

# ZUKUNFT BIENE



3. Zwischenbericht

Stichtag: 31. Oktober 2020

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 Zwischenbericht wurde am 31. Oktober 2020 über Dafne (<https://www.dafne.at>) zur  
Approbation eingereicht.

### 3. Zwischenbericht

Stichtag: 31. Oktober 2020

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,  
Abteilung Bienenkunde und Bienenschutz Wien, Tel: 050 555 33 120; [linde.morawetz@ages.at](mailto:linde.morawetz@ages.at)

## Autoren und Autorinnen des Zwischenberichts

- 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 Nachhaltigkeit und Tourismus	€ 251.397,00
Biene Österreich	€ 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 Zwischenberichts</b>	<b>iv</b>
<b>Finanzierung</b>	<b>v</b>
<b>Vorwort</b>	<b>x</b>
<b>Danksagung</b>	<b>xii</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>Project Summary</b>	<b>3</b>
<b>1 (U) Wintersterblichkeit</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>1.2 Methodik</b>	<b>10</b>
1.2.1 Datenerhebung	10
1.2.2 Datenvalidierung und Fehlerkontrolle	12
1.2.3 Statistik	12
<b>1.3 Ergebnisse</b>	<b>14</b>
1.3.1 Beteiligung	14
1.3.2 Repräsentativität	15
1.3.2.1 Anonyme Teilnahme versus nicht anonyme Teilnahme	15
1.3.2.2 Online-Antworten versus Papierfragebogen-Antworten	15
1.3.2.3 Betriebsgröße	17
1.3.2.4 Geografische Herkunft	18
1.3.2.5 Bienenstandort	18
1.3.3 Verlustrate in Österreich, den Bundesländern und den Bezirken	19
1.3.3.1 Österreich	19
1.3.3.1.1 Populationsdynamik in Österreich	20
1.3.3.2 Bundesländer	21
1.3.3.3 Ausgewählte Bezirke	24
1.3.4 Symptome	24
1.3.5 Verteilung der Völkerverluste	26
1.3.6 Risikoanalyse	26
1.3.6.1 Seehöhe	27
1.3.6.2 Betriebsgröße	27
1.3.6.3 Betriebsweise	28
1.3.6.3.1 Stand- versus Wanderimkereien	29
1.3.6.3.2 Vereinigung von Völkern	30
1.3.6.4 Wabenhygiene	31
1.3.6.5 Trachtangebot	31
1.3.6.6 Bekämpfung der Varroamilbe	33
1.3.6.6.1 Bestimmung des Varroabefalls	35
1.3.6.6.2 Zeitpunkt und Häufigkeit der Anwendungen	38
1.3.6.6.3 Anwendungen in den Jahreszeiten	39
1.3.6.6.4 Auswirkungen der Drohnenbrudentnahme auf die Winterverluste	41

1.3.6.6.5	Ameisensäure-Behandlung . . . . .	43
1.3.6.6.6	Oxalsäure . . . . .	43
1.3.6.6.7	Hiveclean/Bienenwohl/Varromed . . . . .	44
1.3.6.6.8	Thymol . . . . .	45
1.3.6.6.9	Hyperthermie . . . . .	46
1.3.6.6.10	Andere biotechnische Methoden (ohne Hyperthermie / Drohnenbrutentnahme)	47
1.3.6.6.11	Behandlungskombinationen . . . . .	47
1.3.6.7	Königinnen-Verluste . . . . .	50
1.3.6.7.1	Königinnenprobleme . . . . .	50
1.3.6.7.2	Im Einwinterungsjahr begattete Königin („junge Königin“)	52
1.3.6.8	Verkrüppelte Flügel . . . . .	53
<b>1.4</b>	<b>Diskussion . . . . .</b>	<b>54</b>
1.4.1	Populationsdynamik in Österreich . . . . .	55
1.4.2	Repräsentativität und Anonymität . . . . .	55
1.4.3	Bundeshländer und Bezirke . . . . .	56
1.4.3.1	Seehöhe . . . . .	57
1.4.4	Symptome . . . . .	57
1.4.5	Betriebsgröße . . . . .	58
1.4.6	Betriebsweisen . . . . .	59
1.4.6.1	Wanderimker . . . . .	59
1.4.6.2	Fremdwachs und Naturwabenbau . . . . .	59
1.4.6.3	Varroatoleranz und kleine Brutzellen . . . . .	60
1.4.6.4	Bauart des Bienenstockes . . . . .	60
1.4.6.5	Zertifizierte Bio-Imkerei . . . . .	61
1.4.6.6	Vereinigung von Völkern . . . . .	61
1.4.7	Wabenhygiene . . . . .	61
1.4.8	Trachtangebot . . . . .	62
1.4.9	Bekämpfung der Varroamilbe . . . . .	63
1.4.9.1	Bestimmung des Varroabefalls . . . . .	64
1.4.9.2	Behandlungsmethoden . . . . .	64
1.4.9.2.1	Biotechnische Maßnahmen . . . . .	64
1.4.9.2.2	Ameisensäure . . . . .	65
1.4.9.2.3	Oxalsäure . . . . .	66
1.4.9.2.4	Thymol . . . . .	66
1.4.9.2.5	Kombinationen . . . . .	67
1.4.10	Königinnen-Verluste . . . . .	67
1.4.10.1	Königinnenprobleme . . . . .	68
1.4.10.2	Im Einwinterungsjahr begattete Königin („junge Königin“)	68
1.4.11	Verkrüppelte Flügel . . . . .	69
1.4.12	Zusammenfassung . . . . .	69
<b>1.5</b>	<b>Anhang . . . . .</b>	<b>70</b>
<b>2</b>	<b>(A) Virenmonitoring . . . . .</b>	<b>75</b>
<b>2.1</b>	<b>Einleitung . . . . .</b>	<b>75</b>

<b>2.2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>76</b>
2.2.1	Zeitablauf	76
2.2.2	Anwerbung und Auswahl der TeilnehmerInnen	78
2.2.3	Stichprobengröße und Auswahl der TeilnehmerInnen	79
2.2.4	Durchführung der Probenahme	81
2.2.5	Probenbearbeitung	83
2.2.6	Abfrage Winterverluste	83
2.2.7	Virusanalytik	83
2.2.7.1	Plasmide und Bienenhomogenate zur Methodenetablierung und Validierung	84
2.2.7.2	Nukleinsäureextraktion aus Bienenhomogenaten	86
2.2.7.3	Methodenetablierung und -validierung zum Nachweis und zur Quantifizierung von ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A, DWV-B und SBV	87
2.2.7.4	CBPV-Ringversuch und Quantifizierung weiterer CBPV Referenzproben	89
2.2.7.5	Methodenetablierung und -validierung zum Nachweis und zur Quantifizierung von IAPV und KBV	89
2.2.7.6	Testung und Quantifizierung der Projektproben	91
2.2.8	Statistik	91
2.2.8.1	Zusammenhang zwischen Prävalenz bzw. Virustiter und Standort- bzw. Volksfaktoren	91
2.2.8.2	Einflussfaktoren auf die Winterverluste	92
<b>2.3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>95</b>
2.3.1	Projektfortschritt	95
2.3.1.1	Kontakt mit den ProjektteilnehmerInnen	95
2.3.1.2	Datenauswertung	96
2.3.2	Kennwerte der teilnehmenden Imkereibetriebe	96
2.3.3	Ergebnisse Virusdiagnostik	97
2.3.3.1	Prozesskontrollen	97
2.3.3.2	Negativextraktionskontrollen	97
2.3.3.3	Semi-quantitativer Nachweis der Apis-Actin mRNA	97
2.3.4	Virusprävalenz und Viruskonzentration	97
2.3.5	Geographische Varianz in der Virusprävalenz und Viruskonzentration	100
2.3.5.1	Bundesländer	100
2.3.5.2	Seehöhe	104
2.3.6	Zusammenhang Viruskonzentration und Winterverluste	108
2.3.6.1	Logistische Regression	109
2.3.6.2	Regression Tree	110
2.3.6.3	Random Forest-Modell	111
2.3.6.4	Stacking	112
2.3.6.5	Vergleich der Vorhersagekraft der Winterverlust-Modelle	113
2.3.7	Zusammenhang Virusprävalenz und Viruskonzentration mit den berichteten Symptomen der Völker	114
2.3.7.1	Totenfall vor dem Bienenvolk	114
2.3.7.2	Varroamilben auf Bienen	114
2.3.7.3	Bienen mit verkrüppelten Flügeln	115
2.3.7.4	Schwarz-glänzende Bienen	116

2.3.7.5	Sackbrutsymptome . . . . .	117
<b>2.4</b>	<b>Diskussion . . . . .</b>	<b>118</b>
2.4.1	Repräsentativität der StudienteilnehmerInnen . . . . .	118
2.4.2	Prävalenzlevel . . . . .	119
2.4.3	Höhe Virustiter . . . . .	121
2.4.4	Winterverluste . . . . .	122
2.4.4.1	DWV-B . . . . .	122
2.4.4.2	ABPV . . . . .	123
2.4.4.3	Imkererfahrung . . . . .	124
2.4.4.4	Vollständigkeit der Modelle . . . . .	124
2.4.5	Zusammenfassung und Ausblick . . . . .	125
<b>2.5</b>	<b>Anhang . . . . .</b>	<b>126</b>
2.5.1	Anhang I: Anleitung zur Probenahme . . . . .	126
2.5.2	Anhang II: Fragebogen Probenahme 2019 . . . . .	130
2.5.3	Anhang III: Ergebnis Virenanalyse . . . . .	131
2.5.4	Anhang IV: Informationsblatt zu unseren Ergebnismitteilungen . . . . .	134
2.5.4.1	„Frage und Antwort“ Katalog . . . . .	134
2.5.4.2	Bekämpfung der Viruserkrankungen . . . . .	137
<b>3 (V)</b>	<b>Virendiagnostik und -prophylaxe bei Honigbienen</b>	<b>139</b>
<b>3.1</b>	<b>Einleitung . . . . .</b>	<b>139</b>
<b>3.2</b>	<b>Methodik . . . . .</b>	<b>140</b>
3.2.1	Ausgangslage der Studie . . . . .	141
<b>3.3</b>	<b>Ergebnisse . . . . .</b>	<b>141</b>
3.3.1	Antigene . . . . .	141
3.3.2	Immunisierungen . . . . .	145
3.3.2.1	Sackbrutvirus (SBV) . . . . .	145
3.3.2.2	Akutes Bienenparalysevirus (ABPV) . . . . .	146
3.3.3	Antikörper . . . . .	146
3.3.3.1	Flügeldeformationsvirus (DWV) . . . . .	146
3.3.3.2	Sackbrutvirus (SBV) . . . . .	147
3.3.3.3	Akutes Bienenparalysevirus (ABPV) . . . . .	147
3.3.3.3.1	Antikörper gegen das hochreine Virus . . . . .	147
3.3.3.3.2	Antikörper gegen die rekombinanten Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 . . . . .	148
3.3.4	ELISA-Tests mit definierten Proben . . . . .	148
3.3.5	ELISA-Tests mit Feldproben . . . . .	148
<b>3.4</b>	<b>Diskussion . . . . .</b>	<b>148</b>
<b>Veröffentlichungen und Vortragstätigkeit im Zeitraum der Projektdauer (22.12.2017 bis 30.10.2020)</b>		<b>150</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>		<b>154</b>
<b>Literatur</b>		<b>155</b>

## Vorwort

Im Oktober 2019 durfte ich, wie bereits bei Projektbeginn geplant, die Leitung des Projekts „Zukunft Biene 2“ von Herrn Professor Karl Crailsheim übernehmen. Herr Professor Crailsheim hat das Projekt vom Start im Jahr 2017 an — obwohl bereits im Ruhestand — geleitet und wird uns erfreulicherweise auch noch bis Projektende als Mitglied des Projekts erhalten bleiben. Ich möchte mich hiermit bei ihm für die geleistete Arbeit bedanken und festhalten, dass ich in bester Zusammenarbeit ein intaktes Projektkonsortium übergeben bekommen habe, das in allen Vorhaben im Zeitplan war. Ich selbst bin seit Beginn der „Zukunft Biene“ Projektreihe im Jahr 2014 in das Projekt involviert, und habe im Jahr 2008 mit Professor Crailsheim die ersten Untersuchungen der Wintersterblichkeit in Österreich begonnen. Seit damals schätze ich den Austausch mit den PraktikerInnen, und habe in den letzten Jahren daran gearbeitet, Untersuchungen mit Imkerbeteiligung im Sinne von Citizen Science in Österreich voranzutreiben. Das zeigt sich auch in 2 Modulen des laufenden Projektes, in denen ImkerInnen aktiv in die Datengenerierung und Probennahme eingebunden sind. Auch in dem von der Covid-19 Pandemie beherrschten Jahr 2020 haben wir unsere Untersuchungen durchgeführt, und wie geplant Bienenproben auf Viren untersuchen können. Und das, obgleich ProjektmitarbeiterInnen der AGES zeitweise bei der Corona-Hotline ausgeholfen haben und die KollegInnen von der Veterinärmedizinischen Universität Wien PCR-Tests auf Corona durchgeführt haben.

Zu unserer Freude sind im Jahr 2019 auch noch drei wissenschaftliche Publikationen mit Daten aus dem Projekt „Zukunft Biene 1“ (Laufzeit: 2014-2017) erschienen. Dies zeigt, dass uns die von den Fördergebern gewährte Forschungsförderung Zeit für valide, international geprüfte, und gut aufbereitete wissenschaftliche Erkenntnisse lässt. Die für alle zugänglichen Publikationen finden sich in der Online-Zeitschrift *PlosOne* zur in den Jahren 2014 und 2015 an 1596 Bienenvölkern durchgeführten Beobachtungsstudie (Morawetz et al., 2019a), in der Online-Zeitschrift *Scientific Reports* zur Trachtpflanzendiversität von Pollenspendern (Brodtschneider et al., 2019c), sowie in der Zeitschrift *Agriculture, Ecosystems & Environment* wo ein mehrjähriger Vergleich zwischen Österreich und unserem Nachbarland Tschechien hinsichtlich Imkerei und Winterverluste veröffentlicht wurde (Brodtschneider et al., 2019a).

Eine aus dem Projekt „Zukunft Biene 2“ entstammende wissenschaftliche Publikation mit einer detaillierten Auswertung der Überwinterungs-Ergebnisse der österreichischen Imkerei unter Berücksichtigung unterschiedlicher Betriebsweisen ist im Jahr 2020 in der Online-Zeitschrift *Diversity* erschienen (Oberreiter und Brodtschneider, 2020). Wir haben der internationalen Wissenschaftsgemeinschaft damit nach einer ersten, 2010 im *Journal of Apicultural Research* erschienenen Analyse, ein weiteres Mal die österreichische Imkerei und die State-of-the-Art Untersuchung von Völkersterblichkeit anhand der von Imkereien zur Verfügung gestellten Daten darlegen können. Alle diese Publikationen zeugen von der gesteigerten Aufmerksamkeit, die der Honigbiene in unserem Land in den letzten Jahren durch diese Projektförderungen zu Teil wurde, und die sich hoffentlich direkt und möglicherweise auch indirekt auf die Praxis in Form eines gesunden Imkereisektors auswirkt.

Die immer mit großer Spannung erwartete Auswinterung der Bienenvölker zeigt seit nunmehr drei Jahren in Folge durchschnittliche Ergebnisse hinsichtlich der Wintersterblichkeit. Im Winter 2019/20 haben Österreichs Imkereien relativ gut ausgewintert. Nur 12,6% der Bienenvölker

haben den Winter nicht überlebt; ein Wert der akzeptiert und durch Nachschaffung auch wieder kompensiert werden kann. Es gab jedoch auch in dieser Periode wieder lokal oder vereinzelt inakzeptabel hohe Verlustraten.

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. Einen langjährig gedienten Mitstreiter dürfen wir 2020 in den Ruhestand entlassen. Dr. Rudolf Moosbeckhofer hat als Leiter der Abteilung für Bienenkunde der AGES über Jahrzehnte die Bienenforschung in Österreich mitbestimmt, und kennt den Sektor wie wohl nur wenige. Ich wünsche ihm im Namen aller ProjektmitarbeiterInnen alles Gute, wünsche mir, dass wir noch oft von seiner Expertise profitieren können, und dem Rudi volle Honigtöpfe und einen Korb voller Pilze!

Robert Brodschneider, Projektleiter  
Graz, am 03.09.2020

## Danksagung

Großer Dank gebührt den Geldgebern dieses Projektes, dem Bundesministerium für Nachhaltigkeit 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 Verlustraten der eingewinterten Völker reichen dabei von 8,1% (95% CI: 7,4-8,8%) (Winter 2015/16) bis 28,4% (95% CI: 27,0-29,9%) (Winter 2014/15).

Die 1.539 Antworten betreffend 30.724 eingewinterte Bienenvölker der Untersuchung 2020 wurden auf ihre Repräsentativität überprüft und Analysen zur geografischen Verteilung der Verluste, 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.

Die Winterverlustrate für ganz Österreich lag 2019/20 bei 12,6% (95% CI: 11,9-13,3%). Dieser Wert liegt im Jahresvergleich etwas unter dem laufenden langjährigen Durchschnitt von 16,1%. Im Vergleich zwischen den Bundesländern zeigt sich ein deutlich höherer Verlust für Wien 20,1% (95% CI: 16,0-24,8%). Das häufigste gemeldete Symptom war „keine oder nur wenige tote Bienen im oder vor dem Volk“ mit einer relativen Häufigkeit von 39,9%.

Wie in den vorangegangenen Jahren konnten bei Faktoren die auf Parameter wie Professionalität, Erfahrung in der Imkerei etc. hindeuten signifikant niedrigere Verlustraten festgestellt werden. Hierzu zählen zum Beispiel Betriebsgröße (größere Betriebe haben weniger Verluste) und WanderrimkerInnen die geringere Verlustraten aufweisen. Auch konnte heuer wieder ein positiver Effekt für einen eigenen Wachskreislauf identifiziert werden, was wiederum auf die Professionalität der ImkerInnen oder auf generelle Qualitätsprobleme mit Wachs hindeuten könnte.

Interessanterweise zeigte sich heuer zum ersten Mal eine Wahrscheinlichkeit für einen niedrigeren Winterverlust, wenn Königinnen aus „Zucht auf Varroa-Toleranz“ gemeldet wurden. Diese niedrigere Verlustrate konnte aber nur im Vergleich zur Gruppe mit der Angabe „Unsicher“ belegt werden. Zusätzlich zeigten TeilnehmerInnen die „kleine Brutzellen“ verwendet haben deutlich geringere Verlustraten im Vergleich zu Imkereien mit normaler Brutzellgröße.

Bei den Trachtpflanzen zeigte sich ein signifikant höherer Verlust bei Raps und Mais. ImkerInnen mit Waldtracht hatten geringere Verluste als die ohne. Im Vergleich zum letzten Jahr konnte dieses Jahr kein signifikant höherer Verlust durch Melezitose erkannt werden.

Bei der Varroabekämpfung zeigte sich ein weiteres Mal, dass biotechnische Methoden im Sommer (totale Brutentnahme, Königin käfigen etc.) ein probates Mittel zur Reduktion von Völkerverlusten sind. Im Gegensatz dazu führte eine Anwendung von Thymol im Sommer zu höheren Verlustraten über den Winter. Die Anwendung von Ameisensäure in Kurzzeitbehandlung ohne Frühjahr- oder Winterbehandlung führte zu hohen Verlusten verglichen mit anderen Behandlungsmethoden.

Wurden Königinnenprobleme während der Saison häufiger beobachtet als im Vorjahr, führte dies zu erhöhten Verlustraten über den Winter. Ein aktiver Austausch mit jungen Königinnen hat hingegen einen positiven Effekt auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Völker.

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, was ein mögliches Symptom einer Virenerkrankung sein kann. Dies konnte von uns auch schon in vorangegangenen Untersuchungen festgestellt werden.

