

## PHARMAKODYNAMIK DER OXALSÄURE IN HONIGBIENENVÖLKERN

A. NANETTI<sup>1</sup>, P. BARTOLOMEI<sup>2</sup>, Stefania BELLATO<sup>3</sup>,  
Maria DE SALVIO<sup>3</sup>, E. GATTAVECCHIA<sup>3</sup>, R. GHINI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Istituto Nazionale di Apicoltura, Bologna, ITALIEN  
e-mail: [istnapic@inaapiucoltura.org](mailto:istnapic@inaapiucoltura.org)

<sup>2</sup>E.N.E.A. – U.F.I.S. sede di Montecuccolino, Bologna, ITALIEN  
e-mail: [istnapic@inapicoltura.org](mailto:istnapic@inapicoltura.org)

<sup>3</sup>U.C.I. Scienze Chimiche, Radiochimiche e Metallurgiche, Facoltà di Farmacia,  
Università di Bologna, ITALIEN  
e-mail: [istnapic@inapicoltura.org](mailto:istnapic@inapicoltura.org) oder [ghini@biocfarm.unibo.it](mailto:ghini@biocfarm.unibo.it)

### Resümee

Die Pharmakodynamik der getropften Oxalsäure (OS) wurde mit radiochemischen Methoden untersucht. Eine Zuckerlösung, die eine C<sup>14</sup> markierte OS enthielt, wurde in einem Bienenvolk in der vorgeschriebenen Menge und anhand der in der Bienenzucht üblich verwendeten Methode getropft. In den ersten 4 Tagen erreichte die Verseuchung der Imagines 118 µg/kg, sank aber nach einer und 2 Wochen nach der Behandlung auf weniger als 1/10. bzw. 1/60. Im Laufe der folgenden Monate setzte sich das Abnehmen fort. In 8-9 Tage alter Brut, die auch nur zeitweilig verseucht war, wurden beachtlich niedrige Mengen gemessen. Autoradiografien veranschaulichten die Anwesenheit von OS in den Abdomenorganen der Imagines.

Im frisch geernteten Honig stieg die OS bis zu 0,6 mg/kg an. Dieses stellt aber nur eine geringe Fraktion des natürlichen OS-Gehalts des Honigs dar. Der radioaktive Marker wurde auch im Wachs frisch gebauter Waben angetroffen, doch ist es nicht klar, ob er wegen der direkten Verseuchung und demzufolge der freien Reaktion zwischen OS und Wachs zugegen war, oder durch die Metaboliten, die die Bienen aus der absorbierten OS erzeugten.

In einem dritten Versuch mit der gleichen Verabreichungsweise wurde anderes beachtet. Der radioaktive Marker war sowohl in der Hämolymphe der Imagines als auch im CO<sub>2</sub> des Bienenvolkes vorhanden. Dieses stimmt mit der Hypothese überein, daß die Bienen einen OS-Stoffwechsel durchführen.

**Stichwörter:** Varroamilbe/Rückstände/Oxalsäure/Verteilung

### Einleitung

Die Tröpfelung einer Zuckerlösung mit Oxalsäure in den Bienenvölkern (NANETTI und STRADI, 1997) ist eine verbreitete Bekämpfungsmethode der Varroatose in vielen europäischen Ländern. Zahlreiche Versuche wurden unternommen, um in verschiedenen technischen und Umweltbedingungen die Wirksamkeit und Verträglichkeit dieser Methode festzustellen. Oft wurden lokale Methodologiestrukturen aufgestellt (NANETTI, 2002).

Trotzdem sind unsere Kenntnisse über die aktive Substanz noch weit davon entfernt, vollständig zu sein. Die Kenntnisse über die Aktivität der Oxalsäure in den Bienenvölkern und über ihre Wirkung auf die einzelnen Bienen sind sehr karg. Dennoch ist die Verständnis dieses Phänomens von ausschlaggebender Bedeutung für die Kenntnisse über die negativen Behandlungswirkungen und für die Verbesserung der Anwendungsmethoden. Die wenigen verfügbaren Daten über die Rückstände im Honig veranschaulichen gewöhnlich ein herabgesetztes Risiko für den Qualitätsverlust des Honigs nach einer Behandlung mit Oxalsäure (MUTINELLI et al., 1997; DEL NOZAL et al., 2000; BERNARDINI und GARDI, 2001; BOGDANOV et al., 2002; NANETTI et al., 2002). Dennoch können die gewöhnlich verwendeten Analysemethoden zwischen einer Verseuchung mit Oxalsäure und dem natürlichen Vorkommen der Oxalsäure im Honig nicht unterscheiden. Dieses natürliche Vorkommen hängt in großem Maße von der botanischen Herkunft des Honigs ab (MUTINELLI et al., 1997; NANETTI et al., 2002).

