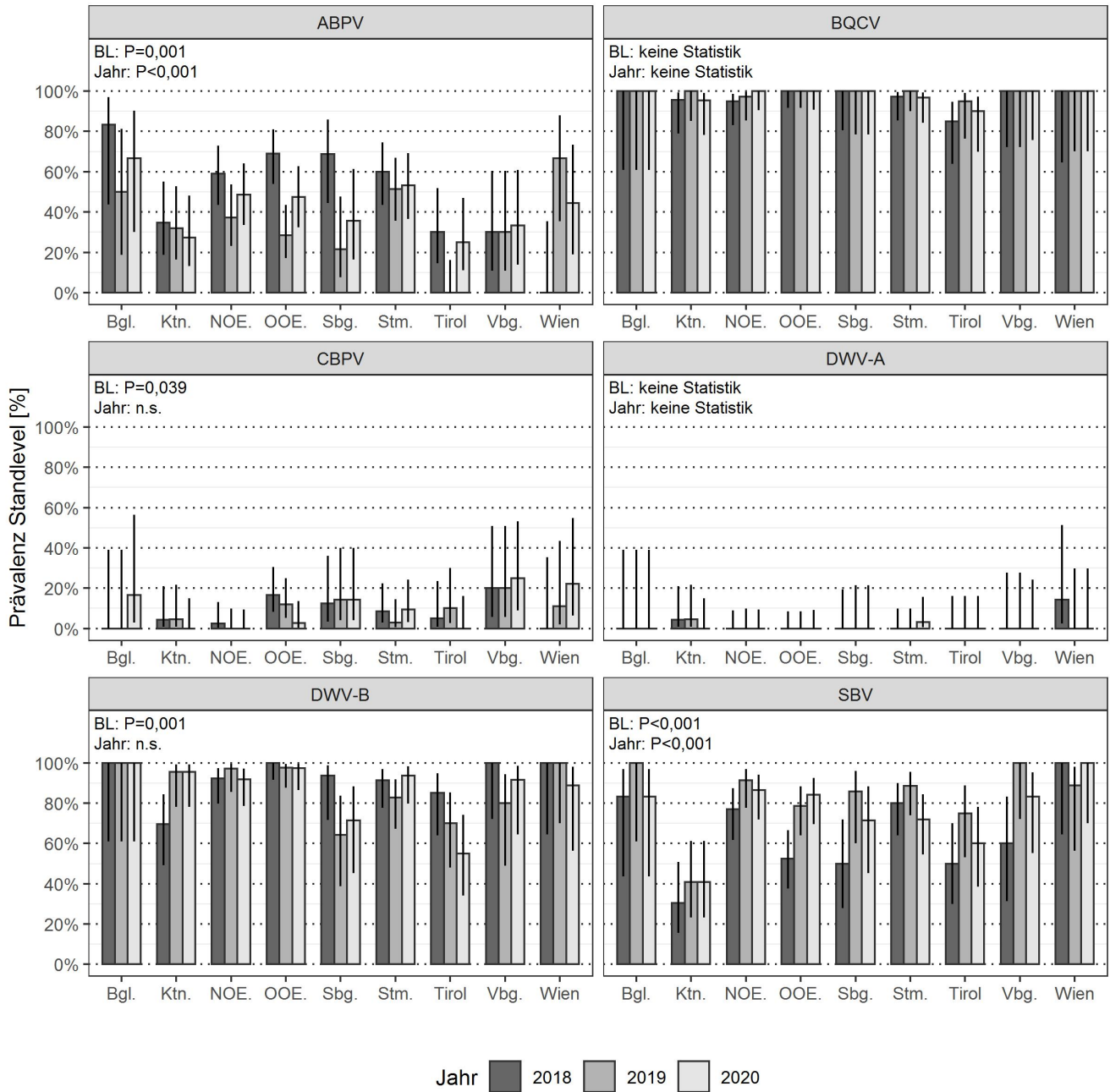


Abbildung 2.7: Virusprävalenz in den neun Bundesländern und drei Untersuchungsjahren (inklusive 95% CI). Statistik: GLMM mit binomialer Verteilung (random effect: Standortidentität), „n.s.“ = nicht signifikant. Anzahl Stände pro Bundesland für die Jahre 2018, 2019, 2020: **Bgl.** N=6 für alle Jahre; **Ktn.** N=23 N=22 N=22; **NÖ.** N=39 N=35 N=37; **OOÖ.** N=42 N=42 N=38; **Sbg.** N=16 N=14 N=14; **Stm.** N=35 N=34 N=32; **Tirol** N=20 für alle Jahre; **Vbg.** N=10 N=10 N=12; **Wien** N=7 N=9 N=9.

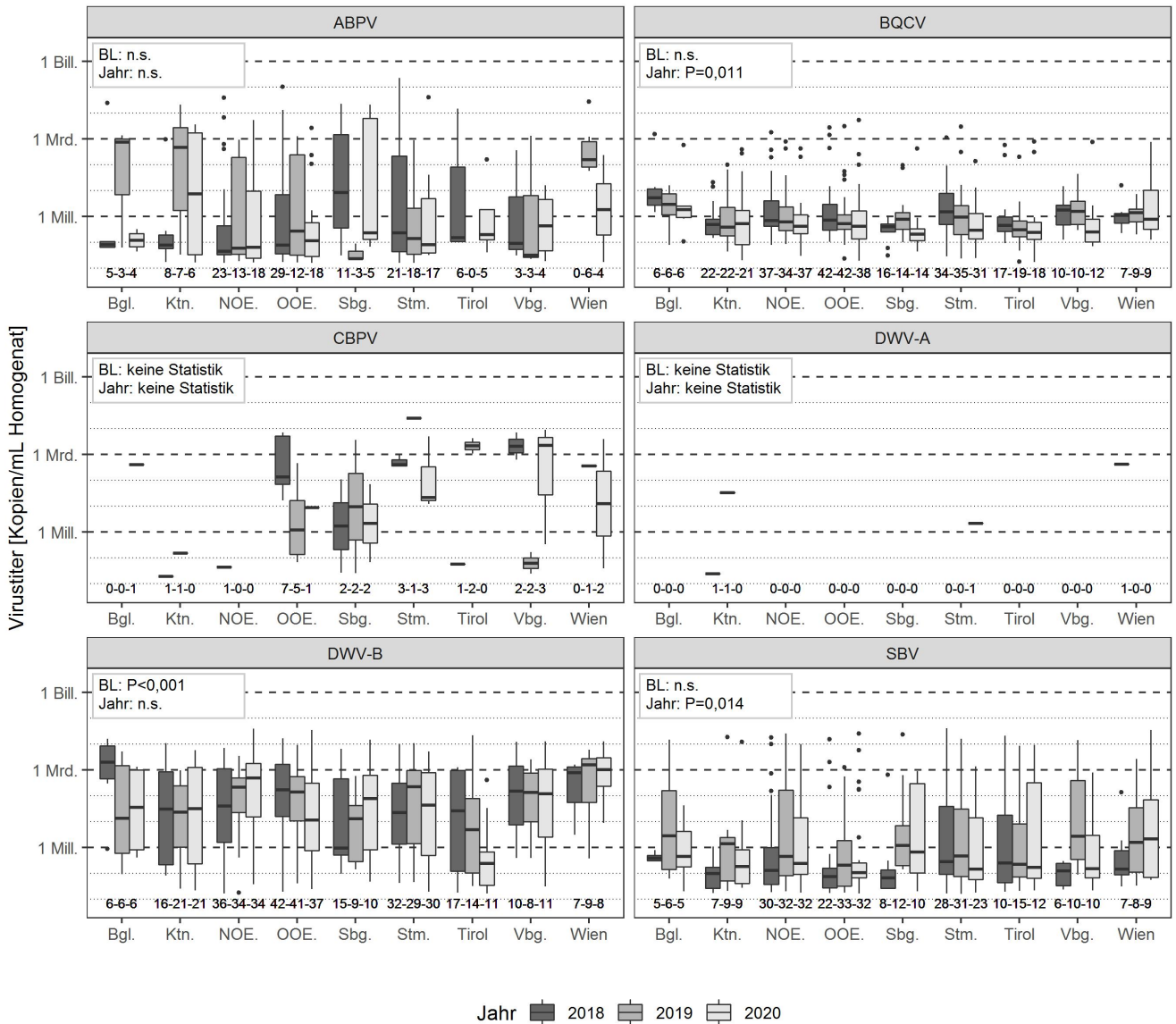


Abbildung 2.8: Virustiter der sechs nachgewiesenen Viren in den positiven Proben in den neun Bundesländern und den drei Untersuchungsjahren. Statistik: GLMM (random effect: Standortidentität), „BL“ Bundesland, „Mill.“ Million (=10<sup>6</sup>); „Mrd.“ Milliarden (=10<sup>9</sup>), „Bill.“ Billion (=10<sup>12</sup>), „n.s.“ = nicht signifikant. Statistik in der Grafik: Kruskal-Wallis-Test. Darstellung als Boxplot Diagramm: dicker Mittelstrich: Median; untere/obere Grenze der Box: unteres/oberes Quartil; Antennen: maximal 1,5-facher Interquartilsabstand. Anzahl positiver Stände pro Bundesland und Virus sind unter den Boxplots angegeben.



### 2.3.5.2 Seehöhe

Aufgrund der orographischen Gegebenheiten in Österreich weisen die Bienenstände signifikante Unterschiede in der Seehöhe zwischen den unterschiedlichen Bundesländern auf ( $H=108,93$ ;  $df=8$ ;  $P<0,001$ ; Abbildung 2.9). Die beschriebenen Unterschiede im Virusauftreten zwischen den Bundesländern könnten auch mit den Unterschieden in der Seehöhe zusammenhängen. Daher wurde diese als zusätzlicher Faktor ausgewertet.

Bei drei der sechs gemessenen Bienenviren war ein Zusammenhang zwischen der Prävalenz des Virus und der Seehöhe des entsprechenden Bienenstandes nachweisbar (ABPV, DWV-B, SBV; Abbildung 2.10). Dabei sank die Prävalenz umso mehr, je höher der Bienenstand gelegen war. Bei BQCV und CBPV wurde kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Virus und der Seehöhe gefunden. DWV-A wurde aufgrund der geringen Anzahl positiver Proben nicht ausgewertet. Bei BQCV und DWV-B war zusätzlich ein Zusammenhang zwischen der Höhe des Virustiters und der Seehöhe des Bienenstandes nachweisbar (Abbildung 2.11).

In den Grafiken und der statistischen Analyse wurden auch die statistischen Unterschiede zwischen den Versuchsjahren berechnet und angegeben. Diese werden im Abschnitt 2.3.4 besprochen und werden daher im aktuellen Abschnitt nicht weiter kommentiert.

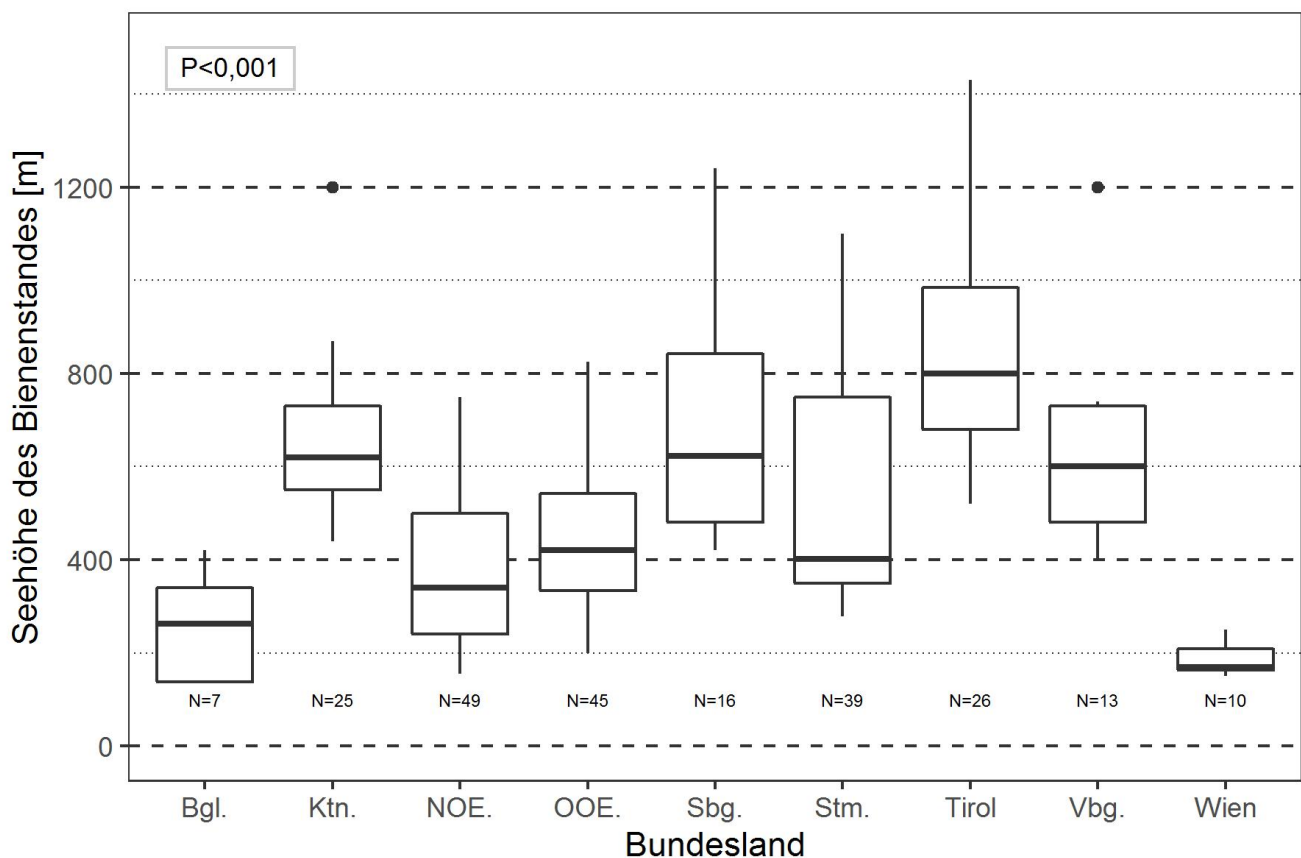


Abbildung 2.9: Seehöhe der Bienenstände nach Bundesländern (N=230, da 19 Bienenstände während des Projekts den Standort gewechselt haben). N=Anzahl der Proben pro Bundesland. Statistik: Kruskal-Wallis Test. Darstellung als Boxplot Diagramm: dicker Mittelstrich: Median; untere/obere Grenze der Box: unteres/oberes Quartil; Antennen: maximal 1,5-facher Interquartilsabstand.

**ABPV** trat umso seltener auf, je höher der Bienenstand gelegen war ( $\chi^2=29,28$ ;  $df=4$ ;  $P<0,001$ ). Die höchste Prävalenz wurde auf Bienenständen der Gruppe  $\leq 200$  m in den Jahren 2019 und 2020 gemessen und betrug 69,2% (95% CI: 42,4-87,3%). Die geringste Prävalenz wurde im Jahr 2019 in der Gruppe 601-800m gemessen und betrug 9,8% (95% CI: 3,9-22,5%). Im Jahr 2018 waren der Zusammenhang zwischen Seehöhe und ABPV-Prävalenz leichter ausgeprägt als in den zwei anderen Versuchsjahren, es gibt jedoch keinen signifikanten Unterschied im Trend zwischen den Versuchsjahren (Interaktion Prävalenz und Versuchsjahr:  $\chi^2=9,04$ ;  $df=1$ ;  $P=0,339$ ). Es war kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Seehöhe des Bienenstandes und dem Virustiter von ABPV-positiven Proben feststellbar ( $\chi^2=2,32$ ;  $df=1$ ;  $P=0,901$ ).

**BQCV** trat extrem häufig auf, daher war kein statistischer Vergleich der Prävalenzen zwischen den verschiedenen Seehöhe-Kategorien sinnvoll. Die Abbildung zeigt jedoch einen Trend zu einer geringeren Prävalenz in höheren Lagen: alle Proben von Bienenständen unter 400 m waren positiv auf BQCV, Proben von Bienenständen über 400 m waren in einigen wenigen Fällen negativ auf BQCV getestet. Es ist ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Seehöhe und der Höhe des BQCV-Titers feststellbar ( $\chi^2=30,82$ ;  $df=1$ ;  $P<0,001$ ): je höher der Bienenstand gelegen ist, desto geringer war der Titer der entsprechenden Probe. Daher wurde der höchste Median in der Gruppe  $\leq 200$  m im Jahr 2018 gemessen und betrug  $2,81 \times 10^6$  RNA-Kopien/mL Homogenat (Q1-Q3:  $1,20 \times 10^6$ - $4,41 \times 10^6$  RNA-Kopien/mL Homogenat). Der geringste Median wurde in der höchstgelegenen Gruppe  $> 800$  m im Jahr 2020 gemessen und betrug  $1,45 \times 10^5$  RNA-Kopien/mL Homogenat (Q1-Q3:  $8,88 \times 10^4$ - $3,10 \times 10^5$  RNA-Kopien/mL Homogenat).

Für **CBPV** wurden keine Unterschiede in der Virusprävalenz zwischen den verschiedenen Seehöhen festgestellt ( $\chi^2=0,45$ ;  $df=4$ ;  $P=0,978$ ). Aufgrund der geringen positiven Probenanzahl in den einzelnen Seehöhe-Gruppen wurde keine Auswertung des Virustiters durchgeführt (siehe Stichprobenzahlen in Abbildung 2.11).

**DWV-A** wurde aufgrund der geringen Stichprobe von vier positiven Werten nicht statistisch ausgewertet.

Für **DWV-B** wurde ein Zusammenhang zwischen der Seehöhe des Bienenstandes und der Virusprävalenz sowie des Virustiters festgestellt (Prävalenz:  $\chi^2=45,89$ ;  $df=4$ ;  $P<0,001$ ; Titer:  $F(1,516)=22,13$ ;  $P<0,001$ ). Dabei sank sowohl die Prävalenz als auch der Titer umso mehr ab, desto höher der beprobte Bienenstand gelegen war. Die höchste Prävalenz wurde in der Gruppe  $\leq 200$  m im Jahr 2019 gemessen: hier waren alle Proben positiv auf DWV-B und die Prävalenz lag daher bei 100,0% (95% CI: 77,2-100,0%). Ebenso war der Virustiter in dieser Gruppe und diesem Jahr im Median am höchsten (Median:  $1,57 \times 10^9$  RNA-Kopien/mL Homogenat; Q1-Q3:  $1,36 \times 10^8$ - $2,76 \times 10^9$  RNA-Kopien/mL Homogenat). Die niedrigste Prävalenz wurde ebenfalls im Jahr 2019 in der Gruppe  $> 800$  m gemessen und betrug 57,7% (95% CI: 38,9-74,5%). In der selben Gruppe war auch der mediane Titer am niedrigsten und betrug im Jahr 2020  $3,75 \times 10^5$  RNA-Kopien/mL Homogenat (Q1-Q3:  $9,25 \times 10^4$ - $2,90 \times 10^7$  RNA-Kopien/mL Homogenat).

Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von **SBV** nahm ebenfalls umso mehr ab, je höher der Bienenstand gelegen war ( $\chi^2=31,84$ ;  $df=4$ ;  $P<0,001$ ). Die maximale Prävalenz wurde im Jahr 2018 für die Gruppe  $\leq 200$  m gemessen und betrug 100,0% (95% CI: 77,2-100,0%). Die geringste Prävalenz wurde ebenfalls im Jahr 2018 in der Gruppe  $> 800$  m gemessen und betrug 32,1% (95% CI: 17,9-50,7%). Für SBV wurde zwischen den verschiedenen Seehöhen kein Unterschied im Virustiter festgestellt ( $\chi^2=0,16$ ;  $df=1$ ;  $P=0,692$ ).

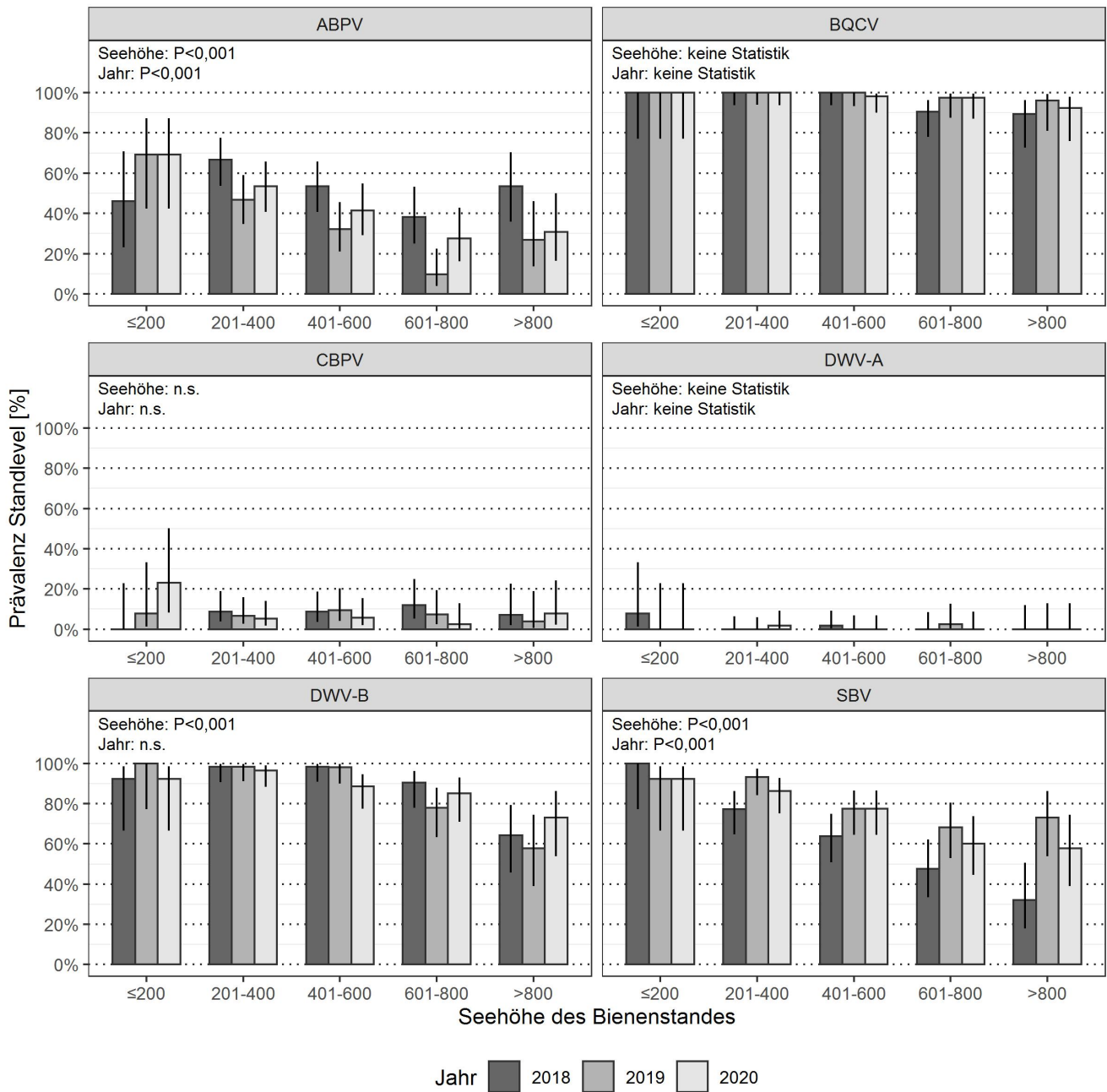


Abbildung 2.10: Virusprävalenz der Bienenstände auf unterschiedlichen Seehöhen und in den drei Untersuchungsjahren (inklusive 95% CI). „n.s.“ = nicht signifikant. Anzahl Stände pro Kategorie für die Jahre 2018, 2019, 2020:  $\leq 200\text{m}$  N=13 für alle Jahre; **201-400m** N=57 N=60 N=58; **401-600m** N=58 N=53 N=53;  $\leq 800\text{m}$  N=42 N=41 N=40;  $> 800\text{m}$  N=28 N=26 N=26.

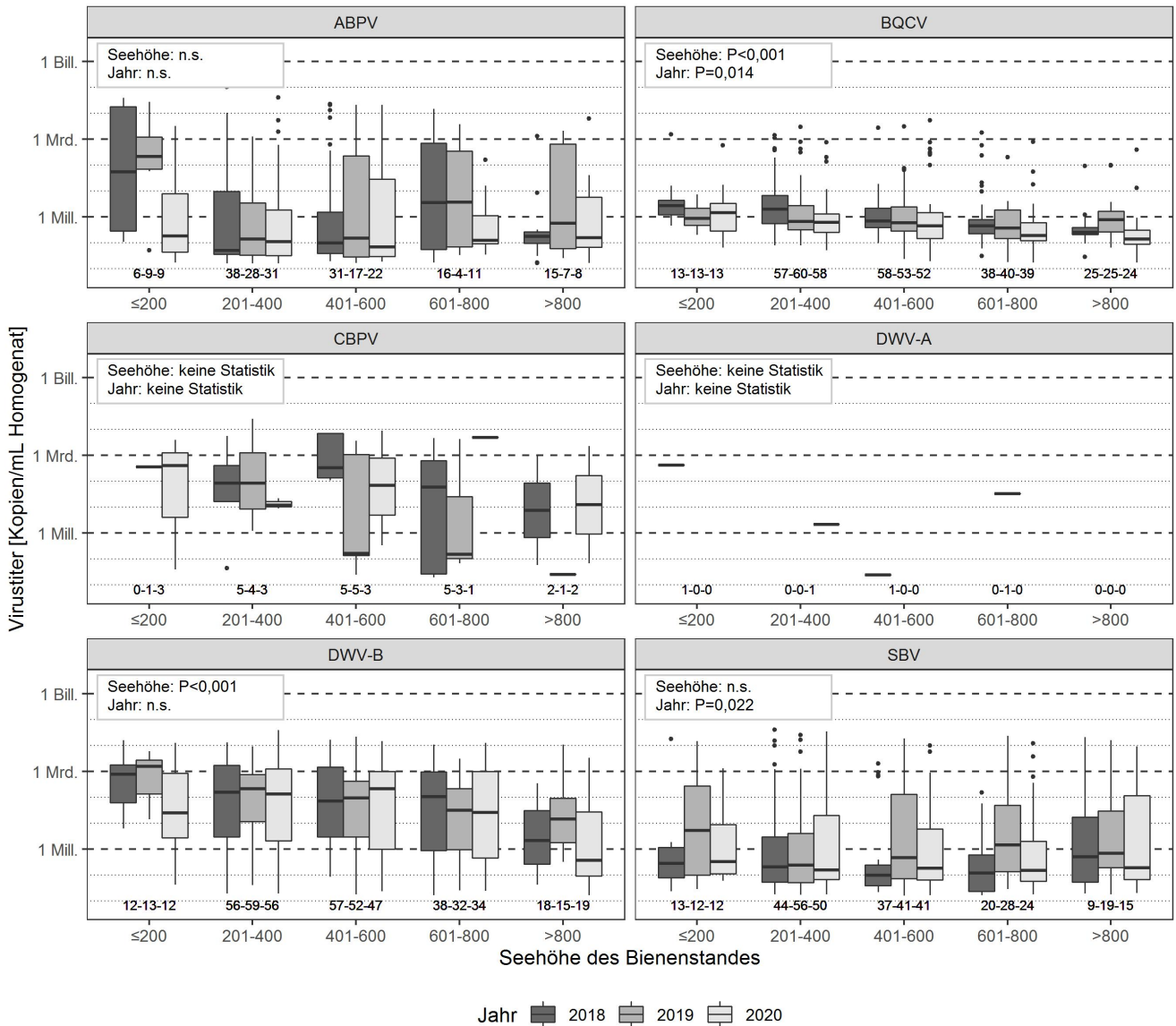


Abbildung 2.11: Virustiter der sechs nachgewiesenen Viren in den positiven Proben in den fünf Kategorien für Seehöhe und den drei Untersuchungsjahren. „Mill.“ Million ( $=10^6$ ); „Mrd.“ Milliarde ( $=10^9$ ), „Bill.“ Billion ( $=10^{12}$ ), „n.s.“ = nicht signifikant. Statistik: GLMM (random effect: Standidentität). Darstellung als Boxplot Diagramm: dicker Mittelstrich: Median; untere/obere Grenze der Box: unteres/oberes Quartil; Antennen: maximal 1,5-facher Interquartilsabstand. Anzahl positive Stände pro Kategorie und Virus sind unter den Boxplots angegeben.

## 2.3.6 Zusammenhang Virusprävalenz und Viruskonzentration mit imkerlichen Praktiken

### 2.3.6.1 Wabenerneuerung

Der Fragebogen erhob, wie hoch der Anteil der Wabenerneuerung in den teilnehmenden Betrieben im Jahr der Probenahme war. Etwa ein Drittel der Betriebe erneuerten über 50% der Waben (Tabelle 2.10) und rund 40% der Betriebe zwischen 31% und 50% der Waben. Die restlichen Imkerinnen und Imker tauschten zwischen 1 und 30% der Waben aus. Nur insgesamt vier Mal im gesamten Projektverlauf wurde angegeben, dass im letzten Jahr kein Wabentausch im Betrieb erfolgt ist. Da diese Kategorie so selten war, wurde sie mit der benachbarten Kategorie zu 0% bis 30% Wabentausch zusammengefasst. Das Antwortmuster unterschied sich nicht signifikant zwischen den Untersuchungsjahren ( $\chi^2=2,19$ ;  $df=6$ ;  $P=0,901$ , Tabelle 2.10).

In den Grafiken und der statistischen Analyse wurden auch die statistischen Unterschiede zwischen den Versuchsjahren berechnet und angegeben. Diese werden im Abschnitt 2.3.4 besprochen und werden daher im aktuellen Abschnitt nicht weiter kommentiert.

Tabelle 2.10: Angaben der teilnehmenden Imkereibetriebe, welchen Anteil der Waben sie im letzten Jahr erneuert hatten.

Wabenerneuerung	2018		2019		2020	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
0%	2	1%	1	1%	1	1%
1-30%	36	18%	40	20%	45	23%
31-50%	88	45%	82	42%	78	41%
über 50%	72	36%	69	36%	66	35%
keine Angabe	0	0%	1	1%	0	0%
insgesamt	198	100%	193	100%	190	100%

Es gab keinen signifikanten Einfluss des Anteils der Wabenerneuerung auf die Virusprävalenz und die Viruskonzentration der Probenvölker (Abbildungen 2.12 und 2.13 und Tabelle 2.11). Es wurden vier Viren auf den Zusammenhang zwischen Prävalenz und Wabenerneuerung getestet (ABPV, CBPV, DWV-B, SBV, Abbildung 2.12 und Tabelle 2.11). BQCV trat zu häufig und DWV-A zu selten für eine Testung auf. Es wurden ebenfalls vier Viren auf den Zusammenhang zwischen der Viruskonzentration positiver Proben und dem Anteil der Wabenerneuerung getestet (ABPV, BQCV, DWV-B, SBV Abbildung 2.13 und Tabelle 2.11). Es waren zu wenige Proben positiv auf CBPV und DWV-A um diese statistisch auszuwerten.

Tabelle 2.11: Ergebnisse der statistischen Tests zum Zusammenhang zwischen Virusprävalenz/Virustiter und dem Anteil der Wabenerneuerung im Betrieb. Statistik Prävalenz: GLMM mit binominaler Verteilung (random effect: Imkeridentität), Statistik Virustiter: GLMM (random effect: Imkeridentität), P-Werte wurden nach Bonferroni-Holm korrigiert. keine Statistik: die Datenlage ließ keine Durchführung eines statistischen Testes zu.

Virus	Prävalenz	Virustiter
ABPV	$\chi^2=2,62$ ; $df=2$ ; $P=0,270$	$\chi^2=4,51$ ; $df=2$ ; $P=0,419$
BQCV	keine Statistik	$\chi^2=0,47$ ; $df=2$ ; $P=0,792$
CBPV	$\chi^2=4,70$ ; $df=2$ ; $P=0,381$	keine Statistik
DWV-A	keine Statistik	keine Statistik
DWV-B	$\chi^2=3,52$ ; $df=2$ ; $P=0,334$	$\chi^2=0,05$ ; $df=2$ ; $P=1,000$
SBV	$\chi^2=4,04$ ; $df=2$ ; $P=0,397$	$\chi^2=0,76$ ; $df=2$ ; $P=1,000$

Die Ergebnisse der Gruppe „0% Wabenerneuerung“ lassen vermuten, dass diese Praxis mit einem erhöhten Virenauftreten gekoppelt ist (nicht als eigene Gruppe in den Grafiken angeführt!). Daher werden diese

Ergebnisse nun deskriptiv dargestellt. Es muss jedoch betont werden, dass diese Kategorie mit vier Datenpunkten eine zu kleine Stichprobe besitzt um verlässliche Aussagen zu liefern und die Ergebnisse als anekdotisch anzusehen sind. In dieser Gruppe erreichten BQCV, DWV-B und SBV eine Prävalenz von 100,0% (95% CI: 51,0-100%) und ABPV eine Prävalenz von 75% (95% CI: 30,1-95,4%). Vergleicht man dies mit den Werten in Abbildung 2.12, wird ersichtlich, dass vor allem ABPV und SBV in Betrieben mit 0%Wabenerneuerung überproportional häufig war. Aufgrund der geringen Stichprobenzahl sind die 95%Konfidenzintervalle sehr groß, ein statistischer Unterschied zu den anderen Kategorien ist daher nicht gegeben. Zusätzlich wurden für ABPV und SBV sehr hohe Titerwerte gemessen. Bei ABPV überstiegen alle drei positiven Proben 1 Milliarde RNA-Kopien/mL Homogenat (MAX:  $2,26 \times 10^{11}$  RNA-Kopien/mL Homogenat). Bei SBV überstieg eine der vier positiven Werte diese Schwelle und erreichte einen Virustiter von  $4,08 \times 10^{10}$  RNA-Kopien/mL Homogenat.

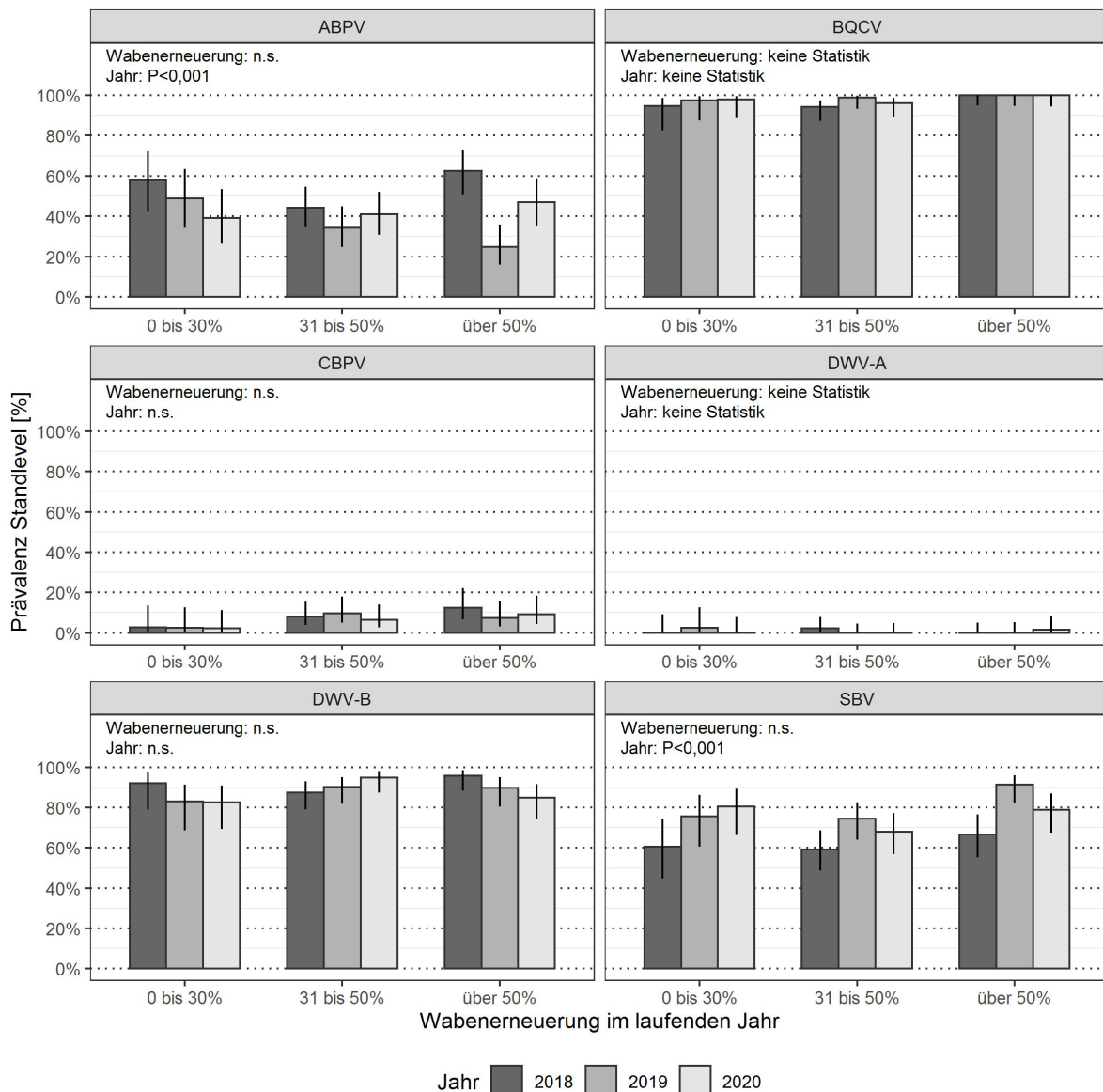


Abbildung 2.12: Virusprävalenz auf Standniveau in den drei Untersuchungsjahren im Zusammenhang mit dem Anteil an Wabenerneuerung im jeweiligen Betrieb (inklusive 95% CI). Statistik: GLMM mit binomialer Verteilung (random factor: Standidentität), „n.s.“ = nicht signifikant. Anzahl Stände pro Kategorie siehe Tabelle 2.10.

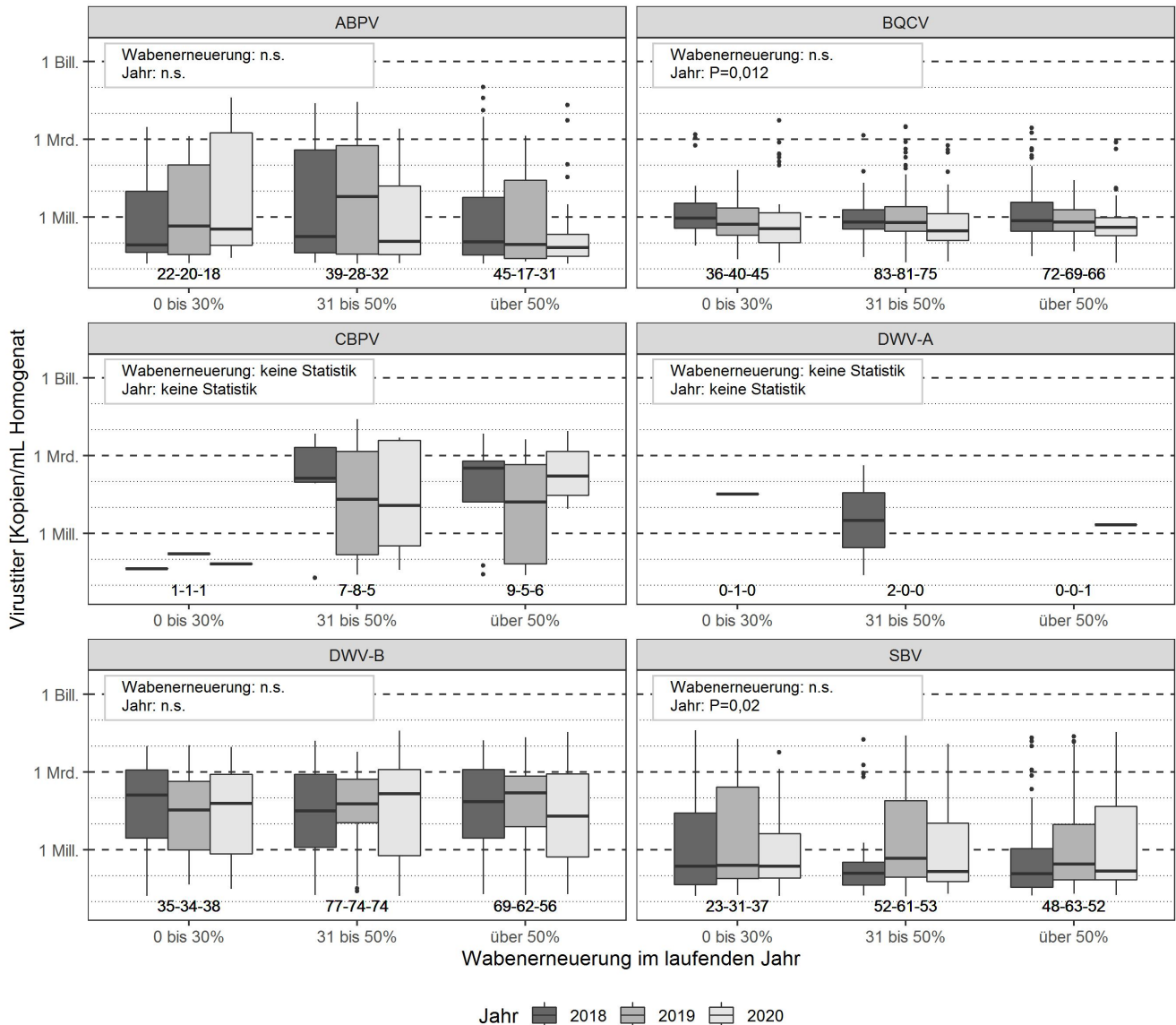


Abbildung 2.13: Virustiter der sechs nachgewiesenen Viren in den positiven Proben der drei Versuchsjahre im Zusammenhang mit dem Anteil an Wabenerneuerung im jeweiligen Betrieb. „Mill.“ Million (=10<sup>6</sup>); „Mrd.“ Milliarde (=10<sup>9</sup>), „Bill.“ Billion (=10<sup>12</sup>), „n.s.“ = nicht signifikant. Statistik: GLMM (random effect: Standidentität). Darstellung als Boxplot Diagramm: dicker Mittelstrich: Median; untere/obere Grenze der Box: unteres/oberes Quartil; Antennen: maximal 1,5-facher Interquartilsabstand. Anzahl positive Stände pro Kategorie und Virus sind unter den Boxplots angegeben.

### 2.3.6.2 Waben aus abgestorbenen Völkern

Die Teilnehmerinnen und Teilnehmer gaben im Fragebogen bekannt, wie sie in ihrem Betrieb mit Futterwaben und Leerwaben aus abgestorbenen Völkern verfahren: ob sie diese einschmolzen, in andere Völker umhängten oder ob sie beide Praktiken je nach Situation anwandten (Tabelle 2.12). Die Reihung nach Häufigkeit des Auftretens war in allen drei Jahren die Gleiche: am häufigsten wurden die Waben eingeschmolzen und am zweithäufigsten wurden in der Imkerei beide Praktiken angewandt. Einige Imkereien hatten in dem entsprechenden Jahr keine toten Völker gehabt und konnten daher nicht antworten. Bei weitem am seltensten wurden die Waben abgestorbener Völker immer in andere Völker umgehängt.

Doch die Antwortmuster unterschieden sich signifikant zwischen den Untersuchungsjahren ( $\chi^2=23,12$ ;  $df=6$ ;  $P<0,001$ ; Tabelle 2.12). Der Anteil der Imkereibetriebe, bei denen die Waben aus abgestorbenen Völkern ausschließlich eingeschmolzen wurden, nahm kontinuierlich von 63% im Jahr 2018 auf 76% im Jahr 2020 zu. Im Gegenzug sank der Anteil der Imkereien, die beide Praktiken in ihrem Betrieb anwandten, von anfangs 32% auf 14% ab.

Tabelle 2.12: Angaben der teilnehmenden Imkereibetriebe, in welche Weise sie Futter- oder Leerwaben aus abgestorbenen Völkern im angegebenen Jahr verwendet hatten.

Wabenverwendung	2018		2019		2020	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
umhängen	4	2%	10	5%	7	4%
einschmelzen	124	63%	132	68%	144	76%
beides	63	32%	34	18%	27	14%
kein totes Volk	7	3%	16	8%	10	5%
keine Angabe	0	0%	1	1%	2	1%
insgesamt	198	100%	193	100%	190	100%

Betriebe, die beide Praktiken angewandt hatten, merkten in den Kommentaren häufig an, dass sie gezielt entschieden, welche Waben eingeschmolzen werden und welche in andere Völker umgehängt werden. Entscheidungsgrundlage waren hier der Grund des Absterbens, das Alter der Wabe (Jungfernwabe werden umgehängt, alte Waben eingeschmolzen) und der Zustand der Waben (verschmutzte, verkotete Waben werden eingeschmolzen). Selten wird auch angemerkt, dass die Honigwaben behandelt werden (erhitzt, eingefroren, mit Essigsäure begast), es wird jedoch offen gelassen, ob sie danach als Bienenfutter verwendet werden. Zweimal wurde angegeben, dass die Waben verbrannt wurden, diese wurden der Kategorie „einschmelzen“ hinzugefügt.

Tabelle 2.13: Ergebnisse der statistischen Tests zum Zusammenhang zwischen Virusprävalenz/Virustiter und der Art der Verwendung von Futter- und Leerwaben abgestorbener Völker im Betrieb. Statistik Prävalenz: GLMM mit binominaler Verteilung (random effect: Imkeridentität), Statistik Virustiter: GLMM (random effect: Imkeridentität), P-Werte wurden nach Bonferroni-Holm korrigiert. keine Statistik: die Datenlage ließ keine Durchführung eines statistischen Testes zu.

Virus	Prävalenz	Virustiter
ABPV	$\chi^2=0,50$ ; $df=3$ ; $P=0,920$	$\chi^2=7,55$ ; $df=3$ ; $P=0,225$
BQCV	keine Statistik	$\chi^2=0,61$ ; $df=3$ ; $P=0,895$
CBPV	$\chi^2=3,14$ ; $df=2$ ; $P=0,830^*$	keine Statistik
DWV-A	keine Statistik	keine Statistik
DWV-B	$\chi^2=0,72$ ; $df=2$ ; $P=1,000^*$	$\chi^2=3,81$ ; $df=3$ ; $P=0,849$
SBV	$\chi^2=1,74$ ; $df=3$ ; $P=1,000$	$\chi^2=1,02$ ; $df=3$ ; $P=1,000$

\*ohne Kategorie „umhängen“ berechnet da in dieser zu wenige (CBPV) oder zu viele positive Fälle (DWV-B) vorhanden waren

In den Grafiken und der statistischen Analyse wurden auch die statistischen Unterschiede zwischen den Versuchsjahren berechnet und angegeben. Diese werden im Abschnitt 2.3.4 besprochen und werden daher im aktuellen Abschnitt nicht weiter kommentiert.

Es gab keinen signifikanten Einfluss der Wabenverwendung aus abgestorbenen Völkern auf die Prävalenz und die Viruskonzentration der Probenvölker (Abbildungen 2.14 und 2.15 und Tabelle 2.13). Es gab jedoch sehr starke Schwankungen in den Fallzahlen zwischen den verschiedenen Kategorien. Die Kategorie „umhängen“ kam im Datensatz in nur 4% der Fälle vor (21 Fälle), die Kategorie „keine toten Völker“ in 6% der Fälle (33 Fälle). Die Ergebnisse dieser Kategorien werden zwar angeführt, die Aussagekraft einer



derart kleinen Stichprobe ist begrenzt. Es wurden vier Viren auf den Zusammenhang zwischen Prävalenz und Wabenverwendung getestet (ABPV, CBPV, DWV-B, SBV, Abbildung 2.14 und Tabelle 2.13). BQCV trat zu häufig und DWV-A zu selten für eine Testung auf. Es wurden ebenfalls vier Viren auf den Zusammenhang zwischen der Viruskonzentration positiver Proben und der Wabenverwendung getestet (ABPV, BQCV, DWV-B, SBV Abbildung 2.15 und Tabelle 2.13). Es waren zu wenige Proben positiv auf CBPV und DWV-A um diese statistisch auszuwerten.