Im Modul A wird 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 wird die Prävalenz von acht Bienenviren auf Bienenstandniveau über drei Jahre erhoben. Diese Viren umfassen 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 dritten Zwischenbericht liegen die Ergebnisse für die zweite Probenahme im Herbst 2019 vor, an der 193 ImkerInnen aus ganz Österreich teilnahmen. In den Bienenproben wurden sechs der acht untersuchten Viren gefunden, die Viren IAPV und KBV wurden in keiner Probe nachgewiesen. Am häufigsten nachgewiesenen wurden BQCV in 191 der 193 Proben (Prävalenz: 99,0%; 95% CI: 96,3-99,7%) und DWV-B in 171 der 193 Proben (88,6%; 95% CI: 83,3-92,4%). SBV wurde mit einer Prävalenz von 80,8% (95% CI: 74,7-85,8%) am dritthäufigsten gefunden (156 Proben positiv). ABPV war in 65 Proben nachweisbar (33,7%; 95% CI: 27,4-40,6%). CBPV und DWV-A wurden selten nachgewiesen: CBPV in 14 Proben (7,3%; 95% CI: 4,4-11,8%) und DWV-A in einer Probe (0,5%; 95% CI: 0,1-2,9%). Die beiden nicht nachgewiesenen Viren KBV und IAPV hatten die gleiche Prävalenz von 0,0% (95% CI: 0,0-2,0%).

Der Virustiter der positiven Proben variierte bei allen nachgewiesenen Viren um mehrere Zehnerpotenzen (minimaler Titer:  $10^4$  -  $10^8$  RNA-Kopien/mL Homogenat, maximaler Titer:  $10^7$  -  $10^{11}$  RNA-Kopien/mL Homogenat). Die drei Viren ABPV, BQCV und SBV hatten die geringsten Titer (Median unter  $10^6$ ). Bei CBPV lag der Median um eine Zehnerpotenz höher bei  $8,8 \times 10^6$  RNA-Kopien/mL Homogenat. Der mediane Titer von DWV-B lag bei etwa  $10^8$  RNA-Kopien/mL Homogenat und war mit Abstand am höchsten. DWV-A wurde nur in einer Probe gefunden ( $3,3 \times 10^7$  RNA-Kopien/mL).

Die Prävalenz von ABPV, DWV-B und SBV unterschied sich zwischen den verschiedenen Bundesländern und Seehöhen. Die drei 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 die Viren kamen besonders häufig in niederen Lagen und seltener in höheren Lagen vor. Auch der DWV-B Titer 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 Virusreproduktion auf diesen Ständen ist.

Um den Zusammenhang zwischen Winterverlust und Bienenviren zu beschreiben wurden vier 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. Alle Modelle bestätigten den Zusammenhang zwischen einem hohen DWV-B Titer und einer hohen Wahrscheinlichkeit von Winterverlusten. Einflussfaktoren, die nur in einzelnen Modellen vorkamen, waren ein hoher ABPV-Titer, das Symptom „Varroamilben auf Bienen“ und die Betriebsgröße. Die beiden letzten Faktoren stehen für den negativen Einfluss der Varroamilbe und den positiven Einfluss von imkerlicher Professionalität auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Völker. Es wird sich zeigen, ob durch die Auswertungen im Folgejahr und der damit einhergehenden größeren Datenmenge die derzeitigen Aussagen bestätigt werden können.

Im Modul V sollen Antikörper zum Nachweis viraler Antigene erzeugt und „Enzyme linked immuno sorbent assays (ELISA)“ zum schnellen und kostengünstigen diagnostischen Nachweis von Virusinfektionen bei Honigbienen im Labor und im Feld entwickelt werden. Der geplante Test soll ähnlich wie der Schnelltest der aktuellen COVID-19 Diagnostik ablaufen und dem Imker binnen Minuten ohne apparativen Aufwand ein Ergebnis liefern. Als Projektdauer wurden drei bis vier Jahre veranschlagt, wobei ein planmäßiger Projektbeginn nach Eingang der Finanzierung eingehalten werden konnte. Im ersten Schritt 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 und das Strukturprotein VP1 des SBV wurden bakteriell exprimiert und chromatographisch gereinigt. Beide Antigene wurden zur Immunisierung von Mäusen verwendet. Für das VP1 des SBV konnten mehrere Hybridomzellklone, die monoklonale Antikörper produzieren, isoliert werden. Die Hybridome der rekombinant hergestellten Antigene des ABPV befinden sich derzeit noch in Selektion. Als Ergänzung zu den gentechnisch erzeugten Antigenen wurden große Mengen von SBV, ABPV und DWV durch Infektion von Bienenlarven erzeugt und mittels Dichtegradientenzentrifugation gereinigt. Die hochreinen Viruspräparationen von ABPV und SBV wurden wiederum zur Immunisierung von Versuchsmäusen herangezogen. Bei allen Versuchstieren konnte die Serokonversion bestätigt werden und die B-Lymphozyten der mit ABPV immunisierten Mäuse wurden bereits fusioniert.

## Project Summary

In module U, risk factors for winter losses of bee colonies are monitored and examined. Thus far, this study has been carried out in Austria since the winter of 2007/08. The loss rates of overwintering colonies ranges from 8.1% (95% CI: 7.4-8.8%) (winter 2015/16) to 28.4% (95% CI: 27.0-29.9%) (winter 2014/15).

The 1,539 answers concerning 30,724 wintered bee colonies of the 2020 study were checked for their representativeness and analyses were carried out on the geographical distribution of the losses, on the symptoms accompanying the winter losses, and on the 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.

The winter loss rate for the whole of Austria in 2019/20 was 12.6% (95% CI: 11.9-13.3%). The loss rate is close to the average of the past years, which is 16,1%. A comparison between the provinces revealed that the loss rate for Vienna 20.1% (95% CI: 16.0-24.8%) is noticeably higher than for the rest of Austria. The most common reported symptom was “no or few dead bees in or in front of the colony” with a relative frequency of 39.9%.

As in previous years factors which could allude for professionalism, experience of the beekeeping operation, etc. were associated with lower loss rates. These include factors like the size of the beekeeping operation (bigger have smaller losses) as well as migratory beekeeping. Participants who did not purchase wax from outside their operation experienced also lower losses, which could point to professionalism or a quality problem of the wax on the common market.

Interestingly, this year participants which did use “Queens bred from Varroa tolerant/resistant

stock” showed lower loss rates, but only compared to the group which did answer with “Unsure”. Additionally, the use of a “Small brood cell size (5.1 mm or less)” led to statistically lower loss rates.

The report of beekeepers that bees foraged on maize or rapeseed was associated with a statistically higher loss rate. Participants with honeydew harvest showed lower loss rates compared to the ones without. This year, in contrast to last year, no higher loss rate was associated with the occurrence of melezitose.

As for methods to combat the varroa mite, biotechnical methods applied in summer (total brood removal, queen confinement, etc.) demonstrated again the possibility for lower loss rates. The usage of thymol in summer caused a negative effect on colony survival over the winter. Exclusive use of formic acid - short term treatment in summer, without a spring or winter treatment displayed a potential for high winter losses.

More observed queen problems over the season in comparison to last year caused a negative effect on the winter loss rate, as in earlier analyses. Active exchange of “old queens” did improve the chance of survival of the colonies.

As a link to the other two modules of this project, we want to stress that the observation of bees with crippled wings during the bees’ active season, which is a possible sign for viral diseases, results in significantly higher winter losses.

Content of module A is a monitoring for bee viruses in Austria. Despite the impact of bee viruses onto 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 are being collected during three years. The viruses analysed are 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 third progress report the results of the second sampling cycle in autumn 2019, in which 193 beekeepers from all over Austria took part, are being reported. Six out of eight analysed bee viruses were detected in the bee samples. BQCV and DWV-B were the most commonly detected viruses, they were present in nearly every sample. BQCV was detected in 191 out of 193 samples (prevalence: 99,0%; 95% CI: 96,3-99,7%) and DWV-B was detected in 171 samples (88,6%; 95% CI: 83,3-92,4%). SBV was detected third most frequent with a prevalence of 80,8% (95% CI: 74,7-85,8%) (156 samples positive). ABPV was detectable in 65 samples (33,7%; 95% CI: 27,4-40,6%). CBPV and DWV-A were seldom detected: CBPV was present in 14 samples (7,3%; 95% CI: 4,4-11,8%) and DWV-A in one sample (0,5%; 95% CI: 0,1-2,9%).

For all detected viruses the positive samples’ titers ranged between several decimal powers (minimal titer:  $10^4$  -  $10^8$  RNA-copies/mL homogenate, maximal titer:  $10^7$  -  $10^{11}$  RNA-copies/mL homogenate). The three viruses ABPV, BQCV und SBV showed the lowest titers (median below  $10^6$ ). With CBPV the median was one decimal power higher ( $8,8 \times 10^6$  RNA-copies/mL homogenate). The median titer value of DWV-B with  $10^8$  RNA-copies/mL homogenate was by far the highest one. DWV-A was detected in only one sample ( $3,3 \times 10^7$  RNA-copies/mL homogenate).

The prevalence of ABPV, DWV-B and SBV differed significantly between the different federal provinces and sea levels. The viruses’ highest prevalence was measured in Vienna and in the

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. The viruses were most prevalent at lower sea levels and least prevalent at higher sea levels. Additionally, the DWV-B 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.

In order to correlate winter loss and bee viruses, four different model types were calculated. For modelling the titer values of the six viruses and eight further influencing factors concerning beekeeper operation and colony characteristics were used. All models highlighted a positive correlation between the DWV-B titer and high winter losses. Further influencing factors, which appeared only in some of the models, were a high ABPV-titer, the symptom "Varroa mites on bees" and the operation's total number of colonies. The two latter factors stress the negative impact of the Varroa mite and the positive impact of high professionalism onto the colonies' survival. It remains to be seen, if the next year's data collection and the accompanying increase in data will verify the current statements.

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 anitgen 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. The project will run for three to four years. The first step of this module is the production of antigen preparations that can be used for vaccination of experimental animals and antigen tests. Due to the favorable project start time, the seasonal breeding activity of our honey bees in 2018 could be used to produce authentic antigens of different virus species (DWV, ABPV and SBV) through infection experiments. In this first phase of the project, large scale preparations of different virus species were generated and studied to determine their purity and infectivity. Highly purified virus stocks have been obtained by density gradient centrifugation serve for immunizations, screening and test development. So far, mice have been successfully immunized using the highly purified ABPV and SBV virus preparation. The fusion of b-lymphocytes with myeloma cells was successful and the screening of the antibody producing hybridoma cells will start shortly.

Additionally, recombinant antigens of Deformed Wing Virus (DWV-A), Varroa destructor Virus (VDV/DWV-B), Sacbrood Virus (SBV) and Acute Bee Paralysis Virus (ABPV) were produced. So far, capsid proteins of SBV (VP1), DWV (VP1) and APBV (VP1, VP2, VP3) were cloned and successfully expressed in bacteria. Purified antigens were used for the immunization of mice. Monoclonal antibodies that detect VP1 of SBV and DWV have been successfully prepared. Mice have been immunized with recombinant ABPV antigens. For the intended use in diagnostic tests, antibodies will be further characterized to determine the highest possible sensitivity and specificity.

# 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, 2006; Cameron et al., 2011; vanEngelsdorp et al., 2011; Cornman et al., 2012; Goulson, 2013; Steinhauer et al., 2014; van der Zee et al., 2014; Clermont et al., 2015; Woodcock et al., 2016; Steinhauer et al., 2018; Belsky und Joshi, 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).

Generell ist das Bienensterben kein neues Phänomen, 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).

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, 2008, 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). 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 (van der Zee et al., 2012, 2014; Brodschneider et al., 2016, 2018c, 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 (van der Zee et al., 2012; Steinhauer et al., 2014; van der 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., 2019a). 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. 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 Phase betreibt die Milbe auch Phoresie. Das bedeutet, dass *Varroa destructor* die adulte Biene als Transportmittel benutzt, um in neue Brutzellen oder gar entfernt liegende Bienenvölker zu gelangen. 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 Deformed Wing Virus (DWV, Flügeldeformationsvirus), welche sich durch die stark verkümmerten Flügel und verkürzten 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., 2019a). 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; van der 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., das 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. 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 Schädlingen in Österreich könnte in Zukunft noch durch den kleinen Bienenstockkäfer (*Aethina tumida*) (Neumann, 2016) und der 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). Die Verbreitung von Krankheiten kann aber nicht nur durch eine hohe Völkerdichte an einem Standort, sondern auch durch Handel und Wanderimkerei über weite Entfernungen stattfinden. Internationale Untersuchungen von van der 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 synergistischen Wirkung verschiedener Stressfaktoren. Untersuchungen von Pettis et al., 2012; Di Prisco et al., 2013 sowie von Alburaki et al., 2017 machen auf die Zusammenhänge zwischen dem subletalen Einfluss von Pestiziden und gesteigertem Pathogenbefall bei Honigbienen aufmerksam. 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 Verlusten, 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. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Larven, die mit Amerikanischer Faulbrut infiziert und gleichzeitig subletalen Dosen bestimmter Pestizide ausgesetzt waren, eine signifikant höhere Mortalität aufwiesen als Larven die nur einem dieser beiden Stressoren ausgesetzt waren (López et al., 2017). DeGrandi-Hoffman und Y. Chen, 2015 beschreibt 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.

ten. 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 (Brodschneider 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 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; Brodschneider et al., 2010; Brodschneider 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 (Brodschneider et al., 2016, 2018c, 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). 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 Experten 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 (van der Zee et al., 2015).

## 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 relativ 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 April-Ausgabe der Zeitschrift „Biene Aktuell“ veröffentlicht. Dadurch sollte eine möglichst große Reichweite erzielt werden und auch ImkerInnen ohne Internetzugang haben somit die Chance zur Teilnahme (van der 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 (begattet 2019), 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 Erneuertem Brutwaben (in relativen Prozentgruppen), die Häufigkeit der Beobachtung von verküppelte Bienen in der Sammelsaison (häufig, selten, keine, weiß nicht) und Zusammenlegung von schwachen Völkern vor dem Winter. 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 sind), 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 verküppelten 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 noch Fragen zur Erneuerung der Waben und zum Alter der Königinnen gestellt beziehungsweise wollten wir wissen, welche Auswirkungen diese Faktoren nach Einschätzung der ImkerInnen auf die Völkerverluste hatte. Zur Auswahl standen folgende Antwortmöglichkeiten: gleich, besser, schlechter oder weiß nicht. Zusätzliche Fragen bezogen sich auf Trachtquellen (Sonnenblumen, Waldtracht, Spätblühende Zwischenfrüchte, Waldtracht mit Melezitose, Raps, Mais) und die Varroabehandlungsmethode sowie deren Zeitraum und ob Varroa-Befall kontrolliert wurde und auch hier

gegebenenfalls der Zeitraum.

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 Zahl 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; van der 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 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 wurden mit Python 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 Höhenschätzung für die Standorte wurde mit dem Topografiemodell SRTM-3v4 über einen Webdienst durchgeführt (GeoNames, o.D.).

## 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, 2020) und das Paket tidyverse (Wickham et al., 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>1</sup>. Die Versionskontrolle der einzelnen Pakete ist mit einem `renv.lockfile` gesichert. 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 mit Hilfe eines Generalisierten Linearen Modells (GZLM) mit quasi-binomialer Verteilung und der Linkfunktion „logit“ berechnet. Die Erstellung erfolgte nach wissenschaftlich etablierten Methoden (van der Zee et al., 2013). Die so berechnete Verlustschätzung ist als umrahmter Fehlerbalken dargestellt, wobei die Box den 95% CI darstellt. Die Verluste von Bienenvölkern durch Elementarschaden wurde in der Auswertung nicht inkludiert, außer wenn explizit im Text erwähnt.

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

Der Großteil der Analyse wurde als einzelner Faktor mit zwei möglichen unterschiedlichen Gruppen durchgeführt, das heißt „Ja“ und „Nein“ Fragen. Um signifikante Unterschiede zu identifizieren wurden die Konfidenzintervalle zwischen den Faktoren verglichen. Wenn sich die Konfidenzintervalle nicht überlappten, zählten wir dies als signifikanten Unterschied. Wenn die Überlappung sehr gering und es ein Vergleich zwischen zwei Gruppen war, wurde die Null Abweichung abzüglich der Abweichung der Residuen im Modell getestet. Wenn dieser Wert signifikant von Null abwich, hatte der analysierte Faktor im Modell einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Bienenvölker (ANOVA mit  $\chi^2$  Abweichung,  $p < 0,05$ ).

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.

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 nicht berücksichtigt. Zusätzlich haben wir die Methode „Entfernung der Drohnenbrut“ exkludiert aufgrund zu kleiner Stichproben, wenn diese Behandlungstechnik berücksichtigt wurde. Mit der resultierenden Matrix wurden die TeilnehmerInnen mit der gleichen Behandlungskombination zur weiteren Auswertung gruppiert und die Verlustrate wie zuvor beschrieben berechnet. Um statistisch relevante Ergebnisse zu erhalten wurden nur Kombinationen mit mindestens 15 TeilnehmerInnen verwendet.

Die Standortkarten wurden mit R (R Core Team, 2020) und Shapefiles unter einer „kreativen gemeinsamen Lizenz“ erstellt<sup>2</sup>. Cluster der Bienenstandorte auf der Karte wurden mit der k-Means-Cluster-Suchmethode erstellt. Um die Genauigkeit in Gebieten mit geringerer Dichte zu verbessern wurden die resultierenden Cluster die nur einen einzigen Bienenstand oder eine

<sup>1</sup>[https://github.com/HannesOberreiter/coloss\\_honey\\_bee\\_colony\\_losses\\_austria](https://github.com/HannesOberreiter/coloss_honey_bee_colony_losses_austria) und archiviert Oberreiter, 2019

<sup>2</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

geringe Anzahl an Bienenständen und hoher Quadratsummen im Cluster aufwiesen entfernt und die ursprüngliche Geolokalisierung für die Karten verwendet.

## 1.3 Ergebnisse

### 1.3.1 Beteiligung

Bei der Erhebung der Winterverluste 2019/20 haben wir von 1.539 Imkereien Datensätze zu 30.724 eingewinterten Bienenvölkern erhalten. Prozentual betrachtet erreicht die Beteiligung österreichischer Imkereibetriebe dabei einen Wert von 5,1%. Diese gaben Rückmeldung über 7,9% aller in Österreich gehaltenen Bienenvölker. In der nachstehenden Tabelle 1.1 werden auch die Rückmeldungen der vorangegangenen Winter dargestellt. Die Grundlage für die Berechnung der Rückmeldungen (in %) bilden die Daten der „Biene Österreich“ (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Beteiligungsrate der österreichischen Imkereien an unserer Umfrage zu den Winterverlusten seit Winter 2013/14.

Jahr	Imkereien			Bienenvölker		
	Gesamt <sup>1</sup> [#]	Teilnehmer [n]	Anteil [%]	Gesamt <sup>1</sup> [#]	Teilnehmer <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
2017/18	27.580	1.391	5,0	353.267	28.373	8,0
2018/19	28.432	1.534	5,4	373.412	33.651	9,0
2019/20	30.237	1.539	5,1	390.607	30.724	7,9

<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.

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

## 1.3.2 Repräsentativität

### 1.3.2.1 Anonyme Teilnahme versus nicht anonyme Teilnahme

Von den 2019/20 insgesamt 1.539 Imkereien haben 503 (32,7%) anonym teilgenommen während 1.036 (67,3%) eine Kontaktmöglichkeit (Kontaktadresse, E-Mail oder Telefonnummer) hinterlassen haben. Beim Vergleich der Verlustrate zwischen anonymen 13,1% (95% CI: 11,8-14,7%) und nicht-anonymen TeilnehmerInnen und Teilnehmern 12,4% (95% CI: 11,6-13,3%) konnte in diesem Jahr kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 1.1).

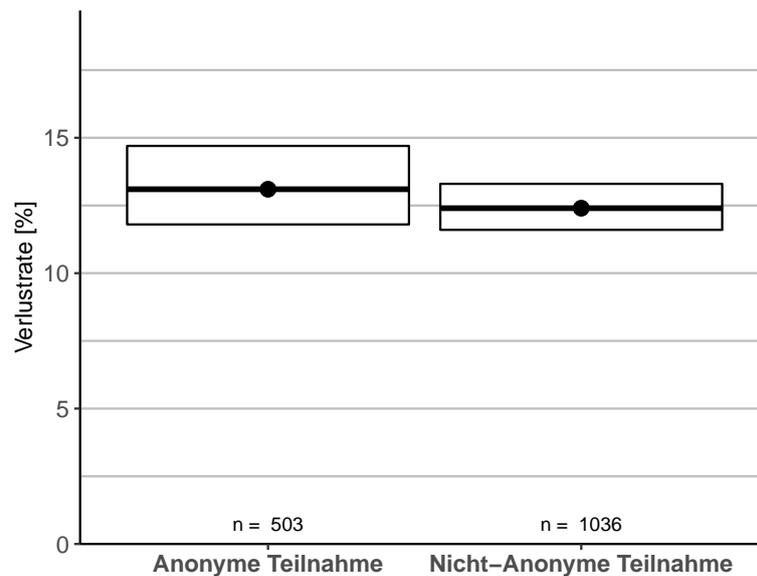


Abbildung 1.1: Höhe der Winterverluste 2019/20 anonymer TeilnehmerInnen und nicht-anonymer TeilnehmerInnen in Prozent ( $\pm 95\%$ CI).