Die vorliegende Arbeit ist ein Beitrag zur Bereicherung dieser Kenntnisse. Zur Überbrückung dieses Problems des natürlichen Vorkommens dieser Substanz in verschiedenen Stellen des Bienenvolkes wurde die Verteilung der Oxalsäure durch die Verabreichung von C<sup>14</sup> markierten Lösungen und durch andere radiochemische Analysen studiert.

### Material und Methode

Der Versuch bestand aus zwei Replikationen im Laufe des Sommers 1999 bzw. 2000, die in der Nähe von Bologna (Italien) während der Honigernte stattfanden. In jedem Jahr wurde je ein Bienenvolk verwendet, das in einer DB-Beute untergebracht war. In beiden Bienenvölkern bevölkerten die Bienen alle zehn verfügbaren Waben, von denen 6 bis 7 Brut enthielten.

Am 19. Juli 1999 bzw. 28. Juli 2002 wurden die Bienenvölker durch Tröpfelung von Oxalsäure behandelt. Die Behandlungen bestanden in 50 bzw. 40 ml wässrige Lösungen, die 4,2% Oxalsäure und 60% Zucker (Gewicht/Vol.) enthielten und mithilfe einer Spritze getropft wurden. Vorher wurde den Lösungen mit C<sup>14</sup> markierte Oxalsäure zugefügt (Sigma N. 31, 391-2), u.zwar in Mengen, die 12,1 MBq bzw. 7,4 MBq entsprachen.

Bei beiden Replikationen wurden aus den weiter unten angeführten Stellen Proben vor der Behandlung entnommen. Die Proben nach der Behandlung wurden einmal (1999) oder zweimal pro Tag (7 und 18 Uhr in 2002) entnommen, später aber auch in viel größeren Zeitintervallen.

1999 wurden folgende Stellen beachtet:

- Imagines von den seitlichen Waben;
- 8 – 9 Tage alte Brut;
- ungedeckelter Honig;
- Wachs von frisch gebauten Zellwänden (Mittelwand).

In 2002 wurden die Proben von folgenden Stellen gesammelt:

- Imagines von den seitlichen Waben;
- CO<sub>2</sub> aus der Innenluft der Beute;
- Wachs von den neu gebauten Waben;
- frischer in neuen Waben abgelagerter Honig.

Mithilfe von Pasteur-Kapillarpipetten wurden aus im Sommer 2002 gesammelten Bienen Thoraxhämolymphproben in Eppendorf-Röhren gesammelt (FLURI et al., 1981). Die Vorderflügel einer jeden Biene wurden abgeschnitten und auf Objektträgern mit der Außenseite nach oben befestigt. Die rechten Flügel wurden nicht behandelt, die linken wurden reichlich mit destilliertem Wasser gewaschen.

Nach dem Herausziehen des Stechapparats mit Zangen wurden die Därme der Bienen achtsam herausgezogen. Diese wurden ebenfalls auf Objektträgern montiert und bis zur Verwendung bei ungefähr 40°C bewahrt, damit sie langsam trocknen. Um die Dicke des Präparats herabzusetzen, wurden die Honigmägen sanft gepreßt.

Damit die Bienenkönigin über mehr Legeraum verfüge, wurde im Versuch von 2002 am 5. Tag eine seitliche Honigwabe herausgenommen und durch eine leere Wabe ersetzt. Vor der Behandlung war nur der obere Teil dieser Wabe mit Honig gefüllt. Danach wurde sie allmählich bis zur Mitte gefüllt. Im Moment der Herausnahme befand sich hier eine Zone mit ungedeckelten Honigzellen.

Zur Sammlung von CO<sub>2</sub>-Proben aus dem Bienenvolk wurde eine Plastmasseröhre in die Beute eingeführt, deren Außenende mit einem Stopfen versehen war und deren anderes Ende sich in der Mitte des Brutnestes befand. Es wurde darauf gesorgt, daß weder Bienen noch Lösungstropfen in die Röhre gelangen. 4 l Luft wurden hinausgesogen und in einer anderen Röhre brodeln gelassen, die 5 ml Hyaminhydroxid 10-X (1M in Methanol; Packard Katalog nr. 6003005) enthielt.