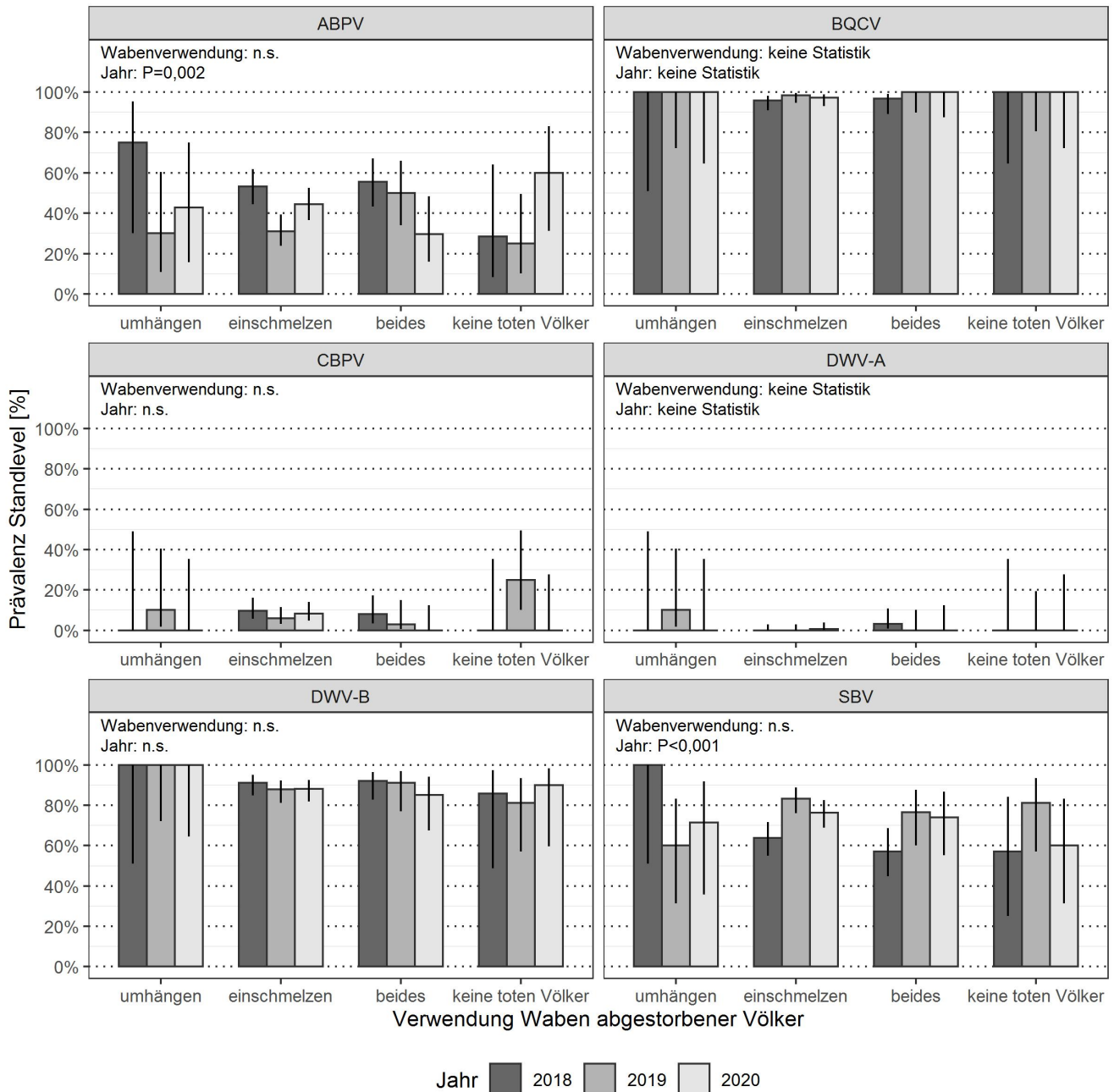


Abbildung 2.14: Virusprävalenz auf Standniveau in den drei Untersuchungsjahren im Zusammenhang mit der Verwendung von Waben abgestorbener Völker im jeweiligen Betrieb (inklusive 95% CI). Statistik: GLMM mit binomialer Verteilung (random effect: Standidentität), „n.s.“ = nicht signifikant. Anzahl Stände pro Kategorie siehe Tabelle 2.12

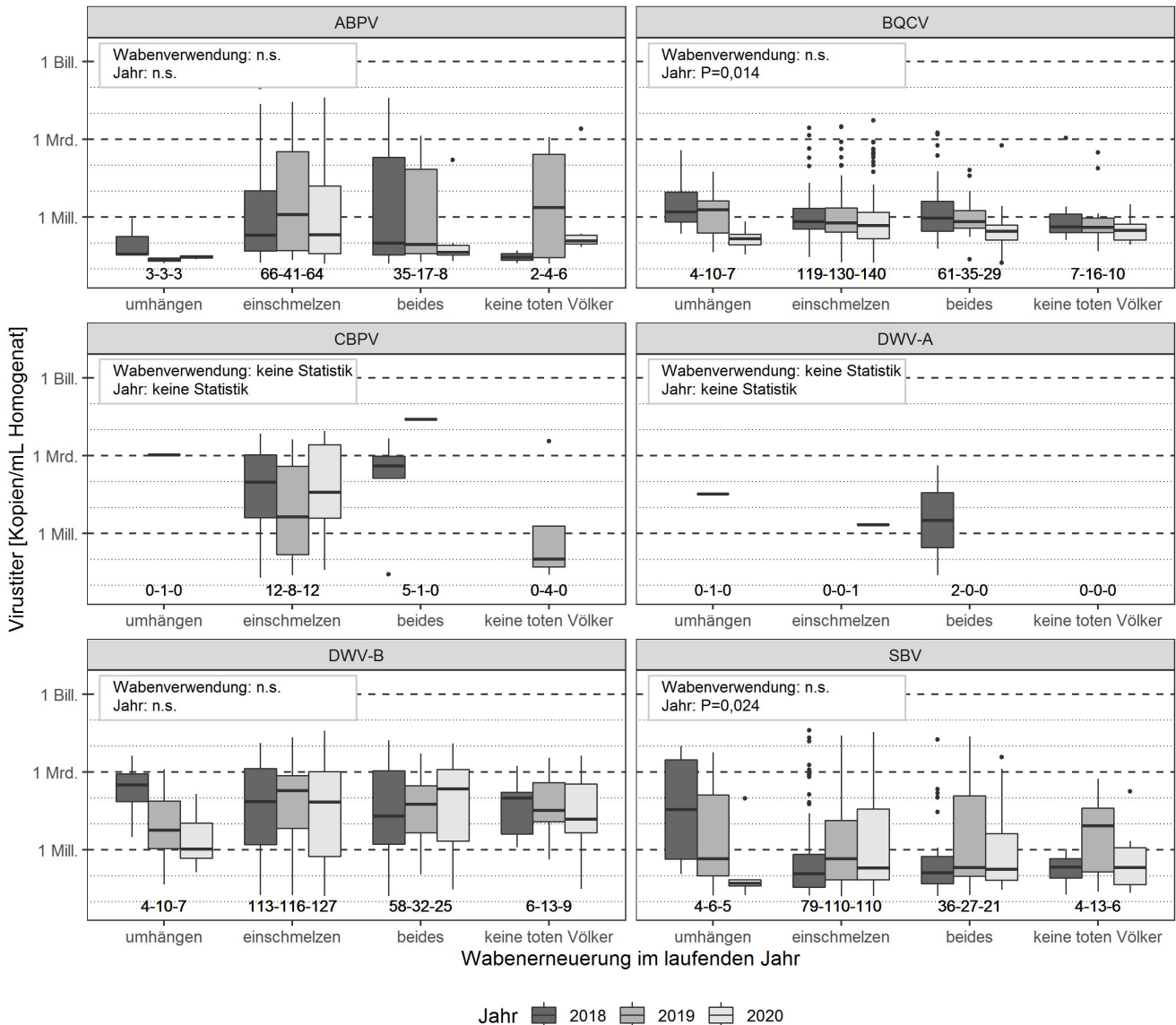


Abbildung 2.15: Virustiter der sechs nachgewiesenen Viren in den positiven Proben der drei Versuchsjahre im Zusammenhang mit der Verwendung von Waben abgestorbener Völker im jeweiligen Betrieb. „Mill.“ Million ( $=10^6$ ); „Mrd.“ Milliarde ( $=10^9$ ), „Bill.“ Billion ( $=10^{12}$ ), „n.s.“ = nicht signifikant. Statistik: LMM (random effect: Standidentität). Darstellung als Boxplot Diagramm: dicker Mittelstrich: Median; untere/obere Grenze der Box: unteres/oberes Quartil; Antennen: maximal 1,5-facher Interquartilsabstand. Anzahl positive Stände pro Kategorie und Virus sind unter den Boxplots angegeben.

### 2.3.6.3 Art der Völkervermehrung

Die Teilnehmerinnen und Teilnehmer gaben jedes Jahr an, auf welche Art sie ihre Völker vermehrt haben. Dabei wurde am häufigsten angegeben, dass Brutableger gebildet wurden (80%, 466 von 581 Angaben). Etwas weniger häufig wurden Kehrschwärme gebildet (57%, 329 Angaben) und Naturschwärme eingeschlagen (47%, 272 Angaben). Ab dem zweiten Jahr kam eine weitere Kategorie - Fluglingbildung - hinzu, da diese öfter in den Kommentaren angegeben wurde. Sie wurde jedoch eher selten angewandt (11%, 64 Angaben). Drei Mal erfolgte die Angabe, dass in dem Betrieb noch nie vorher Völker vermehrt wurden. Drei weitere Betriebe vermehrten die Völker in Verbindung mit Bannwaben-Verfahren. Etwa drei Viertel der Teilnehmerinnen und Teilnehmer gaben mehrere Methoden der Völkervermehrung an. Dabei wurden

am häufigsten zwei Methoden angegeben (49%), weitere 22% gaben an im letzten Jahr drei Methoden verwendet zu haben. Nur in 1% der Angaben wurden alle vier möglichen Methoden angegeben. 28% der Angaben beschränkten sich auf eine Methode.

Tabelle 2.14: Die häufigsten Kombination zur Völkervermehrung der teilnehmenden Imkereibetriebe. Brutabl. = Brutableger, Kehrschw. = Kehrschwarm, Naturschw. = Naturschwarm.

Völkervermehrung	2018		2019		2020	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
Brutabl.	35	18%	23	12%	26	14%
Brutabl. + Kehrschw.	68	34%	42	22%	34	18%
Brutabl. + Naturschw.	23	11%	32	16%	37	19%
Brutabl. + Kehrschw. + Naturschw.	43	22%	29	15%	27	14%
Sonstiges	29	15%	67	35%	66	35%
insgesamt	198	100%	193	100%	190	100%

Aufgrund der vielen Mehrfachnennungen ergaben sich 17 verschiedene Vermehrungsstrategien aus verschiedenen kombinierten Methoden mit teilweise sehr geringen Stichprobenzahlen. Für eine weitere Auswertung werden wir uns daher auf die vier häufigsten Strategien konzentrieren Tabelle 2.14: „Brutableger“, „Brutableger + Kehrschwarm“, „Brutableger + Naturschwarm“ und „Brutableger + Kehrschwarm + Naturschwarm“. Die Häufigkeit des Auftretens der Vermehrungskombinationen verschob sich während des Projektes signifikant ( $\chi^2=243,95$ ;  $df=8$ ;  $P<0,001$ ; Tabelle 2.14). Die Kombination „Brutableger + Kehrschwarm“ sank stark in ihrer Beliebtheit. Die Kombination „Brutableger + Naturschwarm“ hingegen wurden im letzten Projektjahr fast doppelt so häufig angegeben als im ersten Projektjahr. Am stärksten war die Änderung in der Kategorie „Sonstiges“, in der der Anteil der Nennungen von 15% auf 35% stieg. Diese Beliebtheitssteigerung betraf vor allem Kombinationen innerhalb der Kategorie „Sonstiges“, in denen Naturschwärme zur Vermehrung angewandt wurden.

Tabelle 2.15: Ergebnisse der statistischen Tests zum Zusammenhang zwischen Virusprävalenz/Virustiter und der Art der Vermehrungsstrategie im Betrieb. Statistik Prävalenz: GLMM mit binominaler Verteilung (random effect: Imkeridentität), Statistik Virustiter: GLMM (random effect: Imkeridentität), P-Werte wurden nach Bonferroni-Holm korrigiert. keine Statistik: die Datenlage ließ keine Durchführung eines statistischen Testes zu.

Virus	Prävalenz	Virustiter
ABPV	$\chi^2=8,22$ ; $df=3$ ; $P=0,209$	$F(3,176)=2,96$ ; $P=0,102^*$
BQCV	$\chi^2=0,23$ ; $df=3$ ; $P=0,972$	$\chi^2=8,98$ ; $df=3$ ; $P=0,118$
CBPV	$\chi^2=0,73$ ; $df=3$ ; $P=1,000$	keine Statistik
DWV-A	keine Statistik	keine Statistik
DWV-B	$\chi^2=0,73$ ; $df=3$ ; $P=1,000$	$\chi^2=2,38$ ; $df=3$ ; $P=0,498$
SBV	$\chi^2=1,82$ ; $df=3$ ; $P=1,000$	$\chi^2=5,69$ ; $df=3$ ; $P=0,225$

\*LM statt GLMM, da kein random factor (sehr wenige Imkeridentitäten mehrfach im Datensatz vorhanden).

In den Grafiken und der statistischen Analyse wurden auch die statistischen Unterschiede zwischen den Versuchsjahren berechnet und angegeben. Diese werden im Abschnitt 2.3.4 besprochen und werden daher im aktuellen Abschnitt nicht weiter kommentiert.

Es gab keinen signifikanten Einfluss des Vermehrungskonzepts auf die Virusprävalenz und den Virustiter der Probenvölker (Abbildungen 2.16 und 2.17 und Tabelle 2.15). ABPV und BQCV zeigten jedoch einen Trend zu einem Zusammenhang zwischen Art der gewählten Völkervermehrung und Höhe des Virustiters (beide vor Bonferroni-Holm Korrektur:  $P<0,05$ ). Daher werden diese beiden Modelle in Folge näher betrachtet. Es wurden fünf Viren auf den Zusammenhang zwischen Prävalenz und Wabenerneuerung getestet (ABPV,

BQCV, CBPV, DWV-B, SBV, Abbildung 2.16 und Tabelle 2.15). DWV-A trat zu selten für eine Testung auf. Es wurden vier Viren auf den Zusammenhang zwischen der Viruskonzentration positiver Proben und dem Anteil der Wabenerneuerung getestet (ABPV, BQCV, DWV-B, SBV Abbildung 2.17 und Tabelle 2.15). Es waren zu wenige Proben positiv auf CBPV und DWV-A um diese statistisch auszuwerten.

Bei **ABPV** hatten die beiden Kategorien „Brutableger + Naturschwarm“ und „Brutableger + Kehrschwarm + Naturschwarm“ die niedrigsten Titer-Werte (Abbildung 2.17). Der gemeinsame Nenner dieser beiden Kategorien war das Vermehren der Völker durch einen Naturschwarm. Bei Betrieben, die diese Methode angewandt hatten, wurde ein signifikant geringeren ABPV-Titer gemessen als bei Betrieben, die diese Methode nicht angewandt hatten ( $\chi^2=5,40$ ;  $df=1$ ;  $P=0,020$ ). Betriebe, die Naturschwarm als Vermehrungsmethode angegeben hatten und deren Probe positiv auf ABPV getestet wurden, hatten im Median einen ABPV-Titer von  $8,50 \times 10^4$  RNA-Kopien/mL Homogenat (Q1-Q3:  $3,67 \times 10^4$ - $3,60 \times 10^6$  RNA-Kopien/mL Homogenat). Betriebe hingegen, die Naturschwarm nicht als Vermehrungsmethode verwendet hatten und positiv auf ABPV getestet wurden, hatten im Median einen ABPV-Titer von  $2,95 \times 10^5$  RNA-Kopien/mL Homogenat (Q1-Q3:  $3,76 \times 10^4$ - $2,20 \times 10^8$  RNA-Kopien/mL Homogenat).

Bei **BQCV** war der Virustiter BQCV-positiver Proben in der Gruppe „Brutableger + Kehrschwarm“ am geringsten. Es wurde jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen Virustiter und der Anwendung der Einzelmethoden gefunden (Brutableger:  $\chi^2=0,96$ ;  $df=1$ ;  $P=0,326$ ; Kehrschwarm:  $\chi^2=3,274$ ;  $df=1$ ;  $P=0,070$ ).

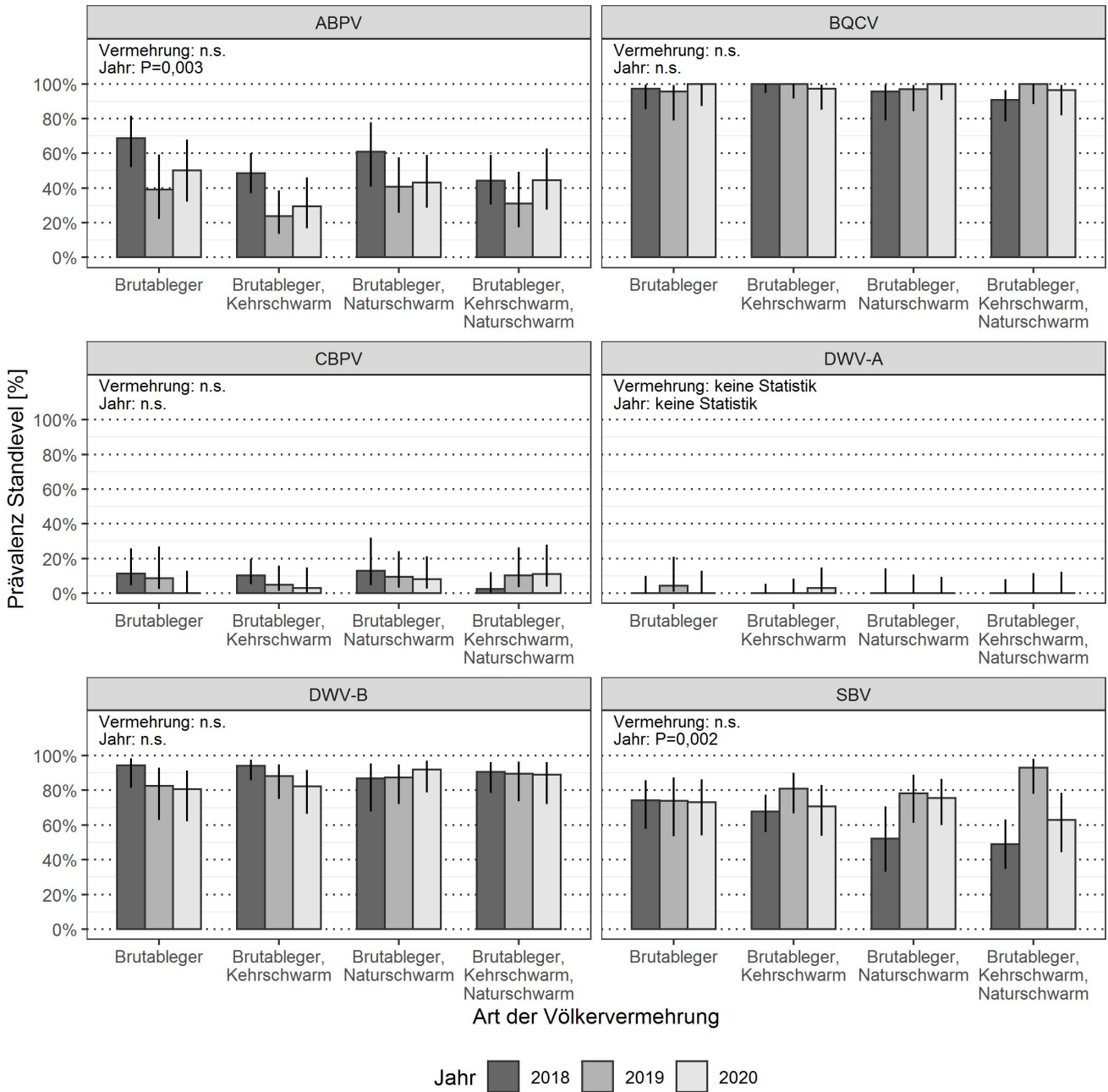


Abbildung 2.16: Virusprävalenz auf Standniveau in den drei Untersuchungs Jahren im Zusammenhang mit der Vermehrungsstrategie im jeweiligen Betrieb (inklusive 95% CI). Statistik: GLMM mit binomialer Verteilung (random effect: Standidentität), „n.s.“ = nicht signifikant. Anzahl Stände pro Kategorie siehe Tabelle 2.14.

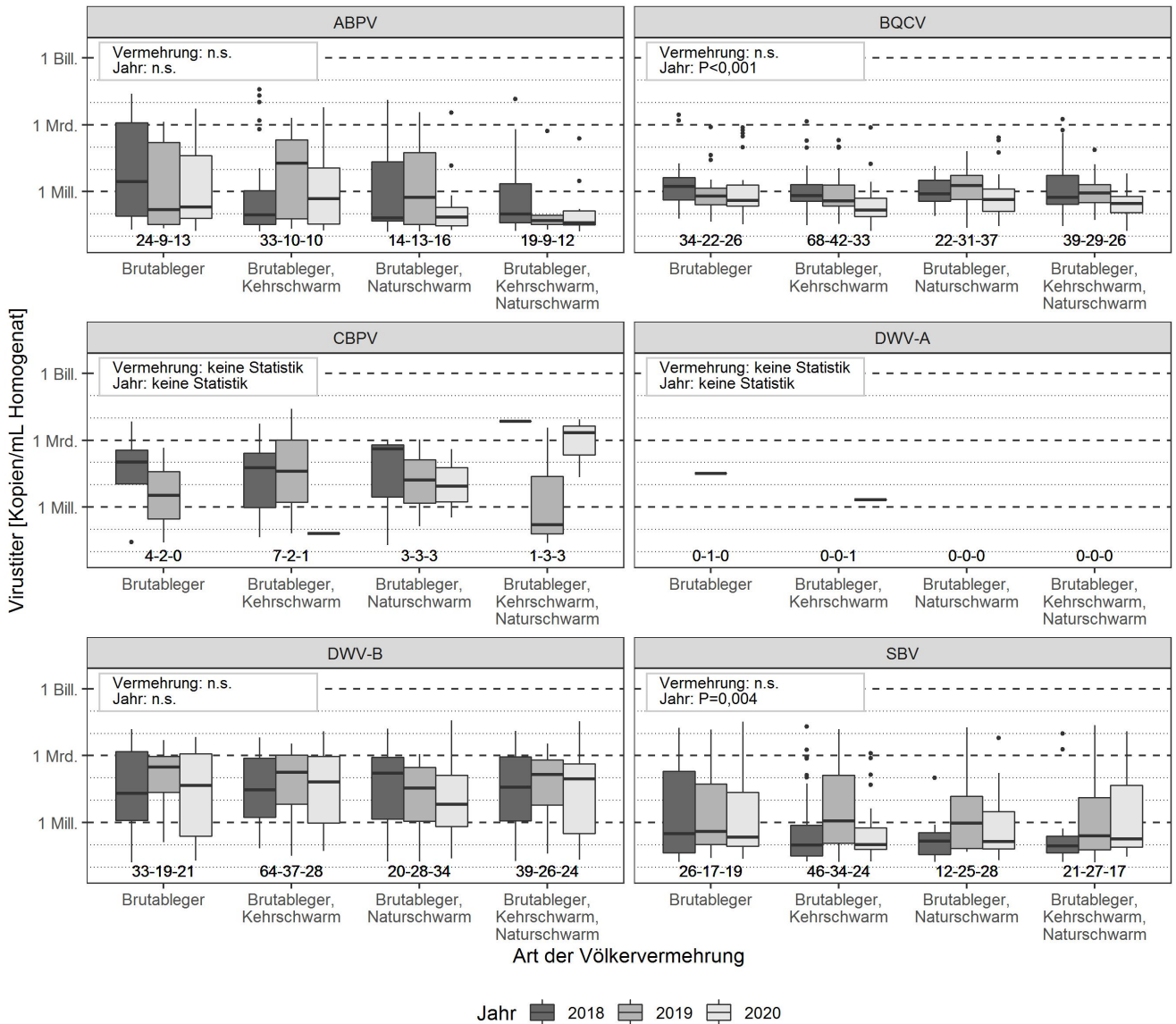


Abbildung 2.17: Virustiter der sechs nachgewiesenen Viren in den positiven Proben der drei Versuchsjahre im Zusammenhang mit der Vermehrungsstrategie im jeweiligen Betrieb. „Mill.“ Million ( $=10^6$ ); „Mrd.“ Milliarde ( $=10^9$ ), „Bill.“ Billion ( $=10^{12}$ ), „n.s.“ = nicht signifikant. Statistik: LMM (random effect: Standidentität). Darstellung als Boxplot Diagramm: dicker Mittelstrich: Median; untere/obere Grenze der Box: unteres/oberes Quartil; Antennen: maximal 1,5-facher Interquartilsabstand. Anzahl positive Stände pro Kategorie und Virus sind unter den Boxplots angegeben.

### 2.3.7 Zusammenhang Virusprävalenz und Viruskonzentration mit den berichteten Symptomen der Völker

Wir baten die teilnehmenden Imkerinnen und Imker ihre Völker auf fünf virusassoziierte Symptome durchzusehen: „Totenfall vor dem Bienenvolk“, „Varroamilben auf Bienen“, „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“, „Schwarz-glänzende Bienen“ und „Sackbrutsymptome“.

Bei 88% der Probenahmen wurde Rückmeldungen über alle Symptome gegeben (511 von 581 Probenahmen). Bei weiteren 4% Probenahmen wurde über einen Teil der Symptome rückgemeldet (23 Probenahmen). Bei den restlichen 8% Probenahmen wurde keine Informationen zu den Symptomen geliefert (47 Probenahmen). In 48% aller Rückmeldungen wurden keine Symptome beobachtet (258 von 534 Probenahmen), in 36% der Rückmeldungen wurde ein Symptom beobachtet (194 Probenahmen), in 12% der Rückmeldungen wurden zwei Symptome beobachtet (64 Probenahmen) und in 4% zwischen drei und fünf Symptome beobachtet (18 ImkerInnen). Dabei wurden „schwarz-glänzende Bienen“ bei weitem am häufigsten beobachtet (32% der Probenahmen positiv, Abbildung 2.18). Die Symptome „Varroamilben auf Bienen“ und „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ waren von etwas mehr als einem Zehntel aller TeilnehmerInnen beobachtet worden (16% und 11% der Probenahmen positiv). Die Symptome „Totenfall vor dem Bienenvolk“ und „Sackbrutsymptome“ wurden sehr selten beobachtet (4% und 3% der Probenahmen positiv).

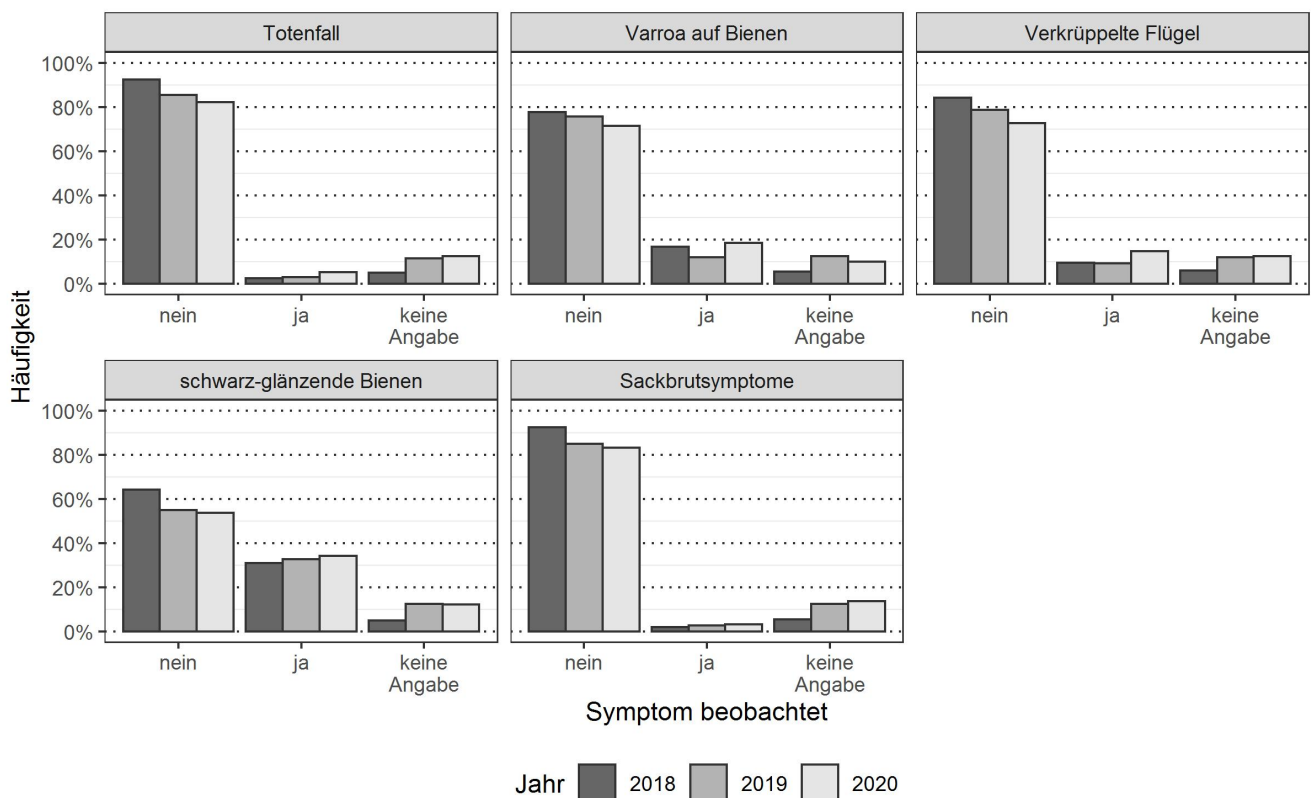


Abbildung 2.18: Häufigkeit der Beobachtung von fünf virusassoziierten Symptomen in den drei Versuchsjahren. 2018: N=198; 2019: N=195; 2020: N=190.

#### 2.3.7.1 erhöhter Totenfall vor dem Bienenvolk

Es wurden in 90% der Probenahmen Angaben zu dem Symptom „erhöhter Totenfall vor dem Bienenvolk“ gemacht (525 Probenahmen von 581; Abbildung 2.18). Dieses Symptom wurde auf 21 Monitoringständen

beobachtet und ist daher auf 4% der Stände aufgetreten (Tabelle 2.16). Ein erhöhter Totenfall vor dem Bienenvolk kann viele verschiedene Ursachen haben und kann auch ein Hinweis auf eine CBPV Infektion sein. Aufgrund des seltenen Auftretens der Symptomatik war eine Auswertung dieses Merkmals auf Zusammenhang mit CBPV nicht möglich.

Tabelle 2.16: Angaben der teilnehmenden Imkereibetriebe, ob sie bei mindestens einem ihrer Probenvölker „erhöhter Totenfall vor dem Bienenvolk“ gesehen haben

Symptomangabe	2018		2019		2020	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
ja	5	3%	6	3%	10	5%
nein	183	92%	165	85%	156	82%
keine Angabe	10	5%	22	12%	24	13%
insgesamt	198	100%	193	100%	190	100%

### 2.3.7.2 Varroamilben auf Bienen

Bei 91% der Probenahmen wurden Angaben zu dem Symptom „Varroamilben auf Bienen“ gemacht (527 von 581 TeilnehmerInnen). 17% der Meldungen berichteten von „Varroamilben auf Bienen“ in mindestens einem der Völker (91 von 527, Tabelle 2.17). „Varroamilben auf Bienen“ sind ein Hinweis auf einen hohen Varroabefall der Bienen und damit auf eine akute Infektion mit ABPV oder DWV. Daher wurde ein Zusammenhang zwischen den Beobachtungen und dem Auftreten von ABPV und DWV-B untersucht. DWV-A wurde nur in vier Proben gefunden und daher ist die Stichprobe hier zu klein für eine statistische Untersuchung.

In den Grafiken und der statistischen Analyse wurden auch die statistischen Unterschiede zwischen den Versuchsjahren berechnet und angegeben. Diese werden im Abschnitt 2.3.4 besprochen und werden daher im aktuellen Abschnitt nicht weiter kommentiert.

Tabelle 2.17: Angaben der teilnehmenden Imkereibetriebe, ob sie in mindestens einem ihrer Probenvölker das Symptom „Bienen mit Varroamilben“ gesehen haben

Symptomangabe	2018		2019		2020	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
ja	33	16%	23	12%	35	18%
nein	154	78%	146	76%	136	72%
keine Angabe	11	6%	24	12%	19	10%
insgesamt	198	100%	193	100%	190	100%

Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von **ABPV** und der Beobachtung von „Varroamilben auf Bienen“ ( $\chi^2=3,77$ ;  $df=2$ ;  $P=0,303$ ; Abbildung 2.19). Die Prävalenz der Gruppe mit Symptomen war jedes Jahr um etwa 10% höher als die Prävalenz der Gruppe ohne Symptome, doch aufgrund der geringen Stichprobe in der Gruppe mit Symptomen war dieser Unterschied nicht signifikant (siehe 95%-Konfidenzintervalle in Abbildung 2.19 in dieser Gruppe). Es war auch kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Titerhöhe von ABPV und dem Auftreten des Symptoms „Varroamilben auf Bienen“ feststellbar ( $\chi^2=4,46$ ;  $df=2$ ;  $P=0,108$ ; Abbildung 2.20). Der Median der Proben mit und ohne Symptome lag fast immer zwischen etwas über Hunderttausend und einer Million RNA-Kopien/mL Homogenat.



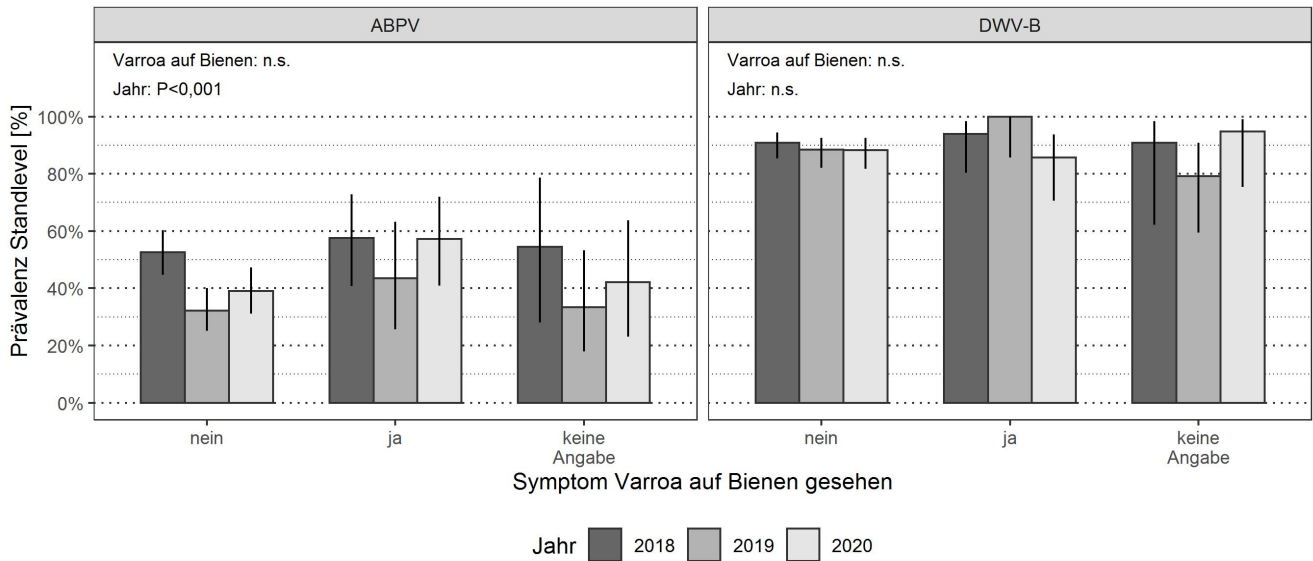


Abbildung 2.19: Zusammenhang zwischen der Prävalenz von ABPV bzw. DWV-B mit dem Auftreten des Symptoms „Varroamilben auf Bienen“ (inklusive 95% CI). „ja“: in zumindest einem der fünf Probenvölker Symptom beobachtet; „nein“: in keinem der fünf Probenvölker Symptom beobachtet, "keine Angabe": die Völker wurden nicht auf dieses Symptom durchgesehen. Statistik: GLMM mit binomialer Verteilung (random effect: Standidentität), „n.s.“ = nicht signifikant. Anzahl Stände pro Kategorie siehe Tabelle 2.17.

Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von **DWV-B** und der Beobachtung von „Varroamilben auf Bienen“ ( $\chi^2=0,852$ ;  $df=2$ ;  $P=0,653$ ; Abbildung 2.19). Es war jedoch ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem DWV-B Titer und der Beobachtung „Varroamilben auf Bienen“ festzustellen ( $\chi^2=11,32$ ;  $df=2$ ;  $P=0,007$ ; Abbildung 2.20). Ein Posthoc Vergleich zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen Proben mit und Proben ohne Symptom ( $P=0,003$ ), beide Kategorien zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Kategorie „keine Angabe“ (ja-keine Angabe:  $P=0,085$ , nein-keine Angabe:  $P=0,994$ ). In allen Versuchsjahren betrug der DWV-B Titer für Proben, in deren Völkern das Symptom gesehen wurde, im Median mehrere hundert Millionen RNA-Kopien/mL Homogenat, während er in Proben von Völkern ohne Symptom zwischen 20 und 100 Millionen RNA-Kopien/mL Homogenat lag. Damit hatten die Proben von Völkern mit Beobachtung von „Varroamilben auf Bienen“, je nach Versuchsjahr, einen 8-fach bis 18-fach höheren medianen DWV-B Titer als die Proben von Völkern ohne Symptome.

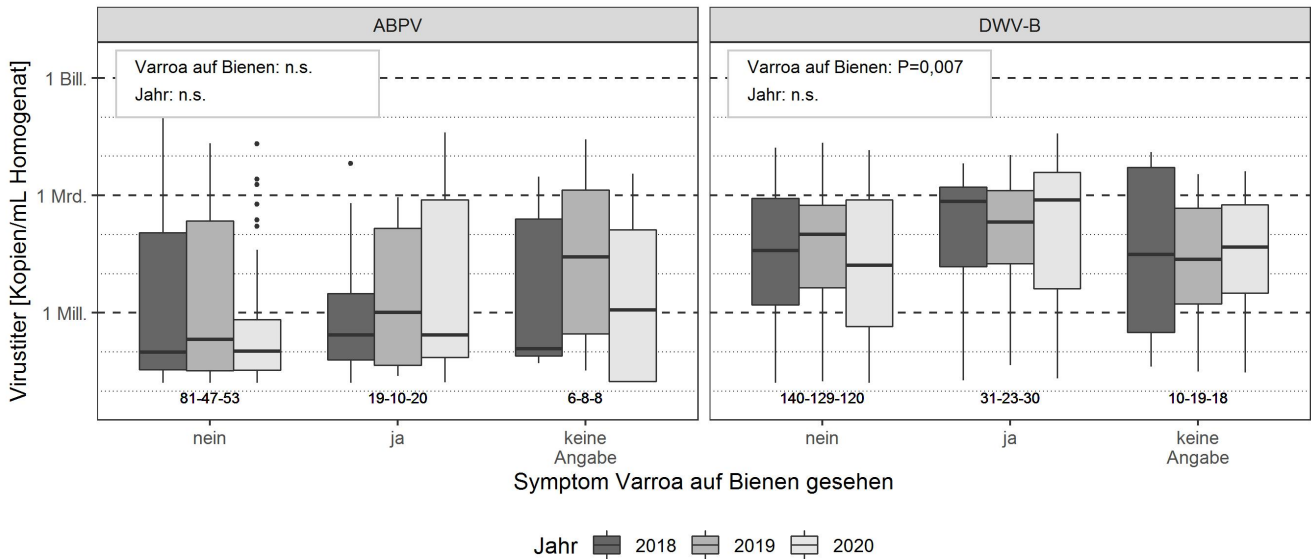


Abbildung 2.20: Zusammenhang zwischen dem Titer der ABPV positiven bzw. DWV-B positiven Proben mit dem Auftreten des Symptoms „Varroamilben auf Bienen“. „ja“: in zumindest einem der Probenvölker Symptom beobachtet; „nein“ in keinem der Probenvölker Symptom beobachtet; „keine Angabe“: die Völker wurden nicht auf dieses Symptom durchgesehen. Statistik: LMM mit binomialer Verteilung (random effect: Standidentität), „n.s.“ = nicht signifikant. „Mill.“ Million (=10<sup>6</sup>); „Mrd.“ Milliarde (=10<sup>9</sup>), „Bill.“ Billion (=10<sup>12</sup>). Boxplot Diagramm: dicker Mittelstrich: Median; untere/obere Grenze der Box: unteres/oberes Quartil; Antennen: maximal 1,5-facher Interquartilsabstand. Stichprobenzahl unter den Boxplots angegeben.

### 2.3.7.3 Bienen mit verkrüppelten Flügeln

Bei 89,9% Probenahmen wurden Angaben zum Symptom „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ gemacht (522 von 581 Probenahmen). Von den Probenahmen mit Symptomanangaben wurde bei 12% das Symptom bei mindestens einem Volk beobachtet (65 von 522 Probenahmen, Tabelle 2.18). „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ sind ein Hinweis auf eine akute DWV-Infektion. Daher wurde der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von DWV-B und dem Auftreten des Symptoms untersucht. DWV-A wurde nur in vier Proben gefunden und wurde daher nicht statistisch ausgewertet. Da eine akute DWV-Infektion mit einem hohen Varroabefall gekoppelt ist und auch ABPV mit Varroabefall korreliert, wurde auch ein Zusammenhang zwischen Auftreten von „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ und ABPV untersucht.

In den Grafiken und der statistischen Analyse wurden auch die statistischen Unterschiede zwischen den Versuchsjahren berechnet und angegeben. Diese wurden im Abschnitt 2.3.4 besprochen und werden daher im aktuellen Abschnitt nicht weiter kommentiert.

Tabelle 2.18: Angaben der teilnehmenden Imkereibetriebe, ob sie in mindestens einem ihrer Probenvölker das Symptom „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ gesehen haben

Symptomangabe	2018		2019		2020	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
ja	19	10%	18	9%	28	15%
nein	167	84%	152	79%	138	73%
keine Angabe	12	6%	23	12%	24	13%
insgesamt	198	100%	193	100%	190	100%

Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Symptom „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“

und der Prävalenz sowie des Titers von **ABPV** (Prävalenz:  $\chi^2=14,84$ ;  $df=2$ ;  $P=0,001$ ; Titer:  $\chi^2=8,05$ ;  $df=2$ ;  $P=0,018$ ). Die Häufigkeit von ABPV war in Proben von Völkern, in denen „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ gesehen wurden, um mindestens ein Drittel höher als in Proben von Völkern ohne ABPV (Posthoc-Vergleich:  $P<0,001$ ; Abbildung 2.21). Dabei bewegte sich die ABPV-Prävalenz bei Proben mit Symptom zwischen 64,3% (95% CI: 45,8-79,3%) und 68,4% (95% CI: 46,0-84,6%). War das Symptom in den Völkern nicht zu sehen, bewegte sich die Prävalenz zwischen 30,3% (95% CI: 23,5-38,0%) und 51,5% (95% CI: 44,0-59,0%). Der mediane ABPV-Titer war in den Proben von Völkern, bei denen „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ beobachtet wurden, abhängig vom Jahr mindestens drei Mal so groß wie in Proben, bei denen das Symptom nicht beobachtet wurde (Posthoc-Vergleich:  $P=0,023$ ). Bei der Gruppe mit Symptomen bewegten sich die Mediane zwischen knapp eine halben Millionen bis einer Millionen RNA-Kopien/mL Homogenat. Der Median der Gruppe ohne sichtbares Symptom blieb im Vergleich immer unter einer halben Million RNA-Kopien/mL Homogenat. Es gab keine paarweisen Unterschied in der Titerhöhe zu der Gruppe mit keine Angaben (Posthoc-Vergleich: ja-keine Angaben:  $P=0,877$ ; nein-keine Angaben:  $P=0,295$ ).

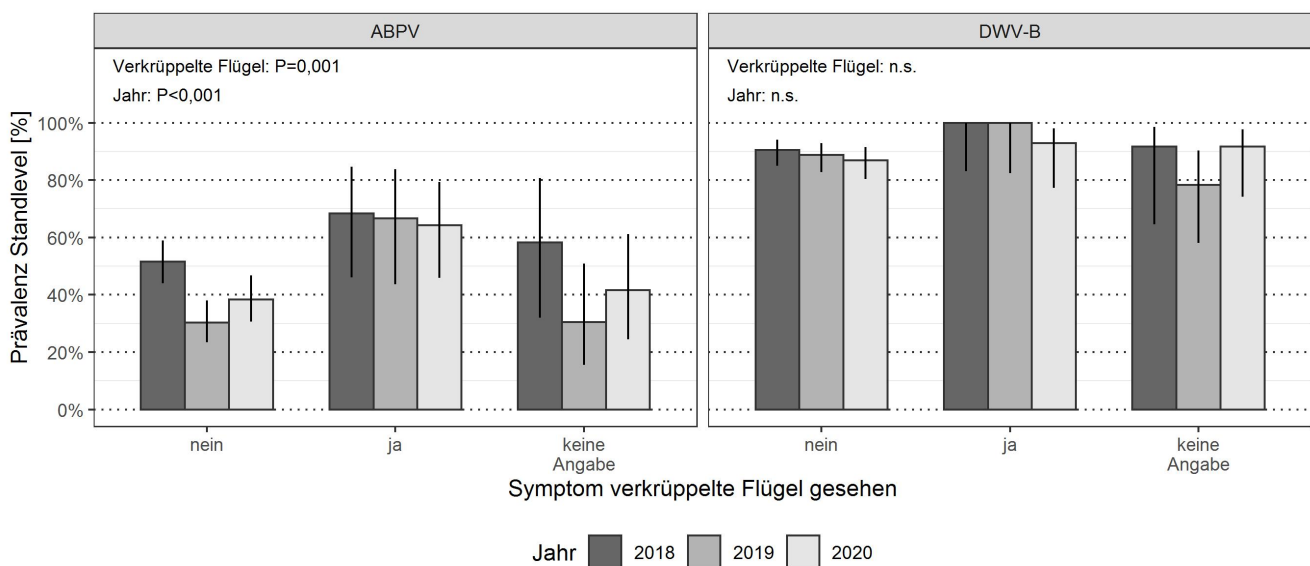


Abbildung 2.21: Zusammenhang zwischen der Prävalenz von ABPV bzw. DWV-B mit dem Auftreten des Symptoms „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ (inklusive 95% CI). „ja“: in zumindest einem der fünf Probenvölker Symptom beobachtet; „nein“: in keinem der fünf Probenvölker Symptom beobachtet, "keine Angabe": die Völker wurden nicht auf dieses Symptom durchgesehen. Statistik: GLMM mit binomialer Verteilung (random effect: Standidentität), „n.s.“ = nicht signifikant. Anzahl Stände pro Kategorie siehe Tabelle 2.18.

Die Prävalenz von **DWV-B** unterschied sich nicht signifikant zwischen Proben, die aus Völkern mit „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ entnommen wurden, und Proben aus symptomfreien Völkern ( $\chi^2=3,97$ ;  $df=2$ ;  $P=0,137$ ; Abbildung 2.21). Es war jedoch ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Titer von DWV-B positiven Völkern und der Beobachtung des Symptoms vorhanden ( $\chi^2=28,06$ ;  $df=2$ ;  $P<0,001$ ; Abbildung 2.21). Wurden „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ in mindestens einem der Probenvölker gesehen, war der DWV-B Titer signifikant höher als der Titer von DWV-B positiven Völkern ohne das Symptom (Posthoc:  $P<0,001$ ; Abbildung 2.22). Dabei bewegte sich der Median bei Völkern ohne Symptom im Bereich von mehreren zehntausend Millionen RNA-Kopien/mL Homogenat, während der mediane Titer bei Proben mit Symptom zwischen einer halben Milliarde und einer Milliarde RNA-Kopien/mL Homogenat betrug. Der Titer unterschied sich daher um etwa eine Zehnerpotenz zwischen den beiden Gruppen. Die Gruppe mit der Beobachtung der verkrüppelten Flügel hatte ebenfalls einen signifikant höheren DWV-B Titer als die Gruppe ohne Angaben (Posthoc:  $P=0,001$ ). Dies ist ein Hinweis, dass dieses Symptom gut von ImkerInnen entdeckt wird und tendenziell nur bei einer negativen Beobachtung keine

Angabe gemacht wurde. Es war kein signifikanter Unterschied im DWV-B Titer zwischen der Gruppe ohne Symptombesobachtung und der Gruppe ohne Angaben vorhanden (Posthoc:  $P=0,930$ ).

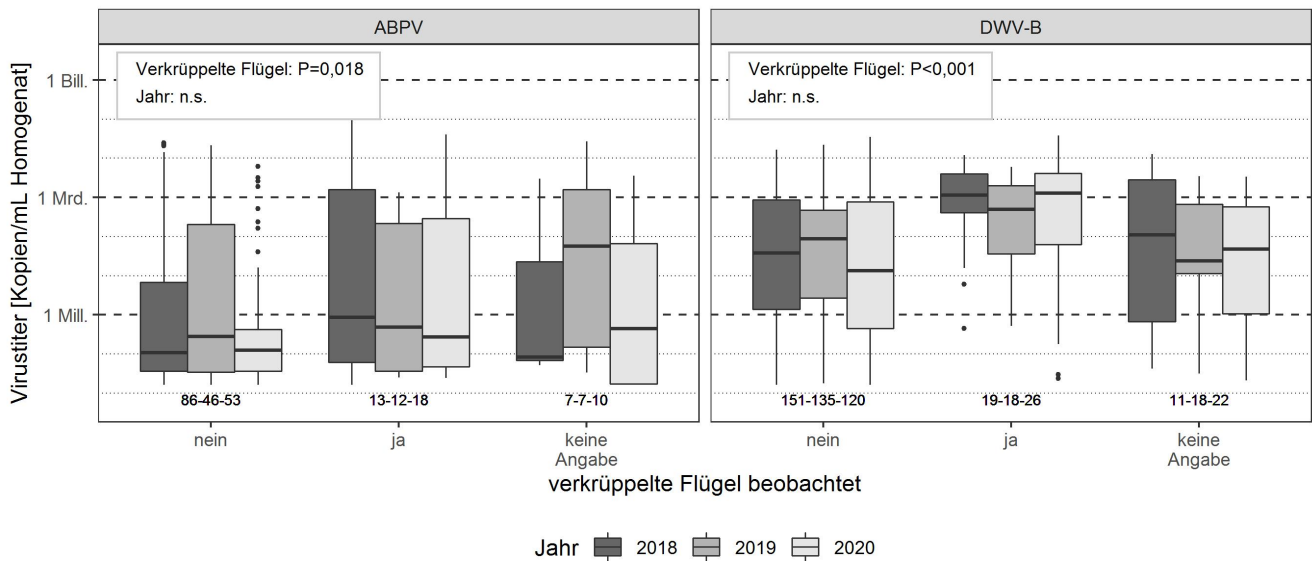


Abbildung 2.22: Zusammenhang zwischen der dem Titer der ABPV positiven bzw. DWV-B positiven Proben mit dem Auftreten des Symptoms „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“. „ja“: in zumindest einem der Probenvölker Symptom beobachtet; „nein“ in keinem der Probenvölker Symptom beobachtet; „keine Angabe“: die Völker wurden nicht auf dieses Symptom durchgesehen. Statistik: LMM (random effect: Standardidentität). „Mill.“ Million ( $=10^6$ ); „Mrd.“ Milliarde ( $=10^9$ ); „Bill.“ Billion ( $=10^{12}$ ); „n.s.“ = nicht signifikant. Boxplot Diagramm: dicker Mittelstrich: Median; untere/obere Grenze der Box: unteres/oberes Quartil; Antennen: maximal 1,5-facher Interquartilsabstand. Stichprobenzahl unter den Boxplots angegeben.

### 2.3.7.4 Schwarz-glänzende Bienen

90,2% der teilnehmenden Imkerinnen und Imker machten Angaben zum Symptom „schwarz-glänzende Bienen“ (524 von 581 TeilnehmerInnen, Tabelle 2.19). Dabei wurde in 36,1% der Fälle angegeben, dass das Symptom in zumindest einem der fünf Probenvölker beobachtet wurde (63 von 524). Da schwarz-glänzende Bienen ein Symptom für CBPV sein können, wurden die Daten auf Korrelation zwischen CBPV und der beobachteten Symptomatik ausgewertet.

In den Grafiken und der statistischen Analyse wurden auch die statistischen Unterschiede zwischen den Versuchsjahren berechnet und angegeben. Diese werden im Abschnitt 2.3.4 besprochen und werden daher im aktuellen Abschnitt nicht weiter kommentiert.