### 1.3.2.2 Online-Antworten versus Papierfragebogen-Antworten

Die Teilnahme war online, mittels Papierfragebogen oder Kurzfragebogen in der Zeitschrift „Biene Aktuell“ möglich. Tabelle 1.2 zeigt, wie viele ImkerInnen sich von 2013/14 bis 2019/20 mit welchem Medium an unserer Untersuchung beteiligt haben. Die meisten Antworten erreichten uns online (Tabelle 1.2). Dieses Jahr war eine signifikant höhere Verlustrate bei Zeitschriften-TeilnehmerInnen 18,7% (95% CI: 14,7-23,3%) im Gegensatz zu Online-TeilnehmerInnen 12,3% (95% CI: 11,5-13,0%) zu erkennen. Die Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen TeilnehmerInnen mittels Papierfragebogen 13,9% (95% CI: 11,1-17,3%) und den zwei anderen Gruppen (Abbildung 1.2).

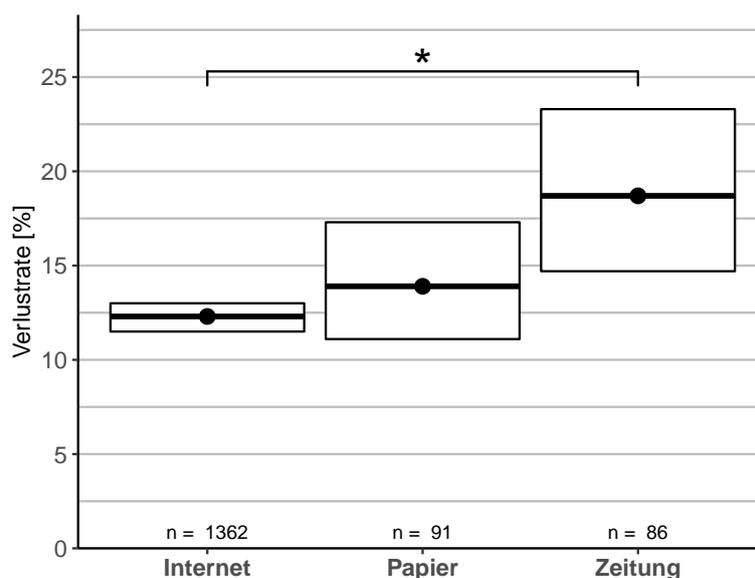


Abbildung 1.2: Höhe der Winterverluste 2019/20 der unterschiedlichen Teilnahmearten (online, Papier, Zeitung) in Prozent ( $\pm 95\%$ CI). Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

Tabelle 1.2: Art der Teilnahme an der Erhebung der Winterverluste von 2013/14 bis 2019/20 (Anzahl TeilnehmerInnen (%)).

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

### 1.3.2.3 Betriebsgröße

Die Verteilung der Größen der teilnehmenden Betriebe ist in Abbildung 1.3-A grafisch dargestellt. Für das Jahr 2019/20 liegt die durchschnittliche Anzahl der eingewinterten Bienenvölker aller teilnehmenden Imkereien bei 20 Völker pro Imkerei. Das ist etwas mehr als der österreichweit erwartete Mittelwert („Biene Österreich“, ca. 13 Völker/Imkerei). Dies kommt durch die Teilnahme von großen Imkereien mit jeweils über 150 eingewinterten Völkern und der daraus resultierenden ungleichen Verteilung der Bienenvölker in unserer Umfrage zustande (Abbildung 1.3-B). Der Median der eingewinterten Völker liegt jedoch bei 10, was in etwa der österreichischen Imkerei-Demographie entspricht.

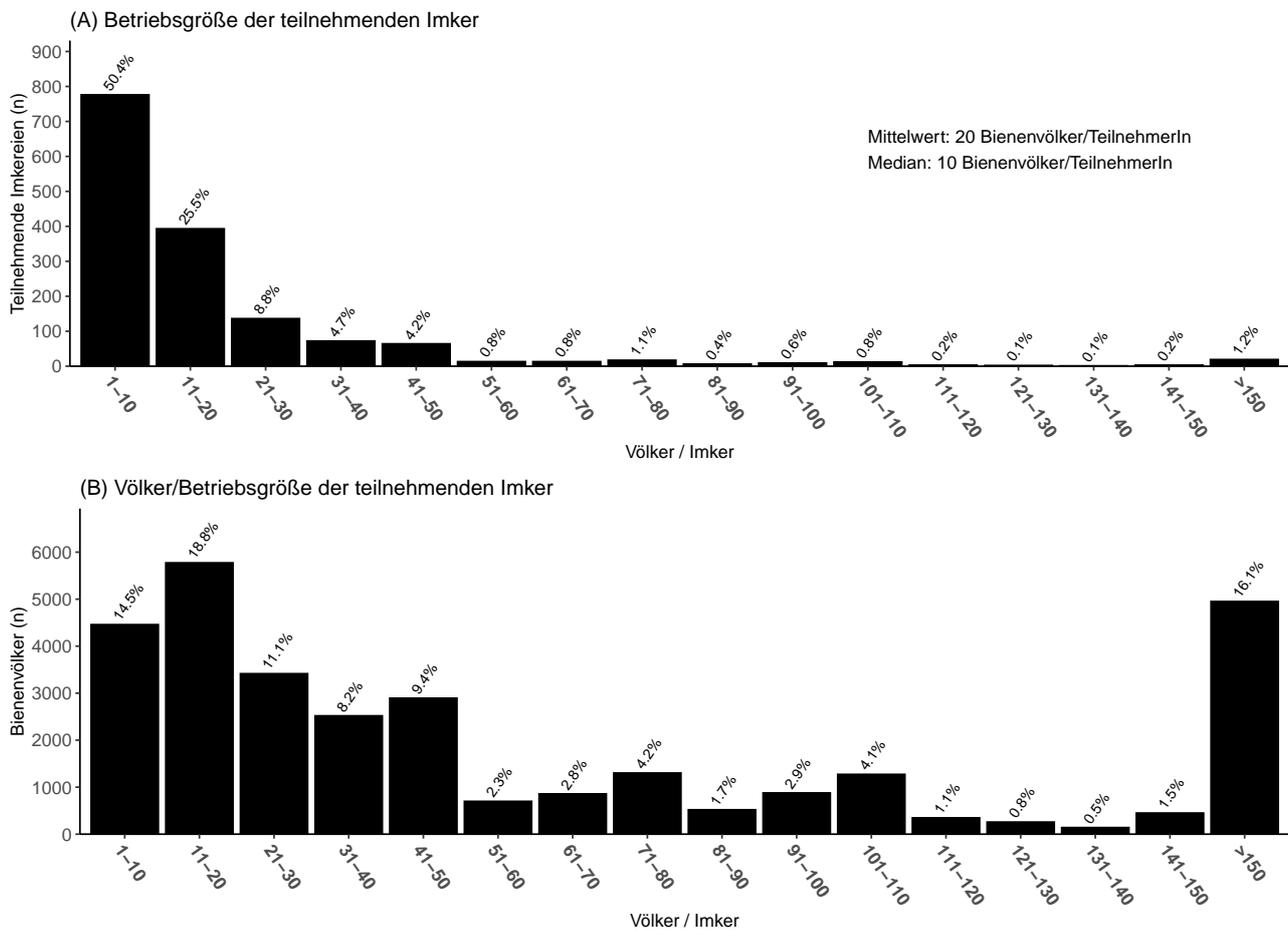


Abbildung 1.3: Betriebsgröße der teilnehmenden Imkereien 2019/20. (A) Anzahl der Imkereien in den jeweiligen Betriebsgrößen. (B) Summe der eingewinterten Bienenvölker in den jeweiligen Betriebsgröße.

### 1.3.2.4 Geografische Herkunft

Abbildung 1.4 zeigt die ungefähre geografische Position des Haupt-Überwinterungsbienenstandes der TeilnehmerInnen, exklusive deren Bienenstände die über mehrere Bezirke verteilt sind. Die Karte zeigt eine landesweite Verbreitung über ganz Österreich, wobei einige Gebiete dominanter waren als andere. Dies könnte auf geografisch unzugängliche Gebiete wie Gebirgszüge zurückgeführt werden und Gebiete mit geringerer Dichte an Imkereibetrieben.

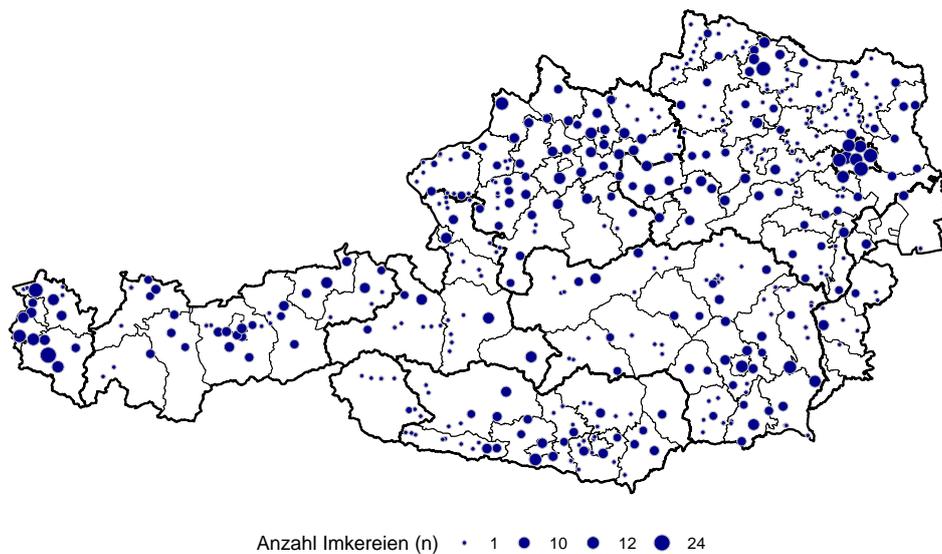


Abbildung 1.4: Geografische Position des Haupt-Überwinterungsbienenstandes der an der Untersuchung der Winterverluste teilnehmenden Imkereien 2019/20. Aggregation der Standorte zu Punkten über eine modifizierte Kluster-Methode, siehe Sektion Material und Methoden.

### 1.3.2.5 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.

In diesem Untersuchungsjahr gaben 88,3% der TeilnehmerInnen an dass sich all ihre Bienenvölker von 15 km des angegebenen Winterstandortes befanden. 11,0% gaben an diesen Radius zu überschreiten. Nur 0,3% der eingelangten Antworten entfielen auf die Kategorie „Unsicher“ und 0,4% enthielten keine derartige Information.

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

### 1.3.3.1 Österreich

Die teilnehmenden 1.539 Imkereien haben im Untersuchungsjahr 2019/20 insgesamt 30.724 Völker eingewintert. Seit Beginn der Erhebung schwanken die Winterverlustraten jährlich. Die Verlustrate aus dem Winter 2015/16 stellt 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 dar (Tabelle 1.5). Die Winterverluste von Bienenvölkern über den Winter 2019/20 betragen 12,6% (95% CI: 11,9-13,3%). In Abbildung 1.5 werden, neben den diesjährigen gemessenen Verlustraten, auch die in den Jahren davor erhobenen Werte zum Vergleich dargestellt. Der langjährige laufende Mittelwert liegt bei 16,1%, inklusive der Winterverluste von 2019/20.

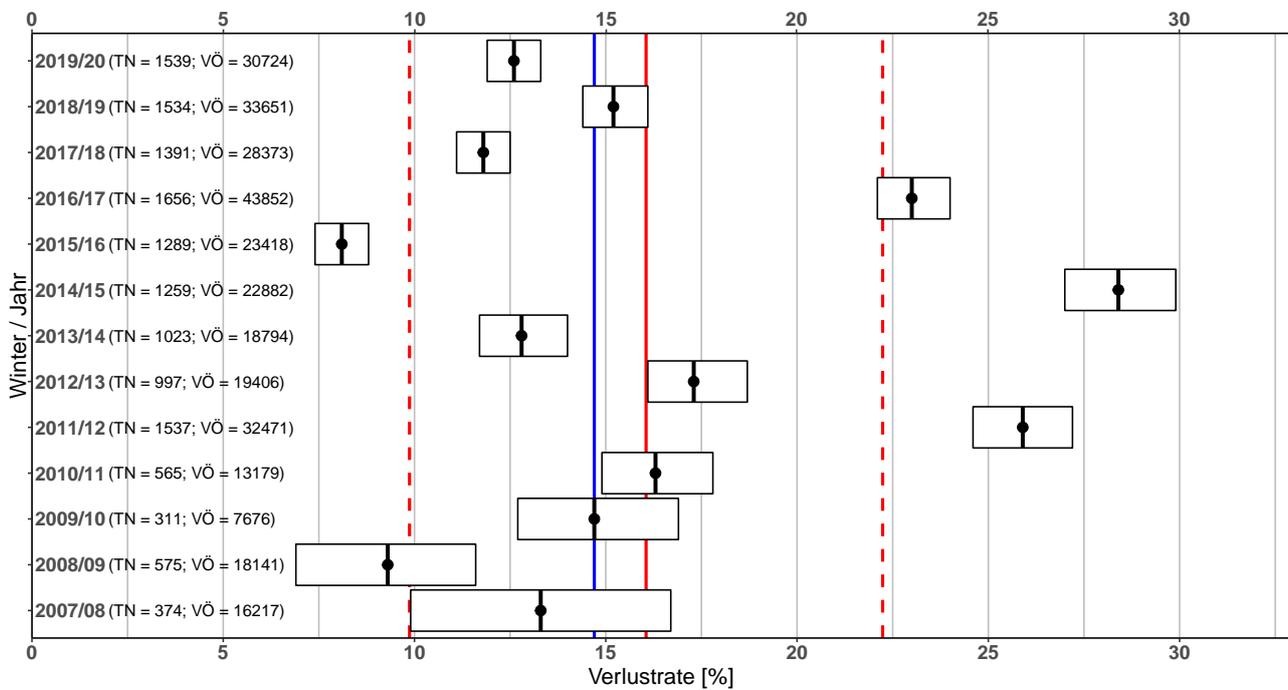


Abbildung 1.5: Höhe der Winterverluste in Österreich von 2007/08 bis 2019/20 in Prozent ( $\pm 95\%$ CI). Rote Linie kennzeichnet den laufenden Mittelwert inklusive aktueller Umfrage; Rot strichlierte Linien Kennzeichnen die Standardabweichung vom Mittelwert. Blaue Linie kennzeichnet den Median Wert. TN = TeilnehmerInnen, VÖ = Gesamtsumme der eingewinterten Völker

### 1.3.3.1.1 Populationsdynamik in Österreich

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 2020 (Abbildung 1.6).

Ausgehend von der Völkeranzahl im Frühjahr des Einwinterungsjahres stieg die Zahl an Bienenvölkern durch Vermehrung und Zukäufe jeweils bis zum Herbst an (Tabelle 1.3, „Vermehrung über den Sommer [%]“). Die prozentuelle Änderung der Anzahl der Bienenvölker vom Frühjahr des Auswinterungsjahres zum Frühjahr des Einwinterungsjahres ist in Tabelle 1.3 („Vergleich Frühjahr-Frühjahr [%]“) zu finden. Allgemein zeigt sich, dass die Vermehrung im Sommer manchmal eine konstante, manchmal sogar eine wachsende Bienenpopulation ermöglicht (Abbildung 1.6). 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 für das Untersuchungsjahr 2019/20 um 5,8% über der Schätzung des letzten Jahres, in der berechnet worden war, welche Netto-Zuwachsrate erforderlich gewesen wäre, um eine konstante Population zu ermöglichen.

Tabelle 1.3: Populationsdynamik der Subpopulation (Imkereien mit vollständigen Angaben) untersuchter österreichischer Bienenvölker vom Frühjahr 2013 bis zum Frühjahr 2020.

Jahr	Imkereien [n]	Verlust-rate [%] <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

<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.

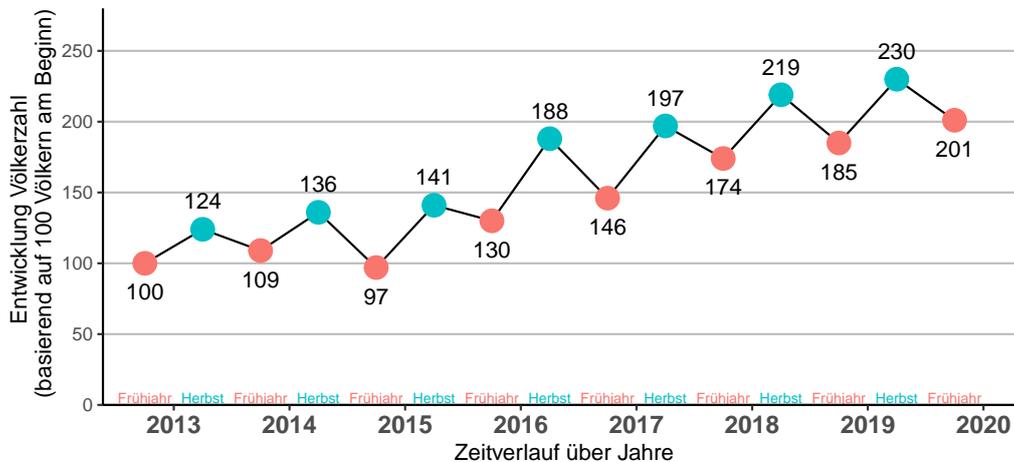


Abbildung 1.6: Veranschaulichte Populationsdynamik von Bienenvölkern der TeilnehmerInnen in Österreich vom Frühjahr 2013 bis zum Frühjahr 2020 basierend auf Winterverlusten und Vermehrung über den Sommer aus Tabelle 1.3. Diese theoretische Entwicklung der Völkeranzahl basiert auf einer Ausgangszahl von 100 Völkern. Rote Punkte sind die Anzahl an Bienenvölkern im Frühjahr des angegebenen Jahres und blaue Punkte sind die Anzahl der Bienenvölker beim Einwintern.

### 1.3.3.2 Bundesländer

Zwischen den Bundesländern sind die Völkerverluste nicht gleichmäßig verteilt. Hier zeigen sich besonders für Wien signifikant höhere Verluste von 20,1% (95% CI: 16,0-24,8%) im Vergleich zu den anderen Bundesländern (ausgenommen Burgenland) und im Vergleich zum österreichischen Gesamtverlust (Abbildung 1.7). Die Tabelle 1.4 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 1.5. Abbildung 1.7 zeigt eine grafische Darstellung der mittleren Verlustraten anhand einer Österreich-Karte.