Alle Proben, außer Flügel, Därme und Honigwabe, wurden bis zur Analyse tiefgefroren (ungefähr – 25 °C).

Autoradiografien wurden mit den gewaschenen und ungewaschenen Flügeln, den getrockneten Därmen und der am 5. Tag entfernten Honigwabe gemacht. Die Exposition dauerte 33 bzw. 23 Tage im Falle der ersten drei Proben bzw. der Honigwabe. Für ein besseres Anhaften der Wabe an den Film, wurde diese auf eine ihrer Seiten gelegt. Die Autoradiografie erfolgte bei ungefähr –25 °C, sodaß der Honig nicht hinausfließen konnte. Die Proben wurden mit einer Polythenschicht (ungefähr 10 µm) versehen, um den Kontakt mit der fotoempfindlichen Emulsion zu vermeiden. Die verwendeten Filme waren Kodak Biomax MR1, die gemäß der Empfehlungen der Hersteller bearbeitet wurden.

#### *Messung der Radioaktivität (Instrumente und Präparierung der Muster)*

Alle Messungen der Radioaktivität erfolgten durch flüssige Szintillation (LSC) in einem Quantulus-1220-Zähler (LKB, Schweden). Verwendet wurden Polyäthylenfläschchen, die mit einer Teflonschicht versehen waren, und eine Szintillationsmischung Ultima Gold (Packard, Canberra, USA).

Fünf lyophilisierte Bienen wurden genau gewogen, zermahlen und in einem bekannten Volumen von kalter Oxalsäure aufgeschwemmt. Die Aufschwemmung wurde 10 Minuten lang dem Ultraschall ausgesetzt, danach auf 70 - 80 °C erwärmt und geschleudert. 1 ml des Obenaufschwimmenden wurde in einem 20 ml Fläschchen zu 18 ml Szintillationsmischung zugegeben.

Eine aliquote Honigmenge (ungefähr 0,2 g) wurde in einer Szintillationsröhre genau gewogen, danach mit Wasser (ungefähr 1 ml) aufgelöst und 18 ml Szintillationsgemisch zugefügt.

0,1 g (genau gewogenes) Bienenwachs wurden in 25 ml Zyklohexan aufgelöst und dem Ultraschall ausgesetzt. 1 ml Lösung wurde in einem 20 ml Fläschchen 18 ml Szintillationslösung zugefügt.

Eine genau gewogene Probe von Bienenbrut im Alter von 8-9 Tagen wurde in 5 ml kalter Oxalsäure aufgeschwemmt, 10 min lang dem Ultraschall ausgesetzt, 10 min lang auf 60 °C erwärmt und geschleudert. Zur Klärung der Lösung wurden 3 Tropfen Trichloressigsäure getropft. Nach der zweiten Schleudung wurde 1 ml Obenaufschwimmendes zu 18 ml Szintillationslösung zugefügt, die sich in einem 20 ml Fläschchen befand.

Eine gewogene Probe von Bienenpollen wurde in 5 ml kalter Oxalsäure aufgeschwemmt, 10 min lang dem Ultraschall ausgesetzt, 10 min lang auf 80 °C erwärmt und danach geschleudert. Das Obenaufschwimmende wurde durch ein 0,1 µm Mikrofilter gefiltert. 1 ml der erhaltenen Lösung wurde 18 ml Szintillationslösung zugefügt, die sich in einem 20 ml Fläschchen befand.

1 ml Hydroxidhamin 10-X, aus der weiter oben beschriebenen CO<sub>2</sub>-Falle erhalten, wurde zu 18 ml Szintillationslösung zugefügt, die sich in einem 20 ml Fläschchen befand.

Die Hämolymphe wurde genau gewogen und mit aufeinanderfolgenden Mengen der Szintillationslösung vollständig übertragen, bis 3 ml erhalten wurden. Diese 3 ml wurden danach 16 ml Szintillationslösung zugefügt, die sich in einem 20 ml Fläschchen befand.

#### TLC-Chromatographie des Bienenwachses

Eine Bienenwachsprobe, die eingesammelt wurde, als die Radioaktivität ihren Höhepunkt erreichte, wurde in Zyklohexan aufgelöst und mit TLC (Silikagel, Merck) analysiert. Nach der Elution mit Äthylazetat wurde die Verteilung der Radioaktivität mit einem Radioscanner (TLC Linearscanner, Berthold, Deutschland) bestimmt.