Tabelle 2.19: Angaben der teilnehmenden Imkereibetriebe, ob sie in mindestens einem ihrer Probenvölker das Symptom „schwarze Bienen“ gesehen haben

Symptomangabe	2018		2019		2020	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
ja	61	31%	63	33%	65	34%
nein	127	64%	106	55%	102	54%
keine Angabe	10	5%	24	12%	23	12%
insgesamt	198	100%	193	100%	190	100%

Es gab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von „schwarz-glänzenden Bienen“

und der Prävalenz oder dem Virustiter von CBPV (Prävalenz:  $\chi^2=0,08$ ;  $df=2$ ;  $P=0,963$ ; Virustiter:  $F(1,36)=0,845$ ;  $P=0,364$ ; Abbildung 2.23). Die Prävalenz betrug bei Proben aus Völkern mit „schwarz-glänzenden Bienen“ mindestens 9% während sie bei Völkern ohne beobachtetem Symptom in allen Jahren um 6% betrug. Daher war die Prävalenz von CBPV zwar um die Hälfte höher, wenn das Symptom beobachtet wurde, als wenn es nicht beobachtet wurde. Doch die deutlich überlappenden Balken des 95% Konfidenzintervalls zeigen, dass dieser Unterschied auch durch Zufall zustande gekommen sein kann. Die Stichprobe für den Zusammenhang zwischen Symptom und CBPV-Titer war allgemein sehr gering. In der Gruppe „keine Angabe“ betrug sie nur drei Beobachtungen, diese Gruppe wurde daher aus der statistischen Testung ausgeschlossen. Die anderen beiden Gruppen streuten stark in den Titerwerten.

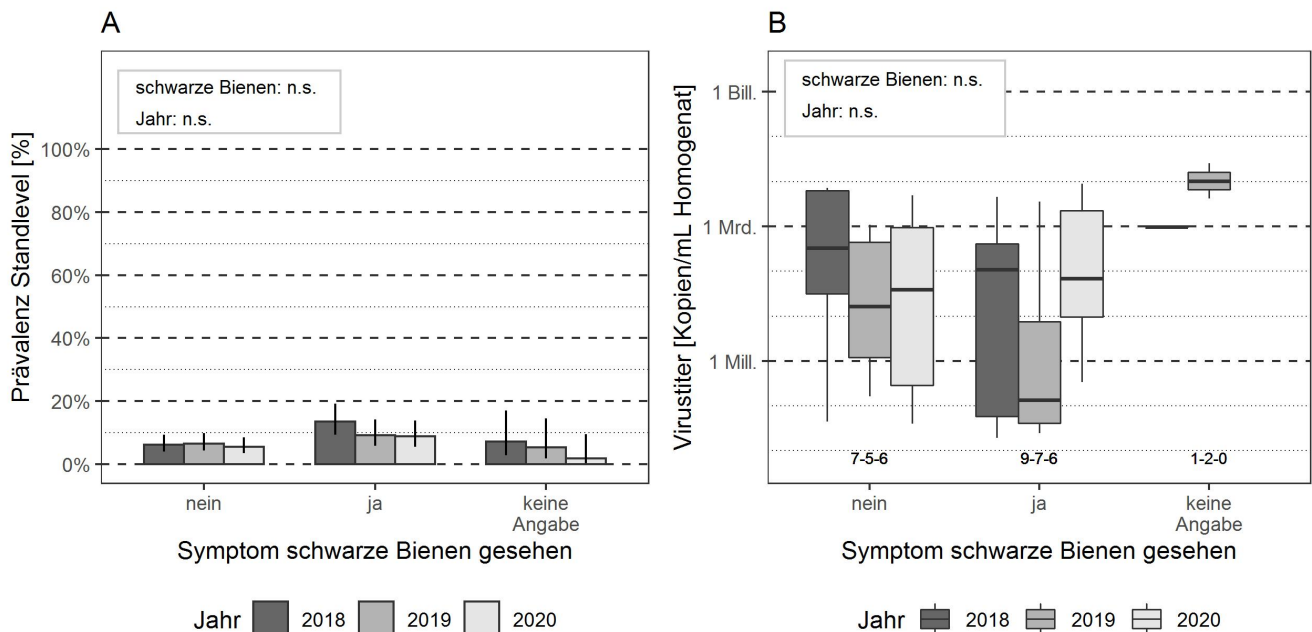


Abbildung 2.23: Zusammenhang zwischen der (A) Prävalenz von CBPV (inklusive 95% CI) bzw. (B) dem Titer der CBPV positiven Proben mit dem Auftreten des Symptoms „schwarz-glänzende Bienen“. „ja“: Symptom in zumindest einem der Probenvölker beobachtet; „nein“ Symptom in keinem der Probenvölker beobachtet; „Mill.“ Million ( $=10^6$ ); „Mrd.“ Milliarde ( $=10^9$ ); „Bill.“ Billion ( $=10^{12}$ ), „n.s.“ = nicht signifikant. Statistik in der Grafik: (A) GLMM mit binomialer Verteilung (random effect: Standidentität); (B) LMM (random effect: Standidentität). Boxplot Diagramm: dicker Mittelstrich: Median; untere/obere Grenze der Box: unteres/oberes Quartil; Antennen: maximal 1,5-facher Interquartilsabstand. Stichprobenzahl: (A) in Tabelle 2.19; (B) Zahlen unter den Boxplots.

### 2.3.7.5 Sackbrutsymptome

Insgesamt haben 90% der Teilnehmerinnen und Teilnehmer Angaben zu Sackbrut-Symptomen gemacht (520 von 581 TeilnehmerInnen). Sackbrutsymptome wurden auf 15 Ständen in mindestens einem Probenvolk beobachtet und sind damit auf 2,9% der Stände aufgetreten (15 von 520, Tabelle 2.20). Aufgrund des seltenen Auftretens des Symptoms war eine Auswertung auf einen Zusammenhang mit SBV nicht sinnvoll.

Tabelle 2.20: Angaben der teilnehmenden Imkereibetriebe, ob sie in mindestens einem ihrer Probenvölker „Sackbrut-Symptome“ gesehen haben

Symptomangabe	2018		2019		2020	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
ja	4	2%	5	3%	6	3%
nein	183	92%	164	85%	158	83%
keine Angabe	11	6%	24	12%	26	14%
insgesamt	198	100%	193	100%	190	100%

### 2.3.8 Zusammenhang Viruskonzentration und Winterverluste

Die Winterverluste (tote Völker) unter den Probenvölkern betragen zwischen 16,4% (95% CI: 12,9-20,2%) und 12,5% (95% CI: 9,7-15,7%). In keinem der Untersuchungsjahre unterschieden sie sich von den Winterverlusten der Monitoringstände (=Stände, auf dem die Probenahme durchgeführt wurde; Tabelle 2.21). Auch zwischen den Untersuchungsjahren sind keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen von Modul U sind die Winterverluste auch als „tote + weisellose Völker“ dargestellt.

Tabelle 2.21: Winterverluste unter den Probenvölkern (4-5 pro Stand) und auf den Monitoringständen (2018: n=198 Stände, 2019: n=192 Stände, 2020: n=187 Stände).

Art der Berechnung der Winterverluste	Gruppe	Jahr	Eingewintert (Anzahl Völker)	Winterverluste (Anzahl Völker)	Winterverluste (95% CI)	
<b>nur tote Völker</b>	Probenvölker	2018	990	162	16,4%	(12,9-20,2%)
		2019	956	130	13,6%	(10,7-16,8%)
		2020	929	116	12,5%	(9,7-15,7%)
	Monitoringstand	2018	2959	389	13,1%	(10,6-16,0%)
		2019	2931	338	11,5%	(9,3-14,1%)
		2020	3265	364	11,1%	(9,1-13,5%)
<b>tote + weisellose Völker</b>	Probenvölker	2018	990	191	19,3%	(15,8-23,2%)
		2019	956	172	18,0%	(14,8-21,5%)
		2020	929	150	16,1%	(13,2-19,4%)
	Monitoringstand	2018	2959	505	17,1%	(14,4-20,0%)
		2019	2931	487	16,6%	(14,2-19,3%)
		2020	3265	521	16,0%	(13,8-18,3%)

#### 2.3.8.1 Logistische Regression

Der Zusammenhang zwischen dem Absterben der Völker auf dem Probenstand und der Gesundheit der fünf Probenvölker bzw. einigen wichtigen imkerlichen Kenngrößen wurde mittels logistischer Regression modelliert. Dabei erwiesen sich die Faktoren DWV-B, die Anzahl an schwachen Völkern, das Symptom „Varroamilben auf Bienen“, ABPV und BQCV als statistisch signifikant (Tabelle 2.22). Die folgenden Faktoren wurden nicht in das Modell eingebaut, da sie die Vorhersage des Modells nicht verbesserten: Virustiter von BQCV und SBV, das Auftreten des Symptoms „deformierte Flügel bei Bienen“, das Untersuchungsjahr, die Seehöhe des Bienenstandes, die Anzahl der Völker im Gesamtbetrieb, die Jahre an imkerlicher Erfahrung und das Vorhandensein eines Bio-Zertifikats.

Tabelle 2.22: Multivariates Modell (GLMM mit binomialer Verteilung): Einfluss auf die Wintersterblichkeit von Bienenvölkern. Prädiktoren: Virustiter von DWV-B im September vor der Einwinterung (Vergleichskategorie: negativ), Anzahl der schwachen Probenvölker, Symptom „Varroamilben auf Bienen“ im September gesehen (Vergleichskategorie: Symptom nicht gesehen), Virustiter von ABPV im September vor der Einwinterung (Vergleichskategorie: negativ) und Virustiter von DWV-B im September vor der Einwinterung (Vergleichskategorie: negativ). K = Konzentration, geringe K =  $< 10^7$  RNA-Kopien/mL Homogenat, mittlere K =  $10^7 - 10^9$  RNA-Kopien/mL Homogenat, hohe K =  $> 10^9$  RNA-Kopien/mL Homogenat, n=429 Werte des Testdatensatzes.

Prädiktor	Schätzer	Standardfehler	P-Wert
DWV-B geringe K	0,973	0,259	<b>&lt;0,001</b>
DWV-B mittlere K	1,483	0,258	<b>&lt;0,001</b>
DWV-B hohe K	2,466	0,285	<b>&lt;0,001</b>
Anzahl schwache Völker	0,333	0,101	<b>0,001</b>
Varroa - gesehen	0,649	0,178	<b>&lt;0,001</b>
Varroa - keine Angabe	0,302	0,238	0,205
ABPV geringe K	0,087	0,146	0,552
ABPV mittlere K	0,727	0,216	<b>&lt;0,001</b>
ABPV hohe K	0,133	0,251	0,594
CBPV geringe K	-0,500	0,396	0,207
CBPV mittlere K	-0,750	0,385	0,052
CBPV hohe K	0,851	0,378	<b>0,024</b>

Bienenstände, in deren Proben DWV-B gefunden wurde, hatten eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit hohe Winterverluste zu verzeichnen, als Stände, in deren Proben kein DWV-B nachgewiesen werden konnte (Tabelle 2.22). Dabei korrelierte die Wahrscheinlichkeit von Winterverlusten positiv mit der Höhe der Virusinfektion. Dieser Zusammenhang wird anschaulich in Abbildung 2.24 verdeutlicht, in denen die mediane Winterverlustrate stetig mit Erhöhung der Konzentration steigt. Lag sie auf Ständen mit negativen DWV-B Proben im Median bei 0% (Q1-Q3: 0-5%), hatte sie sich bei Ständen mit hoher DWV-B Konzentration auf 17% (Q1-Q3: 5-40%) erhöht. Wenn man das obere Quartil (Q3, obere Grenze der Box) für die einzelnen DWV-B Konzentrationen betrachtet, bekommt man einen Überblick über die Stände, die einen besonders hohen Ausfall hatten, da überhalb dieses Wertes die 25% höchsten Messwerte liegen. Das obere Quartil lag bei Ständen mit negativen Proben bei 5% und steigt mit jeder Konzentrationskategorie. Damit verzeichneten ein Viertel aller Stände, die eine mittlere DWV-B Konzentration aufwiesen, Winterverluste über 20%. Bei Ständen mit einem DWV-B Titer über einer Milliarde ( $=10^9$ ) RNA-Kopien/mL Homogenat, hatten 25% aller Stände Winterverluste über 40%. Ähnlich aussagekräftig ist die Höhe der Ausreißer (Abbildung 2.24, Datenpunkte außerhalb des Interquartilsabstandes). In der negativen Kategorie lagen die höchsten Ausreißer bei 38% Winterverlustrate. Je höher die DWV-B Konzentration war, desto häufiger kam es zu Ausreißern bis zu 100% Winterverlustrate, die Wahrscheinlichkeit von sehr hohen Verlusten stieg daher stetig.

Je mehr Probenvölker schwach waren, desto höher war die Wahrscheinlichkeit an hohen Winterverlusten am gesamten Stand (Tabelle 2.22). Dabei lag die mediane Verlustrate auf Ständen ohne schwache Probenvölker bei 5,3% (Q1-Q3: 0-17%), während sie bei Ständen mit mindestens einem schwachen Probenvolk im Median bei 12,5% (Q1-Q3: 0-29%) lag.

Wenn bei mindestens einem Probenvolk im Herbst das Symptom „Varroamilben auf Bienen“ beobachtet wurde, stieg die Wahrscheinlichkeit von Winterverlusten auf dem Stand signifikant im Vergleich zu Ständen, in deren Probenvölker das Symptom nicht beobachtet wurde (Tabelle 2.22). Sie lag bei Ständen mit der Beobachtung von „Varroamilben auf Bienen“ im Median bei 11% (Q1-Q3: 0-24%), bei Ständen ohne

Symptom bei 5% (Q1-Q3: 0-18%). Die Wahrscheinlichkeit der Wintersterblichkeit unterschied sich nicht zwischen Ständen ohne beobachtete Symptome und Ständen mit Probenvölkern ohne Symptomanangaben.

Auch ABPV hatte einen signifikanten Einfluss auf die Höhe des Winterverlustes (Tabelle 2.22). Dabei unterschied sich nur die Kategorie mit der mittleren Konzentration signifikant von der negativen Kategorie. In der negativen Kategorie beliefen sich die Winterverlustraten im Median auf 5% (Q1-Q3: 0-15%, Abbildung 2.24) und in der Gruppe mit mittlerer ABPV Konzentration im Median bei 21% (Q1-Q3: 6-34%). Interessanterweise gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Ständen ohne ABPV in der Probe und Ständen mit einer hohen ABPV-Konzentration. Dies kann an dem geringen Anteil von ABPV-Proben mit hoher Konzentration liegen (siehe auch Tabelle 2.9). Die Verteilung der Datenpunkte in Abbildung 2.24 zeigt, dass es in allen vier Kategorien zu hohen Winterverlusten kam. Der Zusammenhang zwischen Winterverlustraten und ABPV-Konzentration war daher nicht so ausgeprägt wie bei DWV-B.

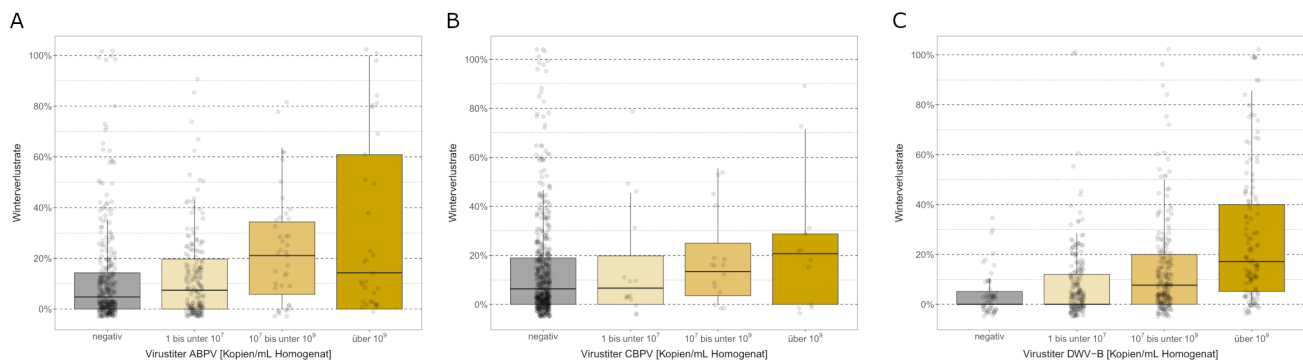


Abbildung 2.24: Zusammenhang zwischen der Höhe der Winterverluste am Monitoringstand und dem Virustiter von (A) ABPV, (B) CBPV und (C) DWV-B. Boxplot Diagramm: dicker Mittelstrich: Median; untere/obere Grenze der Box: unteres/oberes Quartil; Antennen: maximal 1,5-facher Interquartilsabstand; Punkte: Datenpunkte, Stichprobenzahl: n = 577.

Eine hohe CBPV-Konzentration war mit einer signifikant erhöhten Wahrscheinlichkeit von Winterverlusten korreliert (Tabelle 2.22). Eine geringe oder mittlere Konzentration von CBPV führte jedoch nicht zu einer signifikant erhöhten Sterblichkeit der Bienenvölker. Dabei lag die mediane Winterverlustrate auf Ständen mit negativem CBPV-Befund bei 6% (Q1-Q3: 0-19%) und auf Ständen mit mittelhoher CBPV Konzentration 13% (Q1-Q3: 4-25%).

### 2.3.8.2 Random-Forest-Modell

Ein Random-Forest-Modell stellt eine Mittlung der Ergebnisse von tausenden Regression Trees dar. Er wird daher nicht als Baum dargestellt. Stattdessen werden die Faktoren nach ihrer Relevanz gereiht. Die zwei Kennwerte hierfür sind „Total Decrease in Node Impurity“ und „Mean Decrease Accuracy“. Beide Kennwerte rechnen DWV-B den höchsten Einfluss auf die Winterverluste zu (Abbildung 2.25). Nach diesem Prädiktor bricht die Importance stark ein, die weiteren Prädiktoren tauchen weit seltener als wichtige Faktoren in den Regression Trees auf. Der zweitgereihteste Faktor ist jedoch bei beiden Kennwerten ABPV. Danach unterscheidet sich die Reihung der restlichen Prädiktoren zwischen den beiden Kennwerten. Dies lässt auf eine unklare Datenlage schließen.



### Variance Importance Plots - Random Forest

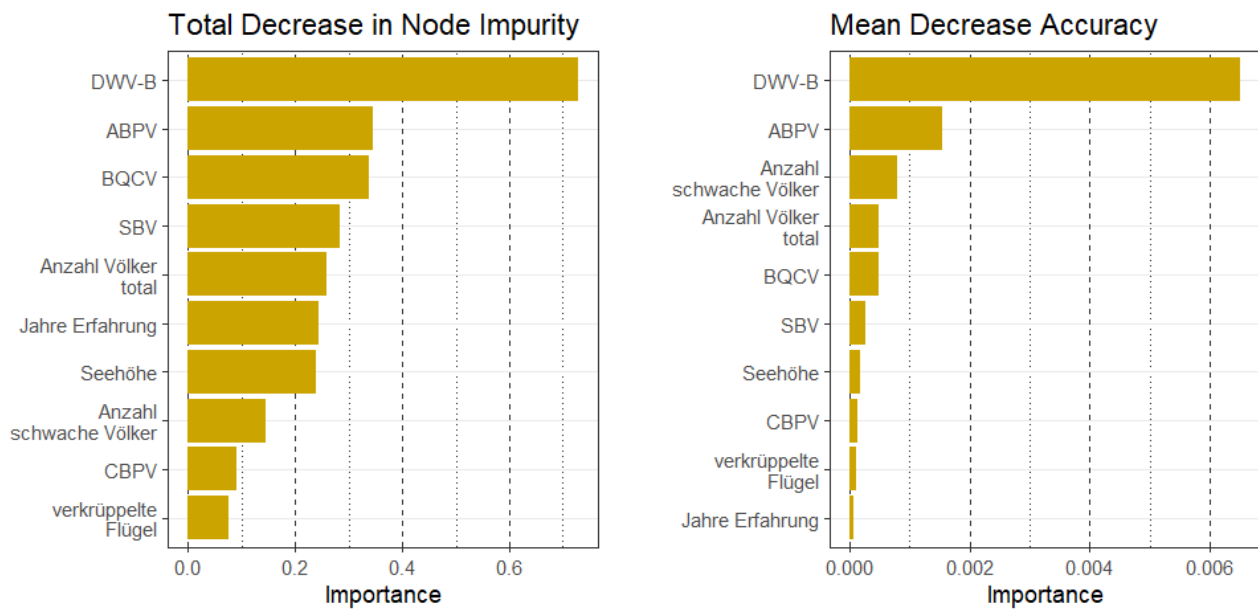


Abbildung 2.25: Einflussfaktoren auf die Winterverluste: Ergebnisse des Random-Forest-Modells.

Für die vier Viren, die bei beiden Kennwerten relativ weit vorne gereiht wurden, wurde die Vorhersage des Modells im Detail dargestellt (Abbildung 2.26). Auch in dieser Darstellung sieht man den Unterschied in der Bedeutung zwischen DWV-B und den drei anderen Viren. Bei allen vier Viren stieg die Wahrscheinlichkeit eines Ausfalls mit der Erhöhung des Virustiters, der Kurvenverlauf unterschied sich jedoch stark. Bei DWV-B war bei niedrigerem Virustiter kein erhöhter Winterverlust zu erwarten. Erst ab einem Titer von  $10^8$  RNA-Kopien/mL Homogenat stieg die vorhergesagte Winterverlustrate steil nach oben und erreichte etwa 19% vorhergesagte Wintersterblichkeit bei  $10^9$  RNA-Kopien/mL Homogenat. Im Gegensatz stieg bei den anderen drei Viren die Wahrscheinlichkeit eines Winterverlustes kontinuierlich aber flach mit Erhöhung des Virustiters, die einzelnen Vorhersagepunkte streuten weit um die Vorhersage-Kurve. Zu beachten ist auch die Streuung der vorhergesagten Wintersterblichkeit bei einem negativen Virustiter. Vorhersagen bewegen sich zwischen 5 und 15% bei DWV-B und BQCV. Bei ABPV und SBV liegen sie jedoch zwischen 5 und 30%.

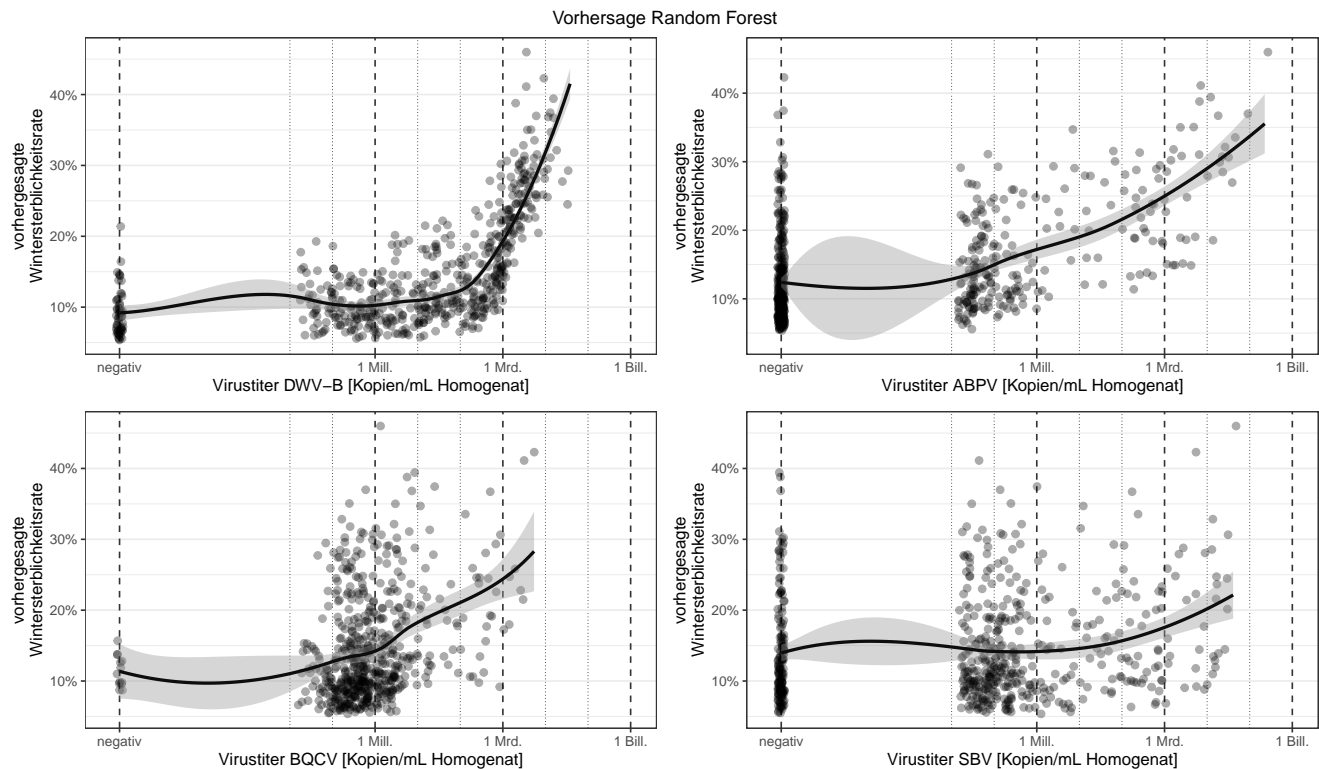


Abbildung 2.26: Vorhersage der Wintersterblichkeit durch das Random-Forest-Modell. Dargestellt sind die vier einflussreichsten Prädiktoren des Modells, die auf Virustiter zurückzuführen sind: der Virustiter von DWV-B (links oben) ABPV (rechts oben), BQCV (links unten) und SBV (recht unten) im September vor der Auswinterung (n=429). „Mill.“ Million ( $=10^6$ ); „Mrd.“ Milliarde ( $=10^9$ ), „Bill.“ Billion ( $=10^{12}$ ).

### 2.3.8.3 Vergleich der Vorhersagekraft der Winterverlust-Modelle

Um die Güte der unterschiedlichen Modelle zu bewerten, wurde eine Kreuzvalidierung durchgeführt (Tabelle 2.23). Dabei wurde jedes Modell zuerst mit einem Trainingsdatensatz angepasst und danach mit einem Test-Datensatz getestet. Der RMSE-Wert gibt an, wie stark die Vorhersage des Modells von der Wirklichkeit abweicht. Je höher der RMSE-Wert ist, desto häufiger hat das Modell Fehler in der Vorhersage gemacht.

Das Basismodell wurde ohne Prädiktoren gerechnet und hat daher auch die höchsten RMSE-Werte (Tabelle 2.23). Den niedrigsten RMSE-Wert im Trainingsdatensatz hatte die logistische Regression, die Vorhersage des Modells ist also besser als die Vorhersage des Random-Forest-Modells. Im Testdatensatz hingegen schneiden beide Modelle ähnlich gut ab. Generell ist die Vorhersagegüte auch des besten Modells nicht viel besser als die Güte des Basismodells. Dies kann dadurch erklärt werden, dass einige Völker trotz hohem DWV-B Titer überlebt haben und dieser Umstand nicht durch die restlichen Prädiktoren erklärt werden konnte. Es dürften also noch weitere Faktoren eine wichtige Rolle spielen, die in der vorliegenden Analyse nicht berücksichtigt wurden.

Tabelle 2.23: Vergleich der unterschiedlichen Modelle hinsichtlich ihrer Vorhersagekraft mittels Kreuzvalidierung. Der Trainingsdatensatz bestand aus 75% der Daten, der Testdatensatz aus 25% der Daten. RMSE = Root-Mean-Square-Error (quasi ein durchschnittlicher Vorhersagefehler).

Modell	Trainings-RMSE	Test-RMSE
Basismodell	0,211	0,205
Random Forest	0,174	0,188
Logistische Regression	0,115	0,190

## 2.4 Diskussion

### 2.4.1 Repräsentativität der StudienteilnehmerInnen

Vorrangiges Ziel des Virenmonitorings ist es, eine für Österreich repräsentative Aussage über die Prävalenz von Bienenviren zu machen. Deswegen wurde bei der Auswahl Sorge getragen, dass eine geographische Repräsentativität der einzelnen Bundesländer gewährleistet ist (Tabelle 2.2). Dies wurde erreicht, indem die TeilnehmerInnen anhand der Bundesländer-Zugehörigkeit ihrer Bienenstände aus den freiwilligen Meldungen ausgewählt wurden. Es kam im Laufe des Projektes zu geringfügigen Änderungen in der Bundesländer-Verteilung der Bienenstände. Diese Verschiebung kam teilweise durch die Absage von ImkerInnen in den einzelnen Probenjahren zustande (Absagen 2018: 2 Stände; 2019: 7 Stände; 2020: 10 Stände). Zusätzlich wählten einige ImkerInnen Bienenstände in anderen Bundesländern als anfangs angegeben zur Teilnahme aus (Verschiebung von Niederösterreich nach Wien).

Die Repräsentativität der Stichprobe ist für die Kenngrößen Imkererfahrung, Betriebsgröße und Bio-Zertifizierung vermutlich nicht voll gegeben. Leider liegen uns für diese Kenngrößen keine Daten aus der Österreichischen Imkerschaft vor. Wir können sie jedoch teilweise mit den Daten der COLOSS-Studie vergleichen, die eine wesentlich größere Stichprobe aufweist. So sind wahrscheinlich die jungen, unerfahreneren ImkerInnen in der Stichprobe des Virenmonitoring überrepräsentiert, da etwa die Hälfte aller teilnehmenden ImkerInnen weniger als elf Jahre Erfahrung in der Imkerei aufweisen (Tabelle 2.7). Die Imkereibetriebe mit weniger als 20 Völkern sind im Vergleich zu COLOSS-Studien unterrepräsentiert (Virenmonitoring: 43% der TeilnehmerInnen; COLOSS-Studien: >70%, Brodschneider et al., 2018a, 2019b, Tabelle 2.7). Der Anteil an zertifizierten Bio-Imkereien scheint mit 21 bis 27% der TeilnehmerInnen ebenso über dem österreichweiten Schnitt zu liegen (Tabelle 2.7). In den COLOSS-Studien lag der Anteil der zertifizierten Bio-Imkereien bei etwa 10% (Brodschneider et al., 2018a, 2019b).

Die beschriebenen Abweichungen der drei Kenngrößen kommen vermutlich aufgrund der TeilnehmerInnen-Aquisition mittels freiwilliger Meldung zustande. Bei Gesprächen oder in E-Mails nannten die TeilnehmerInnen vorrangig drei Gründe für die Teilnahme an der Studie: die Bereitschaft, die wissenschaftliche Forschung zum Thema Bienenviren zu unterstützen; die Möglichkeit, exakte Daten über Virusinfektionen in den eigenen Völkern zu erhalten und das Interesse, sich Wissen über das Thema Bienenviren anzueignen. Aus dieser Motivation heraus war eine Teilnahme an dem Projekt - und damit eine freiwillige Meldung - vor allem für JungimkerInnen und NeueinsteigerInnen interessant, die die Chance wahrnahmen, ihr Wissen zu erweitern. Ebenso ist das vermehrte Interesse von bio-zertifizierten Imkereien erklärbar, die aufgrund ihrer Betriebsweise einen besonderen Fokus auf Prävention und damit auf das sichere Erkennen von Krankheiten haben. Die geringe Beteiligung von kleinen Imkereibetrieben lag zum Teil an der Projektanforderung von minimal fünf Probenvölkern, die einen Teil der ImkerInnen automatisch ausschloss. Um die beschriebenen Abweichungen zumindest teilweise zu vermeiden, hätte man eine Zufallsauswahl aus dem österreichweiten Bienenstandsregister (VIS = Veterinärinformationssystem) durchführen müssen. Dies war leider aus rechtlichen Gründen nicht möglich.

Eine weitere Möglichkeit die Repräsentativität der teilnehmenden Imkerschaft zu prüfen, ist es die Winterverlustergebnisse mit der COLOSS-Studie zu vergleichen. Generell lag die Winterverlustrate der beiden Studien in allen Jahren in der gleichen Größenordnung. Trotzdem lag in den letzten zwei Versuchsjahren die Winterverlustrate der Virusmonitoring-TeilnehmerInnen etwa 4% über der Rate der COLOSS-Studie (=Ergebnisse des Moduls U des vorliegenden Berichts). Diese Unterschiede waren signifikant, wie die nicht überlappenden Konfidenzintervalle ersichtlich machen. Vermutlich hat die vermehrte Teilnahme an ImkerInnen mit weniger Erfahrungsjahren im Virenmonitoring einen Einfluß auf die Winterverlustrate, da geringere Erfahrungsjahre mit erhöhten Winterverlusten gekoppelt sind (Morawetz et al., 2019). Auch könnte eine solche Gesundheitsstudie besonders ImkerInnen anziehen, die vermehrt mit höheren Völkerverlusten konfrontiert sind und daher mehr über den Gesundheitszustand ihrer Völker erfahren möchten.

Der Unterschied in den Winterverlustaten spielt jedoch aufgrund der unterschiedlichen Zielsetzungen der beiden Projektmodule nur eine untergeordnete Rolle. Ziel der COLOSS-Studie ist es, die Winterverluste in Österreich repräsentativ und im Detail zu erfassen. Die Eingabe der Daten erfolgt durch eine möglichst große Anzahl von zum Teil anonymen TeilnehmerInnen (pro Jahr ca. 1.500 Betriebe mit >30.000 Völkern). Im Virenmonitoring werden die Winterverluste in erster Linie dazu erhoben, um Rückschlüsse über die Effekte der nachgewiesenen Viren auf den Überwinterungserfolg der Völker zu untersuchen. Die Daten werden daher von einer vergleichsweise geringen Anzahl an uns bekannten TeilnehmerInnen über mehrere Jahre erhoben (pro Jahr ca. 200 Bienenstände mit ca 3.000 Völker). Es ist nicht verwunderlich, dass die geringe TeilnehmerInnenzahl und größere Teilnahmehürde im Virenmonitoring zu Unterschieden in den Winterverlusten führt.

#### 2.4.2 Prävalenzlevel

Die errechneten Prävalenzwerte sind Prävalenzen auf Bienenstand-Niveau. Der Bienenstand ist eine epidemiologische Einheit, da aufgrund der gruppenweisen Aufstellung auf engem Raum (Blockaufstellung, große Zahl von Bienenvölkern auf einem Bienenstand), imkerlicher Eingriffe (gleiches Werkzeug für alle Bienenvölker, Wechsel von Beutenteilen, Rähmchen, Futter- und Brutwaben zwischen Völkern, etc.) und Verhalten der Bienen (Verflug der Arbeiterinnen und Drohnen, Räuberei in anderen Standvölkern) ein ständiger Austausch von viruskontaminiertem Material zwischen den Völkern zu erwarten ist. Deswegen haben wir in der vorliegenden Studie die fünf eingesandten Bienenproben eines Standes zu jeweils einer Sammelprobe zusammengefasst und untersucht. Mit einer Sammelprobe aus mehreren Völkern steigt die Wahrscheinlichkeit, dass alle häufig auf einem Stand vorkommenden Bienenviren in der Sammelprobe enthalten sind und das gesamte Virusspektrum auf dem Bienenstand damit beschrieben werden kann (Tentcheva et al., 2004; Mouret et al., 2013).

In jedem der drei Untersuchungsjahre waren die gleichen sechs Bienenviren nachweisbar (ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A, DWV-B, SBV; Abbildung 2.5). Zwei weitere getestete Viren wurden in den ersten beiden Versuchsjahren nicht entdeckt (IAPV, KBV), im dritten Jahr wurde nicht mehr darauf untersucht. Das gefundene Virenspektrum war damit zwischen den drei Untersuchungsjahren reproduzierbar. Es stimmte auch mit den Ergebnissen des Vorprojekts „Zukunft Biene“ (Brodschneider et al., 2018a, 2019b) und dem weltweiten Verbreitungsmuster dieser Viren überein (Beaurepaire et al., 2020). Das negative Untersuchungsergebnis für IAPV und KBV stimmt auch mit früheren österreichischen Untersuchungen überein, in denen diese Viren entweder gar nicht oder nur in Einzelfällen detektiert wurden (Köglberger et al., 2009; Girsch und Rudolf Moosbeckhofer, 2012; Rudolf Moosbeckhofer und Mayr, 2014). Doch auch diese Einzelnachweise sind inzwischen als nicht gesichert anzusehen, da die selben Proben im Zuge der Methodenetablierung von IAPV und KBV mit neuen Methoden untersucht wurden und die Viren damit nicht nachgewiesen werden konnten (Abschnitt 2.2.7.5).

Das Prävalenzlevel der Viren blieb größtenteils über die drei Untersuchungsjahre konstant (Abbildung 2.5 und Tabelle 2.8). In allen Jahren war BQCV mit einer Prävalenz knapp unter 100% das häufigste Virus, gefolgt von DWV-B, das in allen Jahren in über 86% der Proben vorkam. Auch die seltenen Viren CBPV und DWV-A traten in den drei Jahren mit einer ähnlichen Häufigkeit auf, bei beiden blieb die Prävalenz unter 10%. Interessanterweise kam es jedoch zu signifikanten Unterschieden in der Prävalenz der Viren ABPV und SBV um jeweils etwa 20 Prozentpunkten. Die Prävalenz ABPV bewegte sich dabei zwischen 34% (95% CI: 27-41%) im Jahr 2019 und 54% (95% CI: 47-60%) im Jahr 2018. SBV kam im Jahr 2018 mit 62% (95% CI: 55-67%) am seltensten vor und im Jahr 2019 mit 81% (95% CI: 75-86%) am häufigsten.

Die hohe Konstanz der gemessenen Prävalenz der Viren ist unerwartet. In drei mehrjährigen Studien in Deutschland, Italien und den USA zeigte sich, dass die Virusprävalenzen von ABPV, BQCV, CBPV und DWV zwischen den Untersuchungsjahren signifikant fluktuierten (Genersch et al., 2010; Porrini et al., 2016; Traynor et al., 2016). Diese Studien sind jedoch nicht ganz vergleichbar, weil sie entweder auf Volksniveau beprobt hatten (Genersch et al., 2010; Porrini et al., 2016) oder die Anzahl und geographische Lokalisation der teilnehmenden Betriebe stark zwischen den Jahren schwankte (Traynor et al., 2016). Die genannten Studien sind jedoch schon etwas älter. Sie haben zum Beispiel DWV-A gemessen, dieses scheint jedoch derzeit von DWV-B ersetzt zu werden (Grindrod et al., 2021; Kevill et al., 2021), was die dynamische Entwicklung im Virusgeschehen anzeigt.

Der Vergleich zu anderen österreichischen Studien lässt vermuten, dass sich das Virusspektrum auch in Österreich in den letzten Jahren verändert hat. In der Vorgängerstudie „Zukunft Biene“ wurden 210 Bienenproben, die im September 2015 genommen worden waren, auf ABPV, CBPV, DWV-A und DWV-B untersucht (Morawetz et al., 2018). ABPV ist damals signifikant häufiger in Bienenproben gefunden worden als die anderen drei Viren und die Häufigkeit von DWV-A und DWV-B unterschied sich nicht signifikant. Auch in einer früheren österreichischen Studie, die Proben von 43 asymptomatischen Völkern im Jahr 2009 auf sechs Viren untersuchte, war ABPV gemeinsam mit SBV das am häufigsten nachgewiesene Virus, gefolgt von BQCV und DWV (Köglberger et al., 2009).

### 2.4.3 Höhe Virustiter

Der Virustiter bewegte sich bei fünf der positiv getesteten Viren in einer sehr großen Spannweite zwischen fünf und sieben Zehnerpotenzen (DWV-A: nur vier Proben). Daher ist zu erwarten, dass die niedrigen Titerwerte verdeckte Infektionen ohne Symptome beschreiben, während die hohen Titerwerte aus Völkern mit einer offenen Virusinfektion stammen (Amiri et al., 2015; Schurr et al., 2019; Šimenc et al., 2021). Zusätzliche Variation in der Spannbreite entsteht dadurch, dass sich eine Sammelprobe aus insgesamt 50 Bienen zusammensetzte, von denen jedes einzelne Individuum in seinem Infektionsgrad zwischen einer nicht vorhandenen, einer verdeckten und einer offenen Infektion variieren kann.

In der Folge werden die im Projekt gemessenen Werte in Relation mit Literaturwerten zu Viruskonzentration gesetzt (Schurr et al., 2019; Šimenc et al., 2021). Es sei jedoch vorab betont, dass der Vergleich von Viruskonzentrationen zwischen verschiedenen Laboren aufgrund methodischer Unterschiede mit Vorsicht interpretiert werden sollte. So hat unser Labor in ausgewählten Proben für ABPV und BQCV eine Abweichung von ein bis zwei Zehnerpotenzen im Vergleich zu den Ergebnissen des EU-Referenzlabores beobachtet (Abschnitt 2.2.7.3). Auch ein Vergleich zwischen 21 Analytiklaboren im Rahmen eines Ringversuches zur Quantifizierung von CBPV zeigte bei der Ermittlung der Titerwerte eine Abweichung von 2 Zehnerpotenzen zwischen den Laboren (Schurr et al., 2017). Daher können wir die Vergleiche nur schätzungsweise heranziehen.

Für **ABPV** wird der Grenzbereich zwischen offener und verdeckter Infektion bei  $10^5$  RNA-Kopien/Biene angesetzt (Schurr et al., 2019; Šimenc et al., 2021; Umrechnungsfaktor zu RNA-Kopien/mL Homogenat: x3). Dies würde bedeuten, dass etwa die Hälfte aller ABPV-Proben überhalb dieses Grenzwertes liegen und

die Chance einer offenen ABPV Infektion erhöht ist (Tabelle 2.9). Da die Symptome einer offenen ABPV-Infektion selten zu beobachten sind, ist diese Einschätzung schwer durch die Beobachtung von typischen ABPV-Symptome zu bestätigen (De Miranda et al., 2010). Die Korrelation zwischen ABPV und zwei Varroa assoziierten Symptomen zeigt jedoch, dass bei erhöhtem ABPV-Titer auch Gesundheitsprobleme in den Völkern beobachtet wurden (Details siehe Abschnitt 2.4.6).

Für **BQCV** liegt der Grenzbereich bei  $10^7$  bis  $10^8$  RNA-Kopien/Biene und damit um drei Zehnerpotenzen höher als bei ABPV (Schurr et al., 2019; Šimenc et al., 2021). Dieser Wert wurde nur bei einigen wenigen Ausreißern erreicht (Tabelle 2.9). Dies bestätigt die Vermutung, dass BQCV in Österreich in erster Linie als verdeckte Infektion auftritt. Das Virus wurde zwar auf nahezu jedem Stand gemessen, es gibt jedoch keinerlei Meldungen und Berichte aus der österreichischen Imkerschaft, dass das typische Symptom der „schwarz gefärbten Königinnenzellen“ beobachtet wurde (Bailey und Woods, 1974).

Für **CBPV** wird der Grenzbereich zwischen offener und verdeckter Infektion ebenfalls bei  $10^8$  RNA-Kopien/Biene angesetzt (Schurr et al., 2019; Šimenc et al., 2021). Dieser Wert wird in zumindest einem Viertel der Messungen überschritten (Tabelle 2.9). Wenn CBPV in einer Probe gemessen wurde, war häufig die Wahrscheinlichkeit hoch, dass eine offene Infektion vorhanden war. Auch das Symptom „schwarzglänzende Bienen“, das typisch für CBPV ist, wurde häufig beobachtet (Rivière et al., 2010). Doch leider ist es nicht sehr aussagekräftig, da das Erscheinungsbild auch aus anderen Gründen zustande kommen kann (Details siehe Abschnitt 2.4.6).

Für **DWV-B** liegt die Grenze bei  $10^7$  RNA-Kopien/Biene (Schurr et al., 2019). Ähnlich wie bei ABPV lagen etwa die Hälfte der gemessenen Konzentrationen über dieser Schwelle und waren daher mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einer offenen DWV-B Infektion verbunden (Tabelle 2.9). Die Höhe der Schwelle wird auch durch die Symptom-Beobachtungen der Imkerinnen und Imker bestätigt: für beide Gruppen der Proben mit den DWV-Symptomen lag Q1 bei etwa  $10^7$  RNA-Kopien/mL Homogenat - das heißt, 75% der Proben mit beobachteten DWV-B Symptomen lagen über dem Grenzwert (Details siehe Abschnitt 2.4.6).

Für den Grenzwert von **SBV** gibt es widersprüchliche Angaben zwischen  $10^7$  RNA-Kopien/Biene und  $10^9$  RNA-Kopien/Biene (Schurr et al., 2019; Šimenc et al., 2021). Im Virenmonitoring wurden für SBV sehr niedrige Titerwerte gemessen (Tabelle 2.9). In den Jahren 2018 und 2020 überschritten nur Ausreißer beide genannten Grenzwerte. Im Jahr 2019 überschritten etwa 25% der Messwerte die untere der genannten Schwellen. Doch der Anteil an berichteten Symptomen lag in allen drei Jahren bei 2-3% der Beobachtungen (Tabelle 2.20) und unterschied sich daher trotz unterschiedlich hoher Titerkonzentrationen nicht zwischen den Jahren. Es darf daher angenommen werden, dass die obere Schwelle bei  $10^9$  RNA-Kopien/Biene Gültigkeit hat und offene SBV Infektionen mit Symptomen in der Studie extrem selten waren.

#### 2.4.4 Unterschiede geographische Verbreitung

Die vier Viren ABPV, CBPV, DWV-B, SBV unterschieden sich in der Prävalenz zwischen den neun Bundesländern (Abbildung 2.7). Dabei waren vor allem in Tirol und Kärnten sehr oft niedrige Prävalenzen zu messen, während Burgenland und Wien meist sehr hohe Prävalenzen aufwiesen. Zusätzlich wurden bei DWV-B auch unterschiedlich hohe Werte im Virustiter gemessen. Das Muster war hier dem Prävalenzmuster sehr ähnlich: die höchsten Titerwerte in Wien und Burgenland, die geringsten Werte in Tirol (Abbildung 2.8). Dass diese Bundesländer an den extremen Enden der Varianz in Prävalenz und Virustiter stehen, lässt einen Zusammenhang mit der Seehöhe vermuten, da die teilnehmenden Bienenstände in Tirol und Kärnten am höchsten gelegen waren, während die Bienenstände in Wien und im Burgenland im Flach- und Hügelland lagen (Abbildung 2.9).

Tatsächlich war für die Viren ABPV, DWV-B und SBV die Prävalenz auf Ständen in größerer Seehöhe signifikant niedriger als auf tiefer gelegenen Ständen (Abbildung 2.10). Analog zu den Ergebnissen der

Bundesländer sank auch der DWV-B Titer, je höher die Bienenstände gelegen war (Abbildung 2.11). Auch der BQCV-Titer sank mit dem Ansteigen der Seehöhe. Doch dieser Effekt war bei DWV-B weit ausgeprägter, wo sich der Unterschied im Titer im Bereich von drei Zehnerpotenzen abspielte. Im Vergleich dazu bewegten sich die Unterschiede bei BQCV nur innerhalb einer Zehnerpotenz.

Der Zusammenhang zwischen der Virus-Prävalenz und der Seehöhe konnte nun in drei aufeinander folgenden Versuchsjahren für Österreich gezeigt werden. Er ist vermutlich durch klimatische und ökologische Faktoren bedingt, die sowohl Einfluss auf die Vegetation und die Art der Landnutzung als auch auf die Entwicklung der Bienenvölker haben. So hat die durch die klimatischen Bedingungen bedingte kürzere Brutzeit der Völker in höheren Lagen einen hemmenden Einfluss auf die Entwicklung der Varroa-Population und damit auf die Verbreitung von Varroa-assoziierten Viren wie DWV, ABPV oder SBV im Bienenvolk (Sumpter und Martin, 2004; McMenemy und Genersch, 2015). Es ist außerdem zu vermuten, dass die Dichte der Bienenvölker in höheren Regionen geringer ist als in niedrigeren Lagen. Mit einer geringen Völkerdichte sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass Varroamilben und die von ihnen verbreiteten Viren zwischen Bienenvölkern durch Räuberei, Bienen-Verflug oder Kontakte bei Blütenbesuchen übertragen werden (Forfert et al., 2015, 2016; Nolan und Delaplane, 2016; Peck et al., 2016). Ebenso ist es zu erwarten, dass sich die Höhenlagen durch Unterschiede im Futterpflanzenspektrum und der Pflanzendiversität unterscheiden. Da die Ernährung einen wichtigen Einfluss auf die Gesundheit und Abwehrkräfte eines Volkes besitzt, können ungünstige Ernährungssituationen mitverantwortlich für die Ausbreitung von Viren in Bienenvölkern sein (Decourtye et al., 2011; DeGrandi-Hoffman und Y. Chen, 2015).

#### 2.4.5 Einfluss von imkerlichen Praktiken

Eine zentrales Element für eine gute Völkergesundheit ist eine gute Pflege der Bienenvölker durch den Imker oder die Imkerin, auch als gute imkerliche Praxis zusammengefasst (Rivera-Gomis et al., 2019). Der Zusammenhang zwischen Imkerpraxis und Völkergesundheit wurde inzwischen im Bezug auf Winterverluste mehrfach bestätigt - je professioneller Imkerinnen oder Imker arbeiten und je erfahrener sie sind, desto geringer sind die Winterverluste (Brodtschneider et al., 2016; Jacques et al., 2017; Steinhauer et al., 2018; Morawetz et al., 2019). Auch das Virusspektrum der Völker kann von der Art der Völkerführung beeinflusst werden (Bartlett et al., 2021). Wir haben nun drei imkerliche Bereiche mit dem Auftreten und der Konzentration der untersuchten Viren korreliert: die Wabenerneuerung, die Verwendung von Futterwaben aus abgestorbenen Völkern und die Völker Vermehrung (Abschnitt 2.3.6).

Dabei ist auffällig, dass sich ein Großteil der teilnehmenden Imkerinnen und Imker an die von der Wissenschaft empfohlenen und derzeit in der Imkerschaft gelehrt Regeln der guten imkerlichen Praxis hält. Dies ist an sich eine interessante und sehr erfreuliche Aussage. Sie kann jedoch nicht automatisch auf die gesamte österreichische Imkerschaft umgelegt werden, da die Stichprobe des Virenmonitorings in einigen Aspekten nicht repräsentativ für die österreichische Imkerschaft ist (Abschnitt 2.4.1).

##### 2.4.5.1 Wabenerneuerung

Eine regelmäßige Wabenerneuerung wird sowohl von der gängigen deutschsprachigen Imkerliteratur als auch von der Wissenschaft empfohlen, um eine Anreicherung von Krankheitskeimen in den Waben zu unterbinden (Pohl, 2005; Ritter, 2016; Rivera-Gomis et al., 2019).