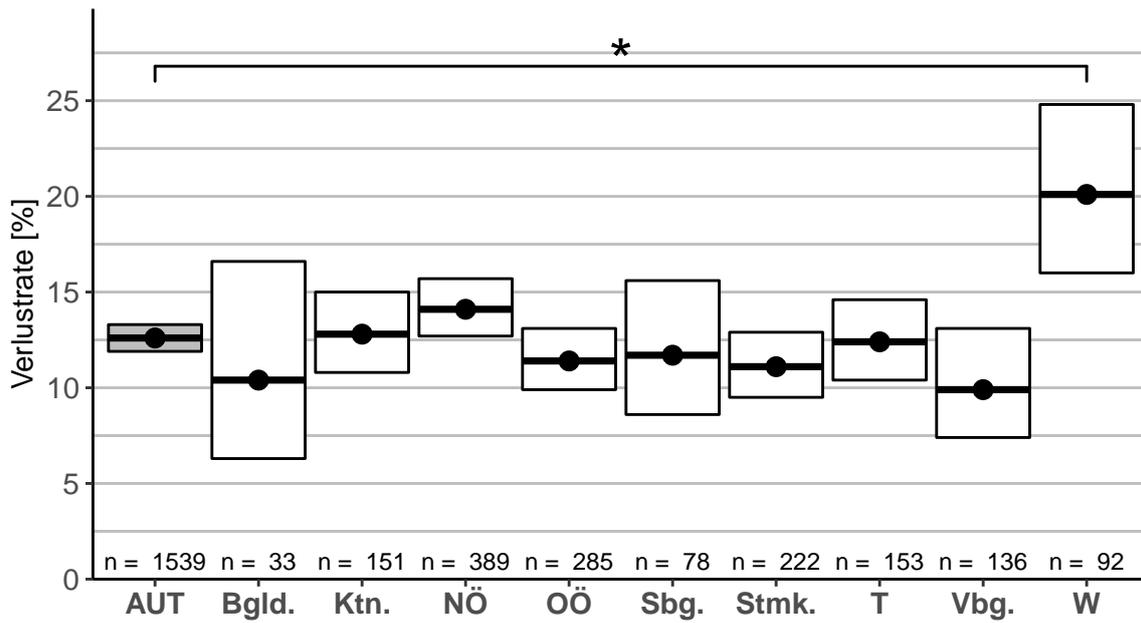


Abbildung 1.7: Höhe der Winterverluste 2019/20 für Österreich und die Bundesländer in Prozent ( $\pm 95\%$ CI). Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

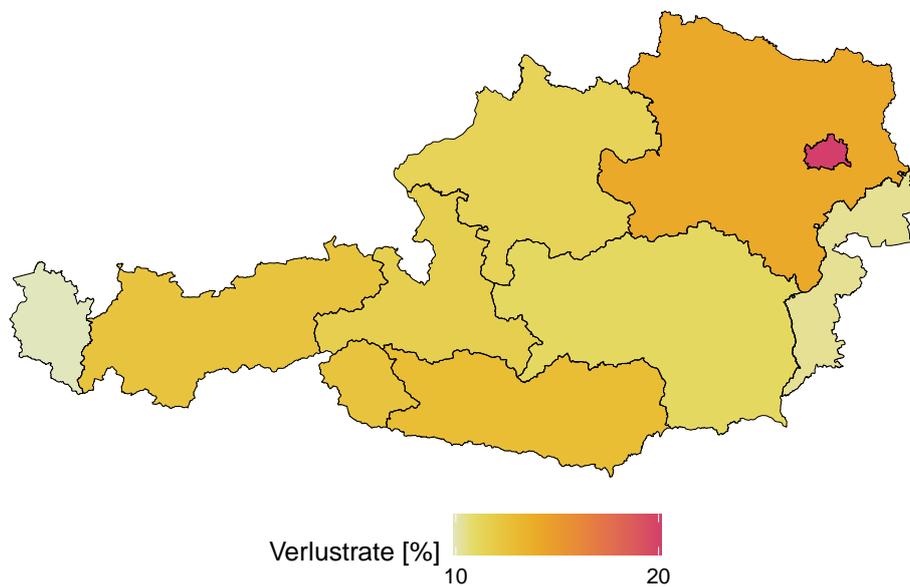


Abbildung 1.8: Mittlere Verlustrate der Bundesländer, dargestellt anhand einer Österreich-Karte. Die Farbskala der Verlustraten beginnt bei 10% für eine bessere Differenzierung der unterschiedlichen Verlustraten zwischen den Bundesländern.

Tabelle 1.4: Teilnehmende Imkereibetriebe, eingewinterte Völker und Verlustraten von Bienenvölkern im Winter 2019/20 für Österreich und pro Bundesland. Völkerverluste durch „Elementarschaden (Flut, Vandalismus, etc.)“ ( $n = 181$ ) sind nicht inkludiert.

Bundesland	Teilnehmende Imkereien [n]	Völker eingewintert[n]	Tote Völker [n]	Verluste (Königinnen-Probleme) [n]	Summe Verlust [n]	Verlust [%]	CI [%]
Österreich	1.539	30.724	2.539	1.334	3.873	12,6	11,9 - 13,3
Burgenland	33	521	31	23	54	10,4	6,3 - 16,6
Kärnten	151	3.743	338	140	478	12,8	10,8 - 15,0
Niederösterreich	389	8.085	734	408	1.142	14,1	12,7 - 15,7
Oberösterreich	285	5.908	404	271	675	11,4	9,9 - 13,1
Salzburg	78	1.234	90	54	144	11,7	8,6 - 15,6
Steiermark	222	4.770	342	186	528	11,1	9,5 - 12,9
Tirol	153	3.699	308	149	457	12,4	10,4 - 14,6
Vorarlberg	136	1.568	106	49	155	9,9	7,4 - 13,1
Wien	92	1.196	186	54	240	20,1	16,0 - 24,8

Tabelle 1.5: Vergleich der Winterverlustraten [%] ( $\pm 95\%$  Konfidenzintervall) von 2013/14 bis 2019/20 für Österreich sowie die einzelnen Bundesländer.

Jahre	AUT		Bgl.		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	(4,8-12,7)	14,5	(10,5-15,7)	12,3	(12,5-15,2)	9,9	(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	(6,3-16,6)	12,8	(10,8-15,0)	14,1	(12,7-15,7)	11,4	(9,9-13,1)
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	10,8	(9,1-17,5)	8,2	(7,3-10,3)	12,0	(9,0-14,6)	10,1	(8,1-12,5)	14,4	(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	(14,9-25,3)
2019/20	11,7	(8,6-15,6)	11,1	(9,5-12,9)	12,4	(10,4-14,6)	9,9	(7,4-13,1)	20,1	(16,0-24,8)

### 1.3.3.3 Ausgewählte Bezirke

Die Verlustraten, Anzahl der teilnehmenden Imkereien und Anzahl der eingewinterten Völker auf Bezirksebene sind im Anhang in den Tabellen Tabellen 1.11 bis 1.19 aufgelistet. Die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungsjahre sind in den Tabellen zum Vergleich ebenfalls dargestellt. Abbildung 1.9 zeigt die mittleren Verlustraten der Bezirke als Karte. 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, dh. Summe der eingewinterten Völker und die Summe der verlorenen Völker, und nicht auf Betriebsebene durchgeführt wird.

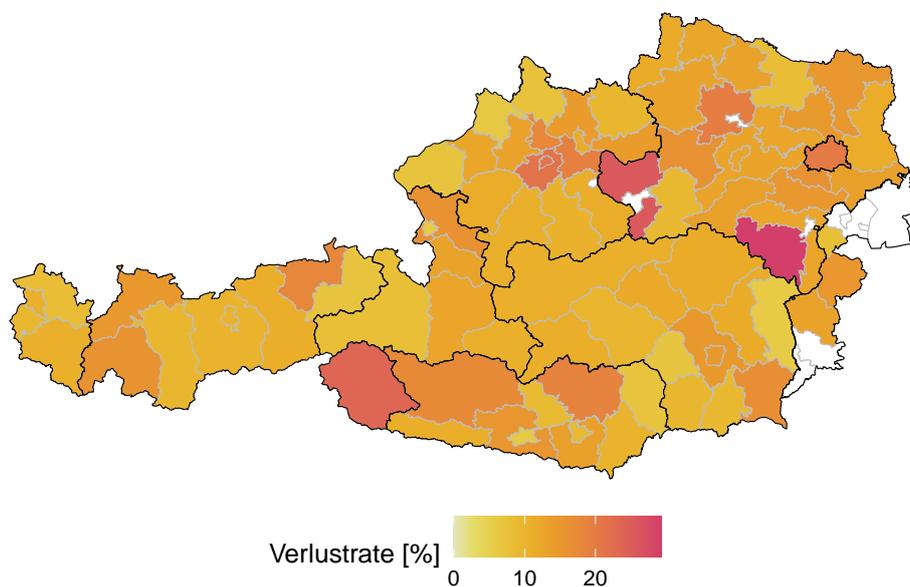


Abbildung 1.9: Mittlere Verlustrate der einzelnen Bezirke. Weiße Bezirke < 5 Antworten.

### 1.3.4 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 1.10 zeigt die Häufigkeiten der die Winterverluste 2019/20 begleitenden Symptome.

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. Insgesamt haben 710 TeilnehmerInnen 2.503 Symptommennungen zu ihren 3.366 verloren Völkern gemacht. Das häufigste Symptom war „b) hatten keine oder nur wenige tote Bienen im oder vor dem Volk“ mit 39,9%, gefolgt von „a) hatten viele tote Bienen im oder vor dem Volk“ mit 14,1% und „d) hatten tote Bienen in Zellen, aber genug Futter im Stock (Futter nicht erreicht)“ mit 10,9%. Ein klassisches Verhungern „c) hatten tote Bienen in Zellen, und kein Futter im Stock (verhungert)“ wurde mit einer Häufigkeit von 5,6% gemeldet und am wenigsten häufig war „e) hatten keine der oben genannten oder unbekannte Symptome“ mit 3,9% (Abbildung 1.10).

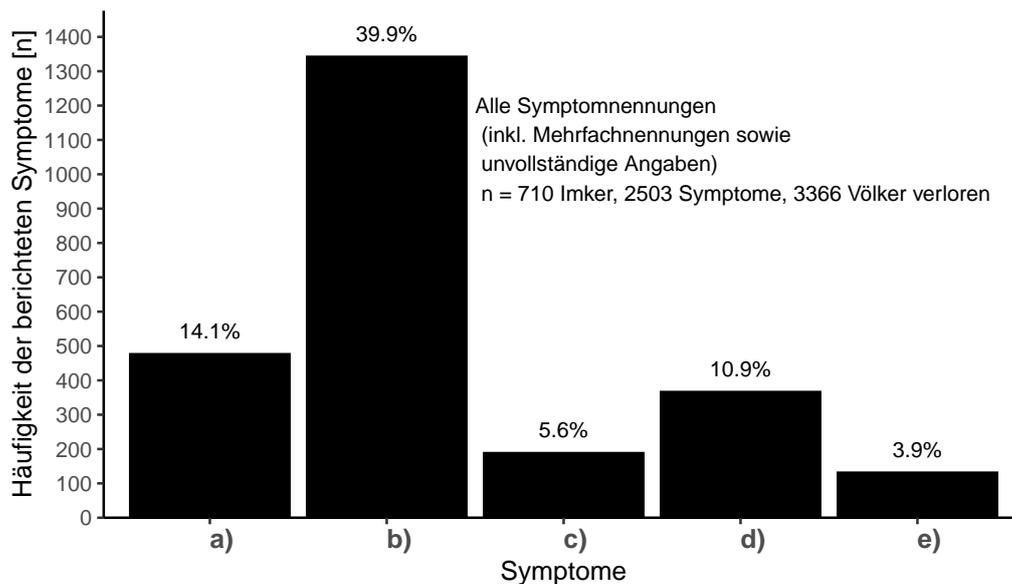


Abbildung 1.10: Häufigkeit der von ImkerInnen berichteten Symptome inklusive Mehrfachnennungen und unvollständigen Angaben a) bis e) in Prozent für 2019/20: a) Viele tote Bienen im oder vor dem Volk, b) keine oder nur wenige tote Bienen im oder vor dem Volk, c) tote Bienen in Zellen, kein Futter im Stock, d) tote Bienen in Zellen, aber genug Futter im Stock, e) keines der oben genannten oder unbekannte Symptome.

### 1.3.5 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. Insgesamt haben 35,6% unserer TeilnehmerInnen keine Verluste erlitten. Zwischen >0-20% haben 38,5% der ImkerInnen Verluste gemeldet (Abbildung 1.11). Verluste über 20% haben 25,9% der TeilnehmerInnen angegeben.

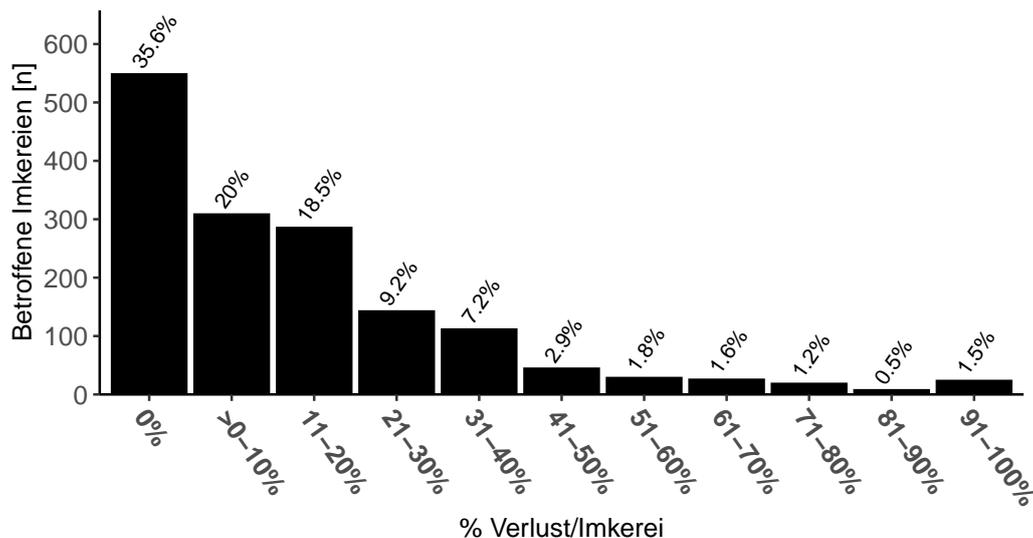


Abbildung 1.11: Verteilung der Verluste in Prozent pro teilnehmender Imkerei in 10%-Verlustgruppen, extra angeführt sind TeilnehmerInnen ohne Verluste in der Gruppe „0%“.

### 1.3.6 Risikoanalyse

In der Risikoanalyse werden die Winterverlustraten 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 Verlustraten 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: 1.3.6.1 Seehöhe, 1.3.6.2 Betriebsgröße, 1.3.6.3 Betriebsweise, 1.3.6.3.1 Stand- versus Wanderimkereien, 1.3.6.3.2 Vereinigung von Völkern, 1.3.6.4 Wabenhygiene, 1.3.6.5 Trachtangebot, 1.3.6.6 Bekämpfung der Varroamilbe, 1.3.6.7 Königinnen-Verluste, 1.3.6.7.1 Königinnenprobleme, 1.3.6.7.2 Im Einwinterungsjahr begattete Königin („junge Königin“), 1.3.6.8 Verkrüppelte Flügel.

### 1.3.6.1 Seehöhe

Um den Einfluss der Seehöhe auf die Wintersterblichkeit von Bienenvölkern zu untersuchen, wurden die Winterstandorte 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 Untersuchungsjahr 2019/20 konnte eine signifikant niedrigere Verlustrate bei der Gruppe „>800 m“ mit 11,6% (95% CI: 10,0-13,4%) und der Gruppe „401-600 m“ mit 11,9% (95% CI: 10,6-13,3%) im Vergleich zu der Gruppe „201-400 m“ mit 15,4% (95% CI: 13,8-17,3%) festgestellt werden.

Die Verlustraten der zwei restlichen Gruppen verteilen sich wie folgt: Gruppe „0-200 m“ mit 15,3% (95% CI: 12,0-19,4%) und Gruppe „601-800 m“ mit 13,0% (95% CI: 11,0-15,3%).

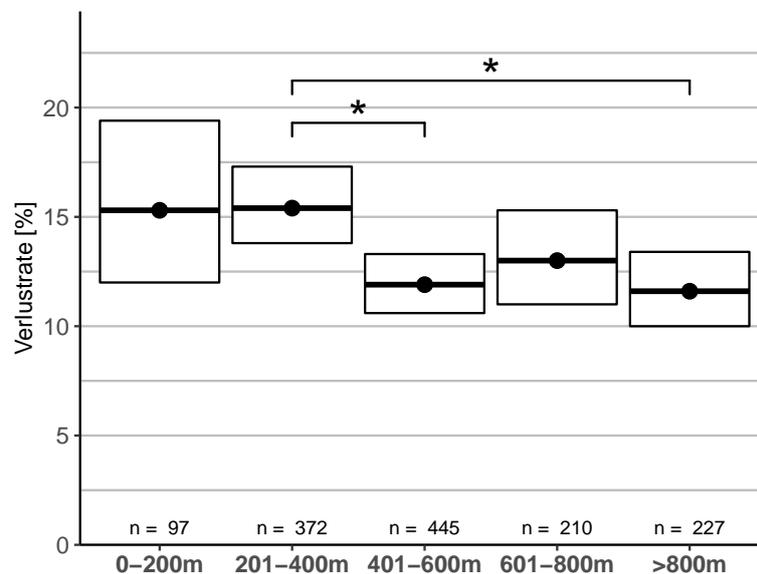


Abbildung 1.12: Höhe der Winterverluste 2019/20 in Prozent ( $\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Seehöhe der Winterstandorte. Nicht ausgewertet sind TeilnehmerInnen die „Nein“ oder „Unsicher“ bei Fragestellung „Alle Bienenvölker innerhalb eines 15 km Radius“ angaben, sowie ihre Bienenvölker in „mehr als einem Bezirk“ aufgestellt haben. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

### 1.3.6.2 Betriebsgröße

Die Analyse der Erhebung 2019/20 hat gezeigt, dass die Betriebsgröße von Imkereien, wie auch in vergangenen Jahren, einen Risikofaktor für Winterverluste darstellt.

Es zeigt sich eine signifikant niedrigere Verlustrate für ImkerInnen mit mehr als 50 Völkern (10,2% (95% CI: 9,2-11,2%)) im Vergleich zu der Gruppe mit 1-50 Völkern mit 14,1% (95% CI: 13,2-15,0%) (Abbildung 1.13-A). Wurde diese Aufgliederung zur genaueren Betrachtung in drei

Gruppen (Betriebe mit 1 bis 20 Völkern, solche mit 21-50 Völkern und Betriebe mit mehr als 50 Völkern) anstatt zwei unterteilt, zeigten sich 2019/20 signifikant höhere Verluste bei der Gruppe „1-20“ mit 15,1% (95% CI: 13,9-16,4%) und der Gruppe „21-50“ mit 12,9% (95% CI: 11,7-14,3%) im Vergleich zur Gruppe mit über 50 Völkern (Abbildung 1.13-B).

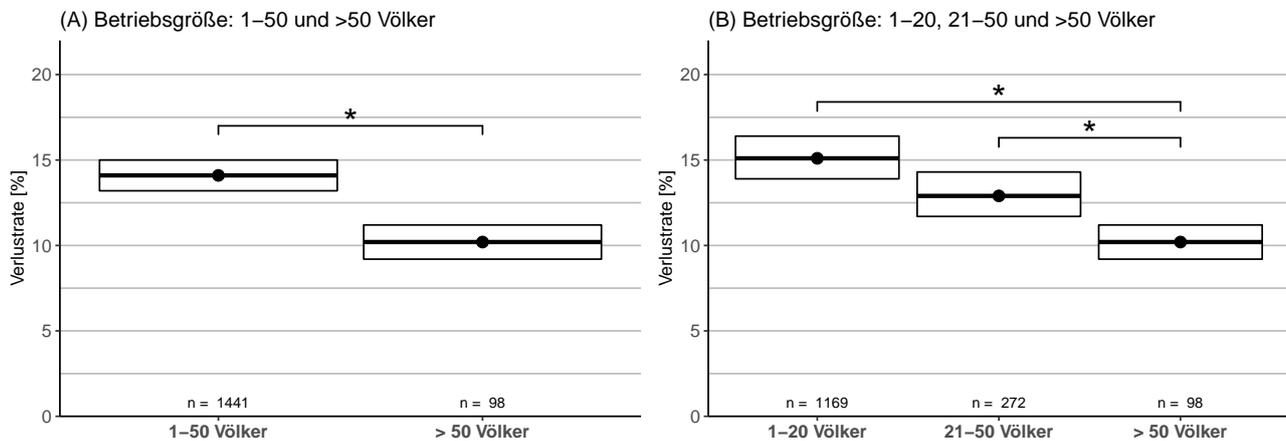


Abbildung 1.13: Höhe der Winterverluste 2019/20 in Prozent ( $\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Betriebsgröße. (A) Einteilung in 1-50 und >50 Völker. (B) Einteilung in 1-20, 21-50 und >50 Völker. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

### 1.3.6.3 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 zukaufte oder neu seit 2019/20 ob schwache (weiselrichtige) Völker vor dem Winter zusammengelegt wurden.