### Ergebnisse und Diskussionen

#### Imagines und Brut

Abb. 1 veranschaulicht eine beachtliche Verseuchung der Imagines, bestimmt nach 24 Stunden nach der Behandlung 1999. Einen Tag später erreichte das Peak einen Höchstwert von 118 µg/g. Am 7. und 11. Tag erfolgte ein beachtliches Abnehmen, als 10,8 bzw. 2 µg/g festgestellt wurden. Wird das durchschnittliche Gewicht einer Biene, d.h. ungefähr 100 mg, als Referenz angenommen, dann machte die individuelle Verseuchung mit Oxalsäure ungefähr 12 µg, 1 µg bzw. 0,2 µg aus. In den folgenden Monaten wurden weitere allmähliche Abnahmen festgestellt.

Figure 1. Contaminating oxalic acid in adult honey bees and in 8-9 day old brood.

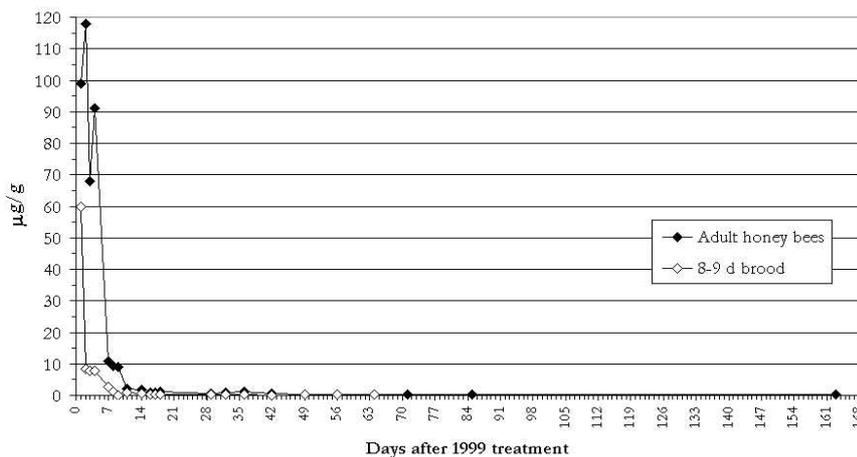


Abb. 1 – Verseuchung mit Oxalsäure von Imagines und 8-9 Tage alter Brut

Auf der Waagerechten: Tage nach der Behandlung in 1999; — ◆ — Imagines, — ◇ — 8-9 Tage alte Brut

Eine niedrigere Verseuchung wurde bei den älteren ungedeckelten Larven festgestellt, wobei der Höchstwert 60 µg/g betrug. Genau wie bei den Imagines wurde das Peak 24 Stunden nach der Behandlung verzeichnet. Im Vergleich zu den Bienen begann das Abnehmen viel schneller und setzte sich auf niedrigeren Niveaus fest.

Bei der zweiten Replikation konnte die Anwesenheit von C<sup>14</sup>-Oxalsäure in der Hämolymphe der Bienen bewiesen werden. Der Höchstwert (10 ng/mg) wurde 12 Stunden nach der Behandlung festgestellt. Später erreichte die Konzentration in der 84. Stunde 1,1 ng/mg, und das nach einem plötzlichen Abnehmen. Die Radioaktivität verschwand fast vollständig einen Monat nach der Behandlung (Abb.2).

Kleine Differenzen, wenn vorhanden, wurden bei den Autoradiografien der ungewaschenen und der mit Oxalsäure reichlich gewaschenen Flügeln festgestellt. Beide hinterließen auf dem Film klare Spuren ihrer Aderung. Diese Tatsache ist ein Beweis der niedrigen Außenverseuchung der Bienen und entspricht der Feststellung einer Oxalsäureverseuchung der Hämolymphe, die die Flügeladerung füllt.