Die Ergebnisse des Virenmonitorings zeigen, dass diese Empfehlung vom größten Teil der teilnehmenden Imkerschaft in der jährlichen Praxis umgesetzt wird: 99% der Teilnehmenden wechselten einen Teil ihrer Waben im jeweiligen Versuchsjahr aus, davon 78% mindestens 30% der Waben (Tabelle 2.10). Diese Größenordnungen werden auch von der COLOSS Studie beschrieben (siehe Modul U). Dabei hatte die Höhe des Anteils ausgetauschter Waben keinen Einfluss auf die Virusprävalenz und die Konzentration

(Tabelle 2.11). Dies ist insofern bemerkenswert, weil meist betont wird, dass ein jährlicher Wabentausch von über 30% angestrebt wird (Pohl, 2005; Rivera-Gomis et al., 2019). Die Notwendigkeit eines Wabentausches über diesem Prozentsatz können wir zumindest für die sechs im Virenmonitoring gemessenen Viren nicht bestätigen.

Doch die vorliegenden Daten betonen in anekdotischer Weise, wie wichtig es generell ist Waben zu tauschen. In vier Fällen wurde „0% Wabenerneuerung“ angegeben. Obwohl diese Fälle zu selten sind, um statistisch ausgewertet werden, ist auffällig, dass in dieser Situation sehr oft ABPV und SBV in hohen Konzentrationen auftrat. Diese Einzelfälle legen nahe, dass ein vollständiges Unterlassen von jährlichem Wabentausch mit erhöhtem Virusauftreten korreliert sein könnte.

#### 2.4.5.2 Waben aus abgestorbenen Völkern

Futterwaben aus abgestorbenen Völkern sollten aus dem Imkereibetrieb ausgeschieden werden, da die Gefahr besteht dass Krankheitskeime in gesunde Völker eingeschleppt werden können (Ritter, 2016; Rivera-Gomis et al., 2019). Für DWV-A wurde zum Beispiel gezeigt, dass das Verfüttern von DWV-A positivem Honig und Nektar zu einer erhöhten Sterblichkeit von adulten Bienen führt (Schittny et al., 2020).

Etwa zwei Drittel der teilnehmenden Imkerbetriebe schied Futterwaben aus abgestorbenen Völkern durch Einschmelzen oder ähnliche Praktiken aus (Tabelle 2.12). Das letzte Drittel entschied von Fall zu Fall, ob Futterwaben ausgeschieden wurden oder in gesunde Völker umgehängt wurden. Interessanterweise unterscheiden sich diese beiden Kategorien nicht signifikant in der Virusprävalenz und dem Virustiter. Daher lässt sich aus den Daten schließen, dass eine Weiterverwendung von Futterwaben aus abgestorbenen Völkern nicht automatisch mit Virenverbreitung einher gehen muss. Eine Einschätzung der Weiterverwendung von Futterwaben aufgrund von Volksgeschichte und Wabenzustand scheint ausreichend zu sein, um eine nachweisbare Erhöhung der Verbreitung und Konzentration von Bienenviren auf dem betreffenden Bienenstand zu verhindern.

Nur ein geringer Prozentsatz der Imkerbetriebe gaben an, Futterwaben aus abgestorbenen Völkern generell in anderen Völker einzuhängen. Die Stichprobengröße dieser Gruppe war zu klein um sie statistisch auswerten zu können. Der positive Aspekt dabei ist, dass ein hohes Bewusstsein in der Imkerschaft bezüglich der Gefahr der Krankheitsübertragung zu existieren scheint.

#### 2.4.5.3 Völkervermehrung

Auch die Völkervermehrung kann im Zusammenhang mit Virusverbreitung stehen. Einige Vermehrungsarten wie Kehrschwarm oder Naturschwarm gehen mit einer Unterbrechung der Brutphase einher (Pohl, 2008; Rudolf Moosbeckhofer und Ulz, 2012). Damit wird nicht nur die Varroavermehrung unterbrochen, sondern auch ein Großteil der Milben in der Brut des Muttervolkes zurückgelassen. Dies unterdrückt die Verbreitung von ABPV, DWV und SBV sowohl vom Muttervolk in das Jungvolk als auch innerhalb des Jungvolkes (McMenamin und Genersch, 2015; Locke et al., 2017; Beaurepaire et al., 2020). Außerdem werden bei diesen Vermehrungsmethoden die Bienen standardmäßig auf Mittelwände eingeschlagen (Lehnherr et al., 2001; Rudolf Moosbeckhofer und Ulz, 2012). Dies führt zu Entfernung von virusbelasteter Brut und Wabenmaterial, womit ein möglicher Transfer der entsprechenden Viren in das neue Volk unterbunden wird (Schittny et al., 2020). Bei der Vermehrung mittels Brutableger kommt es zu einer Reduzierung von Brutwaben und damit Varroamilben im Muttervolk (Pohl, 2008; Ritter, 2016). Es gibt jedoch weder eine Brutunterbrechung noch eine vollständige Erneuerung des Wabenmaterials im Muttervolk (Rudolf Moosbeckhofer und Ulz, 2012). Es wäre daher zu erwarten, dass Imkerinnen und Imker, die mittels Kehrschwarm oder Naturschwarm vermehren, weniger Viren und geringere Virenlasten in den Völkern haben, als jene, die Brutableger bilden.



Da die Imkerinnen und Imker nur selten eine einzige Methode zur Völkervermehrung verwendeten, wurden die vier häufigsten Kombinationen ausgewertet. Brutableger ist die am häufigsten praktizierte Vermehrungsmethode und kommt daher in allen untersuchten Kombinationen vor. Es kann daher keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Verwendung von Brutablegern eine höhere Virusprävalenz oder Viruslast bedingt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es keinen Unterschied machte, ob in einem Betrieb nur Brutableger gebildet wurden oder ob auch andere Vermehrungsmethoden zum Einsatz kamen.

In Betrieben, die „Naturschwarm“ als Vermehrungsmethode angegeben haben, war der ABPV-Titer jedoch signifikant geringer als in Betrieben, die dies nicht angegeben haben. ABPV wird sowohl zwischen adulten Bienen als auch über die Varroamilbe übertragen (De Miranda et al., 2010; Beaufrepaire et al., 2020). Der erste Übertragungsweg wird nicht durch das Schwärmen unterbunden. Vermutlich haben jedoch Naturschwärme eine relativ geringe Anzahl an Varroamilben, da der größte Anteil an Milben zu der Jahreszeit in der Brut sitzt (Martin, 1998). Ob dieser Aspekt ausreicht, um den beobachteten Effekt zu erreichen, ist eher fraglich. Daher ist zu vermuten, dass ein indirekter Zusammenhang zwischen dem ABPV-Titer und der Naturschwarm-Verwendung besteht. Damit wäre der wahre beeinflussende Faktor eine andere, nicht untersuchte Imkereitechnik oder Betriebseigenschaft, die vermehrt in Imkereien eingesetzt wird, die Naturschwärme verwenden.

#### 2.4.6 Aussagekraft von Virussymptomen

Die Durchsicht der eigenen Völker auf Krankheitssymptome ist eine gute Hilfe für Imkerinnen und Imker zur Einschätzung ihrer Völkergesundheit (Pohl, 2005; Ritter, 2016; Rivera-Gomis et al., 2019). Im Virenmonitoring wurden fünf leicht zu erkennende Virussymptome nun auf ihre Praxistauglichkeit geprüft. Dabei haben sich die Symptome „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ und „Varroamilben auf Bienen“ als gute Anzeiger für Probleme mit DWV-B und ABPV gezeigt. Das Symptom „schwarzglänzende Bienen“ war hingegen kein verlässliches Signal für CBPV. Die Symptome „erhöhter Totenfall vor dem Bienenvolk“ und „Sackbrut-Symptome“ wurden zu selten beobachtet, um eine Aussage über sie zu treffen zu können.

Generell ist das Auftreten eines Symptoms das Anzeichen für eine offene Virusinfektion (Miranda und Genersch, 2010). Bienenviren können auch als verdeckte Infektionen auftreten, ohne dass offensichtliche gesundheitliche Probleme im Volk zu bemerken sind. Daher würde man nicht automatisch eine Korrelation zwischen Virusvorkommen und sichtbaren Virussymptomen erwarten. In der Studie wurde nur für ein einziges Symptom eine Korrelation zu dem Auftreten eines Virus gefunden: wenn „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ beobachtet wurden, war die Wahrscheinlichkeit um ein Drittel höher, dass ABPV in der Probe gefunden wurde, als wenn das Symptom nicht beobachtet wurde (Abbildung 2.21). Dies ist insofern überraschend, da „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ ein typisches Symptom für DWV und nicht für ABPV ist (De Miranda et al., 2010; Miranda und Genersch, 2010). Diese Korrelation zwischen ABPV und der Beobachtung von „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ deutet daher darauf hin, dass auf Ständen mit einer offenen DWV-B Infektion inklusive Symptomen eine erhöhte Wahrscheinlichkeit besteht, dass auch ABPV vorhanden ist. Dies mag damit zusammenhängen, dass beide Viren von der Varroamilbe übertragen werden (McMenamin und Genersch, 2015; Beaufrepaire et al., 2020).

Die Symptombeobachtungen von „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ und „Varroamilben auf Bienen“ durch die teilnehmenden Imkerinnen und Imker korrelierten signifikant mit den Laboranalysen. Wurden diese Symptome angegeben, war der Titer von DWV-B und ABPV signifikant erhöht und bewegte sich großteils in einem Titerbereich, in dem von einer offenen Virusinfektion ausgegangen werden kann (Abschnitt 2.4.3, Schurr et al., 2019). Das sichere Erkennen dieser Symptome ist wichtig, da eine DWV-B Infektion im Herbst die Wahrscheinlichkeit eines Winterverlustes stark erhöht (Highfield et al., 2009; Genersch et al., 2010; Dainat et al., 2012; Dainat und Neumann, 2013). Wird eine Infektion frühzeitig erkannt, können Maßnahmen ergriffen werden um die Infektion zu bekämpfen. Die wirksamste Maßnahme, eine DWV

Infektion zu bekämpfen, ist eine Varroabehandlung (Pohl, 2005; Ritter, 2016). Durch die Reduktion der Varroamilben wird die Übertragung von DWV auf Bienenlarven stark reduziert und eine nächste Generation an gesunden Bienen kann heranwachsen (Sumpter und Martin, 2004; Locke et al., 2017). Eine weitere wichtige Maßnahme ist das frühzeitige Abtöten eines stark infizierten Volkes (Rivera-Gomis et al., 2019). Damit kann eine Infektion der anderen Völker durch Reinvansion der DWV-B und ABPV übertragenden Varroamilbe verhindert werden.

Bei CBPV wurde kein Zusammenhang zwischen der Höhe des Virustiters und zwei Symptomen für CBPV festgestellt (Abbildung 2.23), obwohl vermutlich etwa 25% der CBPV positiven Völker mit einer akuten CBPV-Infektion konfrontiert waren (Abschnitt 2.4.3). Die Beobachtung der Symptome „schwarz-glänzende Bienen“ und ein „erhöhter Totenfall vor dem Bienenvolk“ war daher kein verlässlicher Hinweis auf das Auftreten von CBPV. Bienen sehen schwarz-glänzend aus, weil die Haare auf ihrem Abdomen abbrechen. Nur können diese Haare auch aus anderen Gründen (Räuberei, Waldtrachtkrankheit, erbliche Schwarzsucht) oder generell aufgrund des hohen Alters der Biene verloren gehen (Pohl, 2005). Diese Bienen können mit den CBPV geschädigten schwarz-glänzenden Bienen verwechselt werden. Ein erhöhter Totenfall vor dem Volk, das zweite abgefragte CBPV-Symptom, wurde zu selten beobachtet, um ausgewertet zu werden.

„Sackbrutsymptome“ wurden sehr selten beobachtet. Gleichzeitig war der SBV-Titer während der gesamten Studie auch sehr gering und lässt vermuten, dass offene SBV Infektionen in den beobachteten Völkern auch entsprechend selten auftraten (Abschnitt 2.4.3). Dies mag an der reduzierten Brutfläche zu dem Zeitpunkt des Jahres liegen. Daher ist die Möglichkeit reduziert, dass Brut an SBV erkrankt und damit eine offene SBV-Infektion mit „Sackbrutsymptomen“ vorliegt.

## 2.4.7 Winterverluste

In beiden präsentierten Modellen hat sich die Höhe des DWV-B Titers als wichtigster Einflussfaktor auf die Wahrscheinlichkeit eines Winterverlustes erwiesen. Auch bezüglich des Einflusses von ABPV auf die Winterverluste sind sich beide Modelle einig, dass es einen geringeren Einfluss als DWV-B hat. Bei den weiteren untersuchten Modellen unterscheiden sich die Modelle stark in ihrer Aussage, was einen Hinweis auf eine unsichere Datenlage gibt. In Folge werden alle Faktoren, die das logistische Modell beinhaltet, diskutiert (Tabelle 2.22) und eventuelle Abweichungen in der Einschätzung durch das Random-Forest-Modell ergänzt (Abbildung 2.25).

### 2.4.7.1 DWV-B

Ein erhöhter DWV-B Titer in der Sammelprobe führt zu einer signifikant erhöhten Winterverlustrate auf dem entsprechenden Bienenstand (Tabelle 2.22 und Abbildung 2.26). Die Aufgliederung von DWV in seine unterschiedlichen Typen wurde erst in den letzten Jahren standardmäßig durchgeführt und berichtet (Martin et al., 2012; Mordecai et al., 2016). Daher bezieht sich der folgende Text meist allgemein auf DWV, da in den zugrundeliegenden Publikationen nicht zwischen den Typen differenziert wurde.

Der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von DWV und Winterverlusten ist gut belegt, auch für Österreich und die umliegenden Länder (Deutschland: Genersch et al., 2010; Schweiz: Dainat et al., 2012; Österreich: Morawetz et al., 2018). Je höher die Konzentration von DWV in den untersuchten Proben ist, desto wahrscheinlicher ist das Volk krank und in Gefahr abzusterben (Berthoud et al., 2010; Dainat et al., 2012; Amiri et al., 2015; Barroso-Arévalo et al., 2019). Unklar ist nach wie vor, welcher Virustiter als gefährdend einzuschätzen ist. Die in der Literatur genannten Schwellen bezüglich DWV bewegen sich zwischen  $10^6$  und  $10^7$  RNA-Kopien/Biene (Möckel et al., 2011; Amiri et al., 2015; Barroso-Arévalo et al., 2019; Schurr et al., 2019; Šimenc et al., 2021). Aufgrund der Modellierungen der im vorliegenden Projekt gesammelten Daten würden wir die Gefährdungsschwelle von DWV-B in Österreich bei etwa  $10^8 - 10^9$

RNA-Kopien/mL Homogenat ansetzen (etwa  $3 \times 10^7$  -  $3 \times 10^8$  RNA-Kopien/Biene; Abbildung 2.26). Doch wie in Abschnitt 2.4.3 diskutiert, ist ein Vergleich von Titerwerten zwischen Laboren nur schätzungsweise möglich, da aufgrund von methodischen Unterschieden Abweichungen von bis zu zwei Zehnerpotenzen auftreten können (Schurr et al., 2017).

Die vom Modell errechnete Gefährdungsschwelle passt auch zu den Beobachtungen der teilnehmenden ImkerInnen über das Auftreten von DWV Symptomen und damit das Auftreten einer offenen DWV-Infektion in zumindest einem der Probenvölker. Der DWV-Titer von Proben aus Völkern mit den Symptomen „Varroamilben auf Bienen“ oder „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ betrug im Median zwischen  $10^8$  und  $1,5 \times 10^9$  RNA-Kopien/mL Homogenat. Das bedeutet, dass eine Sichtung von „Varroamilben auf Bienen“ oder „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ im September gleichbedeutend mit einem erhöhten Risiko des Absterbens im Winter ist (Dainat und Neumann, 2013).

#### 2.4.7.2 Varroamilben auf Bienen

Der Zusammenhang zwischen hohem DWV-B Titer und Winterverlusten bezieht indirekt die Varroamilbe als wichtigen Faktor in das Modell mit ein. Uns liegen für die Probenvölker keine Informationen über die Varroabelastung vor. Doch das Auftreten von DWV ist eng mit dem Auftreten der Varroamilbe verknüpft (Bowen-Walker et al., 1999; Gisder et al., 2009; Dainat und Neumann, 2013). Je höher der Titer von DWV ist, desto höher ist auch die Milbenbelastung im Volk (Barroso-Arévalo et al., 2019). Dieser Zusammenhang wird auch durch unsere Daten bestätigt: die abgefragten Symptome zur Varroose, „Varroamilben auf Bienen“ und „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“, waren mit signifikant erhöhtem DWV-B Titer verbunden (Abbildungen 2.20 und 2.22). Im logistischen Modell ist der Faktor „Varroamilben auf Bienen“ sogar ein zusätzlicher Faktor, dessen Auftreten eine erhöhte Wintersterblichkeit vorhersagt (Tabelle 2.22).

#### 2.4.7.3 ABPV

Ein hoher ABPV Titer führte auf den Monitoringständen zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit von Winterverlusten (Tabelle 2.22 und Abbildung 2.25). Der Zusammenhang zwischen Winterverlust und ABPV ist bereits für umliegende Ländern gezeigt worden (Berthoud et al., 2010; Genersch et al., 2010), konnte später aber nicht immer reproduziert werden (Dainat et al., 2012; Ravoet et al., 2013). Im Vorgängerprojekt „Zukunft Biene“ konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen ABPV und Winterverlusten für Österreich festgestellt werden (Morawetz et al., 2018). Diese widersprüchliche Datenlage spiegelt sich auch in den vorliegenden Daten wider. Beide gerechneten Modelle zeigen, dass es häufig zu hohen Winterverlusten gekommen ist, ohne dass ein hoher ABPV-Titer gemessen wurde (Abbildungen 2.24 und 2.26). Dies ist ein klarer Hinweis, dass ABPV kein Hauptauslöser für Winterverluste in Österreich ist. Ebenso ist der Zusammenhang zwischen ABPV Titer und Winterverlust wesentlich weniger stark ausgeprägt als bei DWV-B. Die Kurve des ABPV Titers im Random-Forest-Modell steigt kontinuierlich an und zeigt, anders als bei DWV-B, keinen deutlichen Sprung (Abbildung 2.26). Es kann für den ABPV Titer daher auch keine Gefährdungsschwelle definiert werden.

#### 2.4.7.4 CBPV

Das logistische Modell zeigte eine positive Korrelation zwischen dem CBPV-Titer und Winterverlusten. Bisher wurde unseres Wissens noch kein positiver Zusammenhang zwischen CBPV und Winterverlusten gezeigt (Dainat et al., 2012; Ravoet et al., 2013; Chauzat et al., 2016), das Ergebnis ist daher unerwartet. Im Vorgängerprojekt „Zukunft Biene“ wurde sogar ein negativer Zusammenhang zwischen CBPV und Winterverlusten festgestellt: die Wahrscheinlichkeit eines Winterverlustes war geringer, wenn in dem Volk

CBPV-Erreger festgestellt wurden (Morawetz et al., 2018). Der in der logistischen Regression gezeigte Zusammenhang wird auch vom Random-Forest-Modell nicht unterstützt, was die Bedeutung der Aussage weiter schwächt (Abbildung 2.25).

#### 2.4.7.5 Anzahl schwacher Völker

Der einzige nicht direkt Virus-assoziierte Faktor, der in das logistische Modell aufgenommen wurde, war der Faktor „Anzahl schwacher Völker“. Je mehr Probenvölker von den Teilnehmenden als schwach eingestuft wurden, desto höher war die Wahrscheinlichkeit eines Winterverlustes am Probenstand. Der Faktor wird auch bei einem der beiden Kenngrößen des Random-Forest-Modells, der Mean Decrease Accuracy, als drittichtigster Faktor angeführt. Der Zusammenhang zwischen Volksstärke im Herbst und der Wahrscheinlichkeit eines Winterverlustes wurde schon mehrfach gezeigt (Genersch et al., 2010; Morawetz et al., 2019). Diese Erkenntnis wird auch in der Imkereipraxis umgesetzt, in der generell gelehrt wird nur gesunde und starke Völker einzuwintern.

#### 2.4.7.6 Vollständigkeit der Modelle

In der Kreuzvalidierung der verwendeten Modelle zeigte sich, dass die verschiedenen Modelle nur einen gewissen Anteil der Winterverlust-Wahrscheinlichkeit erklären (Tabelle 2.23). Das heißt, in den Modellen gab es zahlreiche Fälle, in denen keiner der vorliegenden Faktoren eine Erklärung für das Absterben der Völker darstellte. Dieses Ergebnis kann im Wesentlichen aus zwei Gründen zustande kommen. Einerseits ist es wahrscheinlich, dass wesentliche Faktoren im Modell fehlen, da sich die präsentierten Modellierungen auf die Effekte von Viren konzentriert haben. Bekannte Faktoren für Winterverluste, die wir nicht in das Modell integriert haben, sind zum Beispiel Klimafaktoren, das Alter der Königin, nicht-virale Krankheiten (Amerikanische Faulbrut, Nosema, etc.) oder verschiedene Effekte der imkerlichen Betriebsführung (Chauzat et al., 2016; Switanek et al., 2017; Brodschneider et al., 2018b; Morawetz et al., 2019). Daher sollten die hier präsentierten Modelle nie als alleinige Erklärung von Winterverlusten verwendet werden, sondern auch das Wissen um andere Faktoren in Interpretation und Maßnahmenetzung mit einbezogen werden.

Andererseits könnten die in der Modellierung verwendeten Messungen die Gesundheit des Volkes ungenügend darstellen. So kann eine Bienenprobe aus zehn Bienen pro Volk nie den Gesamtzustand eines Volkes aus zehntausenden Bienen und ihrer Brut beschreiben. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass das Analyseergebnis zwar negative oder geringe Titerwerte ergibt, der generelle Virustiter in anderen Bienen oder der Brut des Volkes jedoch wesentlich höher liegt. Bei einer Vergrößerung der Stichprobe ist ein möglicher Genauigkeitserfolg gegen die Problematik des Opfern von Bienen abzuwägen. Das Ziel für die Zukunft ist daher, verlässliche und wenig invasive Messmethoden zum Erregernachweis oder der Erkrankung eines Volkes zu entwickeln.

#### 2.4.8 Zusammenfassung und Fazit

Am Ende des Projektes liegen nun verlässliche Aussagen zur Virusprävalenz in Österreichs Bienenvölkern vor. Es hat sich gezeigt, dass bei den meisten Viren das Prävalenzlevel relativ konstant bleibt. Man kann dabei die untersuchten Viren wie folgt einteilen: Viren, die im Herbst nahezu überall zu finden sind (BQCV, DWV-B), häufige Viren (ABVP, SBV), seltene Viren (CBPV, DWV-A) und nicht nachgewiesene Viren (IAPV, KBV). Dabei wurden nur bei den häufigen Viren signifikante Prävalenzschwankungen zwischen den Jahren gefunden. Auch der Virustiter der Proben blieb zwischen den Jahren relativ konstant, nur bei BQCV und SBV wurden signifikante Unterschiede zwischen den Jahren festgestellt. CBPV und DWV-B

erreichten häufig hohe Titerwerte über  $10^8$  RNA-Kopien/mL Homogenat, während die anderen vier Viren meist Werte im Bereich von  $10^6$  RNA-Kopien/mL Homogenat erreichten.

Die Daten konnten das Virusauftreten mit der Seehöhe des Bienenstandes klar in Zusammenhang bringen; je höher ein Bienenstand gelegen war, desto geringer war die Virusprävalenz und auch teilweise der Virustiter. Diese Erkenntnis ist schwierig in die Imkereipraxis umzusetzen, da Imkerinnen und Imker meist in der Möglichkeit der Standortwahl ihrer Bienenvölker begrenzt sind. Zusammenhänge zu Imkereipraktiken waren jedoch eher schwach ausgeprägt. Dies liegt teilweise daran, dass sich die meisten teilnehmenden Imkerinnen und Imker an die generellen Empfehlungen der guten imkerlichen Praxis hielten. Dies ist jedoch ein extrem komplexes Thema, für dessen genauere Untersuchung ein experimenteller Ansatz vorzuziehen ist.

Vor allem die varroa-assoziierten Viren DWV-B und ABPV haben sich bei hohen Titerwerten als gefährlich für die Überwinterung erwiesen. Gleichzeitig kann eine offene Infektion dieser Viren auch gut durch Symptome erkannt werden. Die Korrelation der ImkerInnen-Beobachtungen mit den Laborergebnissen ergab, dass Beobachtungen der Symptome „Varroamilben auf Bienen“ und „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ einen stark erhöhten Virustiter bei ABPV und DWV-B vorhersagen. Unsere Empfehlung ist daher, dass Imkerinnen und Imker bei Völkerdurchsichten im Sommer und Herbst ihre Aufmerksamkeit verstärkt auf diese Symptome lenken sollten. So können Virusprobleme schnell erkannt werden und entsprechende Gegenmaßnahmen eingeleitet werden.

Die Projektergebnisse warfen auch einige Fragen auf. So ist das quasi durchgehend vorhandene Virus BQCV bisher nicht als Problem für Österreichs Bienenvölker bekannt. Es ist nicht klar, ob es wirklich keine Probleme bereitet oder ob wir diese nur bisher übersehen haben (z.B. bei der Königinnenzucht). Auch lassen Vergleiche zum Vorprojekt „Zukunft Biene“ eine Verschiebung der Typenverbreitung von DWV vermuten, wobei DWV-A stark zurück geht und DWV-B sich ausbreitet. Es stellt sich daher die Frage, ob sich diese Verschiebung auf die Virulenz von DWV auswirkt und wie sich dieses Virus in den nächsten Jahren entwickeln wird. Schlussendlich bleibt zu bemerken, dass das Projekt in einer Zeit von gemäßigten Winterverlusten durchgeführt wurde. Dies ist für die Imkerschaft sehr erfreulich. Daher sollten die Virusprävalenz und -konzentration im Zusammenhang mit Winterverlusten Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, um auch Winter mit hohen Ausfällen untersuchen zu können.

## 2.5 Anhang

### 2.5.1 Anhang I: Anleitung zur Probenahme

Auf den folgenden Seiten finden Sie eine detaillierte Anleitung, wie Sie die Probenahme der Bienen durchführen werden. Bei Unklarheiten und Fragen können Sie sich jederzeit an uns wenden (Kontaktdaten auf der letzten Seite).

Wir bedanken uns bei Ihnen für die Zusammenarbeit und hoffen, gemeinsam einen weiteren Schritt in der Erforschung der Bienengesundheit in Österreich zu gehen!

#### **Der zeitliche Ablauf im Überblick:**

**Probenahme:** zwischen 31. August und 15. September 2019 (möglichst Sonntag bis Mittwoch)

**Abschicken per Post:** Am Tag oder Folgetag der Probenahme (möglichst Montag bis Mittwoch)

Sie erhalten die Ergebnisse der Virentests voraussichtlich bis März 2020

**Meldung der Winterverluste:** Frühjahr 2020

Weiterer (letzter) Probenahmetermin: Herbst 2020

### **Arbeitsanleitung**

#### **Arbeitsschritte für die Probenahme 2019:**

1. Eventuell: neue Auswahl und Markierung von Probenvölkern
2. Probenahme
3. **Optional, falls es Ihnen möglich ist: Völkerdurchsicht und Kontrolle auf Krankheitssymptome, Ausfüllen des Fragebogens – „optionaler Teil“**
4. Ausfüllen des Fragebogens – „Pflichtteil“
5. Befüllen der Versandtasche und Absenden

#### **1. Eventuell: neue Auswahl und Markierung von Probenvölkern**

Beprobieren Sie bitte die im Vorjahr ausgewählten und markierten Bienenvölker.

Sollte ein Probenvolk oder mehrere Probenvölker seit der letzten Beprobung ausgefallen sein, wählen Sie jeweils ein beliebiges neues Probenvolk am Monitoringstand aus. Markieren Sie dieses mit dem Plastiketikett des abgestorbenen/aufgelösten Volkes. Damit sollen die Probenvölker zweifelsfrei für den weiteren Versuchsverlauf bis Frühjahr 2021 identifizierbar bleiben.

Tragen Sie die Anzahl der ausgefallenen (=ersetzten) Probenvölker im Fragebogen unter Punkt 6.) ein.

Bei weniger als fünf Völkern am Monitoringstand:

Wenn sich auf Ihrem Monitoringstand weniger als fünf Völker befinden, senden Sie von allen verbliebenen Völkern Bienenproben ein.

Abbildung 2.27: Arbeitsanleitung für Probenahme - Seite 1

## 2. Probenahme:

Bitte führen Sie die Probenahme folgendermaßen durch:

### Wabe zur Probenahme identifizieren:

Die Bienenprobe soll aus jener Zarge entnommen werden, in der sich die Brut befindet bzw. dort, wo die Bienen sitzen, falls keine Brut vorhanden ist.

Die Bienenprobe soll auf jener brutfreien Wabe genommen werden, die an die äußerste Brutwabe anschließt.

Wenn keine Brut vorhanden ist, die Probe von einer äußeren Wabe des Bienensitzes nehmen.



### Die Probe auf der ausgewählten brutfreien Wabe nehmen:

Bitte entnehmen Sie die Probe durch Auflegen der offenen Seite des Käfigs auf die Wabe (offenen Käfig auf kleine Bienengruppe legen) und vorsichtiges Zuschieben des Deckels.



Im Käfig sollten sich 10 Bienen befinden, etwas mehr ist im Zweifelsfall in Ordnung.



Abbildung 2.28: Arbeitsanleitung für Probenahme - Seite 2

### 3. Optional: Völkerdurchsicht, Feststellen der Symptome und Ausfüllen des Fragebogens – „optionaler Teil“

Falls es Ihnen möglich ist, bei den Probenvölkern eine Völkerdurchsicht durchzuführen, könnten Sie das Projekt mit wertvoller Information unterstützen. Dazu ist es nötig, **alle bienenbesetzten Waben** der Probenvölker, sowie den Bereich vor den Probenvölkern zu inspizieren. Im Fragebogen – „optionaler Teil“ ist anzugeben, bei wie vielen der Probenvölker Sie die angeführten Symptome beobachtet haben. Da diese abgefragten Symptome Hinweise auf eine akute Virusinfektion geben können, helfen uns Ihre Beobachtungen, die Ergebnisse der Virusuntersuchung besser zu interpretieren.

In der Beilage „Arbeitsanleitung zur optionalen Völkerdurchsicht“ finden Sie die genauen Informationen, wie dabei vorzugehen ist.

### 4. Ausfüllen des Fragebogens – „Pflichtteil“

Bitte füllen Sie den Pflichtteil des Fragebogens aus.

### 5. Befüllen der Versandtasche und Absenden

Bitte die vorfrankierte und adressierte Versandtasche wie folgt befüllen:

Wichtig: den ausgefüllten Fragebogen in das graue Briefkuvert stecken, da sonst Verschmutzungsgefahr besteht.

Dieses Kuvert einmal zusammenfalten und in die braune Versandtasche schieben.



Die 5 Käfige flach darauflegen und flach hineinschieben (geht sich knapp aus).



Abbildung 2.29: Arbeitsanleitung für Probenahme - Seite 3



Die Versandtasche mit der beigelegten Klammer verschließen (Falz 2 x falten) oder mit einer Klammermaschine zuklammern.

Bitte Versandtasche NICHT lochen (Verschmutzungsgefahr).



Die Versandtasche am Wochenbeginn (Montag bis Mittwoch) bei einer Poststelle aufgeben oder in einen Postkasten werfen, der noch am selben Tag ausgehoben wird. Dies soll eine kurze Transportdauer gewährleisten, um die Bienen zu schonen. Da der Versand rasch nach der Probenahme erfolgen sollte, ist eine Probenahme im Zeitraum von Sonntag bis Mittwoch ideal. Es ist nicht nötig, die Proben per selbst bezahlter Eilpost zu aufzugeben.

### Kontakt

Falls Sie Fragen haben, können Sie uns erreichen unter:

Dr. Linde Morawetz:	050 555-*****	linde.morawetz@ages.at
DI Hemma Köglberger:	050 555-*****	hemma.koeglberger@ages.at

Im Probenahmezeitraum (31. August bis 15. September 2019) können Sie uns jederzeit (auch am Wochenende) erreichen unter:

Handy Bienenkunde: 0664-\*\*\*\*\*

### Ausblick

Die Untersuchungen auf acht Bienenviren werden im Winter stattfinden. Sobald die Ergebnisse vorliegen, werden Sie diese erhalten.

Im Frühling 2020 werden wir die Winterverluste am betreffenden Stand und bei den fünf Probenvölkern abfragen.

Gutes Gelingen! – und Danke für Ihre Teilnahme



**ZUKUNFT  
BIENE**

Abbildung 2.30: Arbeitsanleitung für Probenahme - Seite 4

## 2.5.2 Anhang II: Fragebogen Probenahme 2019

### **Pflichtteil (Bitte unbedingt vollständig ausfüllen!)**

VIM\*\*\* Imkereibetrieb: \*\*\*\*\* Datum Probenahme: .....

### **Verortung des Bienenstandes**

Bundesland:\*\*\*\*\* Standgemeinde: \*\*\*\*\* PLZ: \*\*\*\* Seehöhe: \*\*\* m

Änderungen bitte hier eintragen:

Bundesland: ..... Standgemeinde: ..... PLZ: ..... Seehöhe: .....

### **Fragen zum Imkereibetrieb**

- 1.) Ist der Betrieb ein zertifizierter Biobetrieb?
  - ja
  - nein
  - in Umstellung
- 2.) Welchen Anteil der Brutwaben Ihrer Völker haben Sie 2019 erneuert?
  - 0%
  - 1-30%
  - 31-50%
  - mehr als 50%
- 3.) Was machten Sie 2019 mit Futterwaben oder Leerwaben aus abgestorbenen Völkern (Mehrfachnennungen möglich)?
  - einschmelzen oder aus dem Betrieb ausscheiden
  - in andere Völker oder Ableger einhängen
  - sonstiges: .....
- 4.) Wie vermehrten Sie die Völker 2019 in Ihrem Betrieb (Mehrfachnennungen möglich)?
  - Naturschwarm
  - Kehrschwarm
  - gar nicht
  - Brutableger
  - Flugling
  - sonstiges: .....

### **Fragen zum beprobten Bienenstand (= Monitoringstand)**

- 5.) Wie viele Völker stehen zum Datum der Probenahme am Monitoringstand? ..... Völker
- 6.) Sind Probenvölker seit der Probenahme 2018 ausgefallen?
  - ja
  - nein
  - wenn ja, wie viele?.....
- 7.) Ihre Maßnahmen zur Varroabekämpfung auf dem Monitoringstand im Jahr 2019 bis zum Datum der Probenahme (Mehrfachnennungen möglich)?
  - biotechnisch (Drohnenbrut schneiden, Wärmebehandlung, Königinnensperren, etc.)
  - medikamentös (Präparate auf Basis von Ameisensäure, Oxalsäure, Thymol, Amitraz, etc.)
  - keine
  - andere: .....

Abbildung 2.31: Beispiel Fragebogen bei Probenahme - Seite 1

8.) Wie viele der 5 Probenvölker sind Ihrer Einschätzung nach:

- sehr schwach: ..... Völker
- normal stark: ..... Völker
- sehr stark: ..... Völker

### Optionaler Teil

#### Durchsicht der Völker auf Krankheitssymptome

9.) Bei wie vielen der 5 Probenvölker haben Sie folgende Symptome gesehen?

- erhöhter Bientotenfall vor dem Volk: ..... Völker
- Varroamilben auf Bienen: ..... Völker
- Bienen mit verkrüppelten Flügeln : ..... Völker
- schwarz glänzende Bienen: ..... Völker
- Sackbrut-Symptome der Brut: ..... Völker

10.) Haben Sie weitere Auffälligkeiten in den 5 Probenvölkern beobachtet?

- ja                       nein

wenn ja, welche:

Abbildung 2.32: Beispiel Fragebogen bei Probenahme - Seite 2

## 2.5.3 Anhang III: Ergebnis Virenanalyse

### Ergebnis Virenanalyse Probenahme Herbst 2019

ID Bienenstand: VIM\*\*\*

Datum Probenahme: \*\*.09.2019

Ort Probenahme: Gemeinde, Bundesland

Probenahme:

Es wurden von Ihnen Bienenproben aus 5 Bienenvölkern entnommen (etwa zehn Bienen pro Volk) und lebend in Königinnenversandkäfigen an die AGES, Abteilung Bienenkunde und Bienenschutz, geschickt. Dort wurden die Bienen umgehend auf -20°C tiefgefroren und damit abgetötet. Aus den Bienen Ihrer Einsendung wurde eine Sammelprobe von 50 Arbeiterinnen erstellt und diese mittels einer molekularbiologischen Analyse (RT-PCR) auf insgesamt acht Bienenviren untersucht:

- Akute Bienenparalyse Virus (=ABPV)
- Schwarzes Königinnenzellen Virus (=BQCV)
- Chronische Bienenparalyse Virus (=CBPV)
- Flügeldeformationsvirus Typ A (=DWV A)
- Flügeldeformationsvirus Typ B (=DWV B)
- Israelisches Akute Paralyse Virus (=IAPV)

- Kashmir-Bienenvirus (=KBV)
- Sackbrutvirus (=SBV)

Die Ergebnisse des Bienenstandes VIM\*\*\* sind auf den folgenden zwei Seiten sowohl in Tabelle 2.24 und Abbildung 2.33 dargestellt.

### Ergebnisse Tabelle (ID Bienenstand VIM\*\*\*)

In der Tabelle werden die Ergebnisse aller Viren wie folgt dargestellt:

- Virus (ABPV, . . . , SBV)
- Nachweis (positiv/negativ)
- Viruskonzentration (RNA-Kopien pro ml Homogenat)

Tabelle 2.24: Ergebnisse Bienenstand VIM\*\*\*

Virus	Nachweis	Viruskonzentration	Beurteilung
ABPV	negativ	—	—
<b>BQCV</b>	<b>positiv</b>	<b>11,43 Mill.</b>	<b>hoch</b>
CBPV	negativ	—	—
DWV A	negativ	—	—
<b>DWV B</b>	<b>positiv</b>	<b>2,55 Mill.</b>	<b>hoch</b>
IAPV	negativ	—	—
KBV	negativ	—	—
SBV	positiv	1,15 Mill.	mittel

Legende:

positiv: Virus-RNA wurde in der Sammelprobe festgestellt  
Konzentration: gibt an wie viele RNA-Kopien pro Milliliter untersuchter Lösung (=Homogenat) gemessen wurden  
Beurteilung: setzt die jeweilige Viruskonzentration Ihres Standes in Beziehung zu den positiv gemessenen Werten der anderen teilnehmenden Stände:

- niedrig: Konzentration der Probe liegt im Bereich der 25% niedrigsten Werte
- mittel: Konzentration der Probe liegt im mittleren Bereich aller Werte
- hoch: Konzentration der Probe liegt im Bereich der 25% höchsten Werte
- keine Beurtl.: zu wenige positive Proben für eine Beurteilung der Viruskonzentration
- - - -: nicht nachweisbar

### Ergebnisse Grafik (ID Bienenstand VIM\*\*\*)

Die Abbildung 2.33 vergleicht das Messergebnis Ihres Standes mit den Messergebnissen der anderen teilnehmenden Bienenstände, die positiv auf das entsprechende Virus getestet wurden. Dabei stellt die Grafik Ihren Messwert (=schwarzer Diamant), den niedrigsten und den höchsten gemessenen Wert der Vergleichsstände (unterer und oberer Balken), sowie die auf der vorigen Seite definierten Bereiche "hoch", "mittel" und "niedrig" dar. Wenn kein Messwert (schwarzer Diamant) dargestellt ist, war dieses Virus in Ihrer Probe nicht nachweisbar. Bitte beachten Sie dass die Skala logarithmisch ist, das heißt die Darstellung der Konzentration erfolgt in 10er Potenzen (0,1 Millionen, 1 Million, 10 Millionen etc.). Für das Bienenvirus DWV-A ist nur ein positiver Fall vorhanden - daher die abweichende Darstellung

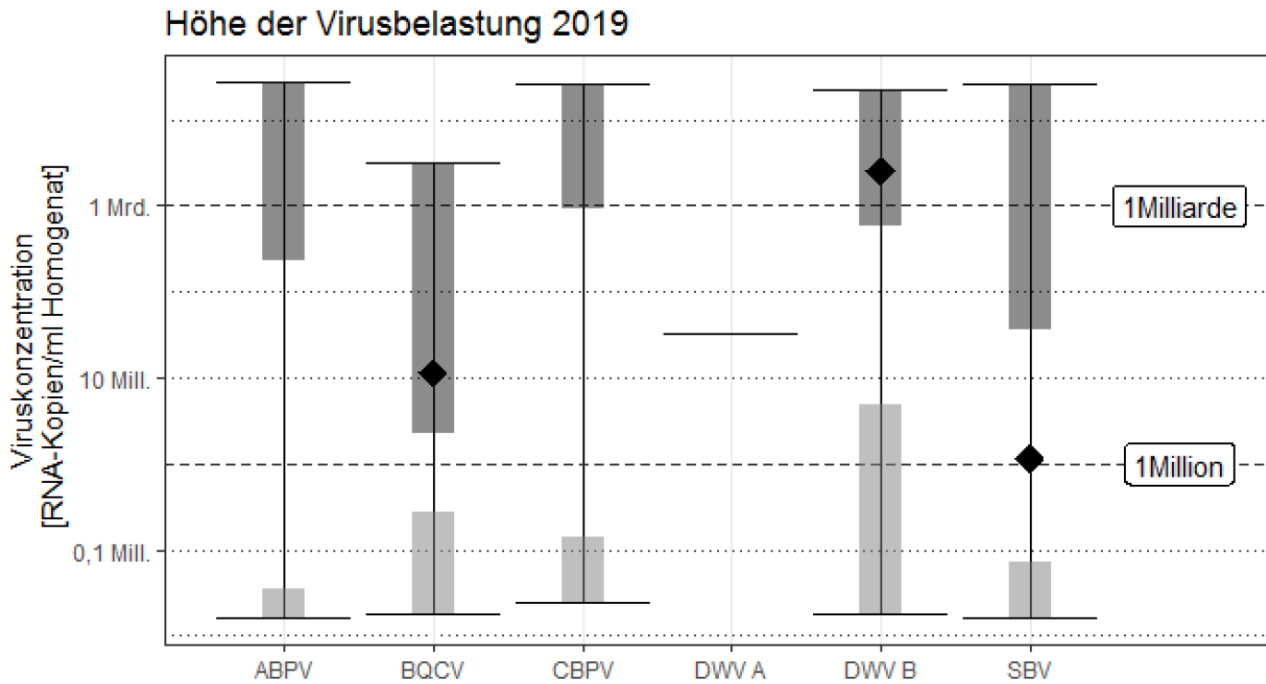


Abbildung 2.33: Ergebnis Bienenstand VIM\*\*\*

### Legende zur Grafik

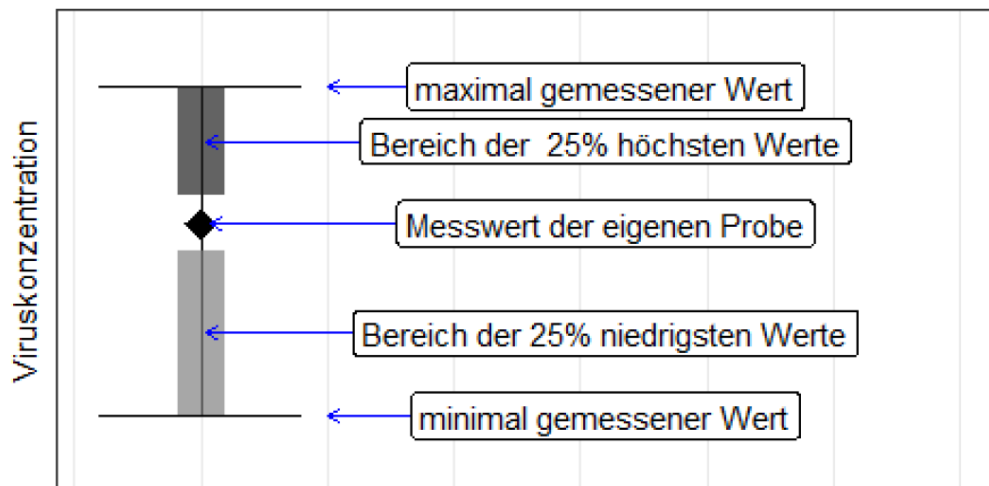


Abbildung 2.34: Legende zum Ergebnis

## 2.5.4 Anhang IV: Informationsblatt zu unseren Ergebnismitteilungen

Nach Übermittlung der Virusergebnisse gab es erfreulicherweise zahlreiche Rückmeldungen und natürlich auch Fragen der am Virenmonitoring teilnehmenden Imker und Imkerinnen. Die am häufigsten gestellten Fragen und unsere Antworten darauf haben wir nun in Form eines „Frage und Antwort Kataloges“ zusammengestellt. Dieser wird an alle Teilnehmerinnen und Teilnehmer verschickt, unabhängig davon,

ob sie eine Frage gestellt haben oder nicht. Somit können alle den größtmöglichen Nutzen aus der Projektteilnahme ziehen.

### 2.5.4.1 „Frage und Antwort“ Katalog

#### Interpretation der Ergebnisse

*Kann ich von den Untersuchungsergebnissen auch Rückschlüsse auf Einzelvölker ziehen?*

Es liegt uns nur eine Information über das Vorhandensein von Viren am Stand vor (repräsentiert durch die fünf Probenvölker), jedoch nicht für das einzelne Volk. Aufgrund der Logistik ist generell bei dem Projekt keine Einzelvölkeruntersuchung möglich (nicht-sterile Probenahme, gemeinsamer Versand der Probenkäfige in einem Kuvert etc.). Da bekannt ist, dass zwischen den Völkern eines Standes immer mit Verflug von Bienen zu rechnen ist, ist es sinnvoll, Virusinfektionen auf Standebene zu betrachten.

*Erklärung zur Grafik bei der Ergebnismitteilung*

Die Grafik zeigt Ihre Ergebnisse (schwarzer „Diamant“), die auch in der Tabelle verbal und als Zahlenwert angegeben sind. Um Ihnen einen Vergleich Ihrer Ergebnisse zu den anderen teilnehmenden Ständen zu ermöglichen, weist die Grafik zusätzlich auch Informationen über die anderen teilnehmenden Stände aus (minimal gemessene Konzentration, maximal gemessene Konzentration etc.).

#### Allgemeines zu Bienenviren

*Wo finden sich Viren im Bienenvolk?*

Viren können im gesamten Bienenvolk vorkommen. In erster Linie können die verschiedenen Bienenstadien (erwachsene Bienen, Puppen, Larven, Eier) Träger von Viren sein. Viren können aber auch in verschiedenen Materialien (Honig, Pollen, Bienenbrot, Wachs, Waben, Beuten) vorhanden sein.

*Was ist eine Virose?*

Viren im Volk sind nicht gleichbedeutend mit einer Viruserkrankung (=Virose). Auch in gesunden Völkern können viele Viren latent vorhanden sein. Ein latenter Befall bedeutet, dass die Bienen keinerlei Anzeichen einer Krankheit (=Symptome) zeigen. Durch verschiedene Faktoren – wie Stress, hoher Varroabefall oder Futtermangel – können die Bienen dann Krankheitssymptome entwickeln. Erst dann spricht man von einer Virose. In manchen Fällen können derartige Symptome auch wieder ganz oder zeitweilig verschwinden.

*Wie kann ich einem Ausbruch von Virose vorbeugen?*

Da der Ausbruch einer Virose verschiedene Ursachen haben kann, gibt es auch verschiedene Möglichkeiten zur Vorbeugung. Hier die wichtigsten:

- Varroamilben bekämpfen  
Varroamilben übertragen Viren im Volk von infizierten zu nicht-infizierten Bienen und auf die Brut. Außerdem können sich gewisse Viren in den Milben vermehren und werden in Milben aktiviert. Überdies schwächen Varroamilben die Bienen und machen sie damit empfänglicher für Virose. Die Varroabehandlung reduziert primär den Varroabefall, ein Rückgang virusinfizierter Bienen erfolgt aber erst im Verlauf der nächsten Bienen Generationen.

Als Faustregel gilt:

- Beginn der Varroabekämpfung nach Trachtschluss so zeitig als möglich, damit gesunde Winterbienen gebildet werden
- Anwendung geeigneter zugelassener Mittel zum richtigen Zeitpunkt
- nicht mehr Anwendungen als nötig

- nach dem Prinzip „so wenig als möglich, mit geeigneten, zugelassenen Mitteln“
- Gute Stand- und Nahrungsbedingungen schaffen
  - bienengenehmer Standort mit optimalem Kleinklima
  - Völker sollten während der ganzen Bienensaison ausreichend Nektar und Pollen im Nahbereich vorfinden
  - nicht zu viele Völker auf einem Stand stellen, angepasst an die dort vorhandene Trachtsituation
- Räuberei und Verflug vermeiden
  - Aufstellung der Völker nicht in einer Reihe, sondern blockweise mit Flugbrett in unterschiedliche Himmelsrichtungen, um Verflug zu verringern
  - Vermeidung von Räuberei
- Hygienische Maßnahmen treffen
  - Keine Wiederverwendung von Waben (Leer-, Futter-, Pollenwaben) aus abgestorbenen Völkern in anderen Völkern oder beim Aufbau von Jungvölkern
  - Waben toter Völker einschmelzen
  - Beuten gründlich reinigen, Rähmchen erneuern oder ebenfalls gründlich reinigen

*Was ist der Unterschied zwischen DWV Typ A und DWV Typ B?*

DWV ist ein sehr variables Virus und die Forschung über die Bedeutung der Typen ist voll im Gange. Mit Hilfe moderner molekularbiologischer Nachweismethoden kann DWV nun in die Typen A und B unterschieden werden. Im Jahr 2018 war DWV Typ A in den Monitoring-Proben im Rahmen des Projektes sehr selten zu finden, DWV Typ B hingegen sehr häufig. DWV Typ B wird derzeit als die schädlichere Variante angesehen, die auch besonders stark mit der Varroamilbe assoziiert ist. Die Forschung dazu ist aber noch im Fluss.

*Welche Viren stehen im Zusammenhang mit Varroabefall?*

Ein besonders enger Zusammenhang mit Varroabefall ist bei den Viren ABPV und DWV gegeben (Übertragung durch die Varroamilbe, teilweise Vermehrung in der Varroamilbe). Auch für die Viren BQCV und SBV ist ein gewisser Zusammenhang bekannt.