Über die Hälfte der TeilnehmerInnen haben angegeben einen offenen Gitterboden in ihren Beuten im Winter zu verwenden und circa 50% haben Wachs von außerhalb des Betriebes zugekauft. Wie auch in der vorjährigen Befragung gab nur ein kleiner Anteil an Betrieben (7,8%) an „Naturwabenbau ohne Mittelwand“ zu verwenden. Zertifizierte Bio-Imkereien waren mit 183 Betrieben in der Befragung vertreten. Einen Überblick über die Häufigkeit der verschiedenen Betriebsweisen (Angaben: „Ja“, „Nein“, „Unsicher“, „keine Angaben“) bietet die Abbildung 1.14. Abbildung 1.15 zeigt den Einfluss der verschiedenen Betriebsweisen auf die Winterverlustraten. In diesem Untersuchungsjahr konnte eine signifikant niedrigere Verlustrate bei TeilnehmerInnen mit Völkern aus „Zucht aus Varroa-Toleranz“ mit 10,3% (95% CI: 8,5-12,4%) im Gegensatz zur Gruppe „Unsicher“ mit 16,7% (95% CI: 12,7-21,5%) gezeigt werden. Kein statistischer Unterschied war zur Gruppe „Nein“ mit einer Verlustrate von 12,7% (95% CI: 12,0-13,6%) (Abbildung 1.15-C) zu erkennen. TeilnehmerInnen die Fremdwachs eingesetzt haben zeigten eine signifikant höhere Verlustrate mit 14,8% (95% CI: 13,4-16,3%) im Gegensatz zu Imkereibetrieben mit eigenem Wachskreislauf (11,7% (95% CI: 10,9-12,6%)) (Abbildung 1.15-G). Es konnte auch ein signifikanter Unterschied festgestellt werden bei der Frage ob „Kleine Brutzellen (5,1 mm

oder weniger“ verwendet wurden. Hier zeigt sich eine signifikant niedrigere Verlustrate für die Gruppe „Ja“ mit 6,8% (95% CI: 4,9-9,4%) im Gegensatz zu den anderen zwei Gruppen (Nein - 12,6% (95% CI: 11,8-13,4%), Unsicher - 16,6% (95% CI: 12,7-21,4%)) (Abbildung 1.15-I). Kein statistisch signifikanter Unterschied konnte festgestellt werden zwischen Bio-Imkereien 11,3% (95% CI: 10,1-12,6%) und nicht zertifizierten Bio-ImkerInnen 12,5% (95% CI: 11,7-13,4%). Auch kein Unterschied konnte bei der Frage „Naturwabenbau“ beobachtet werden (Ja - 12,6% (95% CI: 10,3-15,3%), Nein - 12,6% (95% CI: 11,8-13,4%), Unsicher - 10,6% (95% CI: 7,3-15,1%)). Die Fragen zur Bauart des Bienenstockes hatten in unserer Untersuchung auch keinen Einfluss: „Kunststoff-Beuten“ (Ja - 12,2% (95% CI: 10,2-14,5%), Nein - 12,5% (95% CI: 11,7-13,3%)); „Isolierte Beuten im Winter“ (Ja - 13,6% (95% CI: 12,0-15,4%), Nein - 12,6% (95% CI: 11,8-13,5%), Unsicher - 15,2% (95% CI: 10,2-22,0%)) und „Offener Gitterboden im Winter“ (Ja - 12,9% (95% CI: 12,0-14,0%), Nein - 12,0% (95% CI: 11,0-13,1%)) (Abbildung 1.15-A,D,E,F,H).

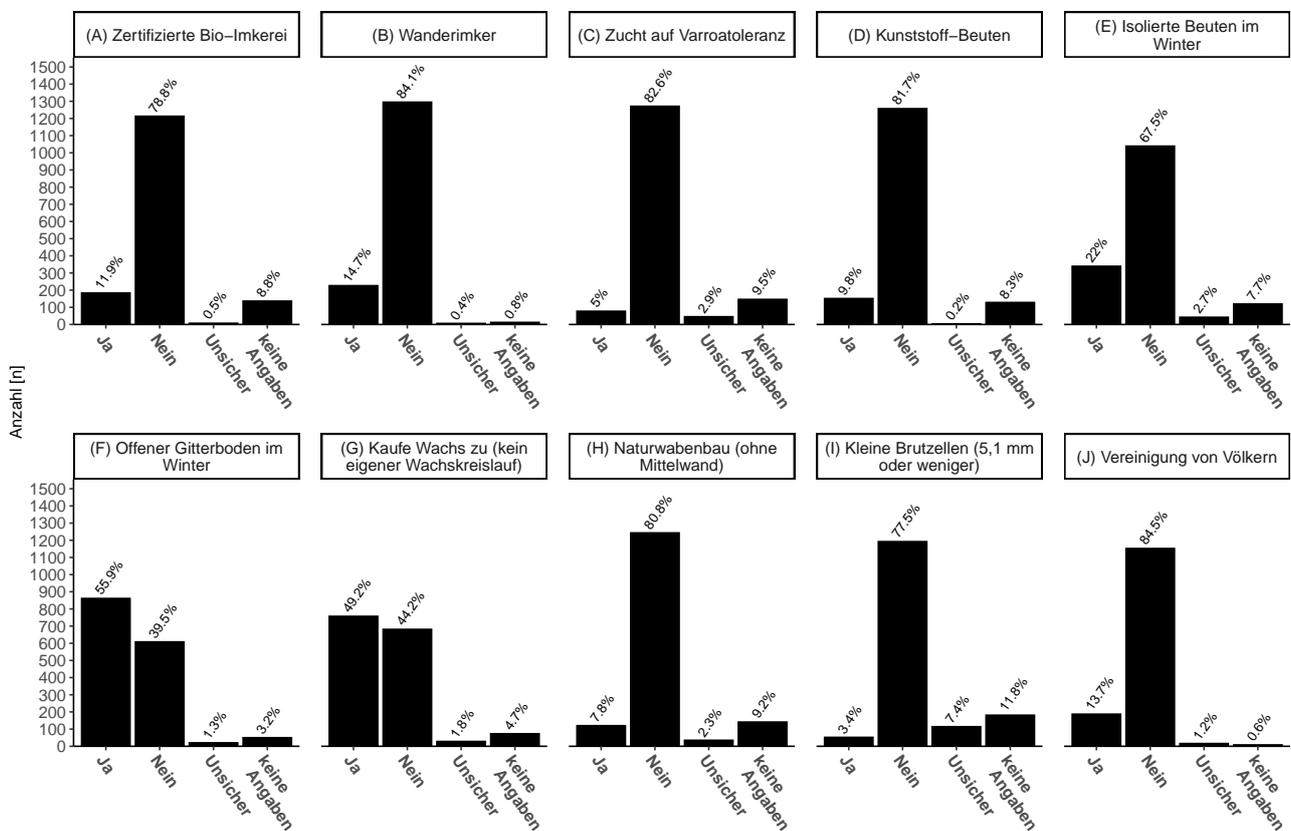


Abbildung 1.14: Häufigkeit der Betriebsweisen 2019/20 in unserer Umfrage inklusive Angabe in Prozent.

### 1.3.6.3.1 Stand- versus Wanderimkereien

Für den Winter 2019/20 wurde untersucht, ob sich Wanderimkerei auf die Wintersterblichkeit auswirkt. 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).

Es konnte eine signifikant geringere Verlustrate bei Wanderimkereien (10,5% (95% CI: 9,4-11,7%)) im Vergleich zu Standimkereien mit 13,8% (95% CI: 12,9-14,7%) festgestellt werden (Abbildung 1.15-B).

### 1.3.6.3.2 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 13,7% der TeilnehmerInnen an Völker bereits vor dem Winter zu vereinigen. Zur Winterverlustrate zeigt sich hier kein statistischer Unterschied zwischen den Gruppen (Ja - 12,7% (95% CI: 11,1-14,4%), Nein - 12,1% (95% CI: 11,3-13,0%)) (Abbildung 1.15-J).

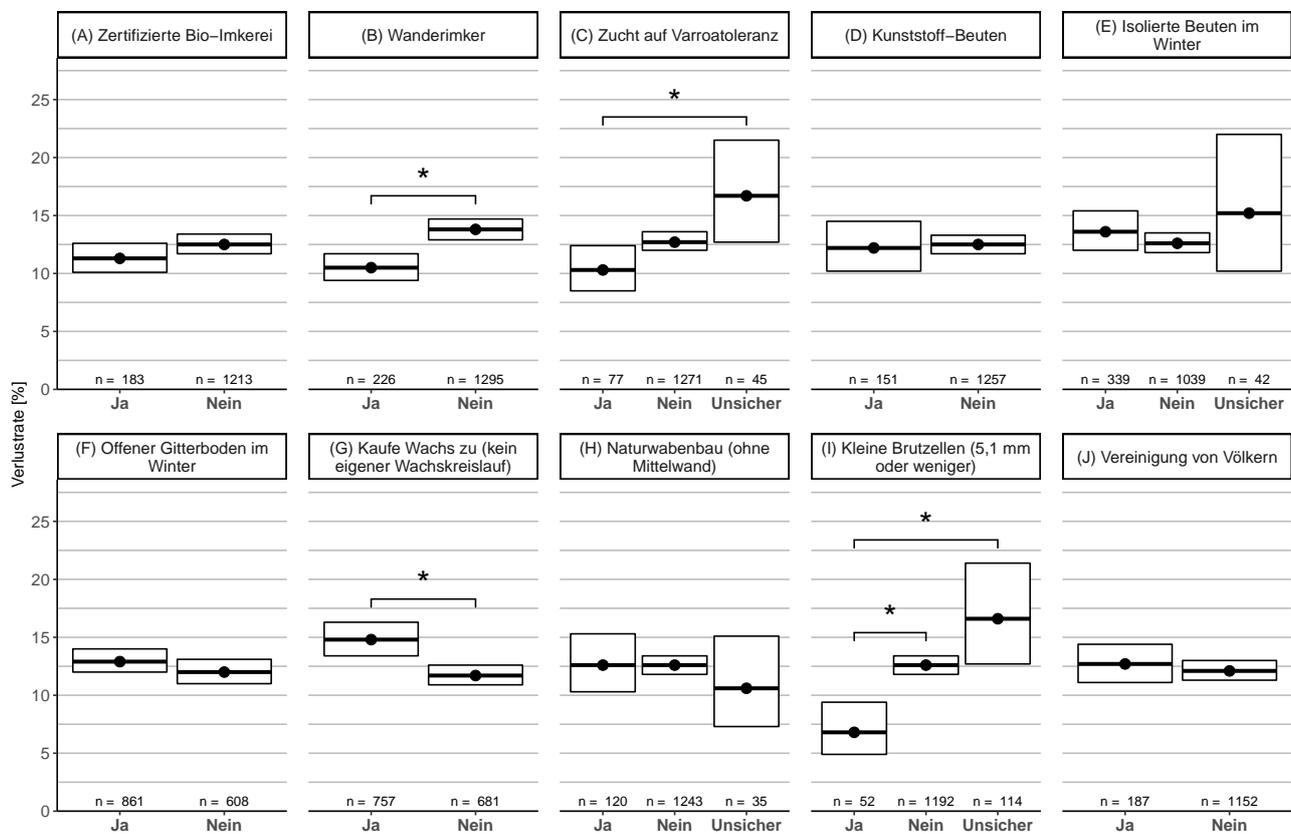


Abbildung 1.15: Höhe der Winterverluste 2019/20 in Prozent ( $\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Betriebsweise der TeilnehmerInnen. Die Gruppe mit der Angabe „Unsicher“ wurde nicht ausgewertet wenn  $n < 30$ . Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

### 1.3.6.4 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. In diesem Jahr konnte kein statistischer Unterschied der Verlustraten zwischen den Gruppen festgestellt werden: Keine Brutwaben erneuert - 14,8% (95% CI: 7,1-28,4%); Gruppe 1-30% - 14,2% (95% CI: 12,5-16,0%); Gruppe 31-50% - 11,4% (95% CI: 10,4-12,5%) und die Gruppe mit der meisten Erneuerung 51-100% mit 12,3% (95% CI: 11,2-13,5%). Die Gruppe der TeilnehmerInnen die zu dieser Frage „keine Angaben“ gemacht hatten zeigt eine Verlustrate von 16,5% (95% CI: 11,4-23,3%) (Abbildung 1.16).

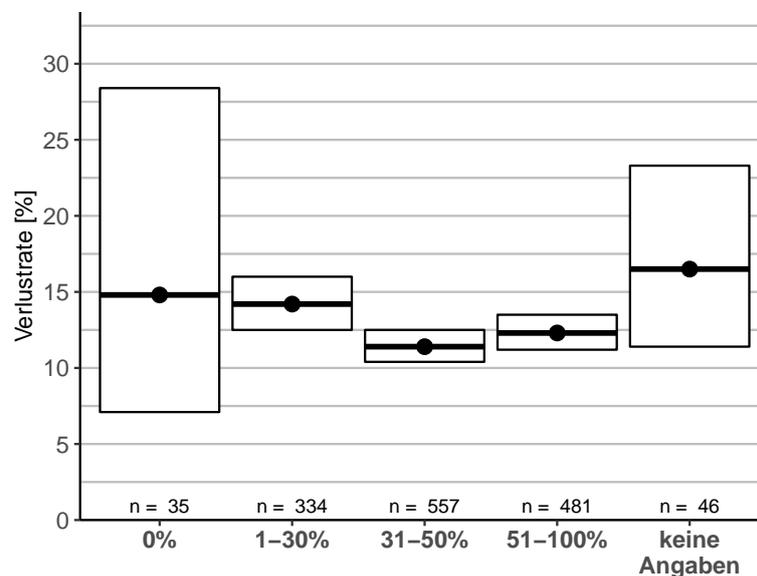


Abbildung 1.16: Höhe der Winterverluste von 2019/20 in Abhängigkeit vom Anteil der im Einwinterungsjahr erneuerten Brutwaben in Prozentklassen ( $\pm 95\%$ CI).

### 1.3.6.5 Trachtangebot

Die teilnehmenden ImkerInnen wurden nach spezifischen Trachtquellen gefragt, die von ihren Bienen befliegen wurden, um mögliche Risikotrachtquellen zu bestimmen. Zur Auswahl standen 2019/20: Raps (*Brassica napus*), Mais (*Zea mays*), Sonnenblume (*Helianthus annuus*), spätblühende Zwischenfrüchte, Waldtracht sowie Waldtracht mit Melezitose.

TeilnehmerInnen die eine Rapstracht hatten zeigten statistisch signifikant höhere Verlustraten (Ja - 13,8% (95% CI: 12,2-15,5%); Nein - 11,5% (95% CI: 10,7-12,4%);  $\chi^2=20,9$ ,  $p<0,05$ ) (Abbildung 1.17-A). Auch ImkerInnen deren Bienen Mais befliegen zeigten signifikant höhere Verluste (Ja - 17,7% (95% CI: 14,8-21,0%); Nein - 11,6% (95% CI: 10,8-12,5%)) (Abbildung 1.17-B).

Ein positiver Effekt konnte bei der Waldtracht festgestellt werden, hier zeigte sich eine signifikant geringere Verlusterate wenn eine Tracht vorhanden war (Ja - 11,4% (95% CI: 10,5-12,3%); Nein

- 14,4% (95% CI: 12,8-16,2%)) (Abbildung 1.17-E).

Kein statistischer Unterschied konnte bei den anderen in der Umfrage angeführten Trachtquellen festgestellt werden: Sonnenblume (Ja - 14,0% (95% CI: 12,2-16,0%); Nein - 12,0% (95% CI: 11,1-12,9%)); Spätblüher (Ja - 12,6% (95% CI: 11,6-13,8%); Nein - 12,6% (95% CI: 11,2-14,1%)) und auch nicht bei Waldtracht mit Melezitose (Ja - 11,6% (95% CI: 10,7-12,6%); Nein - 13,5% (95% CI: 12,3-14,8%)) (Abbildung 1.17-C,D,F).

Zur groben Feststellung der Trachtgebiete wurde anhand der Haupt-Überwinterungsstandorte (ohne WanderimkerInnen) eine Karte der betroffenen ImkerInnen aufgezeichnet, welche im Anhang angeführt ist, siehe Abbildung 1.36.

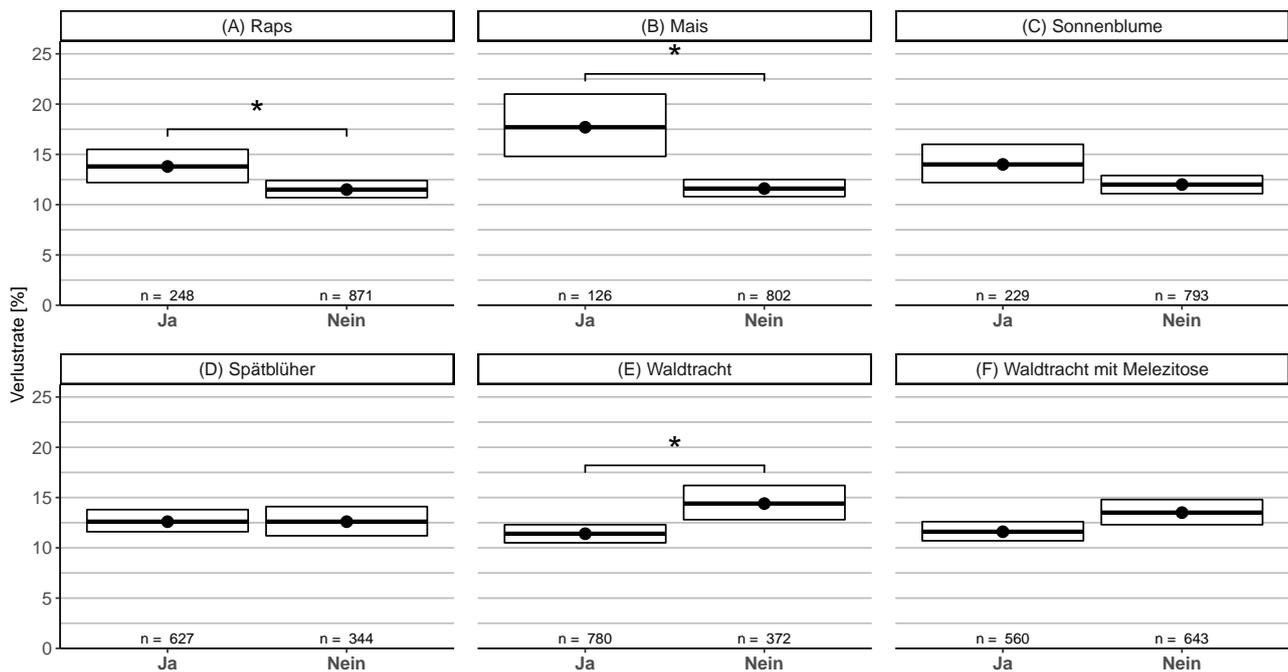


Abbildung 1.17: Höhe der Winterverluste von 2019/20 in Abhängigkeit vom Vorhandensein spezifischer Trachtpflanzen in Prozent ( $\pm 95\%$ CI); n= Anzahl der Betriebe inklusive Wanderimkereien. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

### 1.3.6.6 Bekämpfung der Varroamilbe

Ein wichtiger Teil der Untersuchung sind Erhebungen über die Behandlungsmethoden gegen die Varroamilbe und deren Auswirkung auf die Winterverluste. Abbildung 1.18 zeigt die am Fragebogen zur Auswahl gestellten Behandlungsmethoden. Dabei wird aus Gründen der internationalen Vergleichbarkeit, der von COLOSS erarbeitete Katalog von möglichen Bekämpfungsmethoden verwendet. Nachfolgend wird zuerst die Häufigkeit der verwendeten Methoden dargestellt. Anschließend wurden die einzelnen Methoden im Hinblick auf ihren Einfluss auf die Winterverluste betrachtet. Für die detaillierte Risikoanalyse wurden nur jene Behandlungsmethoden berücksichtigt, von denen auch genügend Datensätze vorhanden waren, um eine valide Aussage treffen zu können. Bei der Befragung mittels dem verkürzten Zeitschriftfragebogen wurden keine Details zur Behandlung abgefragt.

<b>18 In welchen Monaten haben Sie Befallsmessungen oder Bekämpfungen gegen die Varroamilbe (bei Wirtschaftsvölkern) durchgeführt oder begonnen?</b>	Bitte nennen Sie bei monatsübergreifenden Behandlungen nur den ersten Monat!											
	2019						2020					
	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 Trüpfeln (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 1.18: Im Fragebogen zur Auswahl stehende Behandlungsmethoden gegen die Varroamilbe.