Die Hypothese eines Oxalsäure-Stoffwechsels durch die Biene wird durch die Entdeckung von radioaktiver CO<sub>2</sub> in der untersuchten Innenluft des Bienenvolkes unterstützt (Abb.2), dessen Konzentrationspeak im Vergleich zu dem der Hämolymphe etwas verspätet war. Es stellte sich ein plötzliches Abnehmen ein, gefolgt von einem täglichen Zyklus mit positiven Peaks in den Abendproben und niedrigen Peaks in den Morgenproben. Obwohl für dieses Phänomen keine klare Erklärung gegeben werden kann, ist es möglich, daß das unterschiedliche Tätigkeitsniveau des Bienenvolkes in den Tages- und Nachtstunden einen Einfluß gespielt hat.

Figure 2. Contaminating oxalic acid in honey bee haemolymph (left) and in CO<sub>2</sub> (right).

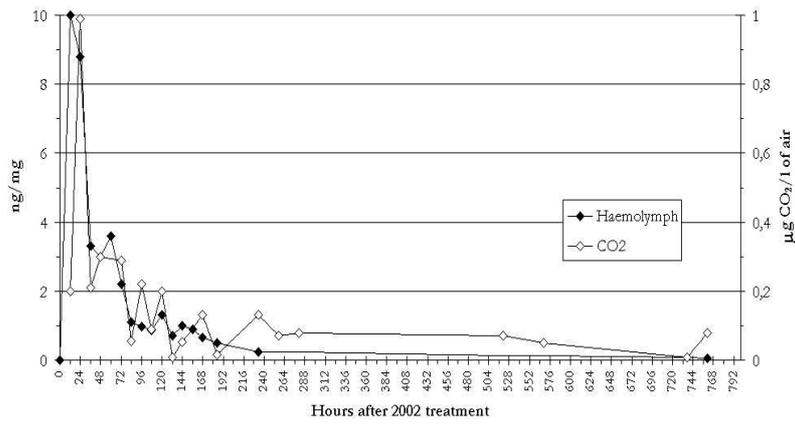


Abb.2 – Oxalsäure-Verseuchung von Bienenhämolymphe (links) und CO<sub>2</sub> (rechts)  
Auf der Waagerechten: Stunden nach der Behandlung in 2002

Abb.3 veranschaulicht die Verteilung der Radioaktivität im Darm. 12 Stunden nach der Behandlung sind in allen Darmtrakts zwischen Honigmagen und Kotblase Marker zugegen, doch etwas später wird der radioaktive Marker nur gelegentlich im Honigmagen entdeckt. Im allgemeinen ließ die Verseuchung mit der Zeit nach. Die am 22. und 31. Tag gesammelten Därme enthielten keine feststellbare Verseuchungsmengen.