*Was kann ich tun, wenn die Ergebnisse einen hohen Virenbefall nachgewiesen haben? Muss ich etwas tun?*

Grundsätzlich leitet sich bei einem Nachweis von Viren noch KEIN Handlungsbedarf ab, selbst wenn der Virusbefall hoch ist. Wenn Sie jedoch gleichzeitig Auffälligkeiten bei den Völkern beobachten, sollten Sie die hohe Virusbelastung als eine mögliche Ursache in Betracht ziehen. In diesem Fall sollten Sie Maßnahmen ergreifen – wir haben einige davon in dem Abschnitt „Bekämpfung der Viruserkrankungen“ angeführt. In Tabelle 2.25 sehen Sie den Zusammenhang zwischen Symptomen mit den untersuchten Viren.

Tabelle 2.25: Symptome

Symptome	ABPV	BQCV	CBPV	DWV	SBV
Völkerzusammenbrüche, massiver Totenfall	+	+	+	+	+
Verhaltensänderung, Krabbler, Zittern	+		+		
Verstümmelte Flügel bei Bienen				++	
Körpergröße verkleinert				+	
aufgeblähter Hinterleib			+		
Haarlosigkeit („schwarzsüchtig“)			++		
Dysenterie („Durchfall“)			+		
Brutschäden	++	++		+	++

+: Zusammenhang gegeben

++: starker Zusammenhang gegeben

*Was bedeutet ein Ergebnis „hoch“ oder „niedrig“ im Vergleich zu den Ergebnissen anderer Teilnehmer?*

Nach derzeitigem Wissensstand gibt es keine konkreten Angaben über Schadschwellen für bestimmte Bienenviren ab denen mit einer akuten Viruserkrankung zu rechnen ist. Diese Frage zu beleuchten ist auch eine Aufgabe des Projektes und wir hoffen, dass wir in drei Jahren mehr wissen. Der Vergleich zu den Ergebnissen der anderen Teilnehmerinnen und Teilnehmer wurde vorgenommen, um Ihnen die Einschätzung Ihrer positiven Virenergebnisse trotzdem etwas zu erleichtern.

### Abgestorbene Völker

*Was können die Ursachen für tote Völker im Herbst oder Winter sein?*

Wenn Bienenvölker während oder vor der Überwinterung zu Grunde gehen, kann das unterschiedliche Ursachen haben. In vielen Fällen sind mehrere schädliche Faktoren gemeinsam ursächlich an dem Völkerzusammenbruch beteiligt. Wenn im Herbst ein hoher Virusbefall festgestellt wurde, ist dies ein möglicher Faktor für den Winterverlust. Weitere Faktoren können hoher Varroabefall, Königinnenverlust, Futtermangel, ungeeignetes Futter, zu geringe Volksstärke bei der Einwinterung, Störungen der Winterruhe etc. sein.

*Was mache ich mit Wabenmaterial aus abgestorbenen Völkern? Kann ich es weiterverwenden?*

Es gibt leider keine wissenschaftlichen Arbeiten zu diesem Problem und so raten wir zur Vorsicht im Umgang mit Wabenmaterial aus abgestorbenen Völkern. Wenn die Völker an einem zu hohen Varroabefall in Herbst oder im Winter zugrunde gegangen sind, bleiben in den meisten Fällen bienenleere Kisten, oft mit einer großen Menge an Honig zurück. Diese Futtevvorräte, sowie das andere Wabenmaterial können durch Viren belastet sein. Wir empfehlen daher, das gesamte Wabenmaterial zu entsorgen (einzuschmelzen) und die Beuten gründlich zu reinigen.



*Kann ich die Wintervorräte aus toten Völkern verfüttern?*

Honigwaben aus abgestorbenen Völkern sollten **NICHT** wieder verfüttert, sondern eingeschmolzen werden.

#### 2.5.4.2 Bekämpfung der Viruserkrankungen

Eine direkte Bekämpfung von Viruserkrankungen ist nicht möglich, da keine Tierarzneimittel verfügbar sind. Neben den oben genannten Vorbeugungsmaßnahmen, die den Ausbruch von Viruserkrankungen verhindern sollen, werden hier Maßnahmen gegen Viruserkrankungen genannt, die als indirekte Bekämpfungsmethoden die Verbreitung der Viren eindämmen oder die Virusbelastung reduzieren und die Selbstheilung des Volkes unterstützen. In vielen Fällen können Symptome auch wieder selbstständig verschwinden (spontane Selbstheilung des Volkes).

*Was mache ich bei Symptomen von ABPV?*

- Akute Bienenparalyse ist mit starkem Varroabefall assoziiert, daher konsequente Varroabekämpfung durchführen
- Aufstellung der Völker optimieren um Verflug gering zu halten
- Bei starkem Auftreten können Brutwaben mit erkrankter Brut entnommen werden, dies unterstützt die Selbstheilung des Volkes.

*Was mache ich bei Symptomen von BQCV?*

- Keine speziellen Bekämpfungsmaßnahmen bekannt
- BQCV ist zwar häufig, es kommt aber selten zu Symptomen (Schwarzfärbung der Innenseite der Weiselzellen)
- Hinweis: kann Grund für Ausfall von Zuchtserien sein

*Was mache ich bei Symptomen von CBPV?*

- Völkermassierungen vermeiden
- Hinweis: fluglose Zeiten können zu Ausbruch beitragen

*Was mache ich bei Symptomen von DWV?*

- DWV-Symptome sind mit starkem Varroabefall assoziiert (=Varroose-Symptome), daher konsequente Varroabekämpfung durchführen

*Was mache ich bei Symptomen von SBV?*

- Sackbrut ist eine Faktorenkrankheit, die vor allem durch Futtermangel der Larven bei Trachtlücken ausgelöst wird, gute Tracht und Futtermittellieferung fördern die Gesundheit
- bei starkem Auftreten können Brutwaben mit erkrankter Brut entnommen werden, dies unterstützt die Selbstheilung des Volkes

## 3 (V) Virendiagnostik und -prophylaxe bei Honigbienen

### 3.1 Einleitung

Durch dieses Projekt soll die Diagnostik von Virusinfektionen bei Honigbienen vereinfacht werden. Die ektoparasitische Varroamilbe (*Varroa destructor*) und virale Krankheitserreger werden für einen Großteil der Kolonieverluste vor (Dainat et al., 2012) und während der Überwinterung verantwortlich gemacht (Kielmanowicz et al., 2015). Untersuchungen aus verschiedenen Ländern belegen einen direkten Einfluss von Iflaviren (SBV, DWV) und Dicistroviren (ABPV) auf die Vitalität von Bienenvölkern. Diese viralen Erreger der Bienen sind unbehüllte RNA Viren, aus der Ordnung *Picornavirales*. Sie teilen sich einen grundsätzlich ähnlichen Aufbau, zeigen zueinander aber nur eine geringe Ähnlichkeit und haben eine variable Genomsequenz. Im Gegensatz zu hochspezifischen RT-PCR-Protokollen, die in den meisten Fällen nur bestimmte Varianten bzw. Virusspezies detektieren können und sehr teuer sind, sind serologische Assays häufig in der Lage, größere Erregergruppen diagnostisch zu erfassen. In diesem Projekt sollen bereits vorhandene serologische Reagenzien gegen das Flügeldeformationsvirus (DWV) zur Etablierung von Hochdurchsatz-Tests im Labor sowie „Point of care“ Tests am Bienenstock genutzt werden. Gleichzeitig sollen neue Reagenzien gegen Sackbrutvirus (SBV) und Dicistroviren (Virus der akuten Bienenparalyse) produziert werden, um auch diese Pathogengruppen abdecken zu können.

Viele frühe wissenschaftliche Studien zu Viruserkrankungen der Honigbienen nutzten zum Nachweis der Erreger serologische Reagenzien (Anderson, 1984). Serologische Nachweisverfahren wurden früher auch erfolgreich zur Diagnostik von Feldinfektionen eingesetzt. In allen Studien wurden polyvalente Seren verwendet, die durch Immunisierung von Versuchstieren mit Virusextrakten gewonnen wurden und eine komplexe Mischung aus unterschiedlichen Immunglobulinen darstellten. Da es für Honigbienen weder Zellkultursysteme noch klonale Virusstämme gab, war die Spezifität der Antiseren beschränkt. Neben Hintergrundreaktionen mit Bienenproteinen aus der Virusproduktion waren auch unerwünschte Reaktionen mit kontaminierenden Viren nie auszuschließen. Obwohl man Reinigungsprotokolle für diese Reagenzien entwickelte (z. B. Adsorption der Seren gegen Bienenlysate), wurden die etablierten ELISA-Systeme in der Diagnostik wegen der limitierten Verfügbarkeit der Reagenzien bald durch RT-PCR Protokolle ersetzt. In jüngster Vergangenheit sollte im Programm „Bees in Europe and the decline of honeybee colonies (BEE DOC)“ im europäischen „Research Framework 7“ ein Bienenviren-ELISA entwickelt werden. Das Problem der unspezifischen Reaktionen mit Bienenproteinen sollte dabei durch Immunisierungen mit synthetischen viralen Peptiden umgangen werden. Die Immunisierungen mit Peptiden verliefen aber nicht erfolgreich, sodass kein Assay entwickelt werden konnte. Monoklonale Antikörper können dagegen durch Immunisierung mit authentischen Proteinen generiert werden, wobei durch Isolierung einzelner B-Zellen und damit IgGs eine hohe Spezifität und Sensitivität der Reagenzien gewährleistet werden kann. Durch den Einsatz monoklonaler Antikörper könnten die Nachteile der etablierten serologischen Nachweissysteme, wie mangelhafte Spezifität und begrenzte Verfügbarkeit der verwendeten Reagenzien, aufgehoben werden und kostengünstige, quantifizierende Testsysteme etabliert werden (Usuda et al., 1999). Die Spezifität und Sensitivität der ELISA wird vorrangig durch die verwendeten serologischen Reagenzien bestimmt. In diesem Projekt werden monoklonale Antikörper verwendet bzw. generiert, die nach Charakterisierung der Reaktivität in unbeschränkter Menge *in vitro* produziert werden können. Die neuen Testverfahren sollen eine kostengünstige Diagnostik von Virusinfektionen bei Honigbienen in Österreich ermöglichen. ELISA Systeme geben schnell ein zuverlässiges, quantitatives Ergebnis und können vor Ort durchgeführt werden („On-site-Tests“). Mit Platten-basierten ELISAs können in Laboratorien kostengünstige Massentests („high throughput systems“) durchgeführt werden, während Lateral-Flow-Tests

(bekannt aus Schwangerschaftstests) zu einem etwas höheren Preis direkt vor Ort angewendet werden können. Ein Lateral-Flow-Test zum Nachweis der Amerikanischen Faulbrut wurde bereits für die Imkerei entwickelt und wird weltweit vertrieben (Vita Europe Ltd.).

## 3.2 Material und Methoden

### 3.2.1 Methodik - Überblick

Antikörper sind die Schlüsselreagenzien für die Etablierung der Antigennachweissysteme z.B. in Form von Enzyme linked immunosorbent assays (ELISA). Um unspezifische Reaktionen auszuschließen, werden für den Prozess hochgereinigte Virusantigene benötigt. Bei der Virusanzucht von ABPV, DWV und SBV in Bienenpuppen werden sehr große Mengen an Viruspartikeln gebildet, die mittels einer mehrstufigen Dichtegradienten-Ultrazentrifugation konzentriert und gereinigt werden können. Zusätzlich werden außerdem die Strukturproteine der Viren rekombinant in *E. coli* exprimiert und chromatographisch gereinigt. Nach Immunisierung von Mäusen mit den rekombinanten Antigenen bzw. den hochreinen Viruspräparationen sollen neue Hybridomzellklone generiert, monoklonale Antikörper produziert und charakterisiert werden. Hochspezifische Antikörper werden in Westernblot, ELISA und im Immunfluoreszenztest validiert und in der Kreuzkompetition getestet. Geeignete Antikörper werden in großen Mengen produziert, gereinigt und untersucht, ob sie zur Anwendung in einem Sandwich-ELISA geeignet sind. Gleichzeitig werden die Antikörper sequenziert, um als chimäre Moleküle für breite ELISA-Anwendungen zur Verfügung zu stehen. Zur Generierung der Antikörper sind im Modul V Tierversuche erforderlich. In diesen Versuchen werden Mäuse mit gereinigten Antigenen immunisiert („Impfung“) und der Erfolg der Immunisierung anhand der Serokonversion geprüft (Blutentnahme). Die Versuchstiere werden nach erfolgreicher Immunisierung euthanasiert und B-Lymphozyten aus ihrer Milz gewonnen. Die Tierversuche werden im Rahmen eines genehmigten Antrages zur Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen Bienenviren durchgeführt (BMWF-68.205/0107-II/3b/2013). Die neu generierten Reagenzien und bereits charakterisierte Antikörper gegen DWV wurden zur Etablierung diagnostischer ELISA genutzt. Dabei wurden Probenlysis (Puffer, Zerkleinerung, Probenmaterial) und verschiedene ELISA-Systeme untersucht. Mit Hilfe von Feldproben, die vom Kooperationspartner AGES (Modul A) bereitgestellt wurden, werden die Verfahren optimiert und validiert.

### 3.2.2 Ausgangslage der Studie

In den letzten Jahren wurden substantielle Vorarbeiten zur serologischen Diagnostik von Bienenviren an der Vetmeduni geleistet. Das Institut für Virologie der Vetmeduni Wien hat langjährige Erfahrung in der Diagnostik von Virusinfektionen. Es wurden bereits rekombinante Antigene und serologische Reagenzien gegen Bienenviren (DWV) hergestellt und serologische Nachweisverfahren für den Einsatz in der Forschung etabliert. Neben dem ersten molekularen Klon des Flügeldeformationsvirus wurden auch die ersten monoklonalen Antikörper gegen Strukturproteine von DWV präsentiert (Lamp et al., 2016). Ein Forschungsschwerpunkt bildet die molekulare Pathologie von Virusinfektionen bei Honigbienen.

Die vorhandenen monoklonalen Antikörper gegen DWV VP1 und 3c-Protease wurden bereits charakterisiert, die Bindung an die viralen Proteine untersucht und eine orientierende Epitopbestimmung durchgeführt. Im hier vorgestellten Projekt wird die praktische Anwendung dieser Antikörper in der Diagnostik untersucht, um belastbare Assays zum Nachweis von DWV zu entwickeln.

### 3.2.3 Arbeiten mit Honigbienen (*Apis mellifera*)

Am Institut für Virologie werden etwa 10 - 15 Honigbienenvölker für Versuchs- und Schulungszwecke betreut. Diese standen für das vorliegende Projekt zur Verfügung und wurden für die Experimente herangezogen.

#### 3.2.3.1 Präparation von Bienenpuppen

Als Grundlage für die Experimente und die Produktion von Bienenviren wurden Bienenpuppen verwendet. Für die Präparation der Puppen wurde eine geeignete Brutwabe aus dem Volk entnommen, durch Abklopfen bzw. mit einem Imkerbesen von adulten Bienen befreit und in einen geeigneten Laborraum überführt. Dort wurden die Zelldeckel mit einer Pinzette entfernt und Arbeiterinnenbrut im passenden Alter (etwa ab Tag 14 nach Eiablage) vorsichtig mit einer Pinzette entnommen und in eine sterile 24-well Zellkulturschale überführt. Die präparierten Puppen wurden für 24 h bei ca. 35 °C inkubiert und anschließend auf etwaige Verletzungen durch die Präparation (z.B. Melanisierungen, Flüssigkeitsaustritt) untersucht. Nur unverletzte Puppen wurden weiterverwendet. Im Frühjahr wurde auch Drohnenbrut nach demselben Prinzip entnommen und präpariert.

#### 3.2.3.2 Produktion von Virusstocks

Die Bienenpuppen wurden etwa 24 h nach Entnahme aus der Brutwabe zur Infektion mit einer sterilfiltrierten (0,45 µL Spitzenvorsatzfilter, Fa. VWR) Virussuspension herangezogen. Dafür wurden Gelauftragsspitzen eigens präpariert und diese genutzt um den Puppen 1 µl Virussuspension in den Thorax zu injizieren. Nach erfolgter Injektion wurde die Puppen für 5-7 Tage in einem Inkubator bei 35 °C bebrütet und im Anschluss bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren. Für Virusproduktion und spätere Aufreinigung wurden etwa 400 Bienen pro Virus infiziert.

#### 3.2.3.3 Probenbearbeitung

Für die Analyse von Einzelproben wurden je drei 3,5 mm sterile Stahlkugeln und 500 µL steriles PBS in ein 2 µL Eppendorf-Tube pipettiert. Im Anschluss wurden die adulten Bienen bzw. die Bienenpuppen mit einer sterilen Pinzette entnommen und in das Reagiergefäß überführt. Danach wurden die Bienen im TissueLyserII (Fa. Qiagen) für 3 min bei 30 Hz homogenisiert, 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und 140 µL Lysat für die folgende RNA-Extraktion entnommen. Der Rest der Probe wurde für analytische Zwecke sofort bei -80 °C eingefroren. Für die Generierung von Virusstocks wurden jeweils ca. 10-15 Stück 3,5 mm Stahlkugeln in ein 50 µL Zentrifugenröhrchen (Fa. Sarstedt) überführt, jeweils 40 virusinfizierte Bienen mit einer sterilen Pinzette aus der Zellkulturplatte in das Röhrchen überführt und mit 20 mL sterilem PBS aufgefüllt. Das Zentrifugenröhrchen wurde solange in einem Labormixer geschüttelt, bis die adulten Bienen bzw. Bienenpuppen homogenisiert waren. Im Anschluss wurden die Stahlkugeln mit einem Magneten entfernt und das Lysat bei 4.000 rpm für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Davon wurden 140 µL für die Extraktion abgenommen und der restliche Überstand in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt, um für weitere Analysen bzw. Aufreinigungen zur Verfügung zu stehen.

## 3.2.4 Arbeiten mit RNA und DNA

### 3.2.4.1 Extraktion von RNA

Die RNA Extraktion aus den Proben (Virusstocks, Feldproben, Negativkontrollen) wurde mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit (Fa. Qiagen) mit dem QIAcube (Fa. Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt und die RNA in 60 µl eluiert. Das Eluat wurde entweder sofort für Untersuchungen weiterverwendet oder bis zur weiteren Analyse auf  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.2.4.2 Konventionelle reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Um sicherzustellen, dass die verwendeten Proben bzw. Stocks frei von kontaminierenden Viren sind, wurden sie mittels RT-PCR untersucht. Für den Nachweis von BQCV wurde eine publizierte, konventionelle RT-PCR verwendet (Tentcheva et al., 2004). Dazu wurde das One *Taq* One-Step RT-PCR Kit (Fa. NEB) nach Herstellerangaben benutzt.

Die Reaktionsbedingungen für die RT-PCR waren folgende, dabei wurde der Zyklus 40x wiederholt:

Tabelle 3.1: Reaktionsbedingungen für die konventionelle BQCV RT-PCR

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit
Reverse Transkription	48°C	15 min
Initiale Denaturierung	94°C	1 min
Denaturierung	94°C	15 sec
Annealing	52°C	30 sec
Elongation	68°C	30 sec
finale Elongation	68°C	5 min

### 3.2.4.3 Reverse-Transkriptase-quantitative-PCR (RT-qPCR)

Für den Nachweis viraler Nukleinsäuren von ABPV, SBV und CBPV aus den Virusstocks und Proben wurden bereits publizierte Primer und Sonden verwendet (Schurr et al., 2019, Blanchard et al., 2007, Jamnikar Ciglencečki und Toplak, 2012).

Für den Nachweis von SBV wurde die MGB-Sonde mit Cy5 und BHQ1 markiert, bei den Primern und Sonden für die anderen Viren gab es keine Unterschiede zu den publizierten Oligonukleotiden. Für den Nachweis der viralen Nukleinsäuren von CBPV wurde das publizierte two-step Assay als one-step Assay durchgeführt. Für die RT-qPCRs wurde das Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit (Fa. NEB) nach Herstellerangaben verwendet.

Für den Nachweis von DWV wurde die am Institut für Virologie etablierte und validierte SYBR Green basierte RT-qPCR verwendet, deren Primer in der Nukleotidsequenz, die für das VP1 des DWV kodiert, binden. Der Mastermix wurde mit dem Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit (Fa. NEB) nach Herstellerangaben hergestellt.

### 3.2.4.4 Klonierung von Plasmiden

Grundsätzlich wird bei einer Klonierung ein bestimmtes DNA-Fragment (Insert) in einen Vektor eingebracht. In diesem Projekt wurden T-Vektoren zur Generierung der Positivkontrollen für die PCRs verwendet. Die viralen Strukturproteine für die Immunisierung der Versuchstiere wurden in geeigneten Expressionsvektoren produziert. Die Herstellung der Expressionskonstrukte erfolgte nach RT-PCR aus positiven Proben mittels Gibson Assembly, wobei das NEBuilder Hifi DNA Assembly Kit (Fa. NEB) laut Herstellerangaben verwendet wurde. Als Expressionsvektor wurde der pet11a-Vektor mit einem N-terminalen His-Tag verwendet.

Die Positivkontrollen für den Nachweis der Nukleinsäuren von ABPV, SBV und BQCV mittels PCR wurden aus positiven Proben generiert. Dazu wurden mittels genspezifischer Primer je ein Fragment für ABPV, SBV und BQCV mit einer Länge von etwa 500 bp mit einer Taq-Polymerase (OneTaq RT-PCR Kit, Fa. NEB) amplifiziert und das Amplicon nach Visualisierung auf einem 0,8% Agarosegel in einen kommerziell erhältlichen T-Vektor (pGEM-T Easy Vector, Fa. Promega) eingebracht (kloniert).

Dazu wurden die jeweiligen Amplicons mit einem PCR-Aufreinigungskit (Fa. NEB) nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 15 µL H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> eluiert. Für die Ligation in den T-Vektor wurde wie folgt vorgegangen.

Tabelle 3.2: Standardprotokoll Ligation

Beschreibung	Volumen
gereinigtes PCR-Produkt	4,5 µL
T-Vektor (Fa. Promega)	0,5 µL
Blunt/TA Ligase MM (Fa. NEB)	5,0 µL
Gesamtvolumen	10,0 µL

Die Reaktion wurde 15 min bei RT inkubiert und danach in kompetente *E. coli* Stamm: HB101 nach einem Standardprotokoll transformiert. Dazu wurden die kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und 50 µL zur Ligation pipettiert. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert und im Anschluss für 90 s auf 37 °C einem Hitzeschock unterzogen. Nach einer weiteren Inkubationszeit für 2 min auf Eis wurden 450 µL LB-Medium hinzupipettiert und der Transformationsansatz auf 37 °C in einem Thermomixer für 30 min geschüttelt. Der Ansatz wurde auf Nähragarplatten mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die sichtbaren Bakterienkolonien wurde mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in 2,5 mL Nährmedium mit Ampicillin abgeworfen und 6 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert.

### 3.2.4.5 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zum schnellen Screening der Flüssigkulturen wurde die Plasmid-DNA mit eigens hergestellten Puffern nach dem Prinzip der alkalischen Lyse präpariert. Die Plasmidpräparationen wurden mittels passender Restriktionsendonukleasen (Fa. NEB) verdaut und jeweils eine Präparation, die das korrekte Bandenmuster nach Visualisierung auf einem 0,8% Agarosegel zeigte, wurde für die weitere Arbeit ausgewählt. Um aus dieser Präparation genügend saubere Plasmid-DNA zu gewinnen, wurde 1 µL der bei 4 °C gelagerten Flüssigkultur in 50 mL LB-Amp Medium überführt und über Nacht im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 15 mL der Flüssigkultur mit dem FavorPrep Plasmid DNA Extraction Mini Kit (Fa. Favorgen) laut Herstellerangaben präpariert. Der DNA-Gehalt und die Reinheit der Präparation wurde spektralphotometrisch mit einem NanoVue plus Spektrophotometer (Fa. GE Healthcare) und dem Quantus Fluorometer (Fa. Promega) laut Herstellerangaben gemessen.

### 3.2.4.6 Sanger Sequenzierung

Damit nicht nur sichergestellt ist, dass die Größe der DNA-Fragmente mit dem erwarteten Ergebnis des Testverbaus mit Restriktionsendonukleasen übereinstimmt, sondern auch tatsächlich die korrekte virale Nukleotidsequenz in das Plasmid ligiert wurde, wurden die präparierten Plasmide der Positivkontrollen sowie der Expressionskonstrukte zur Sequenzierung (Fa. Eurofins) eingeschickt.

## 3.2.5 Herstellung und Aufreinigung der Antigene

### 3.2.5.1 Proteinexpression in *E. coli*

Um ausreichend Proteine für die Immunisierungen der Versuchstiere und das anschließende Screening herzustellen, wurden die viralen Strukturproteine in einem bakteriellen System exprimiert. Hierfür wurden *E. coli* Stamm: BL21 Rosetta (Fa. Clontech, USA) verwendet. Um die Expressionskonstrukte in die Bakterien zu bringen, wurde das Standardprotokoll für Transformationen in *E. coli* Stamm: HB101 verwendet. Der Transformationsansatz wurde mittels Verdünnungsausstrich auf einer Selektionsagarplatte (LB-Amp Platte) ausgebracht und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Für eine erste Testexpression der Kulturen wurden jeweils zwei Kulturen mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in einem Glasröhrchen mit 2 mL Nährmedium (LB-Amp Medium) abgeworfen. Die Kulturen wurden bei 37 °C im Schüttler für 6 h inkubiert. Danach wurde je 1 mL der Flüssigkultur in ein frisches Glasröhrchen überführt, auf 2 mL mit frischem LB-Amp Medium aufgefüllt und bei einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,6-0,8 wurde in eines der Röhrchen 2  $\mu$ L Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG, 1 M) pipettiert, um die Proteinexpression zu starten. Nach 2,5 h wurde 1 mL der Flüssigkultur für weitere Analysen durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 min geerntet. Der Rest der Flüssigkultur wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C im Glasröhrchen gelagert.

Nach der Analyse der Testexpression mittels Coomassie-Blau-Färbung und Westernblot wurden für die Proteinaufreinigung 200 mL LB-Amp Medium in Glasflaschen abgefüllt und mit den nicht induzierten Bakterienkulturen angeimpft. Bei einer  $OD_{600}$  von 0,6-0,8 wurde die Flüssigkultur mit 200  $\mu$ L IPTG, 1 M für 2,5 bis 3 h induziert und anschließend mittels Zentrifugation geerntet. Das bakterielle Pellet wurde in einem Waschpuffer resuspendiert, abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das unlösliche Pellet wurde anschließend in 8 M Urea aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

### 3.2.5.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld nach ihrer jeweiligen Molekülgröße. Zur Auftrennung der Proben wurden Tricin-Gele mit einem 7,5% Acrylamid-Anteil verwendet. Die Proteinproben wurden bei 95 °C für 5 min in einem Proteinladepuffer aufgeköcht und anschließend je nach Probenmaterial 5 - 15  $\mu$ L Probe pro Geltasche geladen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 V mit 180 mA bei RT für etwa 80 min durchgeführt.

### 3.2.5.3 Coomassie-Brillant-Blau R 250 Färbung

Um nach einer SDS-PAGE alle anfärbbaren Proteine in einer Probe darstellen zu können, wurde die Coomassie-Brillant-Blau verwendet. Dazu wurde das Gel in einer Lösung mit 0,25% Coomassie-Brillant-Blau R 250 für 2 h eingefärbt und danach mit einer Entfärbelösung solange entfärbt, bis keine oder kaum Hintergrundfärbung in der Gelmatrix zu sehen war.



### 3.2.5.4 Westernblot

Die bakteriell exprimierte Proteine wurden spezifisch über das angefügte His-Tag mittels Westernblot detektiert. Standardmäßig wurden die Proben dafür über ein Acrylamidgel mittels SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt und im Anschluss bei 70 V für 1 h auf eine Nitrozellulose Membran übertragen (geblottet). Damit die Antikörper zum Nachweis der Proteine nicht unspezifisch an die Nitrozellulose Membran binden, wurde die Membran mit 5% Magermilchpulver in 1x PBS-T 0,1% für 1 h bei RT blockiert. Anschließend wurde der Blot 3x jeweils für 10 min mit 1x PBS-T 0,1% gewaschen und mit dem Erstantikörper für 1 h bei RT auf einem Schwenker inkubiert. Für die bakteriell exprimierte Strukturproteine wurde der eigens hergestellte anti-His-Antikörper 10B6 (Hybridomüberstand 1:5 in 1x PBS-T 0,1% verdünnt) verwendet. Als Zweitantikörper wurde ein kommerziell erhältlicher Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Maus IgG (Fa. Jackson ImmunoResearch Laboratories) Antikörper verwendet, der 1:10.000 in 1x PBS-T 0,1% verdünnt für 1 h bei RT eingesetzt wurde. Zur Signaldetektion wurde das Chemilumineszenz-Substrat Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent (Fa. Cytiva) verwendet und das Signal mit dem C-Digit Blotscanner Model 3600 (Fa. Li-Cor) visualisiert. Als Größenstandard wurde der Color Prestained Protein Standard, Broad Range 10-250 kDa (Fa. NEB) verwendet und mit dem WesternSure Pen (Li-Cor) dargestellt.

### 3.2.5.5 Nickel-Affinitätschromatographie

Als Grundvoraussetzung für die Aufreinigung der bakteriell exprimierte Proteine dient das an das virale Strukturprotein angefügte His-Tag. Dabei handelt es sich um eine Abfolge von Histidinen am N-Terminus des Proteins. Die Aminosäure Histidin ist in der Lage, zweiwertige Ionen (z.B. Kupfer) zu koordinieren, womit His-Tag Proteine eine Affinität zu diesen Ionen aufweisen. Dadurch konnten die Proteine über eine immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC) aufgereinigt werden. Dafür wurde eine Nickelionensäule ( $\text{Ni}^{2+}$ ) (HisTrap HP, 1 mL, Fa. Cytiva) verwendet. Aufgrund der Unlöslichkeit der Proteine erfolgte dies unter denaturierenden Bedingungen in 6 M Urea mit dem Gerät ÄKTA Purifier (Fa. GE Healthcare). Das an die Nickelionensäule gebundene Protein wurde mit einem aufsteigenden Imidazolgradienten in Fraktionen von 100  $\mu\text{L}$  in eine 96-well Testplatte eluiert und in Pools von vier bis fünf Eluat über ein Acrylamidgel aufgetrennt und mittels Westernblot und Coomassie-Färbung analysiert.

### 3.2.5.6 Dialyse der gereinigten Proteine

Da die Proteine unter denaturierenden Bedingungen (6 M Urea) gereinigt wurden, mussten sie vor der weiteren Verwendung als Antigen für die Impfung der Versuchstiere erst in einen geeigneten Puffer ohne Harnstoff und Imidazol verbracht werden. Dazu wurden die Proteine langsam dialysiert und dabei für jeweils 24 h in Puffer mit absteigenden Ureakonzentrationen (4 M, 2 M, 0 M Urea) verbracht. Zum Schluss wurden sie noch 2x in sterile phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) dialysiert. Nach Analyse mittels Coomassie-Färbung des Acrylamidgels standen die Proteine als Antigen für die Immunisierungen zur Verfügung.

### 3.2.5.7 Dichtegradientenzentrifugation der Virusstocks

Homogenat von virusinfizierten Larven- bzw. Puppen wurde 15 min bei 20.000 g zentrifugiert und der klare Überstand durch einen Spritzenvorsatzfilter filtriert (0,45  $\mu\text{m}$ ). Jeweils 5 mL Filtrat wurden auf einen CsCl Stufengradienten (je 2 mL 1,55 g/mL, 1,35 g/mL, 1,22 g/mL) in einem Ultrazentrifugationsröhrchen (14 x 89 mm, ultraclear, Fa. Beckman) vorsichtig überschichtet. Der Gradient wurde bei 34.000 rpm für 14 h bei 8 °C in einem Beckman SW41 Rotor zentrifugiert. Die sich im Bereich der 1,35 g/mL Dichte bildende Bande

wurde mit einer Spritze nach Punktion des Zentrifugenröhrchens abgezogen und mit CsCl Lösung (1,35 g/mL) auf ein Volumen von 5,7 mL gebracht und in ein Röhrchen (13 x 66mm, PA Ultracrimp, Thermo) überführt. Bei 55.000 rpm in einem TV1665 Vertikalrotor (Sorvall) für 14 h banden Viruspartikel in einem sich selbst formenden Dichtegradienten. Die virushaltige Bande wurde durch Punktion des Röhrchens abgezogen, das gewonnene Volumen 5 fach verdünnt und in einem TLA45 Rotor (Fa. Beckman) bei 45.000 rpm (ca. 100.000 x g) für 2 h sedimentiert. Das Sediment wurde mit 70% Ethanol gewaschen und bei 15.000 rpm für 5 min zentrifugiert, um Reste des CsCl zu entfernen.

### 3.2.5.8 Immunisierungen der Versuchstiere

Die Tierversuche wurden im Rahmen eines bereits genehmigten Projekts zur Produktion von Antikörpern gegen Bienenviren durchgeführt (BMWF-68.205/0107-II/3b/2013). Als Versuchstiere wurden je zwei Mäuse (Stamm: BALB/c) pro Antigen immunisiert. Einerseits mit den gereinigten Viruspartikeln und andererseits mit den gereinigten, bakteriell erzeugten rekombinanten Strukturproteinen, wobei hier VP1, VP2 und VP3 bei ABPV und DWV in etwa gleicher Konzentration kombiniert wurden. Um die Immunreaktion zu verstärken wurde ein kommerziell verfügbares Adjuvans (Adjuvant MM, Fa. Gerbu) verwendet. Die Mäuse wurden nach Herstellerangaben über einen Zeitraum von vier Wochen immunisiert. In der vierten Woche wurde mittels Blutabnahme aus der lateralen Schwanzvene die Serokonversion mittels Westernblot überprüft. Dabei wurde das gewonnene Blut bei 2000 rpm für 3 min zentrifugiert und das Serum abgenommen. Dieses wurde als Erstantikörper 1:2000 in 1x PBS-T 0,1% verdünnt im Westernblot eingesetzt. Versuchstiere, die eine ausreichend starke Immunantwort im Westernblot zeigten, wurden an drei aufeinander folgenden Tagen mit Antigen geboostert und anschließend fusioniert.

## 3.2.6 Arbeiten mit eukaryontischen Zellen

### 3.2.6.1 Hybridomatechnik

Zur Generierung von Hybridomen wurden Myelomzellen (Krebszellen, Zelllinie: sp2/0) mit den antikörperproduzierenden B-Lymphozyten aus der Milz des Versuchstieres fusioniert. Dadurch entstehen tausende unsterbliche, antikörperproduzierende Hybridzellen, aus denen im Anschluss die korrekten Zellklone isoliert und charakterisiert werden müssen.

Zwei Tage nach der letzten Boosterung der Versuchsm Maus wurde die Milz, in der sich die meisten B-Lymphozyten befinden, unter sterilen Bedingungen entnommen und in Zellkulturmedium homogenisiert. Die Milzzellen wurden in einem bestimmten Verhältnis an die Myelomzellen durch Zentrifugation und Resuspension angelagert. Durch Zugabe von Polyethylenglykol (PEG 1500, Fa. Roche) wurden die Zellen fusioniert. Nach der Fusion wurden die Zellen in einem Selektionsmedium (HAT-Medium) resuspendiert und auf 20 96-well Zellkulturplatten pro Maus ausgesät. Das Selektionsmedium ist essentiell, um die fusionierten Hybridomzellen von den überschüssigen, nicht fusionierten Myelomzellen zu unterscheiden. Nach etwa zwei Wochen wurden die Hybridome auf den Zellkulturplatten im Lichtmikroskop beurteilt, gekennzeichnet und auf neue 96-well Zellkulturplatten umgesetzt. Das Prozedere wurde etwa zwei Wochen später wiederholt, um auch langsam wachsende Hybridome umsetzen zu können. Nachdem eine adäquate Anzahl (ca. 50 - 100 Zellen/Hybridom) erreicht war, wurde mit dem Screening begonnen.

### 3.2.6.2 ELISA-Screening der Hybridome

Für das initiale Screening wurde ein indirektes ELISA-Verfahren genutzt. Dafür wurde das jeweilige Antigen in einem Carbonat-Bicarbonat-Puffer an spezielle Multiwell-Platten über Nacht bei 4 °C (Microolon, High

Binding, Fa. Greiner Bio-One) gebunden. Danach wurden die Platten mit einem ELISA-Washer (ELx405 Select CW, Fa. BioTek) dreimal gewaschen und mit 10% FCS Lösung in 1x PBS-T 0,1% für 1 h bei 37 °C blockiert. Im Anschluss wurde der Mediumüberstand der Hybridomzellkulturplatten mit einer manuellen Mehrkanalpipette auf die ELISA-Platten übertragen und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten wieder dreimal gewaschen und der Peroxidase-konjugierte Zweitantikörper (Ziege-anti-Maus IgG, Fa. Jackson ImmunoResearch Laboratories) 1:2000 verdünnt für 1 h bei RT aufgebracht. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Platten mit einem Tetramethylbenzidin (TMB) Substrat für einige Sekunden bis Minuten inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde mit einer 25%igen Schwefelsäurelösung gestoppt und im Anschluss mit einem Mikroplatten Leser (GENios, Fa. Tecan) ausgelesen.

Die Wells, die ein stark positives Signal ergaben, wurden auf den korrespondierenden Zellkulturplatten markiert, für die weitere Charakterisierung verwendet und auf 6-Well Zellkulturplatten umgesetzt.

### 3.2.6.3 Immunoblot-Screening

Um die Antikörper zusätzlich mit einem anderen Verfahren zu testen, damit Antikörper, die ein unspezifisches positives Signal im ELISA erbrachten, identifiziert und aus dem Screening ausgeschieden werden können, wurde der Immuno- oder Dotblot verwendet. Der Vorteil liegt darin, dass relativ schnell, günstig und einfach eine große Menge an potentiellen Antikörper Kandidaten getestet werden können. Hierfür wurden schmale Streifen aus einer Nitrozellulose Membran geschnitten, mit jeweils 1 µL Probe betropft und bei RT getrocknet. Im Anschluss wurden die Streifen mit 5% Milchpulver in 1x PBS-T 0,1% für 1 h am Schüttler bei RT blockiert, um unspezifische Bindungen der AK an die Membran zu vermeiden. Danach wurde jeder Streifen individuell mit dem zu screenenden Hybridomüberstand 1:5 verdünnt für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurden die Streifen 3x für 10 Minuten mit 1x PBS-T 0,1% gewaschen und mit dem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper (Ziege-anti-Maus IgG, Fa. Jackson ImmunoResearch Laboratories), 1:10.000 verdünnt, für 1 h bei RT inkubiert. Die Immunoblots wurden wiederum 3x für 10 Minuten mit 1x PBS-T 0,1% gewaschen und das Signal mit dem Chemilumineszenz-Substrat Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent (Fa. Cytiva) detektiert und mit dem C-Digit Blotscanner Model 3600 (Fa. Li-Cor) visualisiert. Als Proben wurden pro Blotstreifen natives Virusantigen, denaturiertes Virusantigen, virusnegative Arbeiterin und virusnegative Drohne verwendet.

### 3.2.6.4 Protein G Platten-Screening

Da nach dem initialen Screening bei einigen Fusionen eine recht hohe Anzahl geeigneter Antikörper Kandidaten verfügbar waren, wurden diese in unterschiedlichen Kombinationen (jeweils Detektions- und Fangantikörper) auf ihre Eignung für den Sandwich-ELISA getestet. Dafür wurden Testplatten verwendet, an die Protein G adsorbiert wurde (Protein G Coated 96 Wells Solid Slates, Fa. Biomat).

Protein G hat die Eigenschaft, Immunglobulin G verschiedener Tierarten zu binden. Da aufgrund der Anzahl nicht alle Antikörper aufgereinigt und markiert werden konnten, wurden die Hybridome an serumfreies (und damit auch Fremdanikörper-freies) Medium angepasst. Dadurch befanden sich im Zellkulturüberstand nur eigene, von der jeweiligen Hybridomzelllinie produzierte, Antikörper. Diese konnten nun an das Protein G der Testplatten adsorbiert werden. Danach wurden die Platten mit 10% FKS in 1x PBS-T 0,1% blockiert, mit einem ELISA-Washer (ELx405 Select CW, Fa. BioTek) gewaschen und für 1 h mit dem Virusantigen bzw. den negativen Kontrollen inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten wieder gewaschen, um ungebundenes Antigen zu entfernen und mit einem zweiten, Bienenvirus-spezifischen Antikörper für 1 h inkubiert, nach einem erneuten Waschschrift wurden sie mit einem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper (Ziege-anti-Maus IgG, Fa. Jackson ImmunoResearch Laboratories) für 1 h inkubiert und wieder gewaschen. Zur Detektion wurde TMB-Substrat verwendet. Die enzymatische Reaktion wurde mit einer 25%igen

Schwefelsäurelösung gestoppt und im Anschluss mit einem Mikroplatten Leser (GENios, Fa. Tecan) dokumentiert.

### 3.2.6.5 Selektion der Hybridome

Da nach der Fusion und dem anschließenden Screening nicht sichergestellt werden konnte, dass sich tatsächlich nur eine einzige fusionierte Zelle im ursprünglichen Zellkulturwell befand, wurden die jeweils zwei bis drei besten Antikörperkandidaten mittels Verdünnungsassays (limiting dilution assay) selektiert. Dadurch wird sichergestellt, dass es sich bei den jeweiligen Hybridomen um eine monoklonale Zellpopulation handelt. Dafür wurden die Hybridomzellen mit Medium aus einem Well einer 96-Well Zellkulturplatte abgespült und auf einer frischen 96-Well Zellkulturplatte in einer aufsteigenden 1:2 Verdünnungsreihe (A-H) pipettiert. Diese Verdünnungsreihe wurde dann wiederum 1:2 in die Reihen B1-H12 verdünnt. Nach 1-2 Tagen wurde jene Wells markiert, die nur eine Hybridomzelle enthielten und nachdem etwa 50-100 Zellen vorhanden waren, wurde die Zellkulturplatte mittels ELISA gescreent, um sicherzustellen, dass es sich um die korrekten, antikörperproduzierenden Hybridomzellen handelte. Diese wurden wiederum einerseits auf 10 cm Zellkulturschalen passagiert und im Anschluss auf  $-150^{\circ}\text{C}$  zur Langzeitlagerung weggefroren und andererseits wurden sie erneut in einer Verdünnungsreihe ausgesät. Der Selektionsvorgang wurde insgesamt dreimal pro Hybridom wiederholt.

### 3.2.6.6 Adaption der Hybridome an serumfreies Medium

Zur Reinigung der Immunglobuline mittels Protein-G-Affinitätschromatographie ist eine serumfreie Kultur Voraussetzung, da ansonsten kontaminierende IgGs aus dem Kälberserum mit gereinigt werden. Dafür wurden die Hybridome schrittweise über einen Zeitraum von mehreren Wochen von Zellkulturmedium mit 10% FKS auf serumfreies Medium (ISF-1, Fa. PAN Biotech) angepasst.

### 3.2.6.7 Aufreinigung der Hybridomüberstände

Zur Aufreinigung der Antikörper wurde eine Protein-G-Affinitätschromatographie verwendet. Dafür wurde der serumfreie Zellkulturüberstand gesammelt und bis zur Aufreinigung auf  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Aufreinigung wurde mit einer Menge von 200 mL Überstand durchgeführt. Für die Aufreinigung wurden die Antikörper aus dem Überstand an eine Protein-G Säule (HiTrap, 1 mL Protein G HP, Fa. Cytiva) gebunden und mittels Glycinpuffer (50 mM, pH 3,0) in Fraktionen von 1 mL eluiert. Dafür wurde der ÄKTA Purifier (Fa. GE Healthcare) verwendet. Die Fraktionen wurden auf einem mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbtem Acrylamidgel visualisiert.

### 3.2.6.8 Isotypisierung der Antikörper

Für die Isotypisierung der Antikörper wurde das kommerziell verfügbare Iso-Gold Rapid Mouse-Monoclonal Isotyping kappa and lambda Kit (Fa. BioassayWorks) laut Herstellerangaben verwendet. Die aufgereinigten Antikörper (etwa 3 mg/mL) wurden 1:4000 im Sample Diluent Buffer verdünnt und pro Kassette wurden 150  $\mu\text{L}$  aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 5-10 Minuten wurde das Ergebnis fotografisch dokumentiert.

### 3.2.6.9 Etablierung des direkten Sandwich-ELISAs

Beim direkten Sandwich-ELISA wird der Detektionsantikörper mit einem Enzym, welches in der Lage ist, ein Substrat umzusetzen, gekoppelt. Für die Kopplung wurde ein kommerziell erhältliches Kit (EZ-Link Plus Activated Peroxidase Kit, Fa. Thermo Scientific) nach Herstellerangaben verwendet. Davor wurden die gereinigten Antikörper in einen geeigneten Puffer (Karbonat-Bikarbonat-Puffer) mithilfe der Zeba Desalt Spin Columns (Fa. Pierce) verbracht. Die Antikörper wurde in unterschiedlichen Kombinationen getestet und die jeweils besten Antikörper-Kombinationen (jeweils ein Fang- und ein Detektionsantikörper) ausgewählt und hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität untersucht.

### 3.2.6.10 ELISA-Tests mit definierten Proben und Feldproben

Als definierte Proben wurden Virusstocks verwendet, die in der RT-qPCR ein stark positives Ergebnis erbrachten. Diese Proben wurden verwendet, um die Sensitivität des ELISA zu bestimmen. Dafür wurden die Proben seriell verdünnt und von jeder Verdünnung wurde ein Aliquot zur RNA-Extraktion entnommen. Anschließend wurden die Verdünnungen im ELISA getestet und parallel dazu der Wert der Genomäquivalente/ $\mu$ l RNA-Extrakt mittels RT-qPCR bestimmt. Als untere Nachweisgrenze wurde der minimalste, noch messbare Wert (Signal mindestens doppelt so hoch wie Negativkontrolle) des ELISA bestimmt und die Verdünnungsstufe mit den zugehörigen GEs/ $\mu$ l RNA-Extrakt angegeben.

Als Feldproben wurden aus Modul A viruspositive Proben aus verschiedenen Bundesländern zur Verfügung gestellt. Diese stammen aus dem Virenmonitoring im Herbst 2020. Insgesamt wurden 14 verschiedene Proben getestet. Um genügend Testmaterial zur Verfügung zu haben, wurden die AGES Proben in Bienenpuppen passagiert und 1:10 sowie 1:100 in PBS verdünnt im direkten Sandwich-ELISA eingesetzt.

## 3.3 Ergebnisse

### 3.3.1 Antigene

#### 3.3.1.0.1 Überblick

Um geeignete Antigene für die Immunisierungen der Versuchstiere und für das folgende Screening der Hybridome zu erhalten, wurden regelmäßig Virusstocks von DWV, SBV und ABPV produziert. Aufgrund der saisonalen Bruttätigkeit der Bienen und der erhöhten Prävalenz von Wildtyp-Virusinfektionen im Herbst, war dies nur im Frühjahr bis in den Frühsommer möglich. Die RNA-Extrakte der Virusstocks wurden mittels RT-qPCR auf die gängigen Bienenviren (DWV, ABPV, SBV, BQCV) getestet. Da allerdings Kontaminationen mit anderen Pathogenen nicht auszuschließen sind, wurden zusätzlich virale Strukturproteine in bakteriellen Expressionssystemen rekombinant generiert. Um die Viren aus Feldproben möglichst effizient detektieren zu können, wurden die viralen Strukturproteine für die bakterielle Proteinexpression ausgewählt. Auch die künstlich erzeugten Virusproteine wurden für die Immunisierung der Versuchstiere verwendet. Im Rahmen des Projekts konnte das Strukturprotein VP1 des SBV, die Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 des ABPV sowie die Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 des DWV-B erfolgreich in Bakterien exprimiert und mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Außerdem konnten mittels fraktionierter Pelletierung und Dichtegradientenzentrifugation erfolgreich hochreine Viruspräparationen von ABPV, SBV und DWV hergestellt werden.

#### 3.3.1.0.2 Akutes Bienenparalysevirus (ABPV)

Für ABPV wurden insgesamt drei Strukturproteine (VP1, VP2 und VP3) erfolgreich exprimiert (Abbildung 3.1). Der höchste Gehalt an exprimierten Proteinen wurde 3,5 h nach Induktion mit IPTG bei 37 °C erreicht (Abbildung 3.2). Es zeigte sich, dass alle drei Strukturproteine nur unter denaturierenden Bedingungen (8 M Urea) in Lösung gebracht werden konnten. Auch kleinere Modifikationen der Proteinexpression, wie z.B. Verringerung der Temperatur oder unterschiedliche Konzentrationen des IPTG, brachten keine Änderung der Löslichkeit. Die einzelnen Fraktionen wurden zusammen auf einem mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbten Acrylamidgel aufgetragen. Für die weitere Arbeit wurden die einzelnen Strukturproteinfraktionen mit dem höchsten Proteingehalt gepoolt. Mittels Dialyse wurden sie in einen, für die Immunisierung geeigneten, Puffer (Phosphatgepufferte Salzlösung, PBS) verbracht und dabei langsam partiell renaturiert (Abbildung 3.3). Für die Immunisierung wurden zwei Versuchsmäuse mit einem Gemisch der drei Strukturproteine als Antigen geimpft.

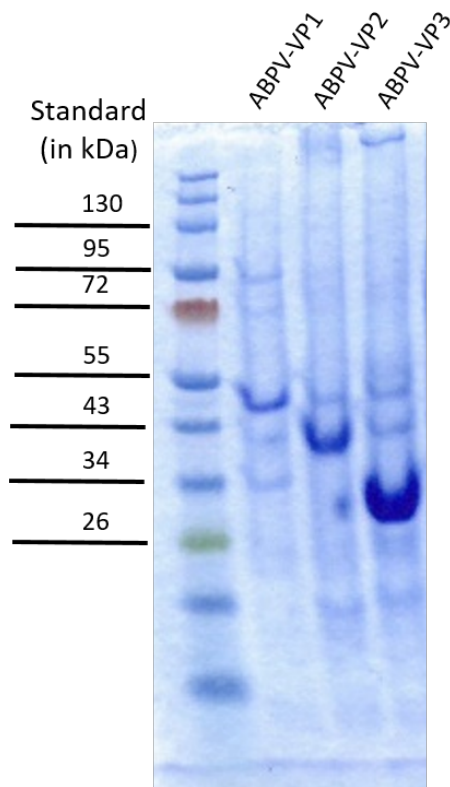


Abbildung 3.1: Coomassie-Färbung des Acrylamidgels der Proteinexpression der rekombinanten Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 des akuten Bienenparalysevirus (ABPV); die Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen (8 M Urea) in Lösung gebracht.