91% der Imkereien bestimmten in mindestens einem Monat des abgefragten Zeitraums den Varroabefall ihrer Völker (zum Beispiel natürlicher Milbenfall mit Stockwindel oder Diagnose mittels Staubzuckermethode) (Tabelle 1.6).

Tabelle 1.7 zeigt die durchgeführten Methoden der Varroabekämpfung von allen Imkereien, die uns Daten im Untersuchungszeitraum von 2019/20 zur Verfügung gestellt haben.

Eine der häufigsten Methoden zur Varroabekämpfung ist die Drohnenbrutentnahme, welche von 54,3% der ImkerInnen in zumindest einem Monat durchgeführt wurde. Danach folgten, nach Häufigkeit der Anwendung, Bekämpfungsmaßnahmen mit organischen Säuren (Ameisensäure Kurzzeit oder Langzeit, unterschiedliche Anwendungsformen der Oxalsäure). Insgesamt 74,8%

der TeilnehmerInnen führte eine Ameisensäurebehandlung durch (Kurzzeit und/oder Langzeit, wobei Langzeitbehandlungen mit 49,1% etwas häufiger angewandt werden). Von den unterschiedlichen Anwendungen der Oxalsäure, wird die Verdampfung von 51,8% aller Imkereien angewandt, das Träufeln oder Sprühen von 35,9% und das Träufeln von Oxalsäureprodukten mit weiteren Inhaltsstoffen (Hiveclean/Bienenwohl/Varromed) von 26,9% der Imkereien. Die Kombinationsanwendung der beiden organischen Säuren (Ameisensäure kurz oder lang, sowie eine Restentmilbung mit Oxalsäure) wird von 69,3% der österreichischen Imkereien angewandt. Thymol, egal ob in alleiniger Anwendung oder in Kombination mit anderen Methoden, wurde von 7,7% der Imkereien als Methode zur Bekämpfung der Varroamilbe verwendet. Biotechnische Methoden abseits der Drohnenbrutentnahme oder Hyperthermie wurden von 25,7% der Imkereien angewandt, dazu zählen etwa die Fangwabe, die Bannwabe oder die totale Brutentnahme. Hyperthermie (=Hitzebehandlung) oder Milchsäure wurden von 4,6% beziehungsweise 3,5% der Imkereien angewandt. Synthetische Akarizide zur Bekämpfung der Varroamilbe wurden nur in einem geringen Ausmaß genannt (2,5%), wobei am häufigsten Amitraz (0,6%) (Streifen oder Verdampfen) genannt wurde.

Tabelle 1.6: Anzahl (Prozent) der Imkereien, welche eine Kontrolle der Varroamilbe in zumindest einem Monat durchgeführt haben.

	Ja		Nein		keine Angaben	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Bestimmung Varroabefall (Milbenfall o. ä. Methode)	1309	91,0%	76	5,3%	54	3,8%

Tabelle 1.7: Anzahl (Prozent) der Imkereien, welche die genannte Methode zur Bekämpfung der Varroamilbe in zumindest einem Monat angewendet haben.

Behandlungsmethode	Ja		Nein	
	n	%	n	%
Drohnenbrutentnahme	778	54,3	655	45,7
Hyperthermie	66	4,6	1367	95,4
Andere biotechnische Methode <sup>1</sup>	368	25,7	1065	74,3
Ameisensäure KB <sup>2</sup> (inkl. MAQS)	538	37,5	895	62,5
Ameisensäure LB <sup>2</sup>	703	49,1	730	50,9
Milchsäure	50	3,5	1383	96,5
Oxalsäure Träufeln (oder Sprühen)	514	35,9	919	64,1
Oxalsäure Verdampfen	742	51,8	691	48,2
Hiveclean/Bienenwohl/Varromed	386	26,9	1047	73,1
Thymol (Apiguard, Apilife VAR, Thymovar)	111	7,7	1322	92,3
Tau-fluvalinat (Apistan)	3	0,2	1430	99,8
Flumethrin (Bayvarol)	7	0,5	1426	99,5
Amitraz (in Streifen, Apivar, Apitraz)	9	0,6	1424	99,4
Amitraz (Verdampfen)	9	0,6	1424	99,4
Coumaphos (Perizin)	0	0,0	1433	100,0
Coumaphos (Checkmite+)	0	0,0	1433	100,0
Anderes chemisches Produkt	8	0,6	1425	99,4
Andere Methode	22	1,5	1411	98,5
<b>Kombination</b>				
Ameisensäure (KB oder LB <sup>2</sup> )	1072	74,8	361	25,2
Ameisensäure (KB oder LB <sup>2</sup> ) und Oxalsäurebehandlung <sup>3</sup>	993	69,3	440	30,7

<sup>1</sup> Beispiel: Fangwabe, Bannwabe, totale Brutentnahme etc.

<sup>2</sup> KB = Kurzzeitbehandlung, LB = Langzeitbehandlung

<sup>3</sup> Träufeln oder Sprühen oder Verdampfen oder Hiveclean/Bienenwohl/Varromed

### 1.3.6.6.1 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 oder nicht. Bei ImkerInnen, die den Varroabefall bestimmt hatten, lag die Verlustrate bei 12,3% (95% CI: 11,6-13,1%) und bei jenen die keine Bestimmung des Varroabefalls durchgeführt hatten bei 12,4% (95% CI: 9,8-15,5%) (Abbildung 1.19).

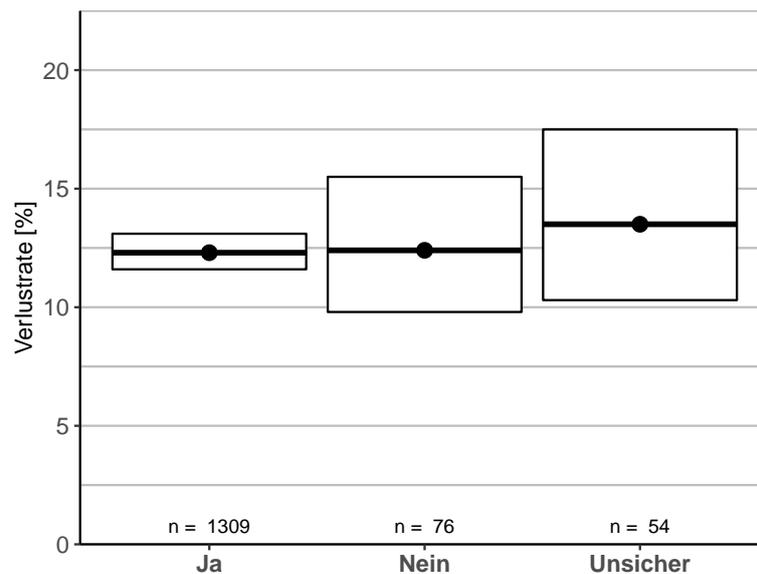


Abbildung 1.19: Höhe der Winterverluste von 2019/20 in Prozent ( $\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von einer durchgeführten Abschätzung des Varroabefalls mit nicht näher abgefragten Methoden.

Auch ein möglicher Effekt der Bestimmungsdauer beziehungsweise Häufigkeit wurde analysiert, das heißt die Anzahl der Monate, in denen die Bestimmung durchgeführt wurde. Die Bestimmungsdauer wurde in drei Klassen unterteilt: Null Monate (keine Bestimmung), Bestimmungszeitraum von einem Monat bis drei Monaten und Bestimmungszeitraum über mehr als drei Monate. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe die den Varroa-Befall nicht bestimmt hat 12,4% (95% CI: 9,8-15,5%) zu den beiden anderen Gruppen (1-3 Monate: 12,1% (95% CI: 11,0-13,3%); >3 Monate: 12,4% (95% CI: 11,3-13,4%)) festgestellt werden (Abbildung 1.20).

Analog zu den vorangegangenen Untersuchungsjahren wurden die Häufigkeiten der Varroabestimmung für jeden Monat des Zeitraums zwischen April des Einwinterungsjahres und März des Auswinterungsjahres errechnet. Diese sind in Abbildung 1.21 dargestellt. Die Methode „Varroabestimmung“ wird vorwiegend in den Monaten Juli bis September, von jeweils über 50% der teilnehmenden Imkereien angewandt.

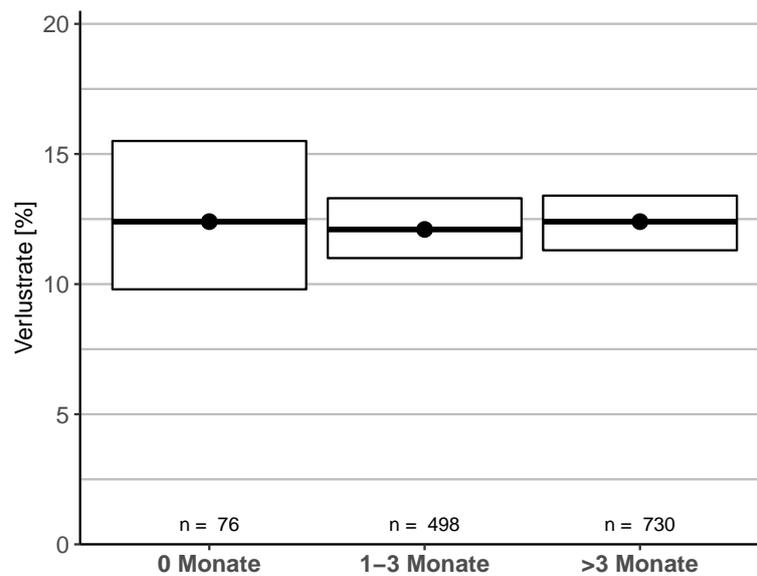


Abbildung 1.20: Höhe der Winterverluste von 2019/20 in Prozent ( $\pm 95\%CI$ ) in Abhängigkeit von der Dauer der Bestimmung des Varroabefalls.

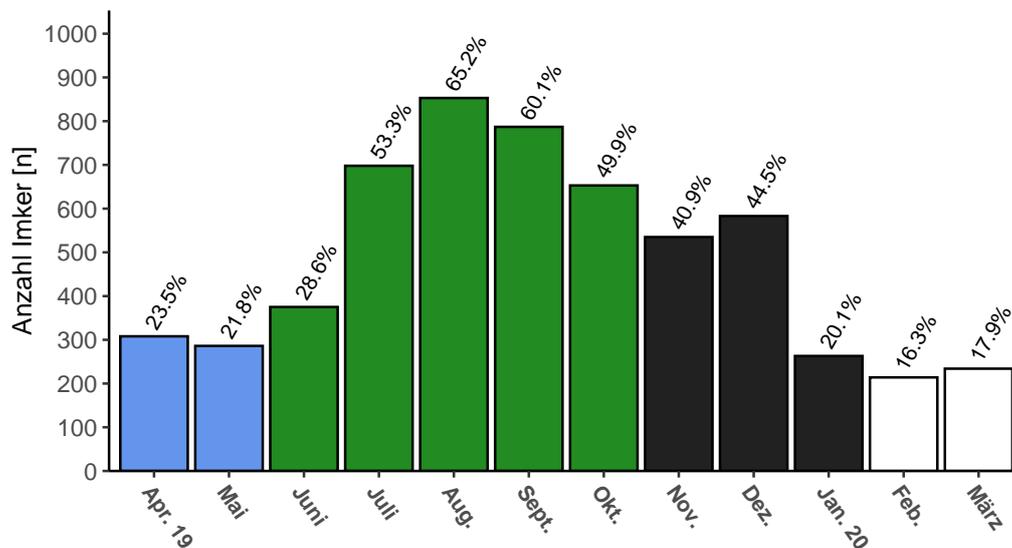


Abbildung 1.21: Häufigkeiten der Bestimmung des Varroabefalls 2019/20 vom April des Einwinterungsjahres bis März des Auswinterungsjahres in Prozent ( $n =$  siehe Tabelle 1.6). April-Mai wurde als Frühjahr definiert (blau), Juni-Oktober als Sommer (grün) und November-Jänner als Herbst/Winter (schwarz), Frühjahr des Folgejahres Februar-März (weiß).

Des Weiteren wurde untersucht, ob der Zeitpunkt (Jahreszeiten Einteilung siehe Abbildung 1.21, exklusive Frühjahr Folgejahr) und die Kombination der Bestimmung des Varroabefalls einen Einfluss auf den Überwinterungserfolg hat. Abbildung 1.22 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. Die kleinste Gruppe war „Frühling und Winter“ mit nur einem/r TeilnehmerIn und wurde nicht in die Auswertung aufgenommen. Die meisten ImkerInnen haben eine Kontrolle im „Sommer und Winter“ durchgeführt, was innerhalb der Personen die eine Kontrolle durchgeführt haben 35,5% entspricht.

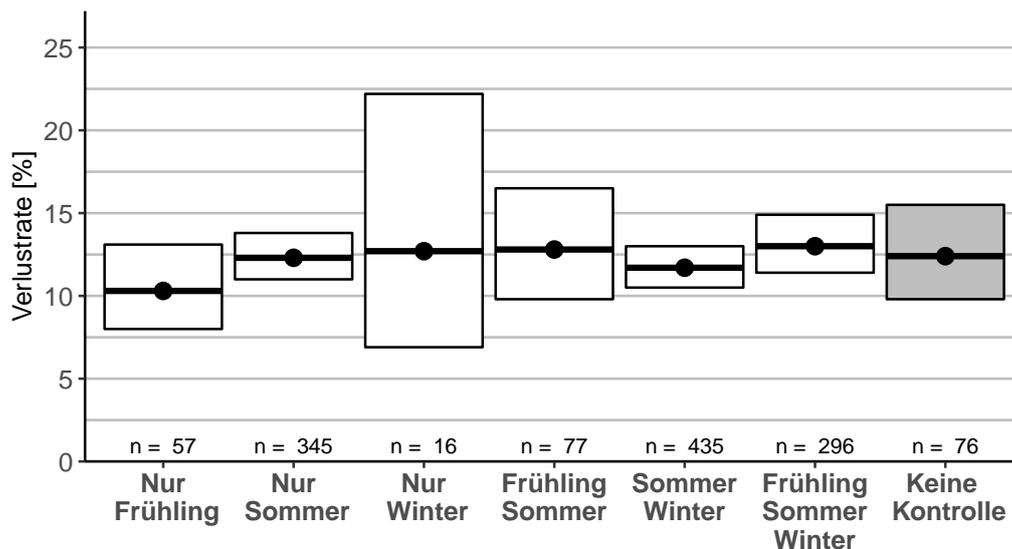


Abbildung 1.22: Höhe der Winterverluste von 2019/20 in Prozent ( $\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Bestimmung des Varroa-Befallsgrades zu den jeweiligen Jahreszeiten. ImkerInnen die „Unsicher“ bei Varroakontrolle angegeben haben wurden aus dieser Analyse ausgeschlossen. Einzelne Monate zusammengefasst siehe Abbildung 1.21, inkl. Frühjahr Folgejahr.

### 1.3.6.6.2 Zeitpunkt und Häufigkeit der Anwendungen

Die TeilnehmerInnen wurden zu ihren verwendeten Methoden zur Bekämpfung der Varroamilbe befragt. Aus den erhaltenen Antworten haben wir die Häufigkeiten, mit der die jeweiligen Methoden in den einzelnen Monaten des Untersuchungsjahres angewendet wurden, bestimmt und in Abbildung 1.23 dargestellt.

Die Monate wurden farblich zusammengefasst in Frühjahr, Sommer und Winter zur weiteren Auswertung der Verlustraten. Hierbei wurde April-Mai als Frühjahr definiert (blau), Juni-Oktober als Sommer (grün) und November-Jänner als Herbst/Winter (grau). Die Monate Februar, März 2020 (weiß) sind in der folgenden Winter-Verlustanalyse nicht inkludiert.

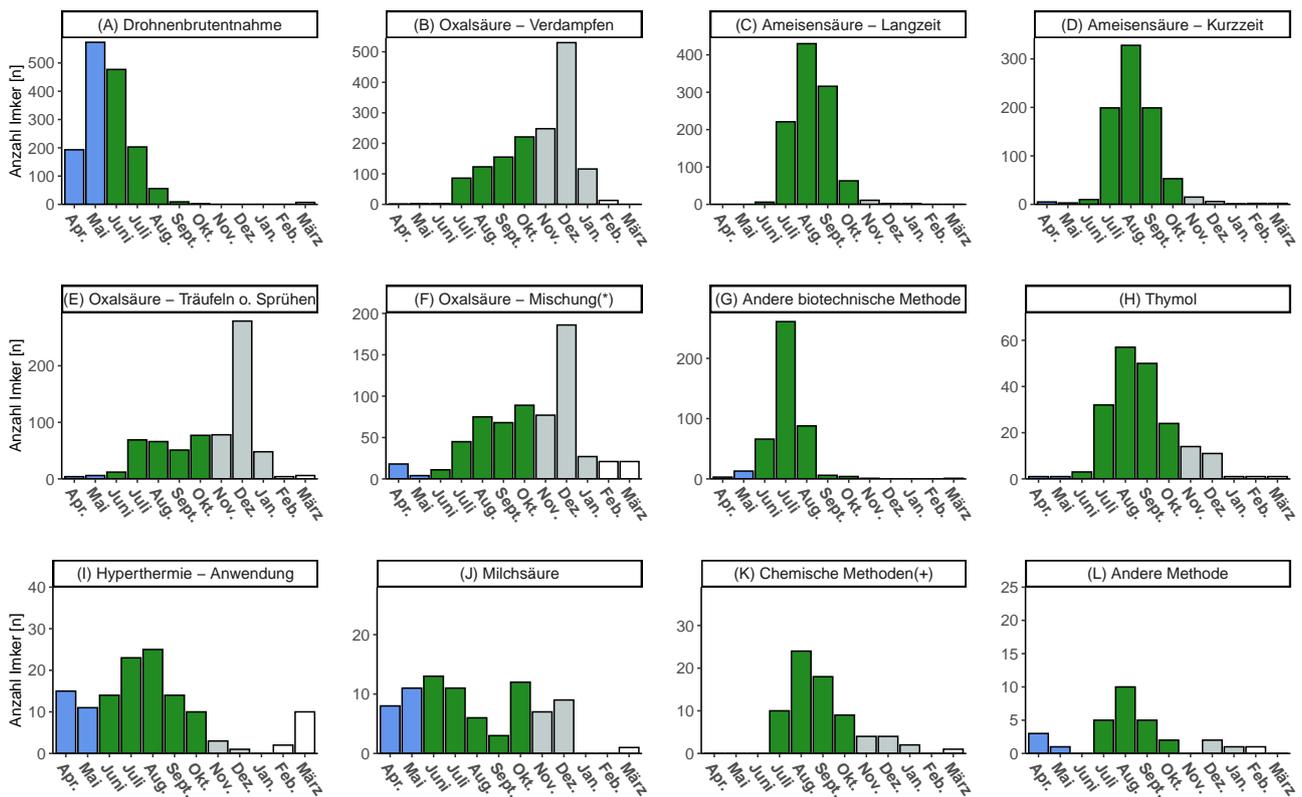


Abbildung 1.23: Zusammenfassung der zur Bekämpfung der Varroamilbe angewandten Methoden für das Untersuchungsjahr 2019/20 in den einzelnen Monaten. Y-Axis mit separaten Skalen für die verschiedenen Behandlungsmethoden. April-Mai wurde als Frühjahr definiert (blau), Juni-Oktober als Sommer (grün) und November-Jänner als Herbst/Winter (grau). Die Monate Februar, März 2020 (weiß) sind in der folgenden Winter-Verlustanalyse nicht inkludiert.

(+) Amitraz (Verdampfen und in Streifen, Apivar, Apitraz), Coumaphos (Checkmite+), Coumaphos (Perizin), Flumethin (Bayvarol), Tau-fluvalinat (Apistan), anderes chemisches Produkt  
 (\*) Hiveclean, Bienenwohl, Varromed

### 1.3.6.6.3 Anwendungen in den Jahreszeiten

Die Verlustrate und statistische Ergebnisse bei Anwendung der einzelnen Behandlungsmethoden laut Abbildungen 1.24 bis 1.26 werden in den folgenden Unterkapiteln näher betrachtet. Mögliche Behandlungen im Frühjahr des Folgejahres (Februar, März) sind nicht inkludiert. Die „Chemischen Methoden“ wurden zusammengefasst wegen der geringen Strichprobenanzahl, siehe Tabelle 1.7. Sowie „Oxalsäure - Träufeln o. Sprühen“ und „Oxalsäure - Mischung“ werden gemeinsam betrachtet, eine getrennte Analyse der zwei Methoden findet sich im Unterkapitel 1.3.6.6.7 Hiveclean/Bienenwohl/Varromed.