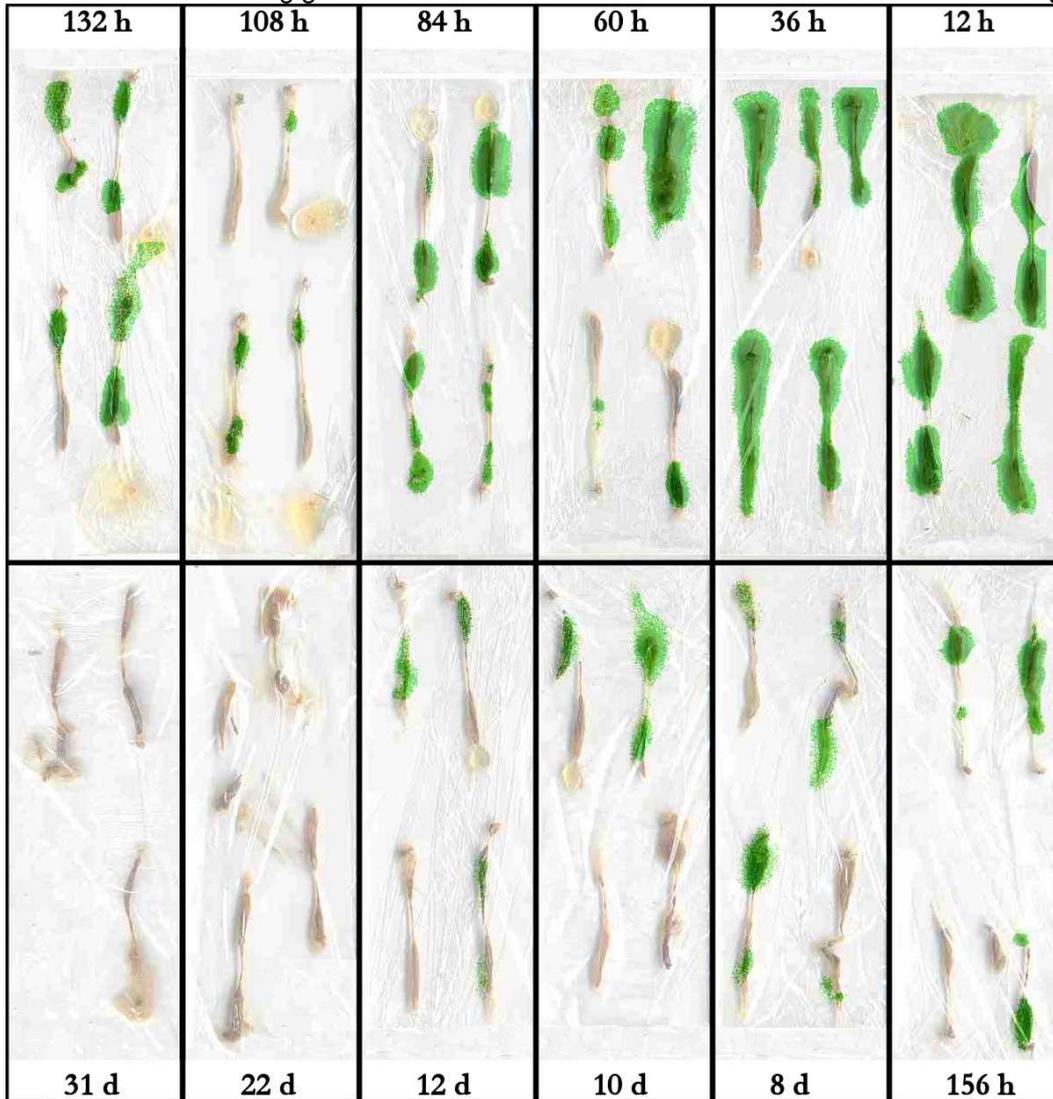


Abb.3 – Radioaktivität in den Därmen der Honigbienen (gefärbte Zonen)

## Bienenwachs und Waben

Abb.4 widerspiegelt die  $\mu$ -Radioaktivität, die 1999 in den Bienenwachsproben festgestellt wurde. Das Peak ist um einen Tag versetzt, wurden Imagines und Brut verglichen. Trotz der hydrophylen Eigenschaft der Oxalsäure wurde die Anwesenheit des radioaktiven Markers ( $C^{14}$ ) auf lange Dauer festgestellt. Die TLC-Analysen einiger Proben ergaben, daß die radioaktive Fraktion des Bienenwachses aus mehr als einem einzigen Bestandteil bestehen kann. Das spricht dafür, daß nach der Behandlung nicht nur Oxalsäurekristalle auf die Waben gelangen können, sondern daß die Säure mit dem Bienenwachs reagiert und/oder daß die Metaboliten der Oxalsäure den Syntheseweg eines bestimmten Bestandteils des bienensekretierten Wachses einschlagen.

Figure 4.  $\beta$ -activity in new wax collected from pre-existing combs.

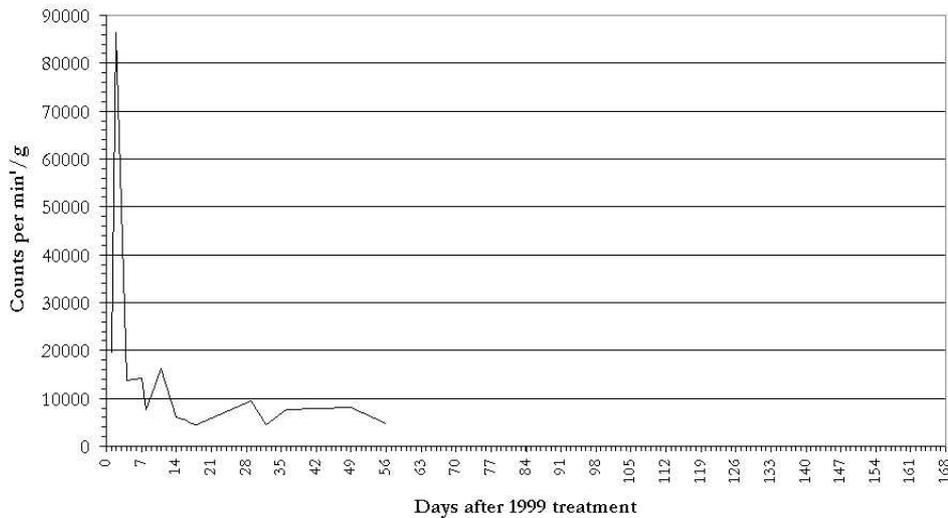


Abb.4 –  $\beta$ -Aktivität in neuem Wachs, eingebracht von schon bestehenden Waben