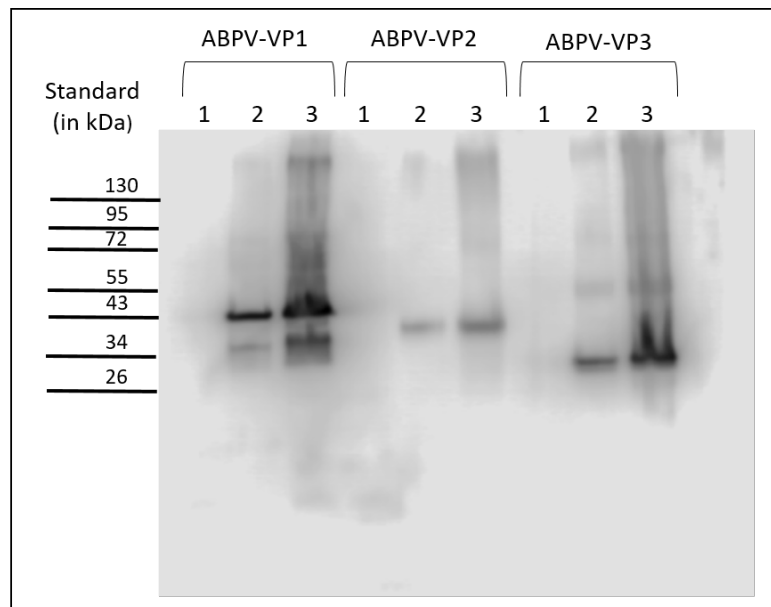


Abbildung 3.2: Westernblot der Proteinexpression der rekombinanten Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 des akuten Bienenparalysevirus (ABPV); 1 – nicht induzierte Bakterienkultur, 2 – induzierte Bakterienkultur nach 2,5 h, 3 – induzierte Bakterienkultur nach 3,5 h; als 1. AK wurde ein anti-His-Tag Antikörper verwendet

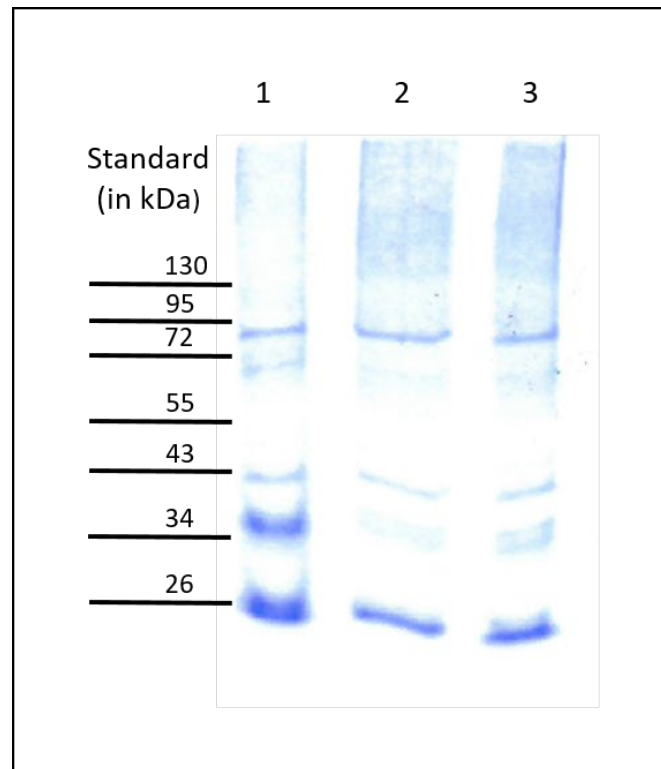


Abbildung 3.3: SDS-PAGE-Proteingel der rekombinanten Strukturproteine VP1, VP2, VP3 des ABPV, gefärbt mit Coomassie-Brilliant-Blau; 1 - Strukturproteine in 8M Urea, 2 - Strukturproteine in 2 M Urea, 3 - Strukturproteine in PBS

Wie bereits erwähnt, wurde als Ergänzung zu den rekombinanten viralen Proteinen ein weiterer Ansatz für die Präparation der Virionen gewählt. Dafür wurden neue Virusstocks von DWV, SBV und ABPV durch Infektion von Bienenbrut erzeugt. Nach der Inkubationszeit wurden die Larven und Puppen mechanisch homogenisiert, zentrifugiert und das Homogenat sterilfiltriert. Im Anschluss wurden die Viren durch fraktionierte Pelletierung und Dichtegradientenzentrifugation angereichert (Abbildung 3.4). Dabei trennen sich die jeweiligen Moleküle nach ihrer Schwebdichte auf und können im Anschluss analysiert werden. Die sichtbaren Fraktionen wurden einzeln mit einer Kanüle aus dem Zentrifugenröhrchen abgezogen. Die Fraktionen wurden im Anschluss auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt. Auf dem Polyacrylamidgel kann man deutlich die einzelnen viralen Strukturproteine erkennen. Auch das hochimmunogene Bienenprotein Hexamerin (etwa 70 kDa) ist nach der ersten Zentrifugation (Spur 1) noch gut zu erkennen, konnte aber in den folgenden Schritten herausgereinigt werden (Spuren 2-9) (Abbildung 3.5). Die gereinigten Virusantigene wurden im Anschluss zur Immunisierung von zwei Versuchstieren herangezogen.



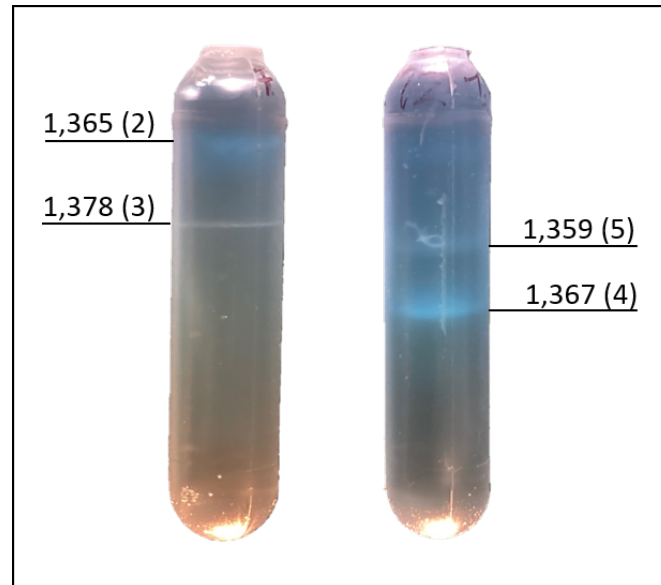


Abbildung 3.4: Viruspräparation von ABPV mit Hilfe eines selbstformierenden Cäsiumchlorid Gradienten (1,4 g/mL, 14 h, 55.000 rpm). Die einzelnen Banden wurden im Anschluss abgenommen und getrennt auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt. Dabei entsprechen die Zahlen in Klammern (2-5) den Spalten in Abbildung 3.5.

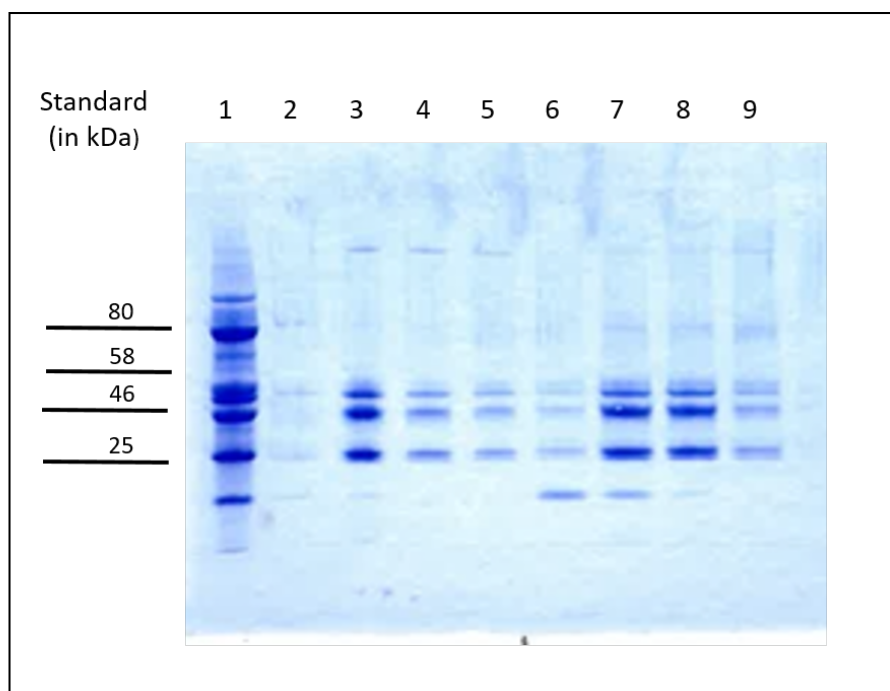


Abbildung 3.5: Viruspräparation von ABPV, aufgetragen auf einem Polyacrylamidgel, gefärbt mit Coomassie-Brillant-Blau. 1 - Viruspräparation nach einer ersten Zentrifugation. Diese wurde anschließend mittels selbstformierenden CsCl-Gradienten weiter aufgereinigt und die einzelnen Fraktionen auf das Gel aufgetragen (2-9). Die Virusproteine (VP1, VP2, VP3) sind deutlich zu erkennen, außerdem kann man auch das kleinste Strukturprotein (VP4) erkennen (6-8).

### 3.3.1.0.3 Sackbrutvirus (SBV)

Das VP1 des SBV konnte erfolgreich in Bakterien exprimiert werden, allerdings war das Protein nicht stabil und daher nicht für die Immunisierung oder für Testzwecke geeignet. Um das virale Strukturprotein zu stabilisieren, wurde das Expressionskonstrukt modifiziert und ein lösliches (Fluoreszenz)Protein (*mCherry*) an das virale Strukturprotein angeknüpft. Das modifizierte Konstrukt konnte erfolgreich exprimiert, gereinigt und zur Immunisierung von zwei Mäusen herangezogen werden (Abbildung 3.6).

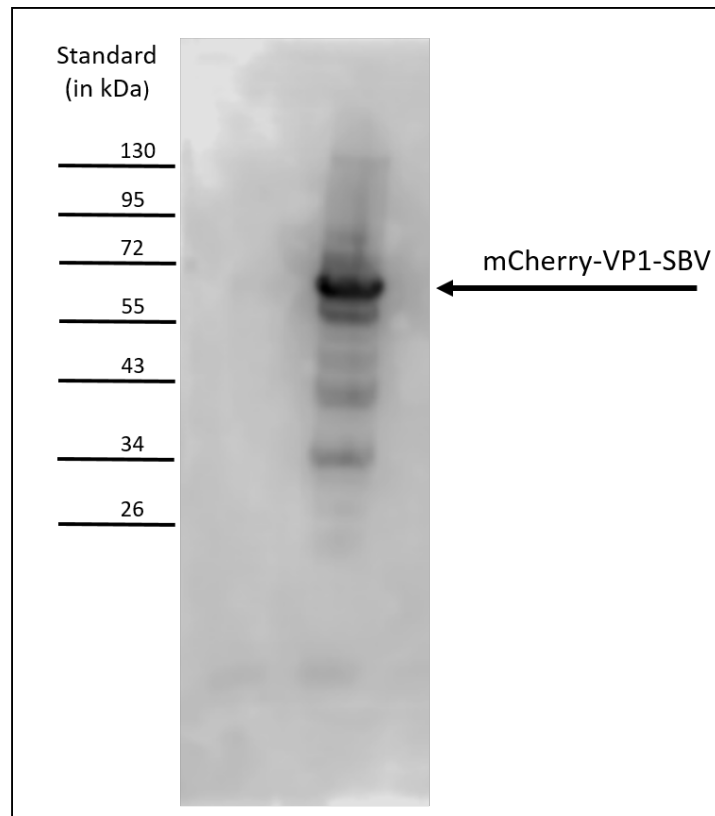


Abbildung 3.6: Proteinexpression des rekombinanten Fusionsproteins *mCherry*-VP1 des Sackbrutvirus (SBV).

Auch für SBV wurde ein Virusstock über fraktionierte Pelletierung und Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt und über ein SDS-PAGE-Proteingel und anschließende Coomassie-Färbung visualisiert. Die Präparation der Virionen wurde für die Immunisierung zweier Mäuse herangezogen.

### 3.3.1.0.4 Flügeldeformationsvirus (DWV)

Gegen DWV waren bereits vor Projektstart drei Antikörper gegen eines der Strukturproteine (VP1) des DWV-A vorhanden. Die vorhandenen Antikörper erkennen Virusstrukturen, die denaturiert vorliegen. Das bedeutet, dass die Bienenproben in einem Harnstoffpuffer gekocht werden müssen, um erfolgreich detektiert zu werden. Dies stellt bei der Probenaufarbeitung für den Sandwich-ELISA im Labor kein Problem dar, würde allerdings die Handhabung des Schnelltests verkomplizieren. Um die Probenaufarbeitung zu vereinfachen und mit den im Projekt generierten ABPV und SBV Antikörpern zu vereinheitlichen, wurden daher auch für VDV/DWV-B sowohl die Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 im bakteriellen Expressionssystem generiert als auch ein gereinigter Virusstock produziert (Abbildung 3.7).

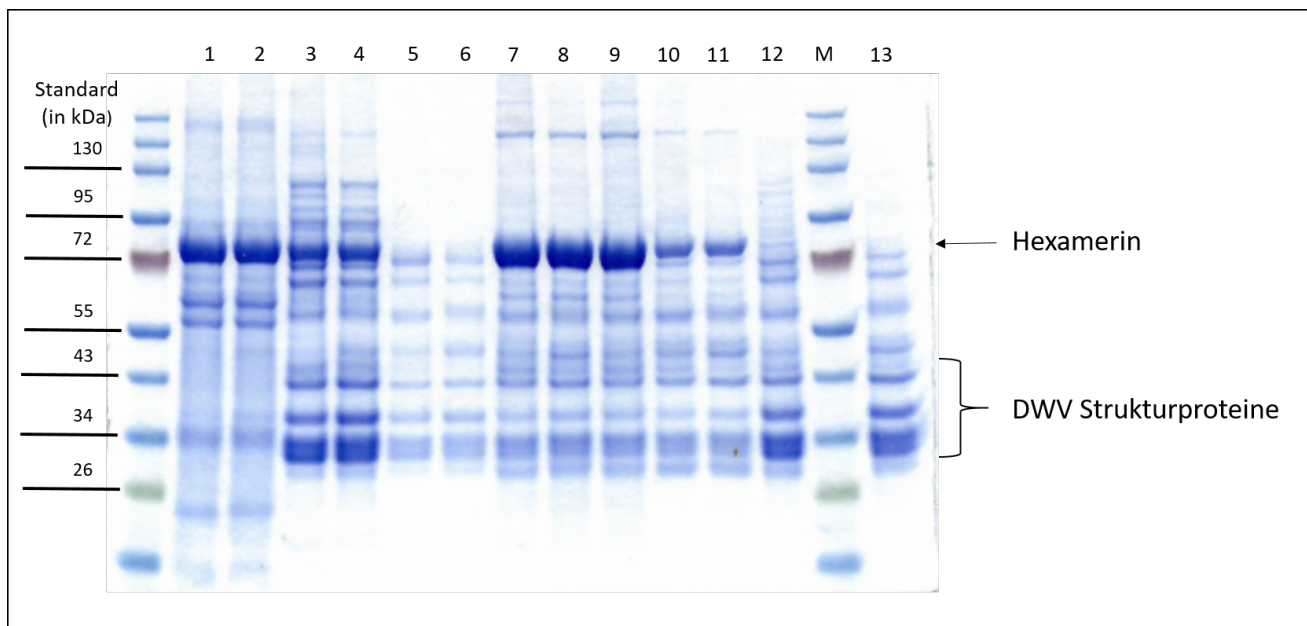


Abbildung 3.7: Virusreinigung eines DWV Virusstocks. Die Spuren 1-11 zeigen Zwischenstufen der Aufreinigung, wobei die Strukturproteine des Virus bereits gut zu erkennen sind. Allerdings ist auch das immunogene Bienenprotein Hexamerin noch stark präsent. Dieses Protein konnte nach einem erneuten Zentrifugationsschritt in den Spuren 12-13 zum Großteil herausgereinigt werden und die Probe für die Immunisierung herangezogen werden.

## 3.3.2 Immunisierungen

### 3.3.2.1 Akutes Bienenparalysevirus (ABPV)

Zwei Mäuse wurden mit der Viruspräparation von ABPV (siehe Abbildung 3.4 sowie Abbildung 3.5) immunisiert. Die Immunisierung mit dem Antigen und einem kommerziell erhältlichen Adjuvans erfolgte über einen Zeitraum von vier Wochen. Im Anschluss wurde die Serokonversion mittels Blutentnahme im Westernblot bestätigt (siehe Abbildung 3.8). Nach einer täglichen Boosterung der Mäuse in der sechsten Woche über insgesamt drei Tage, wurden die B-Lymphozyten aus der Milz der zwei Mäuse mit Myelomzellen fusioniert und standen für das Screening bereit.

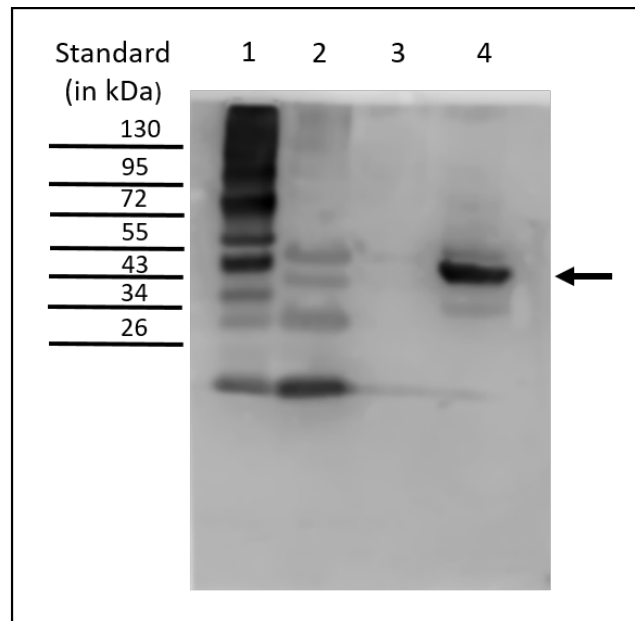


Abbildung 3.8: Westernblot mit dem Serum (1:2000 verdünnt) einer der mit rekombinanten VP1, VP2 und VP3 immunisierten Mäuse; 1: rekombinante Proteine (VP1, VP2, VP3) 2: Lysat aus *E. coli* 3: Negativkontrolle 4: gereinigte ABPV Viruspräparation; insbesondere die Reaktivität des Serums gegen VP1 (Pfeil) zeigt ein besonders deutliches Signal.

### 3.3.2.2 Sackbrutvirus (SBV)

Eine Maus wurde mit gereinigten, viralen Strukturproteinen von SBV immunisiert, um Vergleichsseren zu generieren. Die Antigenpräparationen wurden mittels chromatographischer Verfahren aus inaktivierten Viruspräparationen hergestellt. Dabei trat eine sehr starke Reaktion der Antiseren gegen kontaminierende, hochimmunogene Bienenproteine (v.a. Hexamerin) auf, die eine Präparation monoklonaler Antikörper aus den Plasmazellen der entsprechenden Maus nicht ratsam erscheinen ließ. Das Serum konnte allerdings für Kontrollversuche genutzt werden, um zu zeigen, dass die in *E. coli* erzeugten rekombinanten Antigene in Virusproteinpräparationen vorkommen.

Außerdem wurden zwei Mäuse mit dem rekombinanten, gereinigten mCherry-VP1 des SBV über einen Zeitraum von sechs Wochen immunisiert. Die Serokonversion wurde mittels Blutentnahme im Westernblot bestätigt. Im Anschluss wurden die B-Lymphozyten der Mäuse mit Myelomzellen fusioniert und Hybridomzellklone gewonnen.

Zusätzlich wurden zwei Mäuse mit der neuen Viruspräparation von SBV immunisiert, die über ein anderes Verfahren als die oben beschriebene Virusreinigung durchgeführt wurde. Eine Serokonversion konnte nach vierwöchiger Immunisierung im Westernblot bestätigt werden und die B-Lymphozyten der Mäuse konnten mit Myelomzellen fusioniert werden.

### 3.3.2.3 Flügeldeformationsvirus (DWV)

Zusätzlich zu den vorangegangenen und abgeschlossenen Arbeiten mit den Antikörpern (DWV-A1, DWV-B6, DWV-B10) gegen VP1 des DWV, die denaturiertes Antigen erkennen, wurden erneut Mäuse immunisiert. Diese Mäuse sollen Antikörper produzieren, die native Virusproteine direkt erkennen. Dafür wurden zwei Versuchsmäuse mit der gereinigten DWV Viruspräparation immunisiert. Außerdem wurden

zwei Mäuse mit den gereinigten, bakteriell exprimierten und chromatographisch aufgereinigten Strukturproteinen VP1, VP2 und VP3 des VDV/DWV-B immunisiert. Die Serokonversion der Mäuse, die mit den rekombinanten Strukturproteinen immunisiert wurden, konnte bereits bestätigt werden (siehe Abbildung 3.9)

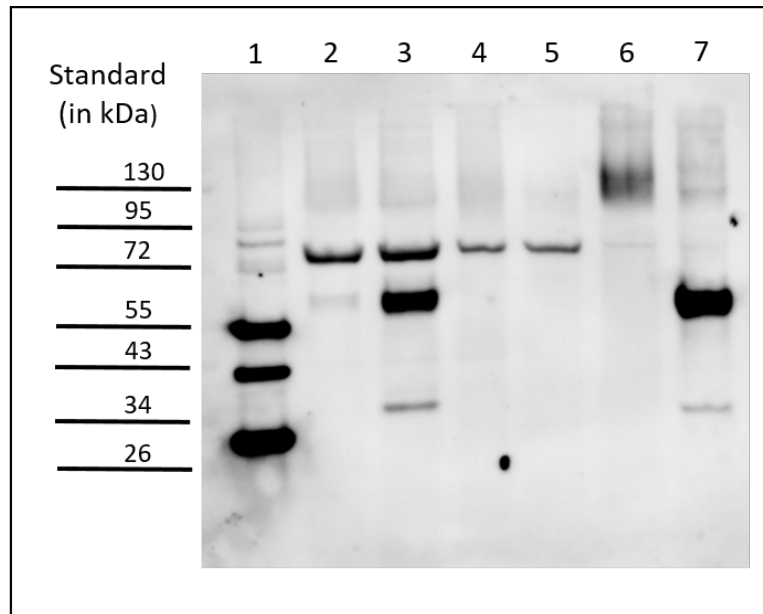


Abbildung 3.9: Westernblot mit dem Serum (1:2000 in 1x PBS-T 0,1 % verdünnt) einer der mit rekombinanten VP1, VP2 und VP3 immunisierten Mäuse; die Antikörper im Serum der Maus zeigen ein starkes, spezifisches Signal gegen die rekombinanten Proteine (Spur 1); 1: rekombinante Proteine (VP1, VP2, VP3) 2: schwach DWV-positive Bienenpoolprobe 3: stark DWV-positive Poolprobe 4 und 5: DWV-negative Bienenbrutpoolprobe 6: DWV-negative Arbeiterin 7: DWV-negative Drohne

### 3.3.3 Antikörper

#### 3.3.3.1 Akutes Bienenparalysevirus (ABPV)

##### 3.3.3.1.1 Antikörper gegen die bakteriell exprimierten Strukturproteine VP1, VP2 und VP3

Nach der Fusion und dem ersten, initialen Screening mittels ELISA gegen die gereinigten Strukturproteine konnten mehr als 100 positive Hybridome identifiziert werden. Die Hybridome wurden außerdem negativ auf Antigene aus *E. coli* getestet. Aus dieser großen Anzahl an Hybridomen wurden 30 ausgewählt, die ein sehr gutes Wachstum in der Zellkultur zeigten und mittels Immunoblot gegen native und denaturierte ABPV Virusproteine aus einer hochpositiven Bienenprobe gescreent. Weiters wurden die Hybridome gegen unspezifische Bindungen gegen Bienenproteine aus Arbeiterinnen- und Drohnenpuppen sowie aus adulten Arbeiterinnen und Drohnen getestet. Nur Kandidaten, die sowohl natives als auch denaturiertes Virusantigen aus der Bienenprobe erkannten, wurden auf ihre Eignung als Antikörper im Sandwich-ELISA getestet. Dabei kamen 14 Antikörper in die engere Auswahl, die zuerst an serumfreies Medium angepasst wurden und im Anschluss mittels Protein-G gekoppelten Testplatten in unterschiedlichen Kombinationen im Sandwich-ELISA untersucht wurden. Hierbei diente eine hochpositive ABPV-Bienenpoolprobe als zu detektierendes Antigen. Alle Antikörper wurden außerdem auf ihre Reaktivität gegen virusnegatives Bienenlysate und den generellen Hintergrund mit PBS getestet. Aus diesen Kandidaten wurden die drei Antikörper (anti-ABPV VUPLA7, anti-ABPV RF9 und anti-ABPV RC11) mit dem stärksten spezifischen Signal und dem niedrigsten Hintergrundsignal ausgewählt. Die serumfreien Zellkulturüberstände der drei

Hybridome wurden aufgereinigt und die Eluatfraktionen mittels Coomassie-Brillant-Blau Färbung des Polyacrylamidgels visualisiert (siehe Abbildung 3.10). Zusätzlich wurden die drei Antikörper im Westernblot getestet (siehe Abbildung 3.11)

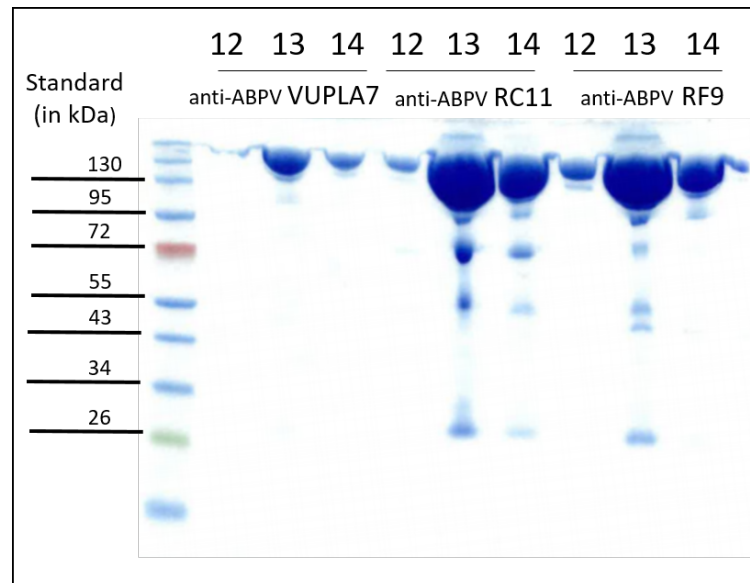


Abbildung 3.10: Coomassie-gefärbtes Polyacrylamidgel der drei Eluatfraktionen nach Aufreinigung der Hybridomüberstände über Protein G Affinitätschromatographie der anti-ABPV Antikörper VUPLA7, RC11 und RF9 mit der höchsten Proteinkonzentration.

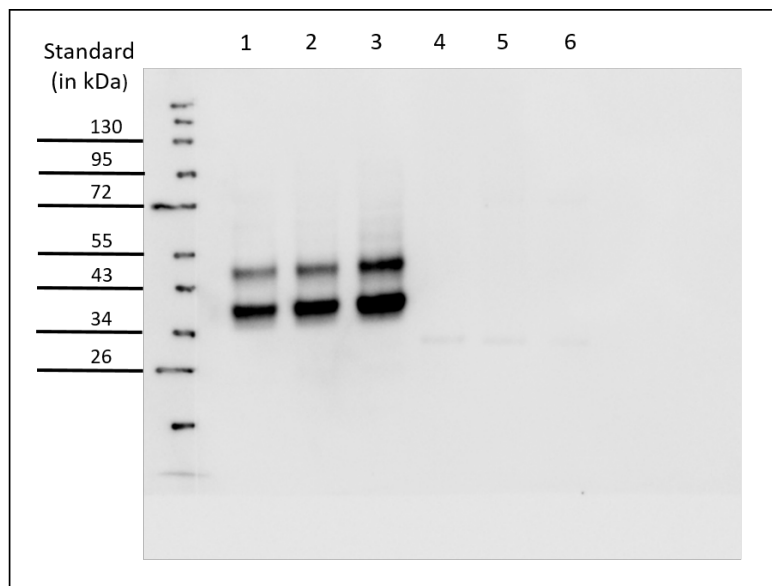


Abbildung 3.11: direkter Westernblot mit HRP-konjugiertem anti-ABPV RF9 als Antikörper, 1:1000 verdünnt. In den Spuren 1-3 sind unterschiedliche ABPV-positive Bienenproben aufgetragen, in der Spur 4 eine ABPV-negative Arbeiterin, in der Spur 5 eine ABPV-negative adulte Drohne und in der Spur 6 eine ABPV-negative Drohnenpuppe.

### 3.3.3.1.2 Antikörper gegen das hochreine Virus

Nach der Fusion der Mäuse, die mit der gereinigten Viruspräparation immunisiert wurden, konnten insgesamt 11 96-well Zellkulturplatten mit jeweils mindestens einem Hybridomzellklon hochgezogen werden.

Damit es nicht zu unerwünschten Kreuzreaktionen (und damit falsch positiven Zellklonen) mit Bienenproteinen kommt, wurde auch hier zuerst gegen die rekombinanten, viralen Strukturproteine gescreent und im Anschluss auf das native Virusantigen aus einer positiven Bienenprobe. Insgesamt gab es nach dem Screening im ELISA 11 hochpositive Kandidaten. Um etwaige kreuzreaktive Antikörper auszufiltern, wurden die 11 Kandidaten zusätzlich mittels Immunoblot gescreent, wobei 8 von 11 eine unspezifische Bindung an Bienenproteine zeigten. Die drei übrigen Antikörper zeigten ein sehr starkes Signal gegen die native, ABPV-positive Bienenprobe und wurden im Anschluss mittels Protein-G gekoppelten Testplatten in unterschiedlichen Kombinationen im Sandwich-ELISA getestet. Leider zeigten alle drei Antikörper ein zu hohes Hintergrundsignal und konnten daher nicht für die weitere Arbeit genutzt werden.

### 3.3.3.2 Sackbrutvirus (SBV)

#### 3.3.3.2.1 Antikörper gegen das bakteriell exprimierte Strukturprotein *mCherry-VP1*

Das initiale Screening mittels ELISA auf Reaktivität gegen das rekombinante Antigen (*mCherry-VP1*) ergab insgesamt etwa 55 stark reaktive Zellklone pro Maus. Die weitere Charakterisierung der Hybridomüberstände umfasste Westernblots mit dem rekombinanten Antigen (*mCherry-VP1*) sowie Virus aus SBV infizierten Bienenpuppen. Dabei wurden 17 Antikörper identifiziert, die das rekombinante Antigen (*mCherry-VP1*) erkennen. Jene Hybridomzellklone, welche eine ausreichende Sensitivität sowie Spezifität gegen das Antigen (*mCherry-VP1*) gezeigt haben, wurden mittels der so genannten „limiting dilution method“ reselektiert, um eine homogene (klonale) Hybridomzellpopulation mit stabiler Antikörperproduktion aufzubauen. Im weiteren Verlauf des Screenings wurden die Antikörper gegen natives Bienenhomogenat getestet. Keiner der getesteten Antikörper war in der Lage, virale, native Eiweißstrukturen direkt aus der Bienenprobe zu erkennen.

#### 3.3.3.2.2 Antikörper gegen das hochreine Virus

Das initiale Screening mittels ELISA wurde direkt gegen eine native, SBV-positive Bienenprobe durchgeführt. Hierbei konnten etwa 23 stark reaktive Hybridome identifiziert werden. Die Kandidaten wurden zusätzlich noch im Immunoblot getestet. Aus den besten potentiellen Kandidaten wurden drei Antikörper, die ein gutes Wachstum in der Zellkultur zeigten und sich am besten an serumfreies Medium anpassen ließen, ausgewählt. Diese drei Antikörper (anti-SBV 6E1, anti-SBV 3G2, anti-SBV 3E4) wurden mit HRP konjugiert und in unterschiedlichen Kombinationen direkt im Sandwich-ELISA getestet. Dabei stellte sich heraus, dass 6E1 als Fangantikörper die beste Sensitivität in Kombination mit 3E4 oder 3G2 zeigte.

### 3.3.3.3 Flügeldeformationsvirus (DWV)

#### 3.3.3.3.1 Antikörper gegen das bakteriell exprimierte Strukturprotein VP1 des DWV-A

Die Nukleotid-Sequenzen der Immunglobuline zweier Hybridome (antiDWV VP1A1 und antiDWV VP1B1) wurden bestimmt, um eine rekombinante Expression der Antikörper und eine Manipulation der Moleküle zu ermöglichen. Ein synthetisches Gen in einem geeigneten Expressionsvektor (pcDNA) mit der entsprechenden

Sequenz der Immunglobuline konnte hergestellt werden. Dadurch wird sichergestellt, dass die genetische Information erhalten bleibt. Mit der Sequenzinformation im geeigneten Expressionskonstrukt konnten die chimären Antikörper erfolgreich in einem eukaryontischen Expressionssystem (HEK-Zellen) produziert werden. Die Expression und Funktionalität der Antikörper wurde mittels Westernblot bestätigt. Die Sequenzierung der IgGs bildet außerdem die Grundlage, rekombinante Moleküle mit anderen FC-Regionen zu erzeugen, um kostengünstige, kommerziell erhältliche Sekundärantikörper zu verwenden und damit die Kosten des Assays in Zukunft senken zu können.

Die bereits vorhandenen Antikörper gegen DWV (antiDWV VP1A1, antiDWV VP1B1 und antiDWV VP1B6) weisen eine hohe Spezifität und Sensitivität auf, allerdings benötigen sie einen bestimmten Probenpuffer für die Lyse der Bienen, der das zu detektierende Virusantigen denaturiert. Die Antikörper sind daher für die im Labor durchgeführten, günstigen ELISA-Tests geeignet. Aufgrund der aufwendigeren Probenaufarbeitung sind die Antikörper allerdings nicht für den Schnelltest geeignet, der durch den Imker selbst durchgeführt werden soll.

### 3.3.3.3.2 Antikörper gegen die rekombinanten Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 des VDV/DWV-B

Damit Antikörper generiert werden, die native Virusstrukturen direkt aus der Bienenprobe erkennen, wurden zwei Mäuse über einen Zeitraum von 4 Wochen mit den rekombinanten Antigenen immunisiert. Die Serokonversion wurde mittels Blutentnahme im Westernblot bestätigt. Anschließend erfolgte die Fusion mit den Myelomzellen. Die Hybridome befinden sich derzeit im Selektionsmedium und können in Kürze initial mit ELISA gescreent werden.

### 3.3.3.3.3 Antikörper gegen das hochreine Virus

Zusätzlich zur Immunisierung von Mäusen mit rekombinanten Antigenen des VDV/DWV-B wurde außerdem zwei Mäuse über einen Zeitraum von 4 Wochen mit der hochreinen Viruspräparation (siehe Abbildung 3.11) immunisiert. Die Serokonversion wurde mittels Blutentnahme im Westernblot bestätigt.

## 3.3.4 ELISA-Tests mit definierten Proben

Um die Sensitivität des direkten Sandwich-ELISAs zu bestimmen, wurde der jeweils ABPV bzw. SBV positive Virusstock verdünnt und im Duplikat im Sandwich-ELISA eingesetzt. Für ABPV als zu detektierendes Antigen wurden alle drei Antikörper als Fangantikörper getestet; jeweils mit anti-ABPV VUPLA7 als enzymmarkierter Detektionsantikörper. Das Detektionslimit war bei der Verwendung von anti-ABPV VUPLA7 als Fang- und Detektionsantikörper geringfügig besser als bei den anderen Kombinationen und lag bei einer Verdünnung der Probe zwischen 1:640 und 1:1280 (siehe Abbildung 3.12). Die Genomkopien der viralen Nukleinsäuren in den Verdünnungen wurden mittels RT-qPCR bestimmt. Für die Verdünnung von 1:1280 ergaben sich  $4,18 \times 10^6$  GE/ $\mu$ l RNA-Extrakt, das etwa  $9 \times 10^8$  GE/0,5 mL Originalprobe entspricht.

Bei der Etablierung des Sandwich-ELISAs für SBV wurde in einem Vorversuch bereits die beste Antikörper Kombination bestimmt und nur diese für die Bestimmung des Detektionsminimums herangezogen (siehe Abbildung 3.13). Dieses liegt bei der verwendeten Probe bei 1:1280, was etwa  $5 \times 10^7$  Genomäquivalenten (GE)/ $\mu$ L RNA-Extrakt entspricht und damit  $10 \times 10^9$  GE/0,5 mL Originalprobe.

Bei der Etablierung des ELISAs gegen DWV mit denaturierten Proben konnte das Detektionslimit bei den beiden besten Kandidaten (anti-DWV A1 und anti-DWV B6) bei etwa  $3 \times 10^6$  GE/ $\mu$ L RNA-Extrakt gesetzt werden, was etwa  $6 \times 10^8$  GE/0,5 mL Originalprobe entspricht.



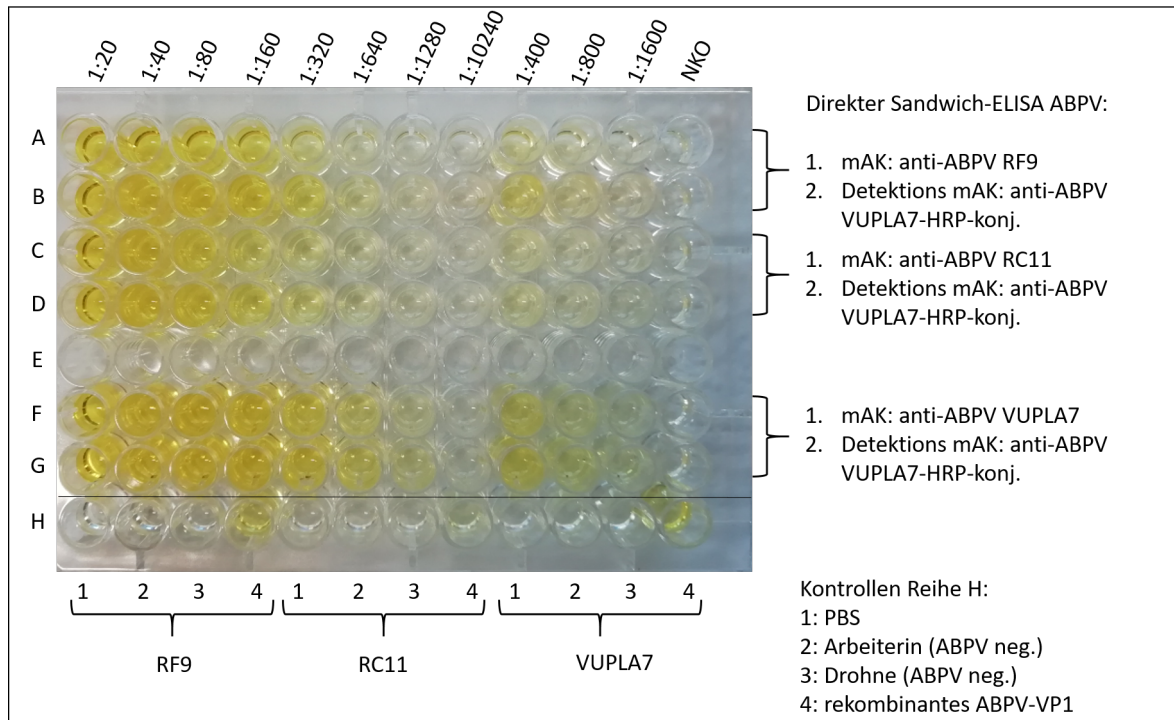


Abbildung 3.12: Direkter Sandwich ELISA der anti-ABPV Antikörper. Um die Sensitivität des Assays zu bestimmen, wurde eine definiert positive Probe im Duplikat in einer Verdünnungsreihe aufgetragen. Das Detektionsminimum liegt bei einer Verdünnung von 1:1280.

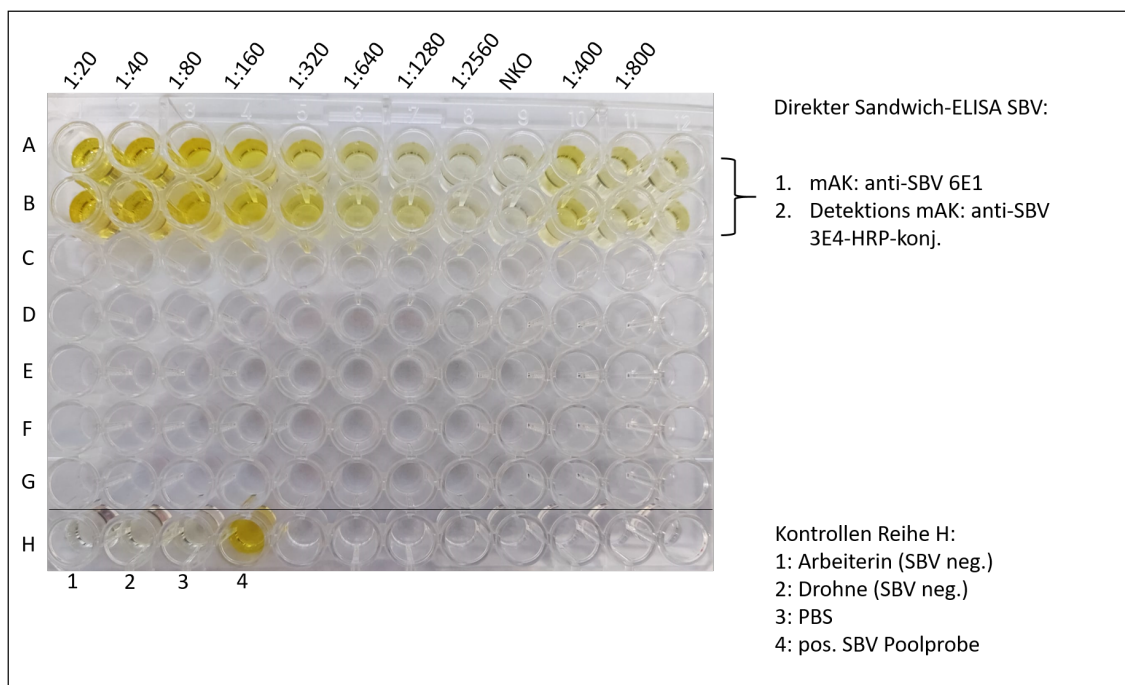


Abbildung 3.13: Bestimmung des Detektionsminimums der anti-SBV Antikörper im direkten Sandwich ELISA in Duplikaten. Das Detektionsminimum liegt bei 1:1280.

### 3.3.5 ELISA-Tests mit Feldproben

Die Antikörper gegen ABPV (VUPLA7, RC11 und RF9) sowie die Antikörper gegen SBV (3E4, 6E1, 3G2) wurden mit Feldproben, die aus Modul A zur Verfügung gestellt wurden, analysiert. Dies diente insbesondere dazu, sicherzustellen, dass die in Österreich kursierenden Feldstämme von den produzierten Antikörpern erkannt werden.

#### 3.3.5.0.1 Isotypisierung der Antikörper

Die Isotypisierung der Antikörper ergab folgendes Ergebnis:

Tabelle 3.3: Isotypisierung der Antikörper

mAK	Isotyp
anti-ABPV VUPLA7	IgG2a
anti-ABPV RC11	IgG2a
anti-ABPV RF9	IgG2a
anti-SBV 6E1	IgG2b
anti-SBV 3G2	IgG2b
anti-DWV VP1A1	IgG1
anti-DWV VP1B6	IgG1

## 3.4 Diskussion

Es ist allgemein akzeptiert, dass für die epidemisch auftretenden Völkerverluste bei Honigbienen in Europa und Nordamerika im Herbst und Winter der ubiquitäre Varroabefall in Kombination mit hohen Infektionsbelastungen mit DWV, SBV oder ABPV verantwortlich ist. Da die Viren unterschwellig in vielen Völkern nachweisbar sind, ohne dass es zu Schäden kommt, ist es wichtig nicht nur einen qualitativen (ja/nein) sondern auch einen quantitativen (wie hoch ist die Belastung) Nachweis zu führen. Die Befallsstärke der Varroa-assoziierten Viren lässt sich daher auch als prognostischer Marker für den Gesundheitszustand bzw. dem drohenden Zusammenbruch eines Bienenvolks verwenden. Derzeit basiert die Virusdiagnostik auf molekularbiologischen RT-qPCR Methoden, bei denen jedoch hohe Laborkosten entstehen. Für einfache und schnell durchzuführende Massentests zur Diagnostik von Virusinfektionen werden in Human- und Tiermedizin häufig serologische Verfahren angewendet. Diese sind unempfindlich gegenüber der Probenlagerung, sehr spezifisch und erheblich kostengünstiger. Auch kann auf teure Gerätschaften verzichtet werden. Für die Bekämpfung der Covid-19 Pandemie waren Antigenschnelltests von entscheidender Bedeutung, da sie insbesondere Infizierte mit hoher Viruslast erkannt haben. Übertragen auf Bienenviren ist das auch Ziel dieses Projekts.

Im Modul V des Zukunft Biene 2 Projekts wurden bereits vorhandene Reagenzien gegen Strukturproteine von DWV genutzt und neue Reagenzien gegen SBV, ABPV und VDV/DWV-B generiert, um serologische Testverfahren zu etablieren. Durch Verwendung der Hybridomtechnik konnten erfolgreich hochspezifische und sensitive Antikörper gegen ABPV und SBV erzeugt werden, die natives, unbehandeltes Antigen in einer Probe erkennen. Das erleichtert die einfache und schnelle Probenbearbeitung im Labor bzw. durch den Anwender des Schnelltests. Die Bienenproben (adulte Honigbienen (ABPV, DWV) oder Honigbienenpuppen (SBV)) können in einer ungefährlichen phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) homogenisiert und Virusproteine erfolgreich aus diesen Proben detektiert werden. Für den Nachweis von DWV ist derzeit noch ein spezieller Probenpuffer erforderlich, in Kürze werden aber auch hier Antikörper zur Verfügung stehen, die natives Virus in der Probe erkennen. Somit wird die Probenaufarbeitung (für den Nachweis von ABPV, SBV und DWV) vereinfacht und kann aus derselben Probe erfolgen. Voraussetzung für einen positiven Virusnachweis ist, dass die zu analysierende Bienenprobe eine relativ hohe Viruslast aufweist. Dies steht im Gegensatz zur RT-qPCR, die in der Lage ist, bereits kleinste Mengen von viralem Erbmateriale nachzuweisen und auch quantifizieren zu können. Durch die RT-qPCR ist man daher in der Lage, in fast jedem Honigbienenvolk einen positiven Virusnachweis zu erbringen. Der alleinige Nachweis eines Virus sagt allerdings nichts über den Gesundheitszustand eines Bienenvolkes aus. Viren kommen in geringen Konzentrationen immer in einem Volk vor, ohne eine Erkrankung hervorzurufen. Erst, wenn diese Viren einen gewissen Schwellenwert überschreiten, kommt es zu einem klinisch sichtbaren Schadbild und zu Völkerverlusten. Durch den direkten Übertragungsweg über die Varroamilbe kommt es daher gerade im Spätsommer bzw. Herbst zu einem Anstieg der Virenbelastung. Die Viren werden über die Milbe direkt in die Biene - unter Umgehung des angeborenen Immunsystems - eingebracht und können sich dort effizient vermehren. Dies führt in kurzer Zeit zu einem relativ hohen Anstieg der Virenanzahl. Um das Ergebnis eines Virusnachweises im Volk richtig interpretieren zu können, ist die Anzahl der Viren im Volk ausschlaggebend.

Mit den im Projekt entwickelten Reagenzien wird nur dann ein positives Ergebnis erzielt, wenn auch tatsächlich eine hohe (und damit schädliche) Virusmenge vorhanden ist. Dies lässt nicht nur Rückschlüsse auf die Virensituation in einem Volk zu, sondern auch auf die Varroabelastung im Volk und könnte daher auch als eine Kontrolle der Varroabehandlung angesehen werden. Die im Projekt generierten Reagenzien sollen dabei helfen, die (Winter)Verluste der Imkereien einzudämmen. Mit diesem Testsystem möchten wir Imkern ein Werkzeug in die Hand geben, mit dem sie ihre Kolonien im Verdachtsfall untersuchen und konkrete Handlungen ableiten können. Schwächere Völker, die noch nicht klinisch an einer Virose erkrankt sind, aber wo bereits eine hohe Virusmenge im Volk zirkuliert, können so entdeckt und Sanierungsmaßnahmen können

abgeleitet werden (z.B. eine Kunstschwarmbildung mit neuer Königin oder eine erneute Varroabehandlung). Außerdem kann durch ein positives Testergebnis verhindert werden, dass Völker mit einer massiven Viruslast mit starken, virusnegativen Völkern vereinigt werden. Ein weiteres Einsatzgebiet des Tests wäre zum Beispiel als eine Art Gesundheitszeugnis beim Kauf/Verkauf von Bienenvölkern.

Das Projektziel der Entwicklung plattenbasierter Hochdurchsatztests, konnte durch die Etablierung eines direkten Sandwich-ELISAs erreicht werden. Hier können etwa 90 Proben auf einer Testplatte analysiert werden, wodurch die Kosten des Verfahrens relativ niedrig sind (zwischen 5 und 10 € pro Probe).

Das optimale Format des Schnelltests wird mit Entwicklungspartnern in den nächsten Monaten festgelegt, da es verschiedene am Markt etablierte Verfahren gibt. Grundsätzlich lassen sich aber nicht nur die drei Viren nachweisen. Als attraktive Erweiterung wäre der gleichzeitige Nachweis anderer wichtiger Seuchenerreger (AFB, Nosema,..) denkbar. Da bei der Diagnostik am Bienenstand Versand und Transportaufwand entfallen und der Imker, Tierarzt oder Bienensachverständige unmittelbar vor Ort handeln kann, wäre ein solcher Multiplex-Test eine bedeutende Erleichterung in der Kontrolle von Bienenkrankheiten.