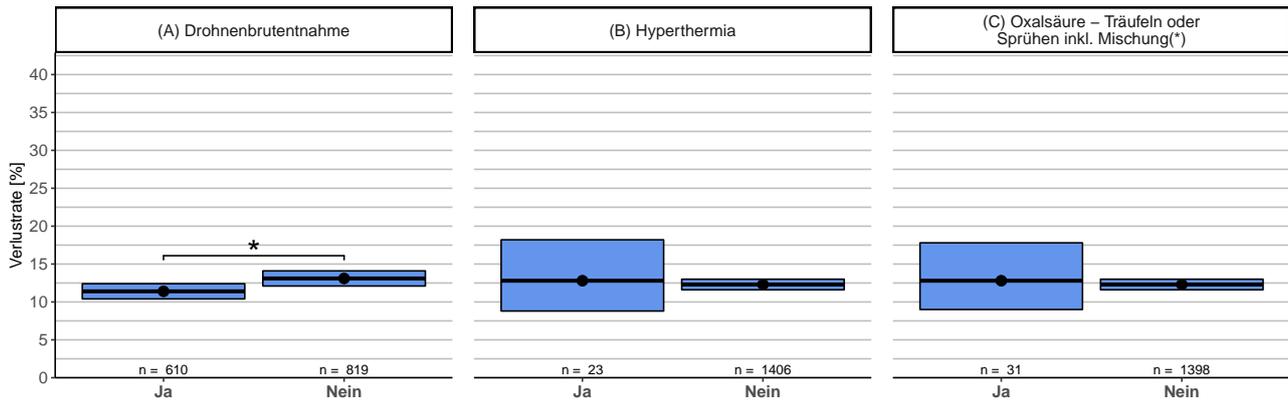


Abbildung 1.24: Höhe der Winterverluste von 2019/20 in Prozent ( $\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode im Frühjahr. Einzelne Monate sind nach Saison zusammengefasst, siehe Abbildung 1.23. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.  
(\* ) Hiveclean, Bienenwohl, Varromed

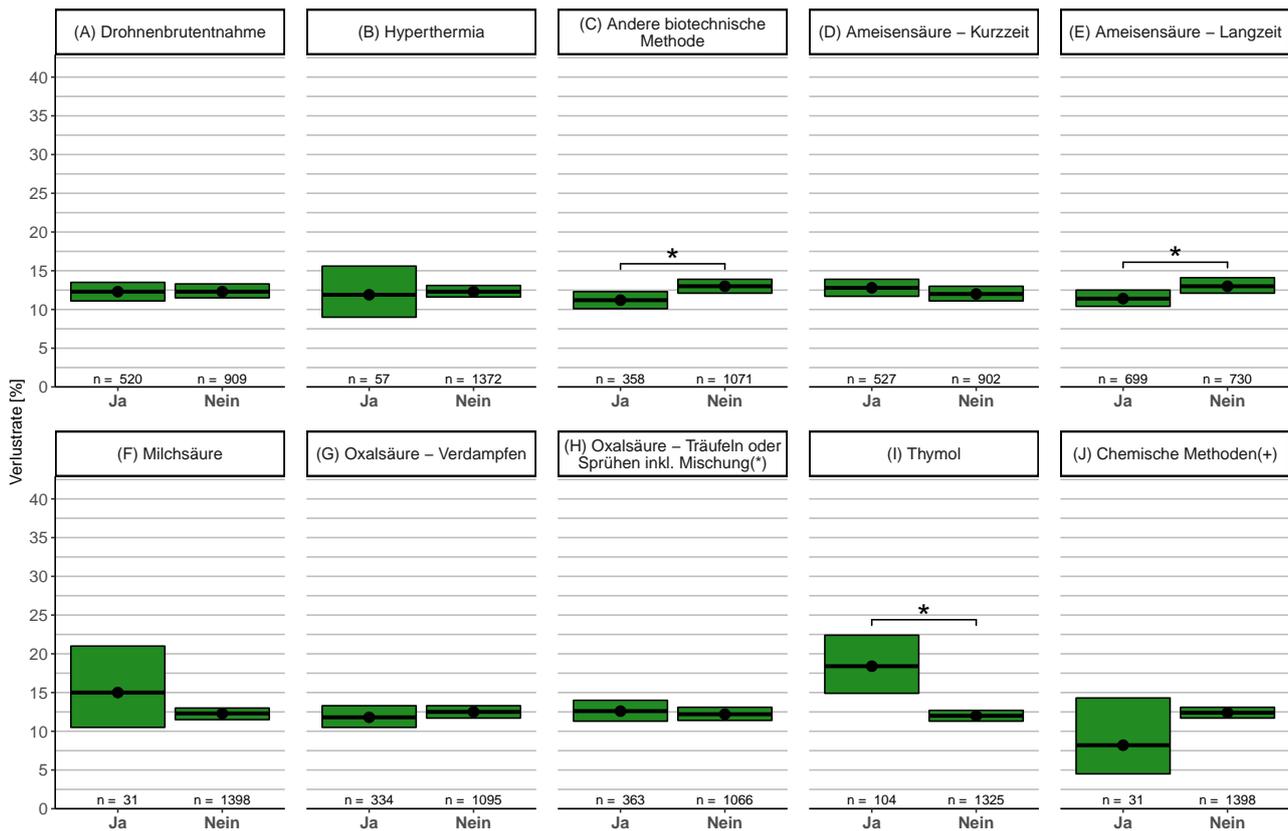


Abbildung 1.25: Höhe der Winterverluste von 2019/20 in Prozent ( $\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode im Sommer. Einzelne Monate sind nach Saison zusammengefasst, siehe Abbildung 1.23. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.  
(+) Amitraz (Verdampfen und in Streifen, Apivar, Apitraz), Coumaphos (Checkmite+), Coumaphos (Perizin), Flumethin (Bayvarol), Tau-fluvalinat (Apistan), anderes chemisches Produkt  
(\* ) Hiveclean, Bienenwohl, Varromed

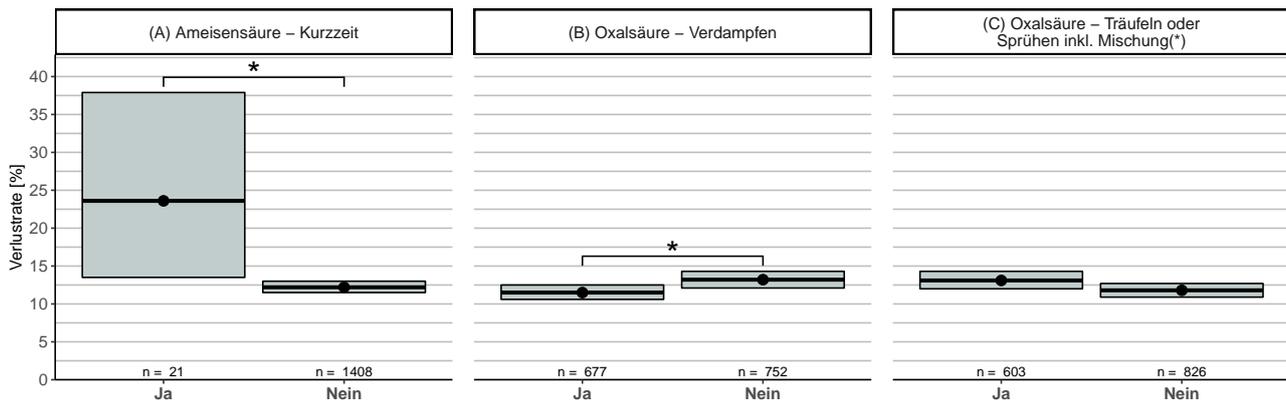


Abbildung 1.26: Höhe der Winterverluste von 2019/20 in Prozent ( $\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode im Winter. Einzelne Monate sind nach Saison zusammengefasst, siehe Abbildung 1.23. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.  
(\*) Hiveclean, Bienenwohl, Varromed

#### 1.3.6.6.4 Auswirkungen der Drohnenbrutentnahme auf die Winterverluste

Eine der am häufigsten angewandten Methoden zur Verringerung des Varroabefalls ist die Drohnenbrutentnahme. Von den teilnehmenden Imkereien 2019/20 haben 54,3% diese Methode in zumindest einem Monat angewandt. TeilnehmerInnen die diese Methode im Frühjahr eingesetzt haben, zeigten eine statistisch signifikant niedrigere Verlustrate (11,4% (95% CI: 10,4-12,4%)) als TeilnehmerInnen die diese Methode nicht durchgeführt haben (13,1% (95% CI: 12,1-14,1%)) ( $\chi^2=20,4$ ,  $p<0,05$ ) (Abbildung 1.24-A). Im Sommer konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (Ja - 12,3% (95% CI: 11,1-13,5%); Nein - 12,3% (95% CI: 11,5-13,3%)) (Abbildung 1.25-A).

In weiterer Folge wurde der Zeitpunkt der Durchführung in „nur Frühling“, „nur Sommer“, die Kombination „Frühling und Sommer“ sowie TeilnehmerInnen die keine Drohnenbrut entfernt haben aufgeteilt. In Abbildung 1.27 sind die Ergebnisse grafisch dargestellt. Hier zeigt sich das die meisten TeilnehmerInnen die eine Drohnenbrutentnahme durchgeführt haben diese im Frühling und Sommer gemacht haben ( $n = 385$ , 11,3% (95% CI: 10,1-12,7%)). Es konnte kein statistischer signifikanter Unterschied beim Zeitpunkt in den Verlustraten festgestellt werden (Nur Frühling - 11,5% (95% CI: 9,9-13,2%); Nur Sommer - 15,2% (95% CI: 12,8-18,0%)). Auch im Vergleich zur Gruppe die keine Drohnenbrutentnahme durchgeführt hat ergibt sich kein statistischer Unterschied (12,8% (95% CI: 11,8-14,0%)).

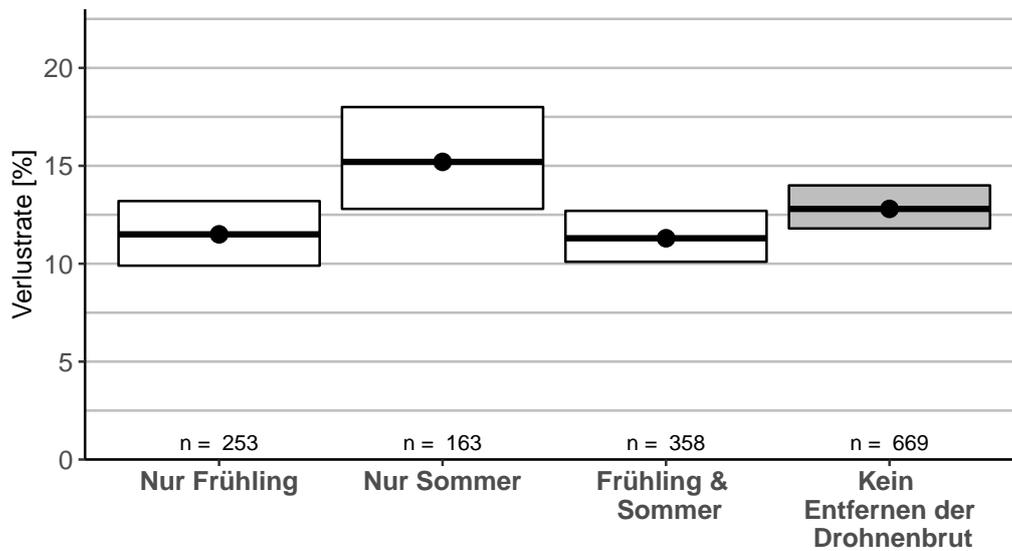


Abbildung 1.27: Höhe der Winterverluste von 2019/20 in Prozent ( $\pm 95\%CI$ ) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Drohnenbrutentnahme“ und Zeitpunkt der Durchführung. Einzelne Monate zusammengefasst siehe Abbildung 1.23.

Zusätzlich wurde die Auswirkung einer mehrfachen Drohnenbrutentnahme auf die Winterverluste untersucht. Das heißt ob die Anzahl der Monate, in denen eine Drohnenbrutentnahme durchgeführt wurde, einen Einfluss auf den Überwinterungserfolg hat. Dazu wurden die Verlustraten der Gruppen „0“ (=keine Behandlung) (12,8% (95% CI: 11,8-14,0%)), „1-3 Monate“ (12,1% (95% CI: 11,1-13,1%)) und „>3 Monate“ (11,5% (95% CI: 8,4-15,4%)) verglichen. Bei dieser Untersuchung konnte kein signifikanter Unterschied aufgrund der Dauer der Behandlung festgestellt werden (Abbildung 1.28).

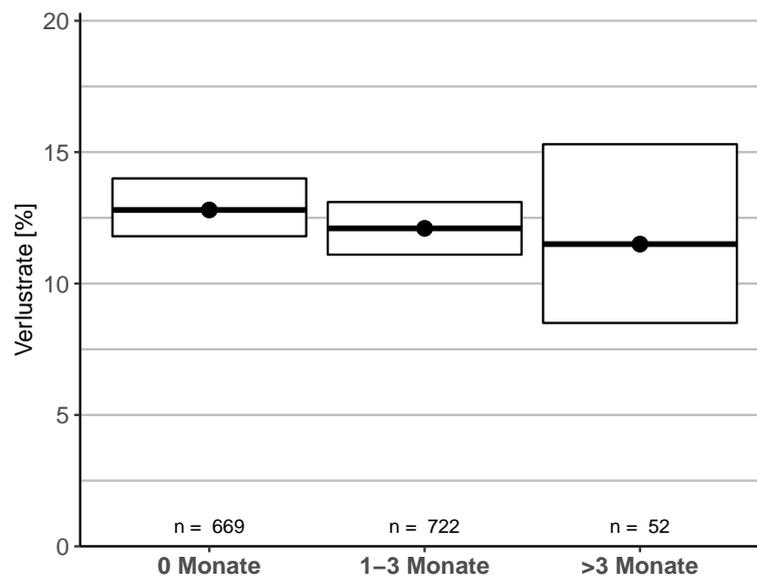


Abbildung 1.28: Höhe der Winterverluste von 2019/20 in Prozent ( $\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Dauer der Drohnenbrutentnahme.

#### 1.3.6.6.5 Ameisensäure-Behandlung

Wir haben bei unseren Analysen zwischen Kurzzeit- und Langzeitbehandlung mit Ameisensäure unterschieden und die daraus resultierenden Verlustraten miteinander verglichen. Es ist zu vermerken, dass bei keiner der Methoden die Konzentration der verwendeten Ameisensäure abgefragt wurde.

Im Sommer zeigt sich für die Kurzzeitbehandlung kein statistischer Unterschied zwischen den ImkerInnen die diese Behandlung durchgeführt haben und denen, die sie nicht durchgeführt haben (Ja - 12,8% (95% CI: 11,7-13,9%); Nein - 12,0% (95% CI: 11,1-13,0%)) (Abbildung 1.25-D). Eine Langzeitbehandlung im Sommer führte zu statistisch signifikant niedrigeren Verlustraten (11,4% (95% CI: 10,4-12,5%)) im Vergleich zur Gruppe die keine Langzeitbehandlung durchgeführt hat (13,0% (95% CI: 12,1-14,1%)) ( $\chi^2=17,9$ ,  $p<0,05$ ) (Abbildung 1.25-E). Eine Kurzzeitbehandlung mit Ameisensäure hatte im Winter in den von uns definierten Monaten eine statistisch signifikante negative Auswirkung auf die Verlustraten (Ja - 23,6% (95% CI: 13,5-37,9%); Nein - 12,2% (95% CI: 11,5-13,0%)) (Abbildung 1.26-A).

Betrachtet man ImkerInnen die ausschließlich eine Kurzzeitbehandlung im Sommer durchgeführt haben, zeigen sich potentiell höhere Winterverlustraten (27,0% (95% CI: 18,1-38,2%)) im Gegensatz zu den ImkerInnen die ausschließlich eine Langzeitbehandlung im Sommer durchgeführt haben (14,5% (95% CI: 11,0-19,0%)) (Abbildung 1.31).

#### 1.3.6.6.6 Oxalsäure

Während der Wintermonate setzen viele ImkerInnen die Oxalsäure zur Bekämpfung der Varroamilbe zur sogenannten Restentmilbung ein. Da Oxalsäure nicht in die verdeckelte Brut wirkt,

muss für eine Behandlung in der warmen Jahreszeit eine Brutfreiheit gegeben sein. Alternativ kann auch eine mehrmalige Anwendung in kurzen Abständen, eine sogenannte Blockbehandlung, über den gesamten Brutzyklus eines Bienenvolkes erfolgen.

Die Oxalsäure kann entweder durch Träufeln oder durch Verdampfen eingesetzt werden. Hiveclean, Bienenwohl und Varromed sind kommerziell erhältliche Fertigmischungen aus Oxalsäure, Zucker und anderen Stoffen, die ebenfalls geträufelt werden. Es wurde untersucht, ob sich die Winterverlustraten bei ImkerInnen, die eine dieser Methoden eingesetzt haben, von jenen, die diese Methoden nicht angewandt haben, unterscheiden, siehe Tabelle 1.8.

Betriebe die im Frühjahr „Oxalsäure durch Träufeln o. Sprühen (inkl. Fertigmischungen)“ eingesetzt haben bzw. nicht eingesetzt haben, zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Winterverlustraten (Ja - 12,8% (95% CI: 9,0-17,8%); Nein - 12,3% (95% CI: 11,6-13,0%)) (Abbildung 1.24-C). Auch in den anderen zwei Jahreszeiten zeigte die Methode zwischen Anwendung und Nicht-Anwendung keinen signifikanten Unterschied: Sommer (Ja - 12,6% (95% CI: 11,3-14,0%); Nein - 12,2% (95% CI: 11,4-13,1%)) (Abbildung 1.25-H); Winter (Ja - 13,1% (95% CI: 12,0-14,3%); Nein - 11,8% (95% CI: 10,9-12,7%)) (Abbildung 1.26-C).

Die gleiche Auswertung für „Oxalsäure Verdampfen“ zeigt im Sommer keinen signifikanten Unterschied in den Verlustraten (Ja - 11,8% (95% CI: 10,5-13,3%); Nein - 12,5% (95% CI: 11,7-13,3%)) (Abbildung 1.25-G). Im Winter zeigt sich eine signifikant niedrigere Verlustrate für das Oxalsäureverdampfen mit 11,5% (95% CI: 10,6-12,5%) als für TeilnehmerInnen die nicht verdampft haben mit 13,2% (95% CI: 12,1-14,3%) ( $\chi^2=18,3$ ,  $p<0,05$ ) (Abbildung 1.26-B). Eine ausschließliche Behandlung mit Oxalsäure durch Verdampfung wurde von  $n = 36$  TeilnehmerInnen durchgeführt und führte zu Verlustraten die im österreichischen Durchschnitt liegen (13,2% (95% CI: 9,5-17,9%)) (Abbildung 1.31-F).

Tabelle 1.8: Stichprobenanzahl und Verlustraten ( $\pm 95\%$ CI) der Oxalsäure Anwendung. Einzelne Monate sind nach Saison zusammengefasst, siehe Abbildung 1.23. \*Oxalsäure durch Träufeln o. Sprühen (inkl. Fertigmischungen)

Anwendung Oxalsäure	Ja		Nein	
	<i>n</i>	Verlust (95% KI)	<i>n</i>	Verlust (95% KI)
Träufel* - Frühjahr	31	12,8 (9,0-17,8)	1398	12,3 (11,6-13,0)
Träufel* - Sommer	363	12,6 (11,3-14,0)	1066	12,2 (11,4-13,1)
Träufel* - Winter	603	13,1 (12,0-14,3)	826	11,8 (10,9-12,7)
Verdampfen - Sommer	363	11,8 (10,5-13,3)	1066	12,5 (11,7-13,3)
Verdampfen - Winter	603	11,5 (10,6-12,5)	826	13,2 (12,1-14,3)

### 1.3.6.6.7 Hiveclean/Bienenwohl/Varromed

Kommerzielle Oxalsäure-Fertigmischungen mit dem Wirkstoff Oxalsäure (und weiteren Hilfsstoffen) werden für einen guten Behandlungserfolg im brutfreien Volk eingesetzt. Im Untersuchungsjahr 2019/20 setzten 26,9% aller befragten ImkerInnen eines dieser Produkte zur Bekämpfung der Varroamilbe ein. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Verlustrate beobachtet werden, wenn eine Fertigmischung zur Bekämpfung der Varroamilbe verwendet wurde mit

12,9% (95% CI: 11,4-14,6%) oder reine Oxalsäure geträufelt wurde 12,8% (95% CI: 11,5-14,2%). Auch wenn beides verwendet wurde (11,8% (95% CI: 9,3-14,8%)) oder keine der beiden Methoden 11,8% (95% CI: 10,8-12,9%) führte es zu keinen statistisch signifikanten Unterschieden Abbildung 1.29.