Konstanterweise wurde in 2002 die Radioaktivität in frischen Wachsproben ebenfalls auf lange Dauer entdeckt. In Abb.5 wurden alle aufgezeichneten Signale in Oxalsäure-Konzentrationen umgewandelt, obwohl in diesem Falle unbekannte Mengen von Bestandteilen, verursacht durch chemische Reaktionen und/oder Stoffwechsel, existierten und zu einer mehr oder weniger unkorrekten Einschätzung der Verseuchung führen konnten. Die Hypothese eines Oxalsäure-Stoffwechsels entspricht gleichzeitig der Existenz der im Bienenwachs und in der  $CO_2$  festgestellten Peaks.

Figure 5. Contaminating oxalic acid in wax (see text) and honey.

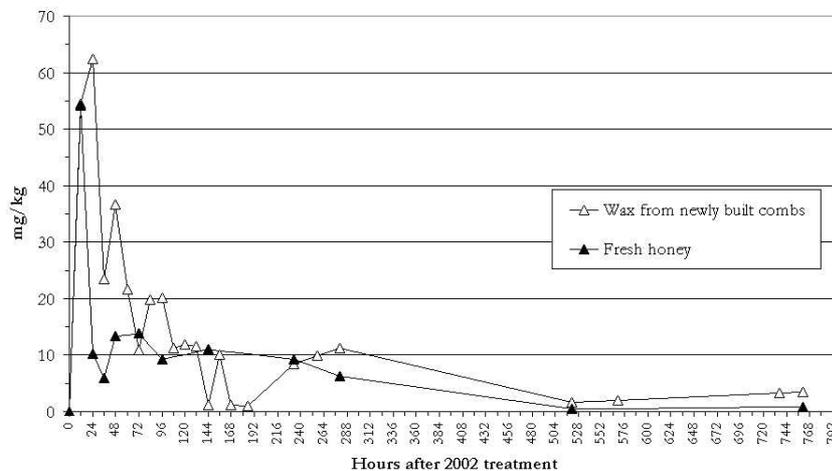


Abb.5 – Oxalsäure-Verseuchung von Bienenwachs und Honig  
 —△— Bienenwachs von frisch gebauten Waben; —▲— frischer Honig

Die Autoradiografie der Honigwabe (Abb.6) ergab, daß der radioaktive Marker sich auf der Wabenoberfläche verteilt hat (eine unverseuchte Wabe hinterließ keine Spur auf dem Film). Die dunkle Zone im oberen Teil befindet sich in der Nähe des Verabreichungspunktes. In den ungedeckelten Zellen schien die Verseuchung in den Zellwänden viel größer zu sein als im Honig.