## Veröffentlichungen und Vortragstätigkeit im Zeitraum der Projektdauer (22. Dezember 2017 bis 30. September 2021)

### Projektbezogene Publikationen:

- Linde Morawetz, Hemma Köglberger, Antonia Griesbacher, Irmgard Derakhshifar, Karl Crailsheim, Robert Brodschneider und Rudolf Moosbeckhofer (2019). „Health Status of Honey Bee Colonies (*Apis Mellifera*) and Disease-Related Risk Factors for Colony Losses in Austria“. *Plos One* 14.7, e0219293. DOI: [10.1371/journal.pone.0219293](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219293)
- Robert Brodschneider, Kristina Gratzner, Elfriede Kalcher-Sommersguter, Helmut Heigl, Waltraud Auer, Rudolf Moosbeckhofer und Karl Crailsheim (2019c). „A Citizen Science Supported Study on Seasonal Diversity and Monoflorality of Pollen Collected by Honey Bees in Austria“. *Scientific Reports* 9.1, S. 16633. DOI: [10.1038/s41598-019-53016-5](https://doi.org/10.1038/s41598-019-53016-5)
- Hannes Oberreiter und Robert Brodschneider (2020). „Austrian COLOSS Survey of Honey Bee Colony Winter Losses 2018/19 and Analysis of Hive Management Practices“. *Diversity* 12.3, S. 99. DOI: [10.3390/d12030099](https://doi.org/10.3390/d12030099)
- Linde Morawetz, Adi Steinrigl, Hemma Köglberger, Irmgard Derakhshifar, Antonia Griesbacher, Rudolf Moosbeckhofer und Karl Crailsheim (2020). „Prevalence of Bee Viruses in Austria in the Year 2018“. In: *Proceedings of 5th Austrian Citizen Science Conference 2019 — PoS(ACSC2019)*. 5th Austrian Citizen Science Conference 2019. Obergurgl, Austria: Sissa Medialab, S. 007. DOI: [10.22323/1.366.0007](https://doi.org/10.22323/1.366.0007)
- Alison Gray, Nouredine Adjlane, Alireza Arab, Alexis Ballis, Valters Brusbardis, Jean-Daniel Charrière, Robert Chlebo, Mary F. Coffey, Bram Cornelissen, Cristina Amaro da Costa, Bjørn Dahle, Jiří Danihlák, Marica Maja Dražić, Garth Evans, Mariia Fedoriak, Ivan Forsythe, Anna Gajda, Dirk C. de Graaf, Aleš Gregorc, Iliyana Ilieva, Jes Johannesen, Lassi Kauko, Preben Kristiansen, Maritta Martikkala, Raquel Martín-Hernández, Carlos Aurelio Medina-Flores, Franco Mutinelli, Solenn Patalano, Aivar Raudmets, Gilles San Martin, Victoria Soroker, Jevrosima Stevanovic, Aleksandar Uzunov, Flemming Vejsnaes, Anthony Williams, Marion Zammit-Mangion und Robert Brodschneider (2020). „Honey Bee Colony Winter Loss Rates for 35 Countries Participating in the COLOSS Survey for Winter 2018–2019, and the Effects of a New Queen on the Risk of Colony Winter Loss“. *Journal of Apicultural Research*, S. 1–8. DOI: [10.1080/00218839.2020.1797272](https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1797272)
- Despina Popovska Stojanov, Lazo Dimitrov, Jiří Danihlák, Aleksandar Uzunov, Miroљjub Golubovski, Sreten Andonov und Robert Brodschneider (2021). „Direct Economic Impact Assessment of Winter Honeybee Colony Losses in Three European Countries“. *Agriculture* 11.5, S. 398. DOI: [10.3390/agriculture11050398](https://doi.org/10.3390/agriculture11050398)
- Benedikt Becsi, Herbert Formayer und Robert Brodschneider (2021). „A Biophysical Approach to Assess Weather Impacts on Honey Bee Colony Winter Mortality“. *Royal Society Open Science* 8.9, S. 210618. DOI: [10.1098/rsos.210618](https://doi.org/10.1098/rsos.210618)

### Projektbezogene Kongressbeiträge (Poster und Vorträge):

- Morawetz L, Köglberger H, Derakhshifar I, Mayr J, Moosbeckhofer R, Crailsheim, K. Health status and factors identified for winter losses of honey bee colonies. Vortrag: Eurbee 8, Gent 2018
- Morawetz L, Griesbacher A, Kuchling S, Mayr J, Brodschneider R, Crailsheim K, Moosbeckhofer R. Österreichisches Bienenbrot-Monitoring auf Pestizidbelastung in unterschiedlichen Landnutzungstypen (Projekt Zukunft Biene). Poster: 66. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V; Frankfurt 2019
- Morawetz L, Steinrigl A, Köglberger H, Derakhshifar I, Griesbacher A, Moosbeckhofer R, Crailsheim, K. Bienen und ihre Viren - Gesundheitsmonitoring in Österreichs Bienenvölkern („Zukunft Biene 2“). Poster: 5. Österreichische Citizen Science Konferenz, Obergurgl 2019

- Seitz K, Rümenapf T, Dinhopf N, Plevka P, Dikunová A, Lamp B. (2019) First molecular clone of Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV); Poster: 29. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV), Düsseldorf 2019
- Seitz K, Power K, Rümenapf T, Buczolic K, Dinhopf N, Lamp B. (2019) First molecular clone of Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV); Vortrag; Honeybee Health Symposium Apimondia 2019, Rom
- Morawetz L, Steinrigl A, Köglberger H, Griesbacher A, Mayr J, Brodschneider R, Crailsheim K, Moosbeckhofer R (2019); Winter colony losses 2015/16 in Austria: are there correlations with pests, pathogens and pesticide residuals?; Poster; 46th Apimondia – International Apicultural Congress; Montréal, Kanada, 08.09 - 12.09.2019
- Morawetz L, Steinrigl A, Köglberger H, Derakhshifar I, Griesbacher A, Moosbeckhofer R, Crailsheim K (2019); Virus monitoring of Austrian honey bee colonies: Are virus titers correlating with symptoms in the field?; Poster; 46th Apimondia – International Apicultural Congress; Montréal, Kanada, 08.09 - 12.09.2019
- Morawetz L, Steinrigl A, Köglberger H, Derakhshifar I, Griesbacher A, Moosbeckhofer R. (2020) Wie erkennt man ein krankes Bienenvolk? Ergebnisse der Beobachtungen von Imker\*innen aus dem Virenmonitoring (Zukunft Biene 2). Poster: Österreichische Citizen Science Konferenz, Wien, 14.09. - 16.09.2020
- Morawetz L. (2020) Bee health monitoring in Austria. Vortrag: SAMS final conference, online, 25.11.-26.11.2020

#### Projektbezogene Vorträge

- Morawetz L „Beobachtungsstudie des Projekts Zukunft Biene: Ursachenforschung zur Wintersterblichkeit“ Wanderlehrerfortbildungstagung des Österr. Imkerbundes, Graz, 27.10.2018
- Morawetz L „Beobachtungsstudie und Posthoc Untersuchungen: Einflussfaktoren auf den Überwinterungserfolg“ Runder Tisch Zukunft Pflanzenbau, AGES, Wien, 8.11.2018
- Moosbeckhofer R „Ergebnisse der Beobachtungs- und Post hoc-Studie zu Einflussfaktoren auf den Überwinterungserfolg von Bienenvölkern“ Fachtagung Österreichischer Erwerbsimkerbund, Premstätten, 24.02.2019
- Morawetz L „Zukunft Biene 2 – Virenmonitoring“ Gesundheitsreferententagung des Österreichischen Imkerbundes, AGES, Wien, 09.05.2019
- Brodschneider R, Auer W, Crailsheim K, Danihlik J, Gratzer K, Heigl H, Moosbeckhofer R, Omar E „Der Pollenspeiseplan unserer Bienen – Vielfalt für gesunde Bienen“. Völkermarkt, 12.10.2019.
- Morawetz L „Zukunft Biene 2 - Zwischenergebnisse des Virenmonitorings“. Wanderlehrerfortbildungstagung, Altlengbach in NÖ, 19.10.2019
- Morawetz L, Sandén T, Dörler D, Heigl F „Wissenschaft trifft Öffentlichkeit: Citizen Science in AGES Projekten“. AGES WSP, Lunchtime Learning, Wien, 31.10.2019
- Brodschneider R "Pollen diversity as a factor for honey bee development". Agdermotet, Norwegen, 9.11.2019.
- Morawetz L „Das kleine ABC der Bienenviren". Science Slam im Zuge der 6. Österreichischen Citizen Science Konferenz, Online, 15.9.2020
- Morawetz L „Gemeinsam mit Imkern gegen Bienenviren". Junior Biologicum, Online, 28.10.2020
- Morawetz L „Bericht Virenmonitoring von Zukunft Biene". 2. Fachtagung des Österreichischen Erwerbsimkerbundes, Online, 20.02.2021
- Brodschneider R "Honigbiene, Blütenvielfalt und Klima". Impulsvortrag Biodiversität, Online, 29.06.2021
- Brodschneider R "Winterverluste von Bienenvölkern. Ergebnisse und Ableitung praxisrelevanter Empfehlungen". Zukunft Biene 2 Online Seminar, Online, 01.07.2021
- Seitz K „Entwicklung kostengünstiger Testverfahren zum Nachweis des Flügeldeformationsvirus, des Sackbrutvirus und des Akute Bienenparalyse-Virus". Zukunft Biene 2 Online Seminar, Online,

01.07.2021

- Morawetz L "Mehrjährige Prävalenzerhebung von Bienenviren in Österreich". Zukunft Biene 2 Online Seminar, Online, 01.07.2021

#### Projektbezogene Beiträge in den Medien

- Crailsheim K, Brodschneider R (2019) Ursachen der Verluste an Honigbienen in Österreich. Der Pflanzenarzt, 5: 27-29.
- Brodschneider R, Moosbeckhofer R, Crailsheim K (2019) Winterverluste 2017/18 und Aufruf zur Teilnahme an der Untersuchung 2019. Bienen aktuell, 4: 20-23.
- Lamp B, Seitz K (2019) Ursachen und Folgen des Bienensterbens. Reportage. ServusTV. <https://www.servus.com/tv/ursachen-und-folgen-des-bienensterbens>
- Brodschneider R (2020) Gut übern Winter. Aircampus. Podcasts der Grazer Universitäten. <https://www.aircampus-graz.at/podcasts/bienensterblichkeit/>
- Brodschneider R, Moosbeckhofer R, Crailsheim K (2020) Winterverluste 2018/19 und Aufruf zur Teilnahme an der Untersuchung 2020. Bienen aktuell, 4: 21-23.
- Morawetz L, Seitz K, Köglberger H, Rümenapf T, Steinrigl A (2020) Bienenviren und ihre Erforschung in Österreich (Projekt Zukunft Biene 2). Bienen aktuell, 7-8: 29-34.
- Morawetz L, Seitz K, Köglberger H, Rümenapf T, Steinrigl A (2020) Bienenviren und ihre Erforschung in Österreich (Projekt Zukunft Biene 2). Bienenpflege, 10: 462-465.
- Brodschneider R (2021) Winterverluste 2019/20 und Fokus auf Alter der Königin. Bienen aktuell, 4: 20-23.
- Brodschneider R, Morawetz L (2021) Zukunft Biene 2: Einladung zu kurzem Online-Seminar. Bienen aktuell, 6: 34.
- Morawetz L (2021) Hörndl, Körndl & Co. Podcast. [episode-7-wenn-s-summt-arbeiten-mit-bienen/](https://www.hoerndl.com/episode-7-wenn-s-summt-arbeiten-mit-bienen/)
- Brodschneider R (2021) Rettet die Bienen! Schutz oder Show? Servus Reportage. [servustv.com](https://www.servustv.com)

#### Projektbezogene Nennungen in den Medien

- studium.at. 13.06.2019. Bienensterben: Winterverluste laut Studie an Uni Graz im Mittelwert.
- orf.at. 13.06.2019. 15 Prozent der Bienenvölker starben im Winter. <https://orf.at/stories/3126641/>
- orf.at. 13.06.2019. Bienensterben: Winterverluste im Mittelwert. <https://steiermark.orf.at/stories/3000281/>
- citizen-science.at. 13.06.2019. Virenmonitoring. [citizen-science.at](https://www.citizen-science.at)
- derstandard.at. 13.06.2019. So schlimm steht es wohl doch nicht um unser liebstes Insekt. [derstandard.at](https://www.derstandard.at)
- krone.at. 13.06.2019. Bienensterben im Winter heuer im Mittelwert. <https://www.krone.at/1941068>
- wienerzeitung.at. 13.06.2019. Bienenverluste im Mittelwert. <https://www.wienerzeitung.at/nachrichten/wissen/natur/2013822-Bienenverluste-im-Mittelwert.html>
- Kronen Zeitung. 14.06.2019. Unseren Bienen geht es besser.
- blickinsland.at. 14.06.2019. Bienenverluste im Winter durchschnittlich. [blickinsland.at](https://www.blickinsland.at)
- Der Standard. 14.06.2019. 15 Prozent Winterverlust bei Bienenvölkern.
- Tiroler Tageszeitung. 14.06.2019. Weniger Verluste bei Bienen.
- TT Kompakt. 14.06.2019. Harter Winter für Bienen.
- Wiener Zeitung. 14.06.2019. Verluste an Bienen im mittleren Bereich.
- Kleine Zeitung. 14.06.2019. Durchschnittliche Bienenverluste im Winter
- wienerzeitung.at. 20.05.2020. Hohe Pollenvielfalt für Bienen, aber nur kurze Zeit. <https://www.wienerzeitung.at/nachrichten/wissen/natur/2061316-Hohe-Pollenvielfalt-fuer-Bienen-aber-nur-kurze-Zeit.html>

- news.uni-graz.at. 20.05.2020. Auf die Bäume. <https://news.uni-graz.at/de/detail/article/auf-die-baeume/>
- Die Presse. 23.05.2020. Pollenanalyse zieht Bienen die „Höschen“ aus.
- krone.at. 28.05.2020. Heimische Bienen haben Winter gut überstanden. <https://www.krone.at/2162778>
- suedtirolnews.it. 28.05.2020. Nur geringe Winterverluste bei Bienen in Österreich. [suedtirolnews.it](https://www.suedtirolnews.it)
- arf.at. 28.05.2020. Gut überwintert: Uni Graz meldet geringe Bienensterblichkeit. [arf.at](https://www.arf.at)
- sn.at. 28.05.2020. Nur geringe Winterverluste bei Bienen in Österreich. [sn.at](https://www.sn.at)
- wienerzeitung.at. 28.05.2020. Bienen im Aufwind. [wienerzeitung.at](https://www.wienerzeitung.at)
- puls24.at. 28.05.2020. Nur geringe Winterverluste bei Bienen in Österreich. [puls24.at](https://www.puls24.at)
- science.apa.at. 28.05.2020. Zoologen melden geringe Winterverluste bei Bienen in Österreich. [science.apa.at](https://www.science.apa.at)
- science.orf.at. 28.05.2020. Relativ guter Winter für Bienen in Österreich. <https://science.orf.at/stories/3200843/>
- drei.at. 28.05.2020. Nur geringe Winterverluste bei Bienen in Österreich.
- bvz.at. 28.05.2020. Nur geringe Winterverluste bei Bienen in Österreich. [bvz.at](https://www.bvz.at)
- volksblatt.at. 28.05.2020. Nur geringe Winterverluste bei Bienen in Österreich. <https://volksblatt.at/nur-geringe-winterverluste-bei-bienen-in-oesterreich/>
- vienna.at. 28.05.2020. Nur geringe Winterverluste bei Bienen in Österreich.
- kleinezeitung.at. 28.05.2020. Nur geringe Winterverluste bei Bienen in Österreich. [kleinezeitung.at](https://www.kleinezeitung.at)
- steiermark.orf.at. 28.05.2020. Geringe Winterverluste bei Bienen. <https://steiermark.orf.at/stories/3050684/>
- orf.at. 28.05.2020. Relativ guter Winter für Bienen in Österreich. <https://orf.at/stories/3167474/>
- noen.at. 28.05.2020. Nur geringe Winterverluste bei Bienen in Österreich. [noen.at](https://www.noen.at)
- studium.at. 28.05.2020. Zoologen melden geringe Winterverluste bei Bienen in Österreich. [studium.at](https://www.studium.at)
- kurier.at. 28.05.2020. Bienensterben in Österreich im Winter vergleichsweise gering. [kurier.at](https://www.kurier.at)
- vn.at. 28.05.2020. Nur geringe Winterverluste bei Bienen in Österreich. [vn.at](https://www.vn.at)
- Wiener Zeitung. 29.05.2020. Bienen im Aufwind.
- tt.com. 29.05.2020. Nur geringe Winterverluste bei Bienen in Österreich. <https://www.tt.com/artikel/16992370/nur-geringe-winterverluste-bei-bienen-in-oesterreich>
- blickinsland.at. 02.06.2020. Bienen überstanden Winter einigermaßen gut. <https://blickinsland.at/bienen-ueberstanden-winter-eingermassen-gut/>
- Bauern Zeitung. 04.06.2020. Heimische Imker: Es war ein guter Winter.
- stmk.lko.at. 15.06.2020. Rückgang bei Bienensterblichkeit. [stmk.lko.at](https://www.stmk.lko.at)
- Landwirtschaftlichen Mitteilungen. 15.06.2020. Rückgang bei Bienensterblichkeit.
- Magazin "Gesund & Leben", 06.2020. Im Stich gelassen! von Theresa Adelman [https://www.karriere-medizin.com/fileadmin/GL\\_Ausgaben/Gesund\\_und\\_Leben\\_in\\_Wien\\_6-20\\_Ansicht.pdf](https://www.karriere-medizin.com/fileadmin/GL_Ausgaben/Gesund_und_Leben_in_Wien_6-20_Ansicht.pdf)
- Bienen aktuell. 01.12.2020. Editorial.
- arf.at. 02.08.2021. Gesunde Bienen: Uni Graz meldet Winterverluste auf Vorjahresniveau. [arf.at](https://www.arf.at)
- aiz.info. 02.08.2021. Wider mehr als 400.000 Bienenvölker in Österreich. [aiz.info](https://www.aiz.info)
- bmlrt.gv.at. 02.08.2021. Gesunde Bienen: Wider mehr als 400.000 Bienenvölker. [bmlrt.gv.at](https://www.bmlrt.gv.at)
- science.apa.at. 02.08.2021. Grazer Zoologen orten geringe Winterverluste bei Bienen in Österreich. [science.apa.at](https://www.science.apa.at)
- regionews.at. 02.08.2021. Köstinger: Positive Bienenbilanz - wieder mehr als 400.000 Bienenvölker. [regionews.at](https://www.regionews.at)
- topnews.at. 02.08.2021. Köstinger: Positive Bienenbilanz - wieder mehr als 400.000 Bienenvölker. [topnews.at](https://www.topnews.at)
- tourismus-information.at. 02.08.2021. Köstinger: Positive Bienenbilanz - wieder mehr als 400.000 Bienenvölker.
- tourismus-zeitung.at. 02.08.2021. Köstinger: Positive Bienenbilanz - wieder mehr als 400.000 Bienen-



- völker. [tourismus-zeitung.at](https://www.tourismus-zeitung.at)
- brandaktuell.at. 02.08.2021. Köstinger: Positive Bienenbilanz - wieder mehr als 400.000 Bienenvölker. [brandaktuell.at](https://www.brandaktuell.at)
  - sbg.lko.at. 02.08.2021. Wieder mehr als 400.000 Bienenvölker in Österreich. [sbg.lko.at](https://www.sbg.lko.at)
  - tirol.lko.at. 02.08.2021. Wieder mehr als 400.000 Bienenvölker in Österreich. [tirol.lko.at](https://www.tirol.lko.at)
  - vbg.lko.at. 02.08.2021. Wieder mehr als 400.000 Bienenvölker in Österreich. [vbg.lko.at](https://www.vbg.lko.at)
  - kleinezeitung.at. 02.08.2021. Gute Nachrichten Bienen-Boom und geringe Verluste. [kleinezeitung.at](https://www.kleinezeitung.at)
  - orf.at. 02.08.2021. Zoologen: Geringe Winterverluste bei Bienen. [orf.at](https://www.orf.at)
  - ots.at. 02.08.2021. Köstinger: Positive Bienenbilanz - wieder mehr als 400.000 Bienenvölker. [ots.at](https://www.ots.at)
  - studium.at. 02.08.2021. Grazer Zoologen orten geringe Winterverluste bei Bienen in Österreich. [studium.at](https://www.studium.at)
  - vn.at. 02.08.2021. Positive Bienenbilanz - wieder mehr Bienenvölker in Österreich. [vn.at](https://www.vn.at)
  - lko.at. 02.08.2021. Wieder mehr als 400.000 Bienenvölker in Österreich. [lko.at](https://www.lko.at)
  - Vorarlberger Nachrichten. 03.08.2021. Positive Bienenbilanz - wieder mehr Bienenvölker in Österreich.
  - TT Kompakt. 03.08.2021. Österreichweit geringe Verluste bei Honigbienen.
  - Tiroler Tageszeitung. 03.08.2021. Winterverluste bei Bienen in Tirol gering.
  - meiheimat.at. 03.08.2021. Wieder mehr als 400.000 Bienenvölker. [meiheimat.at](https://www.meiheimat.at)
  - an24.at. 03.08.2021. Positive Bienenbilanz - wieder mehr als 400.000 Bienenvölker.
  - bauernzeitung.at. 03.08.2021. Positive Bienenbilanz - wieder mehr als 400.000 Bienenvölker. [bauernzeitung.at](https://www.bauernzeitung.at)
  - Oberösterreichisches Volksblatt. 03.08.2021. Gut überwintert.
  - Kronen Zeitung. 03.08.2021. Unsere Bienen summen wieder kräftig!
  - Kleine Zeitung. 03.08.2021. Bienen kamen gut durch den Winter.
  - lko.at. 12.08.2021. Honigbienen erholen sich. [lko.at](https://www.lko.at)
  - oekoreich.com. 17.08.2021. Große Erhebung zeigt: So geht's den Honigbienen in Österreich wirklich. [oekoreich.com](https://www.oekoreich.com)
  - Österreichische Bauernzeitung. 19.08.2021. Gesunde Bienen.

## Abkürzungsverzeichnis

- ABCDS** Die fünf Viren ABPV, BQCV, CBPV, DWV und SBV zusammengefasst
- ABPV** Akute Bienenparalyse Virus
- AGES** Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit
- AK** Antikörper
- BIEN** Abteilung für Bienenkunde und Bienenschutz der AGES
- BQCV** Schwarzes Königinnenzellen-Virus
- BMASGK** Bundesministerium für Arbeit, Soziales, Gesundheit und Konsumentenschutz  
(Stand 31.10.2017)
- CBPV** Chronische Bienenparalyse-Virus
- CI** Konfidenzintervall
- COLOSS** prevention of honey bee COlony LOSSes
- DWV-A/-B** Flügeldeformationsvirus Typ A bzw. Typ B
- ELISA** Enzyme-linked Immunosorbent Assay
- EU-RL** EU-Referenzlabor
- FKS** fetales Kälberserum
- GE** Genomäquivalente
- GLZM** Generalisiertes Lineares Modell
- IAPV** Israelisches Akute Bienenparalyse-Virus
- IgG** Immunglobulin G
- IMAC** immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
- IPTG** Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranosid
- KBV** Kashmir-Bienenvirus
- LOD und LOQ** Limit of Detection, Limit of Quantifikation
- mAk** monoklonale Antikörper
- MOBI** Abteilung für Molekularbiologie des Institutes für veterinärmedizinische Untersuchungen Mödling  
der AGES
- PBS** Phosphatgepufferte Salzlösung
- Q1** Unteres Quartil, 25% der Werte eines Datensatzes liegen darunter
- Q3** Oberes Quartil, 25% der Werte eines Datensatzes liegen darüber
- RT** Raumtemperatur
- RT-qPCR** Reverse Transkriptase quantitative PCR
- SBV** Sackbrutvirus
- SDS-PAGE** Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
- SOP** Standard operating procedure
- TMB** Tetramethylbenzidin
- VDV-1** *Varroa destructor* Virus-1 (=DWV-B)
- VP** Virusprotein

# Literatur

- Abd Al-Fattah, Mohammad Abd Al-Wahab, Yasser Yehia Ibrahim und Marwa Ibrahim Haggag (2021). „Some Biological Aspects of Honey Bee Colonies in Relation to the Age of Beeswax Combs“. *Journal of Apicultural Research* 60.3, S. 405–413. DOI: [10.1080/00218839.2021.1899657](https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1899657) (siehe S. 116).
- Al Naggari, Yahya und Robert J. Paxton (2020). „Mode of Transmission Determines the Virulence of Black Queen Cell Virus in Adult Honey Bees, Posing a Future Threat to Bees and Apiculture“. *Viruses* 12.5, S. 535. URL: <https://www.mdpi.com/1999-4915/12/5/535> (siehe S. 134).
- Al Toufailia, Hasan, Luciano Scandian und Francis L W Ratnieks (2015). „Towards Integrated Control of Varroa: Comparing Application Methods and Doses of Oxalic Acid on the Mortality of Phoretic *Varroa Destructor* Mites and Their Honey Bee Hosts“. *Journal of Apicultural Research* 54.2, S. 108–120. DOI: [10.1080/00218839.2015.1106777](https://doi.org/10.1080/00218839.2015.1106777) (siehe S. 122).
- Alburaki, Mohamed et al. (2017). „Performance of Honeybee Colonies Located in Neonicotinoid-Treated and Untreated Cornfields in Quebec“. *Journal of Applied Entomology* 141.1-2, S. 112–121. DOI: [10.1111/jen.12336](https://doi.org/10.1111/jen.12336) (siehe S. 11).
- Alkassab, Abdulrahim T. et al. (2020). „Effect of Contamination and Adulteration of Wax Foundations on the Brood Development of Honeybees“. *Apidologie* 51.4, S. 642–651. DOI: [10.1007/s13592-020-00749-2](https://doi.org/10.1007/s13592-020-00749-2) (siehe S. 115).
- Amdam, Gro V. et al. (2004). „Altered Physiology in Worker Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) Infested with the Mite *Varroa Destructor* (Acari: Varroidae): A Factor in Colony Loss During Overwintering?“ *Journal of Economic Entomology* 97.3, S. 741–747. DOI: [10.1093/jee/97.3.741](https://doi.org/10.1093/jee/97.3.741) (siehe S. 10, 133).
- Amiri, Esmail et al. (2015). „Four Categories of Viral Infection Describe the Health Status of Honey Bee Colonies“. *PLOS ONE* 10.10, e0140272. DOI: [10.1371/journal.pone.0140272](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140272) (siehe S. 135, 191, 196).
- Amiri, Esmail et al. (2017). „Queen Quality and the Impact of Honey Bee Diseases on Queen Health: Potential for Interactions between Two Major Threats to Colony Health“. *Insects* 8.2, S. 22–26. DOI: [10.3390/insects8020048](https://doi.org/10.3390/insects8020048) (siehe S. 125).
- Amiri, Esmail et al. (2020). „Honey Bee Queens and Virus Infections“. *Viruses* 12.3, S. 322. DOI: [10.3390/v12030322](https://doi.org/10.3390/v12030322) (siehe S. 125).
- Anderson, Denis L. (1984). „A comparison of serological techniques for detecting and identifying honeybee viruses“. *Journal of Invertebrate Pathology* 44, S. 233–243 (siehe S. 212).
- Annoscia, Desiderato et al. (2020). „Neonicotinoid Clothianidin Reduces Honey Bee Immune Response and Contributes to *Varroa* Mite Proliferation“. *Nature Communications* 11.1, S. 5887. DOI: [10.1038/s41467-020-19715-8](https://doi.org/10.1038/s41467-020-19715-8) (siehe S. 11).
- Auguie, Baptiste (2017). *gridExtra: Miscellaneous Functions for "Grid"Graphics*. R package version 2.3. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=gridExtra> (siehe S. 152).
- Bailey, Lesley (1969). „The multiplication and spread of sacbrood virus of bees“. *Annals of Applied Biology* 63.3, S. 483–491. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1969.tb02844.x> (siehe S. 134).
- Bailey, Lesley, B. V. Ball und J. N. Perry (1983). „Honeybee Paralysis: Its Natural Spread and its Diminished Incidence in England and Wales“. *Journal of Apicultural Research* 22.3, S. 191–195. DOI: [10.1080/00218839.1983.11100586](https://doi.org/10.1080/00218839.1983.11100586) (siehe S. 134).
- Bailey, Lesley und A. J. Gibbs (1964). „Acute Infection of Bees with Paralysis Virus“. *Journal of Insect Pathology* 6, S. 395–407 (siehe S. 133).
- Bailey, Lesley, A. J. Gibbs und R. D. Woods (1963). „Two viruses from the adult honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus)“. *Virology* 21, S. 390–395 (siehe S. 133, 134).
- Bailey, Lesley, A. J. Gibbs und R. D. Woods (1964). „Sacbrood virus of the larval honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus)“. *Virology* 23.3, S. 425–429. DOI: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(64\)90266-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(64)90266-1) (siehe S. 134).

- Bailey, Lesley und R. D. Woods (1974). „Three previously undescribed viruses from the honey bee“. *Journal of General Virology* 25, S. 175–186 (siehe S. 192).
- Bailey, Lesley und R. D. Woods (1977). „Two More Small RNA Viruses from Honey Bees and Further Observations on Sacbrood and Acute Bee-Paralysis Viruses“. *Journal of General Virology* 37.1, S. 175–182. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-37-1-175> (siehe S. 134).
- Barroso-Arévalo, Sandra et al. (2019). „High Load of Deformed Wing Virus and *Varroa Destructor* Infestation Are Related to Weakness of Honey Bee Colonies in Southern Spain“. *Frontiers in Microbiology* 10 (June). DOI: [10.3389/fmicb.2019.01331](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01331) (siehe S. 11, 196, 197).
- Bartlett, Lewis J. et al. (2021). „Persistent Effects of Management History on Honeybee Colony Virus Abundances“. *Journal of Invertebrate Pathology* 179, S. 107520. DOI: [10.1016/j.jip.2020.107520](https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107520) (siehe S. 11, 111, 193).
- Bates, Douglas et al. (2015). „Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4“. *Journal of Statistical Software* 67.1, S. 1–48. DOI: [10.18637/jss.v067.i01](https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01) (siehe S. 150, 151).
- Beaurepaire, Alexis et al. (2020). „Diversity and Global Distribution of Viruses of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*“. *Insects* 11.4, S. 239. URL: <https://www.mdpi.com/2075-4450/11/4/239> (siehe S. 133, 134, 190, 194, 195).
- Becsi, Benedikt, Herbert Formayer und Robert Brodschneider (2021). „A Biophysical Approach to Assess Weather Impacts on Honey Bee Colony Winter Mortality“. *Royal Society Open Science* 8.9, S. 210618. DOI: [10.1098/rsos.210618](https://doi.org/10.1098/rsos.210618) (siehe S. 12, 111, 126, 127, 239).
- Belsky, Joseph und Neelendra K. Joshi (2019). „Impact of Biotic and Abiotic Stressors on Managed and Feral Bees“. *Insects* 10.8, S. 233. DOI: [10.3390/insects10080233](https://doi.org/10.3390/insects10080233) (siehe S. 8, 9).
- Benaets, Kristof et al. (2017). „Covert Deformed Wing Virus Infections Have Long-Term Deleterious Effects on Honeybee Foraging and Survival“. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 284.1848, S. 20162149. DOI: [10.1098/rspb.2016.2149](https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2149) (siehe S. 10).
- Berényi, Olga et al. (2006). „Occurrence of Six Honeybee Viruses in Diseased Austrian Apiaries“. *Applied and Environmental Microbiology* 72.4, S. 2414–2420. DOI: [10.1128/aem.72.4.2414-2420.2006](https://doi.org/10.1128/aem.72.4.2414-2420.2006) (siehe S. 135).
- Bergero, Marco et al. (2021). „Agrochemical Contamination of Honey and Bee Bread Collected in the Piedmont Region, Italy“. *Environments* 8.7, S. 62. DOI: [10.3390/environments8070062](https://doi.org/10.3390/environments8070062) (siehe S. 117).
- Berry, Jennifer A. und Keith S. Delaplane (2001). „Effects of Comb Age on Honey Bee Colony Growth and Brood Survivorship“. *Journal of Apicultural Research* 40.1, S. 3–8. DOI: [10.1080/00218839.2001.11101042](https://doi.org/10.1080/00218839.2001.11101042) (siehe S. 116).
- Berthoud, Hélène et al. (2010). „Virus infections and winter losses of honey bee colonies (*Apis mellifera*)“. *Journal of Apicultural Research* 49.1, S. 60–65. DOI: [10.3896/IBRA.1.49.1.08](https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.08) (siehe S. 133, 196, 197).
- Bieńkowska, Małgorzata, Aleksandra Łoś und Paweł Węgrzynowicz (2020). „Honey Bee Queen Replacement: An Analysis of Changes in the Preferences of Polish Beekeepers Through Decades“. *Insects* 11.8, S. 544. DOI: [10.3390/insects11080544](https://doi.org/10.3390/insects11080544) (siehe S. 125).
- Biesmeijer, J. C. et al. (2006). „Parallel Declines in Pollinators and Insect-Pollinated Plants in Britain and the Netherlands“. *Science* 313.5785, S. 351–354. DOI: [10.1126/science.1127863](https://doi.org/10.1126/science.1127863) (siehe S. 8).
- Blanchard, Philippe et al. (2007). „Evaluation of a real-time two-step RT-PCR assay for quantitation of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome in experimentally-infected bee tissues and in life stages of a symptomatic colony“. *Journal of Virological Methods* 141.1, S. 7–13. DOI: [10.1016/j.jviromet.2006.11.021](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.021) (siehe S. 146, 216).
- Blanchard, Philippe et al. (2008). „Improvement of RT-PCR detection of chronic bee paralysis virus (CBPV) required by the description of genomic variability in French CBPV isolates“. *Journal of Invertebrate Pathology* 97.2, S. 182–185. DOI: [10.1016/j.jip.2007.07.003](https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.07.003) (siehe S. 144, 148).
- Blanchard, Philippe et al. (2014). „Development and validation of a real-time two-step RT-qPCR TaqMan® assay for quantitation of Sacbrood virus (SBV) and its application to a field survey of symptomatic honey bee colonies“. *Journal of Virological Methods* 197.Supplement C, S. 7–13. DOI: [10.1016/j.jviromet.2013.09.012](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.09.012) (siehe S. 146).

- Bolli, H. K. et al. (1993). „Zur Wirkungsweise von Ameisensäure Bei *Varroa Jacobsoni* Oud Und Der Honigbiene (*Apis Mellifera* L)“. *Apidologie* 24.1, S. 51–57. DOI: [10.1051/apido:19930106](https://doi.org/10.1051/apido:19930106) (siehe S. 120).
- Bowen-Walker, P. L., Stephen Martin und A. Gunn (1999). „The Transmission of Deformed Wing Virus between Honeybees (*Apis mellifera* L.) by the Ectoparasitic Mite *Varroa jacobsoni*“. *Journal of Invertebrate Pathology* 73.1, S. 101–106. DOI: [10.1006/jipa.1998.4807](https://doi.org/10.1006/jipa.1998.4807) (siehe S. 133, 134, 197).
- Breiman, Leo et al. (1984). *Classification and Regression Trees*. Boca Raton: Repr. Chapman & Hall (siehe S. 151).
- Brodtschneider, Robert, Jan Brus und Jiří Danihlík (2019a). „Comparison of Apiculture and Winter Mortality of Honey Bee Colonies (*Apis Mellifera*) in Austria and Czechia“. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 274, S. 24–32. DOI: [10.1016/J.AGEE.2019.01.002](https://doi.org/10.1016/J.AGEE.2019.01.002) (siehe S. 9, 11, 111, 120, 124).
- Brodtschneider, Robert und Karl Crailsheim (2011). „Völkerverluste Der Honigbiene: Risikofaktoren Für Die Bestäubungssicherheit in Österreich“. *Entomologica Austriaca* 18, S. 73–86 (siehe S. 9, 10, 109, 126).
- Brodtschneider, Robert und Karl Crailsheim (2013). „Fünf Jahre Untersuchung des Bienensterbens in Österreich.“ *Entomologica Austriaca* 20, S. 195–205 (siehe S. 9–11, 14, 116–118, 121, 127).
- Brodtschneider, Robert, Elfriede Kalcher-Sommersguter und S. Klinger (2018a). *Zukunft Biene - Endbericht, Forschungsnummer: 100972*. URL: <http://www.zukunft-biene.at/> (siehe S. 189, 190).
- Brodtschneider, Robert, Rudolf Moosbeckhofer und Karl Crailsheim (2010). „Surveys as a Tool to Record Winter Losses of Honey Bee Colonies: A Two Year Case Study in Austria and South Tyrol“. *Journal of Apicultural Research* 49.1, S. 23–30. DOI: [10.3896/ibra.1.49.1.04](https://doi.org/10.3896/ibra.1.49.1.04) (siehe S. 9, 11, 114).
- Brodtschneider, Robert, Linde Morawetz und Benjamin Lamp (2019b). *Zukunft Biene 2 - 2. Zwischenbericht, Forschungsnummer: 101295*. URL: <http://www.zukunft-biene.at/> (siehe S. 143, 151, 189, 190).
- Brodtschneider, Robert et al. (2016). „Preliminary Analysis of Loss Rates of Honey Bee Colonies during Winter 2015/16 from the COLOSS Survey“. *Journal of Apicultural Research* 55.5, S. 375–378. DOI: [10.1080/00218839.2016.1260240](https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1260240) (siehe S. 9, 11, 109, 113, 143, 193).
- Brodtschneider, Robert et al. (2018b). „Multi-Country Loss Rates of Honey Bee Colonies during Winter 2016/2017 from the COLOSS Survey“. *Journal of Apicultural Research* 57.3, S. 452–457. DOI: [10.1080/00218839.2018.1460911](https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1460911) (siehe S. 9, 11, 109, 113, 114, 143, 198).
- Brodtschneider, Robert et al. (2019c). „A Citizen Science Supported Study on Seasonal Diversity and Monoflorality of Pollen Collected by Honey Bees in Austria“. *Scientific Reports* 9.1, S. 16633. DOI: [10.1038/s41598-019-53016-5](https://doi.org/10.1038/s41598-019-53016-5) (siehe S. 118, 239).
- Büchler, Ralph et al. (2020). „Summer Brood Interruption as Integrated Management Strategy for Effective *Varroa* Control in Europe“. *Journal of Apicultural Research*, S. 1–10. DOI: [10.1080/00218839.2020.1793278](https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1793278) (siehe S. 114, 122).
- Budge, Giles et al. (2015a). „Evidence for Pollinator Cost and Farming Benefits of Neonicotinoid Seed Coatings on Oilseed Rape“. *Scientific Reports* 5.1, S. 12574. DOI: [10.1038/srep12574](https://doi.org/10.1038/srep12574) (siehe S. 9).
- Budge, Giles et al. (2015b). „Pathogens as Predictors of Honey Bee Colony Strength in England and Wales“. *PLOS ONE* 10.7. Hrsg. von Olav Rueppell, e0133228. DOI: [10.1371/journal.pone.0133228](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133228) (siehe S. 9, 10).
- Calatayud-Vernich, Pau et al. (2018). „Pesticide Residues in Honey Bees, Pollen and Beeswax: Assessing Beehive Exposure“. *Environmental Pollution* 241, S. 106–114. DOI: [10.1016/j.envpol.2018.05.062](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.062) (siehe S. 115, 116).
- Calderone, Nicholas W. (2005). „Evaluation of Drone Brood Removal for Management of *Varroa Destructor* (Acari: Varroidae) in Colonies of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in the Northeastern United States“. en. *Journal of Economic Entomology* 98.3, S. 645–650. DOI: [10.1603/0022-0493-98.3.645](https://doi.org/10.1603/0022-0493-98.3.645) (siehe S. 121).
- Cambon, Jesse et al. (2021). *tidygeocoder: Geocoding Made Easy*. R package version 1.0.3. DOI: [10.5281/zenodo.4686074](https://doi.org/10.5281/zenodo.4686074). URL: <https://CRAN.R-project.org/package=tidygeocoder> (siehe S. 14).
- Cameron, Sydney A. et al. (2011). „Patterns of Widespread Decline in North American Bumble Bees“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.2, S. 662–667. DOI: [10.1073/pnas.1014743108](https://doi.org/10.1073/pnas.1014743108) (siehe S. 8).

- Carreck, Norman L., Brenda V. Ball und Stephen Martin (2010). „Honey bee colony collapse and changes in viral prevalence associated with *Varroa destructor*“. *Journal of Apicultural Research* 49.1, S. 93–94 (siehe S. 133).
- Castelli, Loreley et al. (2021). „Impact of Chronic Exposure to Sublethal Doses of Glyphosate on Honey Bee Immunity, Gut Microbiota and Infection by Pathogens“. *Microorganisms* 9.4, S. 845. DOI: [10.3390/microorganisms9040845](https://doi.org/10.3390/microorganisms9040845) (siehe S. 117, 118).
- Castilhos, Dayson et al. (2019). „Bee Colony Losses in Brazil: A 5-Year Online Survey“. *Apidologie*. DOI: [10.1007/s13592-019-00642-7](https://doi.org/10.1007/s13592-019-00642-7) (siehe S. 9).
- Chantawannakul, Panuwan et al. (2006). „A scientific note on the detection of honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in varroa mites collected from a Thai honeybee (*Apis mellifera*) apiary“. *Journal of Invertebrate Pathology* 91, S. 69–73 (siehe S. 146, 148).
- Charrière, Jean-Daniel, Benoit Droz und Gérald Buchwalder (2020). „Oxalsäure-Streifen gegen Varroamilben: eine Alternative zur Ameisensäure unter schweizer Bedingungen?“ *Schweizerische Bienen-Zeitung* 04, S. 19–23 (siehe S. 123).
- Charrière, Jean-Daniel et al. (1998). „Ausschneiden von Drohnenbrut: Eine Wirksame Massnahme Zur Reduktion Des Varroabefalls“. *Schweizerisches Zentrum fuer Bienenforschung*, S. 1–10 (siehe S. 121).
- Chauzat, Marie-Pierre et al. (2016). „Risk Indicators Affecting Honeybee Colony Survival in Europe: One Year of Surveillance“. *Apidologie* 47.3, S. 348–378. DOI: [10.1007/s13592-016-0440-z](https://doi.org/10.1007/s13592-016-0440-z) (siehe S. 9, 197, 198).
- Chęć, Magdalena et al. (2021). „Effect of Stearin and Paraffin Adulteration of Beeswax on Brood Survival“. *Apidologie* 52.2, S. 432–446. DOI: [10.1007/s13592-020-00833-7](https://doi.org/10.1007/s13592-020-00833-7) (siehe S. 115).
- Chen, Yan Ping, J. A. Higgins und M. F. Feldlaufer (2005). „Quantitative Real-Time Reverse Transcription-PCR Analysis of Deformed Wing Virus Infection in the Honeybee (*Apis mellifera* L.)“. *Applied and Environmental Microbiology* 71.1, S. 436–441. DOI: [10.1128/aem.71.1.436-441.2005](https://doi.org/10.1128/aem.71.1.436-441.2005) (siehe S. 146).
- Chen, Yan Ping und Reinhold Siede (2007). „Honey Bee Viruses“. In: *Advances in Virus Research*. Bd. 70. Academic Press, S. 33–80. DOI: [10.1016/S0065-3527\(07\)70002-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(07)70002-7) (siehe S. 133, 134).
- Chen, Yan Ping et al. (2004). „Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*“. *Apidologie* 35.4, S. 441–448. DOI: [10.1051/apido:2004031](https://doi.org/10.1051/apido:2004031) (siehe S. 133).
- Clermont, Antoine et al. (2015). „Virus Status, Varroa Levels, and Survival of 20 Managed Honey Bee Colonies Monitored in Luxembourg Between the Summer of 2011 and the Spring of 2013“. *Journal of Apicultural Science* 59.1, S. 59–73. DOI: [10.1515/jas-2015-0005](https://doi.org/10.1515/jas-2015-0005) (siehe S. 8).
- Colin, Théotime et al. (2019). „Effects of thymol on European honey bee hygienic behaviour“. *Apidologie* 50.2, S. 141–152. DOI: [10.1007/s13592-018-0625-8](https://doi.org/10.1007/s13592-018-0625-8) (siehe S. 123).
- Cornman, R. Scott et al. (2012). „Pathogen Webs in Collapsing Honey Bee Colonies“. *PLoS ONE* 7.8. Hrsg. von Sarah K. Highlander, e43562. DOI: [10.1371/journal.pone.0043562](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043562) (siehe S. 8).
- Cox-Foster, Diana L. et al. (2007). „A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder“. *Science* 318.5848, S. 283–287. DOI: [10.1126/science.1146498](https://doi.org/10.1126/science.1146498) (siehe S. 133, 148).
- Crailsheim, Karl et al. (2018). *Future of Honey Bees - Basic Research for Project for Honey Bee Health and Bee Protection* (siehe S. 9, 110–117, 121, 122).
- Dahle, Bjørn (2010). „The Role of *Varroa Destructor* for Honey Bee Colony Losses in Norway“. *Journal of Apicultural Research* 49.1, S. 124–125. DOI: [10.3896/ibra.1.49.1.26](https://doi.org/10.3896/ibra.1.49.1.26) (siehe S. 9, 119).
- Dainat, Benjamin und Peter Neumann (2013). „Clinical Signs of Deformed Wing Virus Infection Are Predictive Markers for Honey Bee Colony Losses“. *Journal of Invertebrate Pathology* 112.3, S. 278–280. DOI: [10.1016/j.jip.2012.12.009](https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.12.009) (siehe S. 126, 195, 197).
- Dainat, Benjamin et al. (2012). „Predictive Markers of Honey Bee Colony Collapse“. *PLoS ONE* 7.2. Hrsg. von Patricia V. Aguilar, e32151. DOI: [10.1371/journal.pone.0032151](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032151) (siehe S. 112, 133, 134, 195–197, 212).
- De Miranda, Joachim R., Guido Cordoni und Giles Budge (2010). „The Acute bee paralysis virus–Kashmir bee virus–Israeli acute paralysis virus complex“. *Journal of Invertebrate Pathology* 103, Supplement.0, S30–S47. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.014> (siehe S. 134, 148, 192, 195).

- De Miranda, Joachim R. et al. (2013). „Standard methods for virus research in *Apis mellifera*“. In: *The COLOSS BEEBOOK, Volume II: standard methods for Apis mellifera pest and pathogen research*. Hrsg. von V Dietemann, James D Ellis und Peter Neumann. Bd. 52. Journal of Apicultural Research 52(4), S. 2013. DOI: [10.3896/IBRA.1.52.4.22](https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.22) (siehe S. 136).
- Decourtye, Axel et al. (2011). „Why Enhancement of Floral Resources in Agro-Ecosystems Benefit Honeybees and Beekeepers?“ In: *Ecosystems Biodiversity*. Hrsg. von Oscar Grillo und Gianfranco Venora. InTech (siehe S. 193).
- DeGrandi-Hoffman, Gloria und Yanping Chen (2015). „Nutrition, Immunity and Viral Infections in Honey Bees“. *Current Opinion in Insect Science* 10, S. 170–176. DOI: [10.1016/j.cois.2015.05.007](https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.007) (siehe S. 11, 193).
- Di Noi, Agata et al. (2021). „Review on Sublethal Effects of Environmental Contaminants in Honey Bees (*Apis Mellifera*), Knowledge Gaps and Future Perspectives“. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18.4, S. 1863. DOI: [10.3390/ijerph18041863](https://doi.org/10.3390/ijerph18041863) (siehe S. 117).
- Di Pasquale, Garance et al. (2016). „Variations in the Availability of Pollen Resources Affect Honey Bee Health“. *PLoS ONE* 11.9, S. 1–15. DOI: [10.1371/journal.pone.0162818](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162818) (siehe S. 116, 118).
- Di Prisco, Gennaro et al. (2013). „Neonicotinoid Clothianidin Adversely Affects Insect Immunity and Promotes Replication of a Viral Pathogen in Honey Bees“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.46, S. 18466–18471. DOI: [10.1073/pnas.1314923110](https://doi.org/10.1073/pnas.1314923110) (siehe S. 11).
- Döke, Mehmet Ali, Maryann Frazier und Christina M Grozinger (2015). „Overwintering Honey Bees: Biology and Management“. *Current Opinion in Insect Science* 10, S. 185–193. DOI: [10.1016/j.cois.2015.05.014](https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.014) (siehe S. 9).
- Dorai-Raj, Sundar (2014). *binom: Binomial Confidence Intervals For Several Parameterizations*. R package version 1.1-1. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=binom> (siehe S. 150).
- Dussaubat, Claudia et al. (2016). „Combined Neonicotinoid Pesticide and Parasite Stress Alter Honeybee Queens' Physiology and Survival“. *Scientific Reports* 6.1, S. 31430. DOI: [10.1038/srep31430](https://doi.org/10.1038/srep31430) (siehe S. 9).
- Dynes, Travis L. et al. (2019). „Reduced Density and Visually Complex Apiaries Reduce Parasite Load and Promote Honey Production and Overwintering Survival in Honey Bees“. *PLOS ONE* 14.5. Hrsg. von James C. Nieh, e0216286. DOI: [10.1371/journal.pone.0216286](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216286) (siehe S. 111, 112, 114, 119).
- El Agrebi, Noémie et al. (2020). „Pesticide and Veterinary Drug Residues in Belgian Beeswax: Occurrence, Toxicity, and Risk to Honey Bees“. *Science of The Total Environment* 745, S. 141036. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2020.141036](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141036) (siehe S. 115, 116).
- El Agrebi, Noémie et al. (2021). „Adulteration of Beeswax: A First Nationwide Survey from Belgium“. *PLOS ONE* 16.9. Hrsg. von Nicolas Chaline, e0252806. DOI: [10.1371/journal.pone.0252806](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252806) (siehe S. 115).
- Fine, Julia D. und Vanessa Corby-Harris (2021). „Beyond Brood: The Potential Impacts of Insect Growth Disruptors on the Long-Term Health and Performance of Honey Bee Colonies“. *Apidologie* 52.3, S. 580–595. DOI: [10.1007/s13592-021-00845-x](https://doi.org/10.1007/s13592-021-00845-x) (siehe S. 117).
- Fisher, Adrian et al. (2021). „Colony Field Test Reveals Dramatically Higher Toxicity of a Widely-Used Mito-Toxic Fungicide on Honey Bees (*Apis Mellifera*)“. *Environmental Pollution* 269, S. 115964. DOI: [10.1016/j.envpol.2020.115964](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115964) (siehe S. 117).
- Flores, José M. et al. (2020). „A Three-Year Large Scale Study on the Risk of Honey Bee Colony Exposure to Blooming Sunflowers Grown from Seeds Treated with Thiamethoxam and Clothianidin Neonicotinoids“. *Chemosphere*, S. 127735. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2020.127735](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127735) (siehe S. 118).
- Flügel, Hans-Joachim (2015). „Von Columella Bis CCD - Das Bienensterben Im Wandel Der Zeit (Hymenoptera: Apidae)“. *Entomologische Zeitschrift* 125, S. 27–40 (siehe S. 8–10).
- Forfert, Nadège et al. (2015). „Parasites and Pathogens of the Honeybee (*Apis mellifera*) and Their Influence on Inter-Colonial Transmission“. *PLOS ONE* 10.10, e0140337. DOI: [10.1371/journal.pone.0140337](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140337) (siehe S. 193).