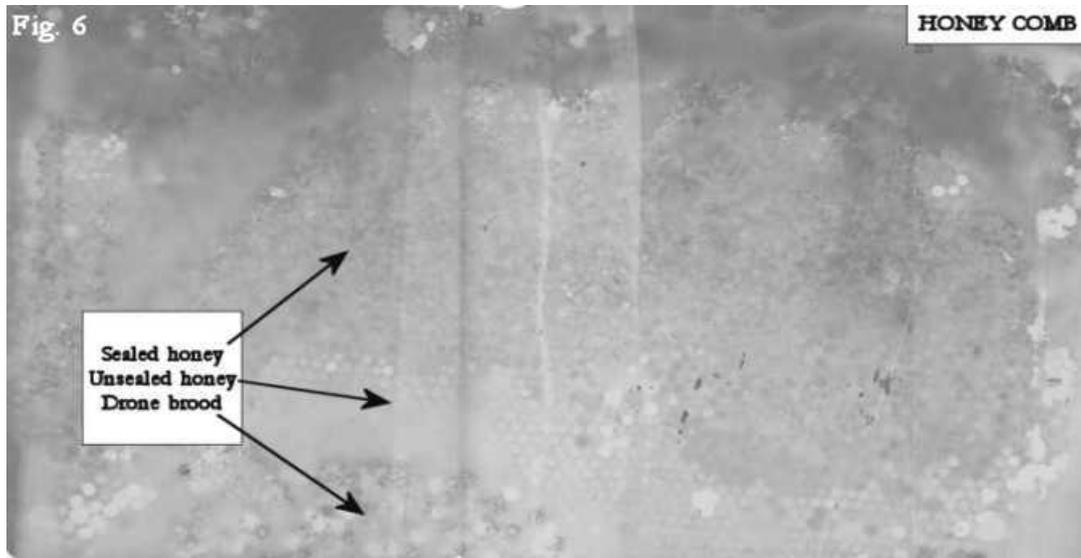


Abb.6 – Autoradiografie einer Honigwabe. Die isolierten schwarzen Flecke sind Kunstgriffe.  
Im Kästchen: gedeckelter Honig, ungedeckelter Honig, Drohnenbrut

#### Rückstände im Honig

Nach der Behandlung in 1999 stieg der Oxalsäuregehalt des ungedeckelten Honigs aus dem Honigraum bis auf 0,59 mg/kg am 4. Tag. Ab dem 8. Tag lag die Verseuchung unter 0,1 mg/kg. Die Proben, die aus den Honigreserven im folgenden Herbst entnommen wurden, enthielten weiterhin 0,07 bis 0,1 mg/kg. Im Vergleich mit dem natürlichen Gehalt des Honigs an Oxalsäure, der abhängig von der botanischen Herkunft zwischen 3 und 760 mg/kg betragen kann, sind diese Werte niedrig und bewegen sich innerhalb der natürlichen Variabilitätsgrenzen (NANETTI et al., 2002). Dieses entspricht einem herabgesetzten Verseuchungsrisiko des Honigs, der gewonnen werden soll.

In 2002 wurden die Honigproben aus Waben genommen, die von den Bienen zwischen zwei aufeinanderfolgenden Probeentnahmen gebaut worden sind, wodurch kein möglicher Einfluß der Verdünnung durch einen schon bestehenden unverseuchten Honig bestand. Dadurch waren die relevanten Daten viel repräsentativer für die aktuelle Übertragung von der Biene zum Honig. In diesem Fall wurde ein Höchstniveau von 54,2 mg/kg in 12 Stunden nach der Behandlung (Abb.5) festgestellt, aber danach folgte ein jähes Abnehmen und Werte zwischen 6 und 13,8 mg/kg in den ersten 1 bis 12 Tagen nach der Behandlung. Weitere Aufzeichnungen lagen unter 1 mg/kg.

#### Danksagung

Die Verfasser danken Prof. Maria Adelaide VECCHI, Universität von Bologna, und Prof. Adriano PODESTÀ, Universität von Pisa, für die wertvollen Diskussionen und Suggestionen.

#### L I T E R A T U R

- Bernardini M., Gardi T. (2001), Impatto degli interventi sanitari per il controllo dell'acaro varroasulla qualità del miele e della cera. *Apitalia* 28(7-8): 21-24
- Bogdanov S., Charrière J.D., Imdorf A., Kilchenmann V., Fluri P. (2002), Determination of residues in honey after repeated field trials with formic and oxalic acid. *Apidologie* 33(4): 399-409
- Del Nozal M.J., Bernal J.L., Diego J.C., Gómez L.A., Ruiz J.M., Highes M. (2000), Determination of oxalate, sulphate and nitrate in honey and honeydew by ion-chromatography. *J. of Chromatography* 881: 629-638
- Fluri P., Sabatini A.G., Vecchi M.A., Wille H. (1981), Blood juvenile hormone, protein and vitellogenin titres in laying and non-laying queen honeybees. *J. Apic. Res.* 20(4): 221-225
- Mutinelli F., Baggio A., Capolongo F., Piro R., Biasion L. (1997), L'acido ossalico nella lotta alla varroasi. *L'ape nostra amica* (4): 4-7
- Nanetti A. (2002), Oxalic acid treatments for varroa control (review). Symposium "Prevention of residues in honey", Celle (Germany), October 10-11, 2002
- Nanetti A., Ghini S., Gattavecchia E., Bartolomei P., Marcazzan G.L., Massi S. (2002), Pharmacodynamics of oxalic acid and treatment residues in honey. Symposium "Prevention of residues in honey", Celle (Germany), October 10-11, 2002. Poster session
- Nanetti A., Stradi G. (1997), Oxalsäure-Zuckerlösung zur Varroabekämpfung. *Allg. Dtsch. Imkerztg* 31 (11): 9-11