- Forfert, Nadège et al. (2016). „Viral Prevalence Increases with Regional Colony Abundance in Honey Bee Drones (*Apis Mellifera* L)“. *Infection, Genetics and Evolution* 44, S. 549–554. DOI: [10.1016/j.meegid.2016.07.017](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.07.017) (siehe S. 11, 111, 112, 114, 119, 193).
- Fries, Ingemar und Scott Camazine (2001). „Implications of Horizontal and Vertical Pathogen Transmission for Honey Bee Epidemiology“. *Apidologie* 32.3, S. 199–214. DOI: [10.1051/apido:2001122](https://doi.org/10.1051/apido:2001122) (siehe S. 11, 111, 112, 114, 119).
- Gallai, Nicola et al. (2009). „Economic Valuation of the Vulnerability of World Agriculture Confronted with Pollinator Decline“. *Ecological Economics* 68.3, S. 810–821. DOI: [10.1016/J.ECOLECON.2008.06.014](https://doi.org/10.1016/J.ECOLECON.2008.06.014) (siehe S. 8).
- Gashout, Hanan A. et al. (2020). „Impact of Sublethal Exposure to Synthetic and Natural Acaricides on Honey Bee (*Apis Mellifera*) Memory and Expression of Genes Related to Memory“. *Journal of Insect Physiology* 121, S. 104014. DOI: [10.1016/j.jinsphys.2020.104014](https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104014) (siehe S. 121).
- Genersch, Elke et al. (2010). „The German Bee Monitoring Project: A Long Term Study to Understand Periodically High Winter Losses of Honey Bee Colonies“. *Apidologie* 41.3, S. 332–352. DOI: [10.1051/apido/2010014](https://doi.org/10.1051/apido/2010014) (siehe S. 9, 125, 127, 133–135, 191, 195–198).
- GeoNames (o.D.). *GeoNames*. URL: <https://www.geonames.org/> (siehe S. 14).
- Giacobino, Agostina et al. (2016). „Queen Replacement: The Key to Prevent Winter Colony Losses in Argentina“. *Journal of Apicultural Research* 55.4, S. 335–341. DOI: [10.1080/00218839.2016.1238595](https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1238595) (siehe S. 125, 127).
- Girsch, Leopold und Rudolf Moosbeckhofer (2012). „Untersuchungen zum Auftreten von Bienenverlusten in Mais- Und Rapsanbaugebieten Österreichs und möglicher Zusammenhänge mit Bienenkrankheiten und dem Einsatz von Pflanzenschutzmitteln“. *Final report* („MELISSA“; Dafne Proj. Nr. 100472) (siehe S. 135, 190).
- Gisder, Sebastian, Pia Aumeier und Elke Genersch (2009). „Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*)“. *Journal of General Virology* 90.2, S. 463–467. DOI: [10.1099/vir.0.005579-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.005579-0) (siehe S. 134, 197).
- Goulson, Dave (2013). „REVIEW: An Overview of the Environmental Risks Posed by Neonicotinoid Insecticides“. *Journal of Applied Ecology* 50.4. Hrsg. von David Kleijn, S. 977–987. DOI: [10.1111/1365-2664.12111](https://doi.org/10.1111/1365-2664.12111) (siehe S. 8).
- Goulson, Dave et al. (2015). „Bee Declines Driven by Combined Stress from Parasites, Pesticides, and Lack of Flowers“. *Science*. DOI: [10.1126/science.1255957](https://doi.org/10.1126/science.1255957) (siehe S. 9, 11, 117).
- Gratzer, Kristina und Robert Brodschneider (2021). „How and Why Beekeepers Participate in the INSIGNIA Citizen Science Honey Bee Environmental Monitoring Project“. *Environmental Science and Pollution Research*. DOI: [10.1007/s11356-021-13379-7](https://doi.org/10.1007/s11356-021-13379-7) (siehe S. 117).
- Gray, Alison et al. (2019). „Loss Rates of Honey Bee Colonies during Winter 2017/18 in 36 Countries Participating in the COLOSS Survey, Including Effects of Forage Sources“. *Journal of Apicultural Research* 0.0, S. 1–7. DOI: [10.1080/00218839.2019.1615661](https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1615661) (siehe S. 9, 117, 124).
- Gray, Alison et al. (2020). „Honey Bee Colony Winter Loss Rates for 35 Countries Participating in the COLOSS Survey for Winter 2018–2019, and the Effects of a New Queen on the Risk of Colony Winter Loss“. *Journal of Apicultural Research*, S. 1–8. DOI: [10.1080/00218839.2020.1797272](https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1797272) (siehe S. 113, 114, 124, 125, 127, 239).
- Greenwell, Brandon, Brad Boehmke und Bernie Gray (2020). *vip: Variable Importance Plots*. R package version 0.2.2. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=vip> (siehe S. 152).
- Grindrod, Isobel et al. (2021). „Ten Years of Deformed Wing Virus (DWV) in Hawaiian Honey Bees (*Apis mellifera*), the Dominant DWV-A Variant Is Potentially Being Replaced by Variants with a DWV-B Coding Sequence“. *Viruses* 13.6, S. 969. URL: <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/6/969> (siehe S. 191).
- Guichard, Matthieu et al. (2020). „Advances and Perspectives in Selecting Resistance Traits against the Parasitic Mite *Varroa Destructor* in Honey Bees“. *Genetics Selection Evolution* 52.1, S. 71. DOI: [10.1186/s12711-020-00591-1](https://doi.org/10.1186/s12711-020-00591-1) (siehe S. 114).



- Hall, Richard J. et al. (2021). „Apicultural Practice and Disease Prevalence in *Apis Mellifera* , New Zealand: A Longitudinal Study“. *Journal of Apicultural Research*, S. 1–15. DOI: [10.1080/00218839.2021.1936422](https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1936422) (siehe S. 120).
- Hall, Thomas A (1999). „BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.“ *Nucleic Acids Symposium Series* 41, S. 95–98 (siehe S. 148).
- Hallmann, Caspar A. et al. (2017). „More than 75 Percent Decline over 27 Years in Total Flying Insect Biomass in Protected Areas“. *PLOS ONE* 12.10. Hrsg. von Eric Gordon Lamb, e0185809. DOI: [10.1371/journal.pone.0185809](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185809) (siehe S. 8).
- Harriet, Jorge et al. (2017). „Agricultural Pesticides and Veterinary Substances in Uruguayan Beeswax“. *Chemosphere* 177, S. 77–83. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2017.02.131](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.131) (siehe S. 115, 116).
- Hernández-López, Javier et al. (2017). „Sublethal Pesticide Doses Negatively Affect Survival and the Cellular Responses in American Foulbrood-Infected Honeybee Larvae“. *Scientific Reports* 7.1, S. 40853. DOI: [10.1038/srep40853](https://doi.org/10.1038/srep40853) (siehe S. 11).
- Highfield, Andrea C. et al. (2009). „Deformed Wing Virus Implicated in Overwintering Honeybee Colony Losses“. *Applied and Environmental Microbiology* 75.22, S. 7212–7220. DOI: [10.1128/aem.02227-09](https://doi.org/10.1128/aem.02227-09) (siehe S. 133, 195).
- Höcherl, Nicole et al. (2012). „Evaluation of the nutritive value of maize for honey bees“. *Journal of Insect Physiology* 58.2, S. 278–285. DOI: [10.1016/j.jinsphys.2011.12.001](https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.12.001) (siehe S. 118).
- Holm, Sture (1979). „A simple sequentially rejective multiple test procedure“. *Scandinavian journal of statistics*, S. 65–70 (siehe S. 150).
- Huber, Brigitte und Ingrid Aichberger (2020). „Emotionalization in the Media Coverage of Honey Bee Colony Losses“. *Media and Communication* 8.1, S. 141–150. DOI: [10.17645/mac.v8i1.2498](https://doi.org/10.17645/mac.v8i1.2498) (siehe S. 8).
- Ibrahim, Abdullah, Gary S. Reuter und Marla Spivak (2007). „Field trial of honey bee colonies bred for mechanisms of resistance against *Varroa destructor*“. *Apidologie* 38. DOI: [10.1051/apido:2006065](https://doi.org/10.1051/apido:2006065) (siehe S. 114).
- Imdorf, A., S. Bogdanov und V. Kilchenmann (1985). „Zementhonig im Honig- und Brutraum - was dann? - Schweizerisches Zentrum für Bienenforschung“. *Schweizer Bienenzeitung* 108.10, S. 534–544 (siehe S. 119).
- Iqbal, Javaid und Uli Mueller (2007). „Virus infection causes specific learning deficits in honeybee foragers“. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274.1617, S. 1517–1521. DOI: [10.1098/rspb.2007.0022](https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0022) (siehe S. 134).
- Jacques, Antoine et al. (2017). „A Pan-European Epidemiological Study Reveals Honey Bee Colony Survival Depends on Beekeeper Education and Disease Control“. *PLOS ONE* 12.3. Hrsg. von Nicolas Chaline, e0172591. DOI: [10.1371/journal.pone.0172591](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172591) (siehe S. 8, 9, 193).
- Jamnikar Ciglenečki, Urška und Ivan Toplak (2012). „Development of a real-time RT-PCR assay with TaqMan probe for specific detection of acute bee paralysis virus“. *Journal of Virological Methods* 184.1, S. 63–68. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.05.010> (siehe S. 146, 216).
- Kablau, Arne et al. (2020). „Hyperthermia Treatment Can Kill Immature and Adult *Varroa Destructor* Mites without Reducing Drone Fertility“. *Apidologie* 51.3, S. 307–315. DOI: [10.1007/s13592-019-00715-7](https://doi.org/10.1007/s13592-019-00715-7) (siehe S. 122).
- Kast, Christina, Verena Kilchenmann und Jean-Daniel Charrière (2021). „Long-term Monitoring of Lipophilic Acaricide Residues in Commercial SWISS Beeswax“. *Pest Management Science*, ps.6427. DOI: [10.1002/ps.6427](https://doi.org/10.1002/ps.6427) (siehe S. 121).
- Kearns, Carol A., David W. Inouye und Nickolas M. Waser (1998). „ENDANGERED MUTUALISMS: The Conservation of Plant-Pollinator Interactions“. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29.1, S. 83–112. DOI: [10.1146/annurev.ecolsys.29.1.83](https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.83) (siehe S. 8).
- Kevill, J. L. et al. (2021). „Deformed wing virus variant shift from 2010 to 2016 in managed and feral UK honey bee colonies“. *Archives of Virology*. DOI: [10.1007/s00705-021-05162-3](https://doi.org/10.1007/s00705-021-05162-3) (siehe S. 191).
- Kielmanowicz, Merav Gleit et al. (2015). „Prospective Large-Scale Field Study Generates Predictive Model Identifying Major Contributors to Colony Losses“. *PLoS Pathogens* 11, e1004816 (siehe S. 212).

- Koenig, John P., G. Mallory Boush und E. H. Erickson (1986). „Effect of Type of Brood Comb on Chalk Brood Disease in Honeybee Colonies“. *Journal of Apicultural Research* 25.1, S. 58–62. DOI: [10.1080/00218839.1986.11100694](https://doi.org/10.1080/00218839.1986.11100694) (siehe S. 116).
- Köglberger, Hemma et al. (2009). „Das Auftreten von Viren und anderen Krankheitserregern der Honigbiene im Jahresverlauf“. *Bienen Aktuell* 2009.11, S. 15–19 (siehe S. 135, 190, 191).
- Kralj, Jasna und Stefan Fuchs (2006). „Parasitic *Varroa destructor* Mites Influence Flight Duration and Homing Ability of Infested *Apis mellifera* Foragers“. *Apidologie* 37.5, S. 577–587. DOI: [10.1051/apido:2006040](https://doi.org/10.1051/apido:2006040) (siehe S. 10).
- Kralj, Jasna et al. (2007). „The Parasitic Mite *Varroa destructor* Affects Non-Associative Learning in Honey Bee Foragers, *Apis mellifera* L.“ *Journal of Comparative Physiology A* 193.3, S. 363–370. DOI: [10.1007/s00359-006-0192-8](https://doi.org/10.1007/s00359-006-0192-8) (siehe S. 10).
- Kuchling, Sabrina et al. (2018). „Investigating the Role of Landscape Composition on Honey Bee Colony Winter Mortality: A Long-Term Analysis“. *Scientific Reports* 8.1. DOI: [10.1038/s41598-018-30891-y](https://doi.org/10.1038/s41598-018-30891-y) (siehe S. 11, 111–113, 117, 119, 126, 127).
- Kuhn, Max (2020). *caret: Classification and Regression Training*. R package version 6.0-86. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=caret> (siehe S. 152).
- Kulhanek, Kelly, Andrew Garavito und Dennis vanEngelsdorp (2021). „Accelerated *Varroa Destructor* Population Growth in Honey Bee (*Apis Mellifera*) Colonies Is Associated with Visitation from Non-Natal Bees“. *Scientific Reports* 11.1, S. 7092. DOI: [10.1038/s41598-021-86558-8](https://doi.org/10.1038/s41598-021-86558-8) (siehe S. 11, 111, 114).
- Lamp, Benjamin et al. (2016). „Construction and rescue of a molecular clone of Deformed wing virus (DWV)“. *PLoS ONE* 11, e0164639 (siehe S. 214).
- Le Conte, Yves et al. (2020). „Geographical Distribution and Selection of European Honey Bees Resistant to *Varroa Destructor*“. *Insects* 11.12, S. 873. DOI: [10.3390/insects11120873](https://doi.org/10.3390/insects11120873) (siehe S. 114, 116).
- Lee, Kathleen V. et al. (2015). „A National Survey of Managed Honey Bee 2013–2014 Annual Colony Losses in the USA“. *Apidologie* 46.3, S. 292–305. DOI: [10.1007/s13592-015-0356-z](https://doi.org/10.1007/s13592-015-0356-z) (siehe S. 8, 9, 11, 113).
- Lehnherr, Matthias, Anton Heinz und Hans-Ulrich Thomas (2001). „Imkerhandwerk“. In: *Der schweizerische Bienenvater*. Fachschriftenverlag dese Vereins deutschschweizerischer und rätoromanischer Bienenfreunde (siehe S. 194).
- Locke, Barbara (2016). „Natural *Varroa* Mite-Surviving *Apis Mellifera* Honeybee Populations“. *Apidologie* 47.3, S. 467–482. DOI: [10.1007/s13592-015-0412-8](https://doi.org/10.1007/s13592-015-0412-8) (siehe S. 114).
- Locke, Barbara et al. (2017). „Persistence of subclinical deformed wing virus infections in honeybees following *Varroa* mite removal and a bee population turnover“. *PLOS ONE* 12.7, e0180910. DOI: [10.1371/journal.pone.0180910](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180910) (siehe S. 194, 196).
- Lodesani, Marco, Simone Franceschetti und Raffaele Dall’Ollio (2019). „Evaluation of early spring bio-technical management techniques to control varroosis in *Apis mellifera*“. *Apidologie* 50.2, S. 131–140. DOI: [10.1007/s13592-018-0621-z](https://doi.org/10.1007/s13592-018-0621-z) (siehe S. 122).
- Maggi, Matías et al. (2016). „A New Formulation of Oxalic Acid for *Varroa Destructor* Control Applied in *Apis Mellifera* Colonies in the Presence of Brood“. *Apidologie* 47.4, S. 596–605. DOI: [10.1007/s13592-015-0405-7](https://doi.org/10.1007/s13592-015-0405-7) (siehe S. 123).
- Maori, Eyal, Edna Tanne und Ilan Sela (2007). „Reciprocal sequence exchange between non-retro viruses and hosts leading to the appearance of new host phenotypes“. *Virology* 362.2, S. 342–349. DOI: [10.1016/j.virol.2006.11.038](https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.11.038) (siehe S. 148).
- Martin, Stephen (1998). „A population model for the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies“. *Ecological Modelling* 109.3, S. 267–281. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-3800\(98\)00059-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3800(98)00059-3) (siehe S. 195).
- Martin, Stephen et al. (2012). „Global Honey Bee Viral Landscape Altered by a Parasitic Mite“. *Science* 336.6086, S. 1304–1306. DOI: [10.1126/science.1220941](https://doi.org/10.1126/science.1220941) (siehe S. 134, 135, 196).

- McMenamin, Alexander J. und Elke Genersch (2015). „Honey bee colony losses and associated viruses“. *Current Opinion in Insect Science* 8, S. 121–129. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2015.01.015> (siehe S. 135, 193–195).
- Mezher, Ziad et al. (2021). „Conducting an International, Exploratory Survey to Collect Data on Honey Bee Disease Management and Control“. *Applied Sciences* 11.16, S. 7311. DOI: [10.3390/app11167311](https://doi.org/10.3390/app11167311) (siehe S. 119, 123).
- Miranda, Joachim R. de und Elke Genersch (2010). „Deformed wing virus“. *Journal of Invertebrate Pathology* 103, Supplement.0, S48–S61. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.012> (siehe S. 133, 195).
- Möckel, Nadine, Sebastian Gisder und Elke Genersch (2011). „Horizontal transmission of deformed wing virus: pathological consequences in adult bees (*Apis mellifera*) depend on the transmission route“. *Journal of General Virology* 92.2, S. 370–377. DOI: [doi:10.1099/vir.0.025940-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.025940-0) (siehe S. 196).
- Monceau, Karine, Olivier Bonnard und Denis Thiéry (2014). „*Vespa Velutina*: A New Invasive Predator of Honeybees in Europe“. *Journal of Pest Science* 87.1, S. 1–16. DOI: [10.1007/s10340-013-0537-3](https://doi.org/10.1007/s10340-013-0537-3) (siehe S. 10).
- Mondet, Fanny et al. (2014). „On the Front Line: Quantitative Virus Dynamics in Honeybee (*Apis mellifera* L.) Colonies along a New Expansion Front of the Parasite *Varroa destructor*“. *PLoS Pathog* 10.8, e1004323. DOI: [10.1371/journal.ppat.1004323](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004323) (siehe S. 134).
- Mondet, Fanny et al. (2020a). „Evaluation of Suppressed Mite Reproduction (SMR) Reveals Potential for *Varroa* Resistance in European Honey Bees (*Apis Mellifera* L.)“. *Insects* 11.9. DOI: [10.3390/insects11090595](https://doi.org/10.3390/insects11090595) (siehe S. 114).
- Mondet, Fanny et al. (2020b). „Honey Bee Survival Mechanisms against the Parasite *Varroa Destructor*: A Systematic Review of Phenotypic and Genomic Research Efforts“. *International Journal for Parasitology*, S002075192030093X. DOI: [10.1016/j.ijpara.2020.03.005](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.03.005). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002075192030093X> (siehe S. 114).
- Moosbeckhofer, R et al. (2015). *Varroa-Bekämpfung Einfach-Sicher-Erfolgreich. 2 Völlig Neu Bearbeitete Auflage* (siehe S. 120).
- Moosbeckhofer, Rudolf und Josef Mayr (2014). „Untersuchungen zur Identifizierung einer möglichen Exposition von Honigbienen gegenüber den Wirkstoffen Clothianidin, Thiamethoxam, Imidacloprid und Fipronil unter Feldbedingungen“. *Final report* („Bienexpo 13“) (siehe S. 135, 190).
- Moosbeckhofer, Rudolf und Josef Ulz (2012). *Der erfolgreiche Imker*. Graz: Leopold Stocker Verlag. ISBN: 978-3-7020-1349-3 (siehe S. 194).
- Morawetz, Linde et al. (2018). „Ursachenforschung zur Wintersterblichkeit durch Posthoc Untersuchungen ausgewählter Proben auf Bienengesundheit und eine vorangegangene Exposition“. In: *Zukunft Biene: Grundlagenforschungsprojekt zur Förderung des Bienenschutzes und der Bienengesundheit. Endbericht*. <http://www.zukunft-biene.at> (siehe S. 134, 135, 146, 191, 196–198).
- Morawetz, Linde et al. (2019). „Health Status of Honey Bee Colonies (*Apis Mellifera*) and Disease-Related Risk Factors for Colony Losses in Austria“. *Plos One* 14.7, e0219293. DOI: [10.1371/journal.pone.0219293](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219293) (siehe S. 9, 10, 110, 113, 125–127, 190, 193, 198, 239).
- Morawetz, Linde et al. (2020). „Prevalence of Bee Viruses in Austria in the Year 2018“. In: *Proceedings of 5th Austrian Citizen Science Conference 2019 — PoS(ACSC2019)*. 5th Austrian Citizen Science Conference 2019. Obergurgl, Austria: Sissa Medialab, S. 007. DOI: [10.22323/1.366.0007](https://doi.org/10.22323/1.366.0007) (siehe S. 239).
- Mordecai, Gideon J. et al. (2016). „Diversity in a honey bee pathogen: first report of a third master variant of the Deformed Wing Virus quasispecies“. *The ISME Journal* 10.5, S. 1264–1273. DOI: [10.1038/ismej.2015.178](https://doi.org/10.1038/ismej.2015.178) (siehe S. 134, 135, 196).
- Moritz, Robin F.A. und Silvio Erler (2016). „Lost Colonies Found in a Data Mine: Global Honey Trade but Not Pests or Pesticides as a Major Cause of Regional Honeybee Colony Declines“. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 216, S. 44–50. DOI: [10.1016/j.agee.2015.09.027](https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.09.027) (siehe S. 9).
- Moritz, Robin F.A. et al. (2010). „Research Strategies to Improve Honeybee Health in Europe“. *Apidologie* 41.3, S. 227–242. DOI: [10.1051/apido/2010010](https://doi.org/10.1051/apido/2010010) (siehe S. 9).

- Mouret, C et al. (2013). „Prevalence of 12 infectious agents in field colonies of 18 apiaries in western France“. *Revue de Medecine Veterinaire* 164.12, S. 577–582 (siehe S. 190).
- Murcia-Morales, María et al. (2020). „APIStrip, a New Tool for Environmental Contaminant Sampling through Honeybee Colonies“. *Science of The Total Environment* 729, S. 138948. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2020.138948](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138948) (siehe S. 117).
- Neov, Boyko et al. (2019). „Biotic and Abiotic Factors Associated with Colonies Mortalities of Managed Honey Bee (*Apis Mellifera*)“. *Diversity* 11.12, S. 237. DOI: [10.3390/d11120237](https://doi.org/10.3390/d11120237) (siehe S. 8, 9, 126).
- Neumann, Peter (2016). „Small Hive Beetle in Italy: What Can We Expect in the Future?“ In: S. 33–40. ISBN: 978-0-86098-278-4 (siehe S. 10).
- Neumann, Peter und Tjeerd Blacquière (2017). „The Darwin Cure for Apiculture? Natural Selection and Managed Honeybee Health“. *Evolutionary Applications* 10.3, S. 226–230. DOI: [10.1111/eva.12448](https://doi.org/10.1111/eva.12448) (siehe S. 114).
- Neumann, Peter und Norman L Carreck (2009). „Honey Bee Colony Losses“. *Journal of Apicultural Research* 49.1, S. 1–6. DOI: [10.3896/ibra.1.49.1.01](https://doi.org/10.3896/ibra.1.49.1.01) (siehe S. 8).
- Noël, Amélie, Yves Le Conte und Fanny Mondet (2020). „*Varroa Destructor*: How Does It Harm *Apis Mellifera* Honey Bees and What Can Be Done about It?“ *Emerging Topics in Life Sciences* 4.1. Hrsg. von Alison Scott-Brown und Hauke Koch, S. 45–57. DOI: [10.1042/ETLS20190125](https://doi.org/10.1042/ETLS20190125) (siehe S. 10, 119–121).
- Nolan, Maxcy P. und Keith S. Delaplane (2016). „Distance between honey bee *Apis mellifera* colonies regulates populations of *Varroa destructor* at a landscape scale“. *Apidologie*, S. 1–9. DOI: [10.1007/s13592-016-0443-9](https://doi.org/10.1007/s13592-016-0443-9) (siehe S. 193).
- Oberreiter, Hannes und Robert Brodschneider (2020). „Austrian COLOSS Survey of Honey Bee Colony Winter Losses 2018/19 and Analysis of Hive Management Practices“. *Diversity* 12.3, S. 99. DOI: [10.3390/d12030099](https://doi.org/10.3390/d12030099) (siehe S. 9, 111, 121, 239).
- Oberreiter, Hannes et al. (2021). „Das Wildnisgebiet Dürrenstein – Ein Lebensraum Für Wildlebende Bienenvölker?“ *Entomologica Austriaca* 0028, S. 25–42 (siehe S. 115).
- Oddie, Melissa A. Y. und Bjørn Dahle (2021). „Insights from Norway: Using Natural Adaptation to Breed *Varroa*-Resistant Honey Bees“. *Bee World* 98.2, S. 38–43. DOI: [10.1080/0005772X.2021.1882783](https://doi.org/10.1080/0005772X.2021.1882783) (siehe S. 114).
- Oddie, Melissa A. Y., Peter Neumann und Bjørn Dahle (2019). „Cell Size and *Varroa Destructor* Mite Infestations in Susceptible and Naturally-Surviving Honeybee (*Apis Mellifera*) Colonies“. *Apidologie* 50.1, S. 1–10. DOI: [10.1007/s13592-018-0610-2](https://doi.org/10.1007/s13592-018-0610-2) (siehe S. 116).
- Ongus, Juliette et al. (2005). „Complete sequence of a picorna-like virus of the genus Iffavirus replicating in the mite *Varroa destructor*“. *The Journal of general virology* 85, S. 3747–55. DOI: [10.1099/vir.0.80470-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.80470-0) (siehe S. 134).
- Palacios, G. et al. (2008). „Genetic Analysis of Israel Acute Paralysis Virus: Distinct Clusters Are Circulating in the United States“. *Journal of Virology* 82.13, S. 6209–6217. DOI: [10.1128/jvi.00251-08](https://doi.org/10.1128/jvi.00251-08) (siehe S. 148).
- Payne, Alexandria N., Elizabeth M. Walsh und Juliana Rangel (2019). „Initial Exposure of Wax Foundation to Agrochemicals Causes Negligible Effects on the Growth and Winter Survival of Incipient Honey Bee (*Apis Mellifera*) Colonies“. *Insects* 10.1, S. 19. DOI: [10.3390/insects10010019](https://doi.org/10.3390/insects10010019) (siehe S. 115).
- Pechhacker, Hermann, W. Praznik und J. Klaus (1990). „Untersuchungen über das Zuckerspektrum in Honigblaseninhalt und Honig“. *Apidologie* 21.5, S. 447–455. DOI: [10.1051/apido:19900506](https://doi.org/10.1051/apido:19900506) (siehe S. 119).
- Peck, David T., Michael L. Smith und Thomas D. Seeley (2016). „*Varroa destructor* mites can nimbly climb from flowers onto foraging honey bees“. *PLOS ONE* 11.12, e0167798. DOI: [10.1371/journal.pone.0167798](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167798) (siehe S. 193).
- Peng, Yan et al. (2015). „Consequences of *Nosema Apis* Infection for Male Honey Bees and Their Fertility“. *Scientific Reports* 5.1, S. 10565. DOI: [10.1038/srep10565](https://doi.org/10.1038/srep10565) (siehe S. 11).

- Pettis, Jeffery S. et al. (2012). „Pesticide Exposure in Honey Bees Results in Increased Levels of the Gut Pathogen Nosema“. *Naturwissenschaften* 99.2, S. 153–158. DOI: [10.1007/s00114-011-0881-1](https://doi.org/10.1007/s00114-011-0881-1) (siehe S. 11).
- Pohl, Friedrich (2005). *Bienenkrankheiten*. Stuttgart: Franckh-Kosmos Verlag (siehe S. 134, 135, 193–196).
- Pohl, Friedrich (2008). *Varroose*. Stuttgart: Franckh-Kosmos Verlag (siehe S. 194).
- Popovska Stojanov, Despina et al. (2021). „Direct Economic Impact Assessment of Winter Honeybee Colony Losses in Three European Countries“. *Agriculture* 11.5, S. 398. DOI: [10.3390/agriculture11050398](https://doi.org/10.3390/agriculture11050398) (siehe S. 109, 126, 239).
- Porrini, Claudio et al. (2016). „The Status of Honey Bee Health in Italy: Results from the Nationwide Bee Monitoring Network“. *PLoS ONE* 11.5, e0155411. DOI: [10.1371/journal.pone.0155411](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155411) (siehe S. 191).
- Potts, Simon G. et al. (2010). „Global Pollinator Declines: Trends, Impacts and Drivers“. *Trends in Ecology & Evolution* 25.6, S. 345–353. DOI: [10.1016/j.tree.2010.01.007](https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007) (siehe S. 9).
- R Core Team (2020). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria (siehe S. 140, 150).
- R Core Team (2021). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/> (siehe S. 14).
- Ramsey, Samuel D. et al. (2019). „*Varroa Destructor* Feeds Primarily on Honey Bee Fat Body Tissue and Not Hemolymph“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116.5, S. 1792–1801. DOI: [10.1073/pnas.1818371116](https://doi.org/10.1073/pnas.1818371116) (siehe S. 10).
- Ravoet, Jorgen et al. (2013). „Comprehensive Bee Pathogen Screening in Belgium Reveals *Crithidia mellificae* as a New Contributory Factor to Winter Mortality“. *PLoS ONE* 8.8, e72443. DOI: [10.1371/journal.pone.0072443](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072443) (siehe S. 197).
- Requier, Fabrice et al. (2017). „The carry-over effects of pollen shortage decrease the survival of honeybee colonies in farmlands“. *Journal of Applied Ecology* 54.4, S. 1161–1170. DOI: [10.1111/1365-2664.12836](https://doi.org/10.1111/1365-2664.12836) (siehe S. 116, 117, 127).
- Ribière, Magali, Violaine Olivier und Philippe Blanchard (2010). „Chronic bee paralysis: A disease and a virus like no other?“ *Journal of Invertebrate Pathology* 103, Supplement.0, S120–S131. DOI: [10.1016/j.jip.2009.06.013](https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.013) (siehe S. 133, 134, 192).
- Ribière, Magali et al. (2007). „Spread of infectious chronic bee paralysis virus by honeybee (*Apis mellifera* L.) feces“. *Applied and environmental microbiology* 73.23, S. 7711–7716. DOI: [10.1128/AEM.01053-07](https://doi.org/10.1128/AEM.01053-07) (siehe S. 134).
- Ricigliano, Vincent A. et al. (2018). „Honey Bees Overwintering in a Southern Climate: Longitudinal Effects of Nutrition and Queen Age on Colony-Level Molecular Physiology and Performance“. *Scientific Reports* 8.1, S. 1–11. DOI: [10.1038/s41598-018-28732-z](https://doi.org/10.1038/s41598-018-28732-z) (siehe S. 125, 127).
- Ritter, Wolfgang (2012). *Bienen gesund erhalten*. Stuttgart: Ulmer Verlag (siehe S. 134, 135).
- Ritter, Wolfgang (2016). *Gute imkerliche Praxis*. Stuttgart: Ulmer Verlag (siehe S. 193–196).
- Rivera-Gomis, J. et al. (2019). „Good farming practices in apiculture“. *Rev Sci Tech* 38.3, S. 879–890. DOI: [10.20506/rst.38.3.3032](https://doi.org/10.20506/rst.38.3.3032) (siehe S. 193–196).
- Rolke, Daniel et al. (2016). „Large-Scale Monitoring of Effects of Clothianidin-Dressed Oilseed Rape Seeds on Pollinating Insects in Northern Germany: Effects on Honey Bees (*Apis Mellifera*)“. *Ecotoxicology* 25.9, S. 1648–1665. DOI: [10.1007/s10646-016-1725-8](https://doi.org/10.1007/s10646-016-1725-8) (siehe S. 117).
- Rosenkranz, Peter, Pia Aumeier und Bettina Ziegelmann (2010). „Biology and Control of *Varroa Destructor*“. *Journal of Invertebrate Pathology* 103, S96–S119. DOI: [10.1016/J.JIP.2009.07.016](https://doi.org/10.1016/J.JIP.2009.07.016) (siehe S. 9, 10, 119–123).
- Roth, Morgan A et al. (2020). „Biology and Management of *Varroa Destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in *Apis Mellifera* (Hymenoptera: Apidae) Colonies“. *Journal of Integrated Pest Management* 11.1. Hrsg. von Matthew Messenger, S. 1. DOI: [10.1093/jipm/pmz036](https://doi.org/10.1093/jipm/pmz036) (siehe S. 120).
- Rousseau, Andr e,  mile Houle und Pierre Giovenazzo (2020). „Effect of Shipping Boxes, Attendant Bees, and Temperature on Honey Bee Queen Sperm Quality (*Apis Mellifera*)“. *Apidologie*. DOI: [10.1007/s13592-020-00756-3](https://doi.org/10.1007/s13592-020-00756-3) (siehe S. 125).

- Roy, C., N. Vidal-Naquet und B. Provost (2015). „A severe sacbrood virus outbreak in a honeybee (*Apis mellifera* L.) colony: a case report“. *Veterinarni Medicina* 60.6, S. 330–335. DOI: [10.17221/8248-VETMED](https://doi.org/10.17221/8248-VETMED) (siehe S. 133–135).
- Rundlöf, Maj et al. (2015). „Seed Coating with a Neonicotinoid Insecticide Negatively Affects Wild Bees“. *Nature* 521.7550, S. 77–80. DOI: [10.1038/nature14420](https://doi.org/10.1038/nature14420) (siehe S. 117, 118).
- Ruttner, Friedrich, H. Marx und G. Marx (1984). „Beobachtungen über eine mögliche Anpassung von *Varroa Jacobsoni* und *Apis Mellifera* L. in Uruguay.“ *Apidologie* 15.1, S. 43–62. DOI: [10.1051/apido:19840105](https://doi.org/10.1051/apido:19840105) (siehe S. 114).
- Schittny, Dominik, Orlando Yañez und Peter Neumann (2020). „Honey Bee Virus Transmission via Hive Products“. *Veterinary Sciences* 7.3, S. 96. URL: <https://www.mdpi.com/2306-7381/7/3/96> (siehe S. 194).
- Schmolke, Amelie, Brian Kearns und Bridget O'Neill (2018). „Plant Guttation Water as a Potential Route for Pesticide Exposure in Honey Bees: A Review of Recent Literature“. *Apidologie* 49.5, S. 637–646. DOI: [10.1007/s13592-018-0591-1](https://doi.org/10.1007/s13592-018-0591-1) (siehe S. 118).
- Schurr, Frank et al. (2017). „Trueness and precision of the real-time RT-PCR method for quantifying the chronic bee paralysis virus genome in bee homogenates evaluated by a comparative inter-laboratory study“. *J Virol Methods*. DOI: [10.1016/j.jviromet.2017.07.013](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.07.013) (siehe S. 191, 197).
- Schurr, Frank et al. (2019). „Validation of quantitative real-time RT-PCR assays for the detection of six honeybee viruses“. *Journal of Virological Methods* 270, S. 70–78. DOI: [10.1016/j.jviromet.2019.04.020](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.04.020) (siehe S. 133, 146, 147, 191, 192, 195, 196, 216).
- Seeburger, Victoria Charlotte et al. (2020). „The Trisaccharide Melezitose Impacts Honey Bees and Their Intestinal Microbiota“. *PLOS ONE* 15.4. Hrsg. von Olav Rueppell, e0230871. DOI: [10.1371/journal.pone.0230871](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230871) (siehe S. 119).
- Seeburger, Victoria Charlotte et al. (2021). „Environmental Factors Affect Melezitose Production in Honeydew from Aphids and Scale Insects of the Order *Hemiptera*“. *Journal of Apicultural Research*, S. 1–11. DOI: [10.1080/00218839.2021.1957350](https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1957350) (siehe S. 119).
- Seeley, Thomas D. (2007). „Honey Bees of the Arnot Forest: A Population of Feral Colonies Persisting with *Varroa Destructor* in the Northeastern United States“. *Apidologie* 38.1, S. 19–29. DOI: [10.1051/apido:2006055](https://doi.org/10.1051/apido:2006055) (siehe S. 114).
- Seeley, Thomas D. und Michael L. Smith (2015). „Crowding Honeybee Colonies in Apiaries Can Increase Their Vulnerability to the Deadly Ectoparasite *Varroa Destructor*“. *Apidologie* 46.6, S. 716–727. DOI: [10.1007/s13592-015-0361-2](https://doi.org/10.1007/s13592-015-0361-2) (siehe S. 11, 111, 112, 114, 119).
- Siede, Reinhold et al. (2005). „Prevalence of Kashmir bee virus in central Europe“. *Journal of Apicultural Research* 44.3, S. 129–129. DOI: [10.1080/00218839.2005.11101164](https://doi.org/10.1080/00218839.2005.11101164) (siehe S. 144, 148).
- Siefert, Paul et al. (2020). „Chronic Within-Hive Video Recordings Detect Altered Nursing Behaviour and Retarded Larval Development of Neonicotinoid Treated Honey Bees“. *Scientific Reports* 10.1, S. 8727. DOI: [10.1038/s41598-020-65425-y](https://doi.org/10.1038/s41598-020-65425-y) (siehe S. 9).
- Šimenc, Laura, Tanja Knific und Ivan Toplak (2021). „The Comparison of Honeybee Viral Loads for Six Honeybee Viruses (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 and SBV) in Healthy and Clinically Affected Honeybees with TaqMan Quantitative Real-Time RT-PCR Assays“. *Viruses* 13.7, S. 1340. URL: <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/7/1340> (siehe S. 191, 192, 196).
- Wu-Smart, Judy und Marla Spivak (2016). „Sub-Lethal Effects of Dietary Neonicotinoid Insecticide Exposure on Honey Bee Queen Fecundity and Colony Development“. *Scientific Reports* 6.1, S. 32108. DOI: [10.1038/srep32108](https://doi.org/10.1038/srep32108) (siehe S. 9).
- Smolyakov, Vadim (2017). *Ensemble Learning to Improve Machine Learning Results*. URL: <https://blog.statsbot.co/ensemble-learning-d1dcd548e936/> (siehe S. 152).
- Staveley, Jane P. et al. (2014). „A Causal Analysis of Observed Declines in Managed Honey Bees (*Apis Mellifera*)“. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 20.2, S. 566–591. DOI: [10.1080/10807039.2013.831263](https://doi.org/10.1080/10807039.2013.831263) (siehe S. 9).

- Steinhauer, Nathalie et al. (2014). „A National Survey of Managed Honey Bee 2012–2013 Annual Colony Losses in the USA: Results from the Bee Informed Partnership“. *Journal of Apicultural Research* 53.1, S. 1–18. DOI: [10.3896/IBRA.1.53.1.01](https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.1.01) (siehe S. 8, 9, 11, 112).
- Steinhauer, Nathalie et al. (2018). „Drivers of Colony Losses“. *Current Opinion in Insect Science* 26, S. 142–148. DOI: [10.1016/j.cois.2018.02.004](https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.004) (siehe S. 8, 193).
- Stoltz, Don et al. (1995). „Molecular diagnosis of Kashmir bee virus infection“. *Journal of Apicultural Research* 34.3, S. 153–160. DOI: [10.1080/00218839.1995.11100900](https://doi.org/10.1080/00218839.1995.11100900) (siehe S. 148).
- Straub, Lars et al. (2019). „Neonicotinoids and Ectoparasitic Mites Synergistically Impact Honeybees“. *Scientific Reports* 9.1, S. 8159. DOI: [10.1038/s41598-019-44207-1](https://doi.org/10.1038/s41598-019-44207-1) (siehe S. 11).
- Sumpter, D. J. T. und Stephen Martin (2004). „The dynamics of virus epidemics in Varroa-infested honey bee colonies“. *Journal of Animal Ecology* 73.1, S. 51–63. DOI: [10.1111/j.1365-2656.2004.00776.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2004.00776.x) (siehe S. 193, 196).
- Switaneck, Matthew et al. (2017). „Modelling Seasonal Effects of Temperature and Precipitation on Honey Bee Winter Mortality in a Temperate Climate“. *Science of The Total Environment* 579, S. 1581–1587. DOI: [10.1016/J.SCITOTENV.2016.11.178](https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2016.11.178) (siehe S. 11, 15, 111, 112, 119, 126, 127, 198).
- Tentcheva, Diana et al. (2004). „Prevalence and Seasonal Variations of Six Bee Viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* Mite Populations in France“. *Applied and Environmental Microbiology* 70.12, S. 7185–7191. DOI: [10.1128/aem.70.12.7185-7191.2004](https://doi.org/10.1128/aem.70.12.7185-7191.2004) (siehe S. 133–135, 190, 216).
- Thoms, Christopher A. et al. (2019). „Beekeeper Stewardship, Colony Loss, and *Varroa Destructor* Management“. *Ambio* 48.10, S. 1209–1218. DOI: [10.1007/s13280-018-1130-z](https://doi.org/10.1007/s13280-018-1130-z) (siehe S. 113).
- Thrasylvoulou, Andreas et al. (2015). „Improvements To The Regulations On Organic Farming To Facilitate The Practice Of Organic Beekeeping“. *Bee World* 91.3, S. 58–61. DOI: [10.1080/0005772x.2014.11417604](https://doi.org/10.1080/0005772x.2014.11417604) (siehe S. 113, 114).
- Toplak, Ivan et al. (2013). „Chronic bee paralysis virus and Nosema ceranae experimental co-infection of winter honey bee workers (*Apis mellifera* L.)“. *Viruses* 5.9, S. 2282–97. DOI: [10.3390/v5092282](https://doi.org/10.3390/v5092282) (siehe S. 134).
- Traynor, Kirsten S. et al. (2016). „Multiyear Survey Targeting Disease Incidence in US Honey Bees“. *Apidologie* 47.3, S. 325–347. DOI: [10.1007/s13592-016-0431-0](https://doi.org/10.1007/s13592-016-0431-0) (siehe S. 10, 135, 191).
- Traynor, Kirsten S. et al. (2020). „*Varroa Destructor*: A Complex Parasite, Crippling Honey Bees Worldwide“. *Trends in Parasitology* 36.7, S. 592–606. DOI: [10.1016/j.pt.2020.04.004](https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.004) (siehe S. 10).
- Tsvetkov, Nadejda et al. (2017). „Chronic Exposure to Neonicotinoids Reduces Honey Bee Health near Corn Crops“. *Science* 356.6345, S. 1395–1397. DOI: [10.1126/science.aam7470](https://doi.org/10.1126/science.aam7470) (siehe S. 9).
- Underwood, Robyn M. und Robert W. Currie (2003). „The Effects of Temperature and Dose of Formic Acid on Treatment Efficacy against *Varroa Destructor* (Acari: Varroidae), a Parasite of *Apis Mellifera* (Hymenoptera: Apidae)“. *Experimental and Applied Acarology* 29.3/4, S. 303–313. DOI: [10.1023/A:1025892906393](https://doi.org/10.1023/A:1025892906393) (siehe S. 120).
- Underwood, Robyn M., Brenna E. Traver und Margarita M. López-Urbe (2019). „Beekeeping Management Practices Are Associated with Operation Size and Beekeepers’ Philosophy towards in-Hive Chemicals“. *Insects* 10.1, S. 10. DOI: [10.3390/insects10010010](https://doi.org/10.3390/insects10010010) (siehe S. 113).
- Urbanowicz, Christine et al. (2019). „Low maize pollen collection and low pesticide risk to honey bees in heterogeneous agricultural landscapes“. *Apidologie* 2011. DOI: [10.1007/s13592-019-00655-2](https://doi.org/10.1007/s13592-019-00655-2) (siehe S. 118).
- Usuda, Sadakazu et al. (1999). „Serological detection of hepatitis B virus genotypes by ELISA with monoclonal antibodies to type-specific epitopes in the preS2-region product“. *Journal of Virological Methods* 80, S. 97–112 (siehe S. 212).
- vanEngelsdorp, Dennis et al. (2008). „A Survey of Honey Bee Colony Losses in the U.S., Fall 2007 to Spring 2008“. *PLoS ONE* 3.12, S. 8–13. DOI: [10.1371/journal.pone.0004071](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004071) (siehe S. 8, 111, 112).
- vanEngelsdorp, Dennis et al. (2007). „An Estimate of Managed Colony Losses in the Winter of 2006 - 2007: A Report Commissioned by the Apiary Inspectors of America“. *American Bee Journal* 147, S. 599–603 (siehe S. 8).

- vanEngelsdorp, Dennis et al. (2009). „Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study“. *PLoS ONE* 4.8. Hrsg. von Justin Brown, e6481. DOI: [10.1371/journal.pone.0006481](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481) (siehe S. 9, 112).
- vanEngelsdorp, Dennis et al. (2010). „A Survey of Honey Bee Colony Losses in the United States, Fall 2008 to Spring 2009“. *Journal of Apicultural Research* 49.1, S. 7–14. DOI: [10.3896/IBRA.1.49.1.03](https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.03) (siehe S. 8, 111).
- vanEngelsdorp, Dennis et al. (2011). „A Survey of Managed Honey Bee Colony Losses in the USA, Fall 2009 to Winter 2010“. *Journal of Apicultural Research* 50.1, S. 1–10. DOI: [10.3896/IBRA.1.50.1.01](https://doi.org/10.3896/IBRA.1.50.1.01) (siehe S. 8).
- vanEngelsdorp, Dennis et al. (2013). „Idiopathic Brood Disease Syndrome and Queen Events as Precursors of Colony Mortality in Migratory Beekeeping Operations in the Eastern United States“. *Preventive Veterinary Medicine* 108.2-3, S. 225–233. DOI: [10.1016/j.prevetmed.2012.08.004](https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.08.004) (siehe S. 125, 134).
- White, G F (1917). „Sacbrood“. *US Department of Agriculture Bulletin* 431 (siehe S. 134, 135).
- Wickham, Hadley (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York: Springer-Verlag. ISBN: 978-0-387-98140-6. URL: <http://ggplot2.org> (siehe S. 150).
- Wickham, Hadley et al. (2019). „Welcome to the tidyverse“. *Journal of Open Source Software* 4.43, S. 1686. DOI: [10.21105/joss.01686](https://doi.org/10.21105/joss.01686) (siehe S. 14).
- Williams, Geoffrey R. et al. (2010). „Colony Collapse Disorder in Context“. *BioEssays* 32.10, S. 845–846. DOI: [10.1002/bies.201000075](https://doi.org/10.1002/bies.201000075) (siehe S. 9, 112).
- Williams, Geoffrey R. et al. (2015). „Neonicotinoid Pesticides Severely Affect Honey Bee Queens“. *Scientific Reports* 5.1, S. 14621. DOI: [10.1038/srep14621](https://doi.org/10.1038/srep14621) (siehe S. 9, 125).
- Wilmart, Olivier et al. (2021). „Honey Bee Exposure Scenarios to Selected Residues through Contaminated Beeswax“. *Science of The Total Environment* 772, S. 145533. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2021.145533](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145533) (siehe S. 115).
- Withrow, James M., Jeffery S. Pettis und David R. Tarpy (2019). „Effects of Temperature During Package Transportation on Queen Establishment and Survival in Honey Bees (Hymenoptera: Apidae)“. *Journal of economic entomology* 112.3, S. 1043–1049. DOI: [10.1093/jee/toz003](https://doi.org/10.1093/jee/toz003) (siehe S. 125).
- Woodcock, Ben et al. (2016). „Impacts of Neonicotinoid Use on Long-Term Population Changes in Wild Bees in England“. *Nature Communications* 7.1, S. 12459. DOI: [10.1038/ncomms12459](https://doi.org/10.1038/ncomms12459) (siehe S. 8).
- Woodcock, Ben et al. (2017). „Country-Specific Effects of Neonicotinoid Pesticides on Honey Bees and Wild Bees“. *Science* 356.6345, S. 1393–1395. DOI: [10.1126/science.aaa1190](https://doi.org/10.1126/science.aaa1190) (siehe S. 9, 118).
- Wright, Marvin N. und Andreas Ziegler (2017). „ranger: A Fast Implementation of Random Forests for High Dimensional Data in C++ and R“. *Journal of Statistical Software* 77.1, S. 1–17. DOI: [10.18637/jss.v077.i01](https://doi.org/10.18637/jss.v077.i01) (siehe S. 152).
- Yue, Constanze und Elke Genersch (2005). „RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*)“. *Journal of General Virology* 86.12, S. 3419–3424. DOI: [10.1099/vir.0.81401-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.81401-0) (siehe S. 134).
- Yue, Constanze et al. (2007). „Vertical-Transmission Routes for Deformed Wing Virus of Honeybees (*Apis mellifera*)“. *Journal of General Virology* 88.8, S. 2329–2336. DOI: [10.1099/vir.0.83101-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.83101-0) (siehe S. 11).
- Zee, Romée van der et al. (2012). „Managed Honey Bee Colony Losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the Winters of 2008–9 and 2009–10“. *Journal of Apicultural Research* 51.1, S. 100–114. DOI: [10.3896/IBRA.1.51.1.12](https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.1.12) (siehe S. 9, 11).
- Zee, Romée van der et al. (2013). „Standard Survey Methods for Estimating Colony Losses and Explanatory Risk Factors in *Apis Mellifera*“. *Journal of Apicultural Research* 52.4, S. 1–36. DOI: [10.3896/ibra.1.52.4.18](https://doi.org/10.3896/ibra.1.52.4.18) (siehe S. 13–15, 109, 110, 137, 150).
- Zee, Romée van der et al. (2014). „Results of International Standardised Beekeeper Surveys of Colony Losses for Winter 2012–2013: Analysis of Winter Loss Rates and Mixed Effects Modelling of Risk Factors for Winter Loss“. *Journal of Apicultural Research* 53.1, S. 19–34. DOI: [10.3896/ibra.1.53.1.02](https://doi.org/10.3896/ibra.1.53.1.02) (siehe S. 8–11, 113, 114, 116–118, 125, 127).



- Zee, Romée van der et al. (2015). „An Observational Study of Honey Bee Colony Winter Losses and Their Association with *Varroa Destructor*, Neonicotinoids and Other Risk Factors“. *PLOS ONE* 10.7. Hrsg. von James C. Nieh, e0131611. DOI: [10.1371/journal.pone.0131611](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131611) (siehe S. 12, 109).
- Ziegelmann, Bettina et al. (2018). „Lithium Chloride Effectively Kills the Honey Bee Parasite *Varroa Destructor* by a Systemic Mode of Action“. *Scientific Reports* 8.1, S. 683. DOI: [10.1038/s41598-017-19137-5](https://doi.org/10.1038/s41598-017-19137-5) (siehe S. 121).