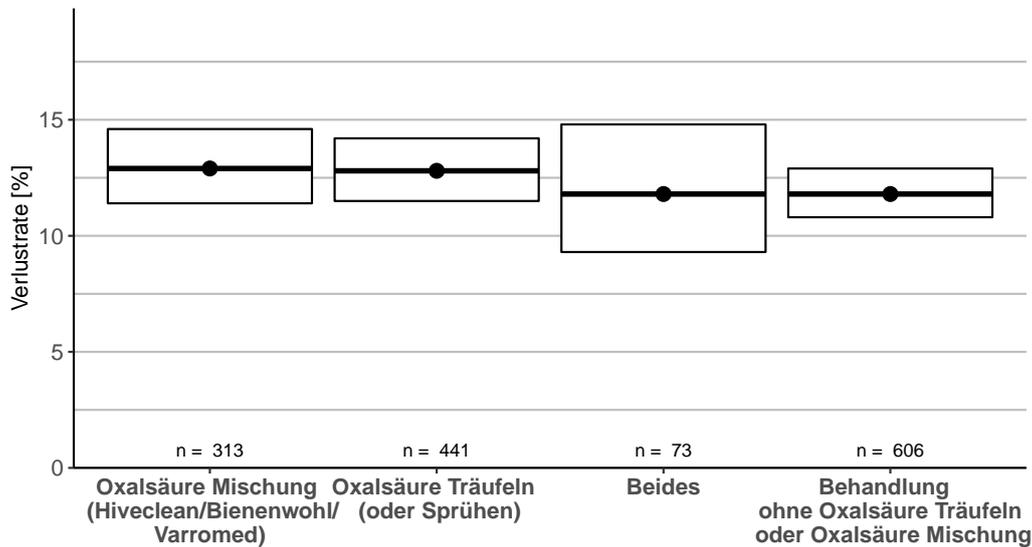


Abbildung 1.29: Höhe der Winterverluste von 2019/20 in Prozent ( $\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Varroabekämpfung mit einer Oxalsäure-Fertigmischung (Hiveclean, Bienenwohl, Varroamed) zu reiner Oxalsäure-Lösung, in Kombination und ohne die zwei Methoden.

### 1.3.6.6.8 Thymol

Von 7,7% aller befragten ImkerInnen wurde angegeben, eine Behandlung mit Thymol durchgeführt zu haben. Hierbei zeigt sich für Betriebe die im Sommer Thymol eingesetzt haben eine statistisch signifikant höhere Verlustrate mit 18,4% (95% CI: 14,9-22,4%) als für die Gruppe die kein Thymol eingesetzt hat 12,0% (95% CI: 11,3-12,7%) (Abbildung 1.25-I).

Betrachtet man die Häufigkeit der Anwendungen in Monaten im Vergleich zu den Winterverlusten, zeigten sich für ImkerInnen mit einmaliger Anwendung statistisch signifikant höhere Verlustraten mit 22,4% (95% CI: 17,4-28,3%) im Vergleich zu keiner Thymol-Behandlung mit 12,3% (95% CI: 11,6-13%). TeilnehmerInnen die in mehr als einem Monat mit Thymol behandelt haben, zeigen keinen statistisch signifikanten Unterschied 13,9% (95% CI: 9,8-19,3%) (Abbildung 1.30).

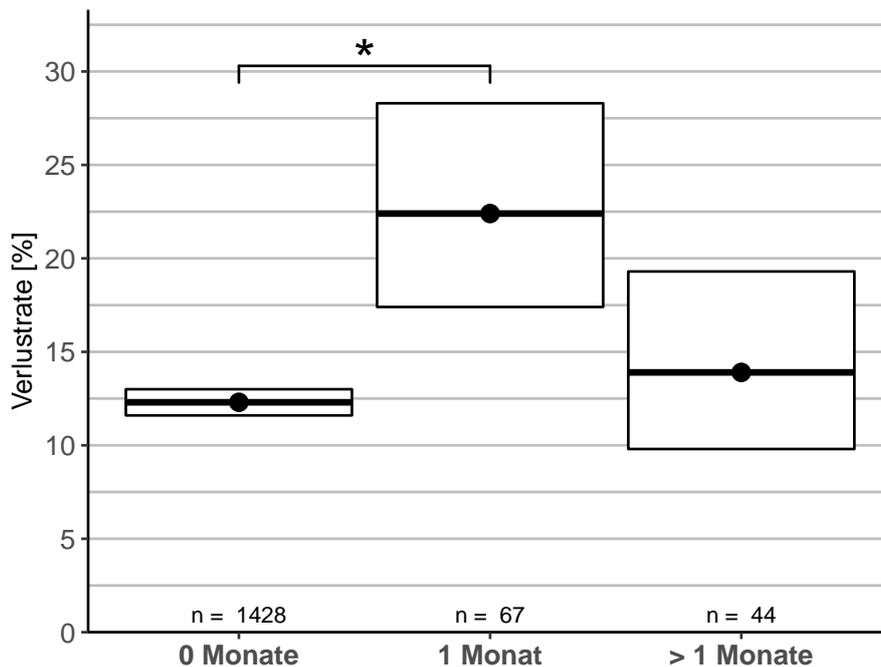


Abbildung 1.30: Höhe der Winterverluste 2019/20 in Prozent ( $\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Häufigkeit der Anwendungen in Monaten von Produkten auf Thymolbasis. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

### 1.3.6.6.9 Hyperthermie

Eine Alternative zur chemischen Behandlung der Völker gegen die Varroamilbe stellt die Hitzebehandlung (=Hyperthermie) dar. Sie beruht auf der unterschiedlichen Wärmetoleranz von Bienen und Milben. 4,6% der ImkerInnen, die sich an der Erhebung der Winterverluste beteiligt haben, wendeten diese nicht-chemische Behandlung in zumindest einem Monat an. Es wurde nicht zwischen den verschiedenen am Markt erhältlichen Systemen zur Hitzebehandlung unterschieden. Hinsichtlich der Verlustrate fanden wir keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Imkereien, die mit Hyperthermie behandelt haben und jenen, die nicht damit behandelt haben: Frühjahr (Ja - 12,8% (95% CI: 8,8-18,2%); Nein - 12,3% (95% CI: 11,6-13,0%)); Sommer (Ja - 11,9% (95% CI: 9,0-15,6%); Nein - 12,3% (95% CI: 11,6-13,1%)) (Abbildung 1.24, Abbildung 1.25 - B).

### 1.3.6.6.10 Andere biotechnische Methoden (ohne Hyperthermie / Drohnenbrutentnahme)

Andere biotechnische Methoden, mit Ausnahme von Hyperthermie und Drohnenbrutentnahme, wurden zusammengefasst abgefragt. 25,7% der befragten ImkerInnen gaben an eine solche biotechnische Methode angewendet zu haben. Dazu zählen die Verwendung von Fangwaben oder Bannwaben oder die totale Brutentnahme.

Im Untersuchungsjahr 2019/20 zeigten sich signifikant niedrigere Verlustraten bei einer Anwendung dieser Methode im Sommer (Ja - 11,2% (95% CI: 10,1-12,3%); Nein - 13,0% (95% CI: 12,1-13,9%);  $\chi^2=21,1$ ,  $p<0,05$ ) (Abbildung 1.25 - C).

### 1.3.6.6.11 Behandlungskombinationen

Die diversen Kombinationen (Abbildung 1.31) beinhalten alle möglichen Kombinationen der Behandlungen nach Jahreszeiten mit mindestens 15 ImkerInnen, ohne Drohnenbrutentnahme. Eine Risikoanalyse zur Drohnenbrutentnahme wurde extra angeführt und ausgewertet (siehe 1.3.6.6.4 Auswirkungen der Drohnenbrutentnahme auf die Winterverluste). Im Untersuchungsjahr 2019/20 gab es insgesamt 332 unterschiedlichen Behandlungskombinationen. Es wurden statistisch nur die Kombinationen ausgewertet die von mindestens 15 TeilnehmerInnen durchgeführt wurden. Dieser Filter führte zu 19 verschiedenen Kombinationen und ihren jeweiligen Verlustraten (Abbildung 1.31, Tabelle 1.9). Hierbei sei bei den Kombinationen mit kleineren Stichproben auf die breiten Konfidenzintervalle hingewiesen.

Die Kombination mit den meisten TeilnehmerInnen war die Langzeitbehandlung mit Ameisensäure im Sommer gefolgt von Oxalsäure mittels Träufeln im Winter ( $n = 138$ , 10,1% (95% CI: 8,2-12,5%), (A)) beziehungsweise Sublimation der Oxalsäure im Winter ( $n = 88$ , 11,1% (95% CI: 8,7- 14,0%), (B)). Ein signifikante höhere Verlustrate im Vergleich zum österreichischen Durchschnitt hatten TeilnehmerInnen die nur eine Ameisensäure - Kurzzeitbehandlung im Sommer durchgeführt haben 27,0% (95% CI: 18,1-38,2%) (L).

Biotechnische Maßnahmen im Sommer gefolgt von Oxalsäure im Sommer und Winter zeigt ein Potential für niedrigere Verlustraten gegenüber dem österreichische Durchschnitt ((E) - 11,1% (95% CI: 8,5-14,4%); (Q) - 9,2% (95% CI: 5,4-15,1%); (P) - 9,0% (95% CI: 5,6-14,3%)).

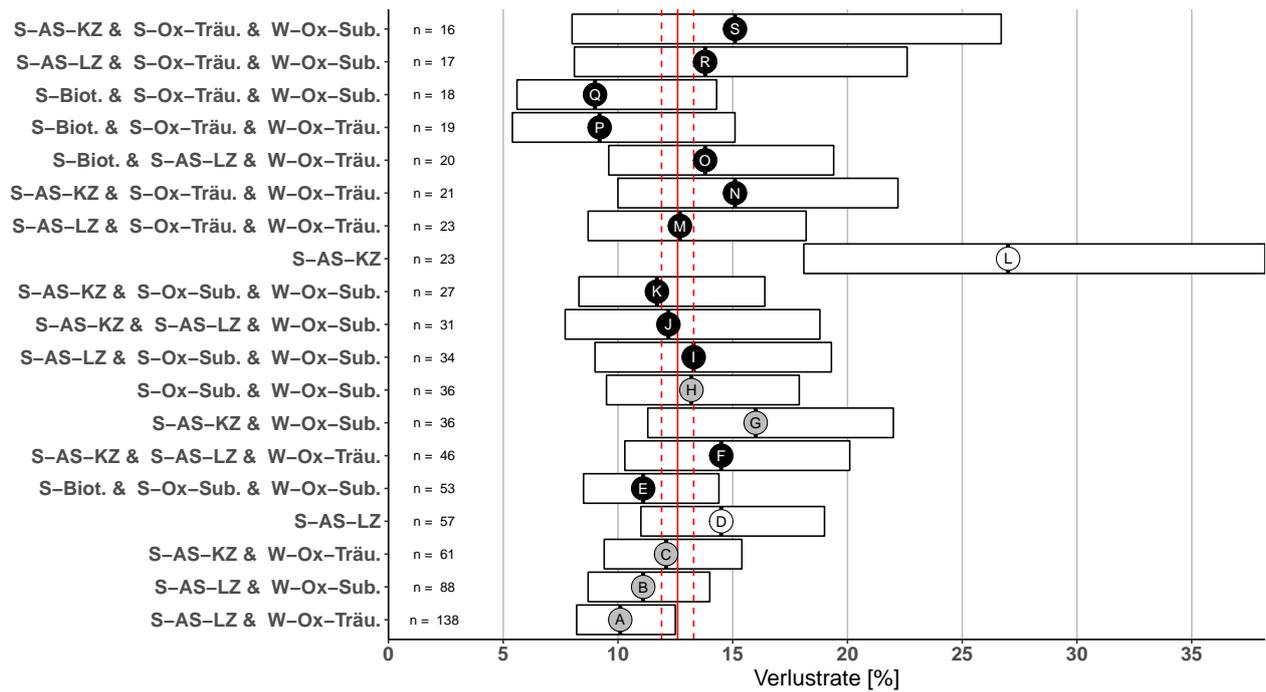


Abbildung 1.31: Höhe der Winterverluste von 2019/20 in Prozent ( $\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethodenkombination und dem Zeitpunkt der Durchführung. Einzelne Monate zusammengefasst siehe Abbildung 1.23. Nur Kombinationen von Methoden mit mindestens 15 TeilnehmerInnen wurden ausgewertet. Die Anzahl der unterschiedlichen Behandlungsmethoden ist farblich gekennzeichnet (weiß = 1, grau = 2, schwarz = 3). Der österreichischer Durchschnitt (rote Linie) mit ( $\pm 95\%$ CI) (gestrichelte Linie) ist vertikal eingezeichnet. Abkürzungen der Behandlungsmethoden siehe Tabelle 1.9.

Tabelle 1.9: Verlustraten und Stichprobenanzahl der Kombinationen. W = Winter, S = Sommer, Einzelne Monate sind nach Saison zusammengefasst, siehe Abbildung 1.23.

Abkürzung	Methode		n	Verlust (95% CI)	
(A) S-AS-LZ & W-Ox-Träu.	S	Ameisensäure - Langzeit	W Oxalsäure - träufeln	138	10,1 (8,2-12,5)
(B) S-AS-LZ & W-Ox-Sub.	S	Ameisensäure - Langzeit	W Oxalsäure - sub.	88	11,1 (8,7-14)
(C) S-AS-KZ & W-Ox-Träu.	S	Ameisensäure - Kurzzeit	W Oxalsäure - träufeln	61	12,1 (9,4-15,4)
(D) S-AS-LZ	S	Ameisensäure - Langzeit		57	14,5 (11,0-19,0)
(E) S-Biot. & S-Ox-Sub. & W-Ox-Sub.	S	Andere biotechnische Methode	S Oxalsäure - sub. W Oxalsäure - sub.	53	11,1 (8,5-14,4)
(F) S-AS-KZ & S-AS-LZ & W-Ox-Träu.	S	Ameisensäure - Kurzzeit	S Ameisensäure - Langzeit W Oxalsäure - träufeln	46	14,5 (10,3-20,1)
(G) S-AS-KZ & W-Ox-Sub.	S	Ameisensäure - Kurzzeit	W Oxalsäure - sub.	36	16,0 (11,3-22)
(H) S-Ox-Sub. & W-Ox-Sub.	S	Oxalsäure - sub.	W Oxalsäure - sub.	36	13,2 (9,5-17,9)
(I) S-AS-LZ & S-Ox-Sub. & W-Ox-Sub.	S	Ameisensäure - Langzeit	S Oxalsäure - sub. W Oxalsäure - sub.	34	13,3 (9,0-19,3)
(J) S-AS-KZ & S-AS-LZ & W-Ox-Sub.	S	Ameisensäure - Kurzzeit	S Ameisensäure - Langzeit W Oxalsäure - sub.	31	12,2 (7,7-18,8)
(K) S-AS-KZ & S-Ox-Sub. & W-Ox-Sub.	S	Ameisensäure - Kurzzeit	S Oxalsäure - sub. W Oxalsäure - sub.	27	11,7 (8,3-16,4)
(L) S-AS-KZ	S	Ameisensäure - Kurzzeit		23	27,0 (18,1-38,2)
(M) S-AS-LZ & S-Ox-Träu. & W-Ox-Träu.	S	Ameisensäure - Langzeit	S Oxalsäure - träufeln W Oxalsäure - träufeln	23	12,7 (8,7-18,2)
(N) S-AS-KZ & S-Ox-Träu. & W-Ox-Träu.	S	Ameisensäure - Kurzzeit	S Oxalsäure - träufeln W Oxalsäure - träufeln	21	15,1 (10-22,2)
(O) S-Biot. & S-AS-LZ & W-Ox-Träu.	S	Andere biotechnische Methode	S Ameisensäure - Langzeit W Oxalsäure - träufeln	20	13,8 (9,6-19,4)
(P) S-Biot. & S-Ox-Träu. & W-Ox-Träu.	S	Andere biotechnische Methode	S Oxalsäure - träufeln W Oxalsäure - träufeln	19	9,2 (5,4-15,1)
(Q) S-Biot. & S-Ox-Träu. & W-Ox-Sub.	S	Andere biotechnische Methode	S Oxalsäure - träufeln W Oxalsäure - sub.	18	9,0 (5,6-14,3)
(R) S-AS-LZ & S-Ox-Träu. & W-Ox-Sub.	S	Ameisensäure - Langzeit	S Oxalsäure - träufeln W Oxalsäure - sub.	17	13,8 (8,1-22,6)
(S) S-AS-KZ & S-Ox-Träu. & W-Ox-Sub.	S	Ameisensäure - Kurzzeit	S Oxalsäure - träufeln W Oxalsäure - sub.	16	15,1 (8,0-26,7)

### 1.3.6.7 Königinnen-Verluste

Die Winterverlustrate durch „Unlösbare Königinnenprobleme“ für ganz Österreich lag 2019/20 bei 4,3% (95% CI: 4,1-4,6%). Der Vergleich von Bundesländern zur österreichischen Gesamtverlustrate zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied. Zwischen den Bundesländern zeigt sich für Niederösterreich eine signifikant höhere Verlustrate mit 5,0% (95% CI: 4,5-5,6%) im Vergleich zu Vorarlberg mit 3,1% (95% CI: 2,3-4,3%).

Die Verlustraten der anderen Bundesländer ergeben: Burgenland 4,4% (95% CI: 2,7-7,0%); Kärnten 3,7% (95% CI: 3,1-4,5%); Oberösterreich 4,6% (95% CI: 4,0-5,3%); Salzburg 4,4% (95% CI: 3,2-5,9%); Steiermark 3,9% (95% CI: 3,3-4,6%); Tirol 4,0% (95% CI: 3,3-4,8%) und Wien 4,5% (95% CI: 3,3-6,1%) Abbildung 1.32.

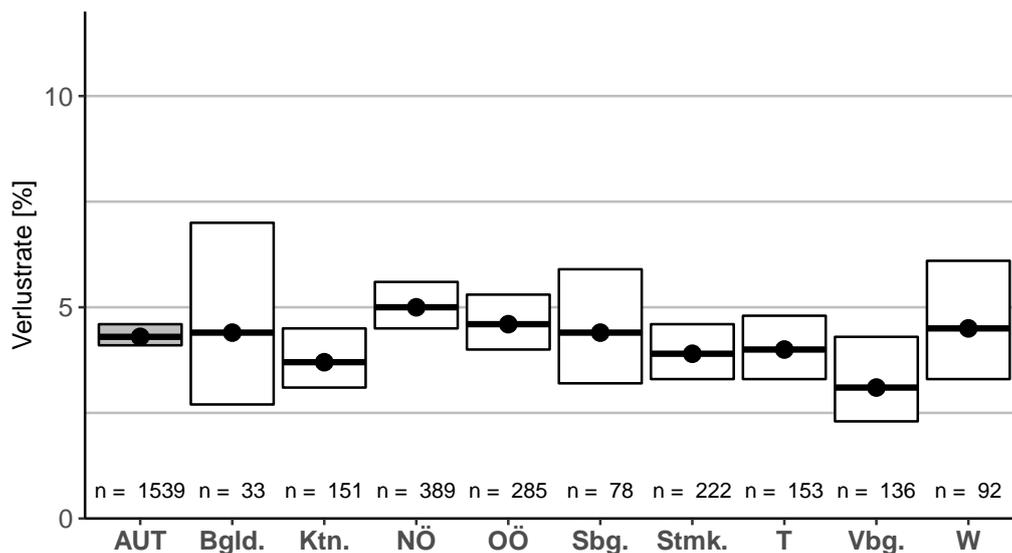


Abbildung 1.32: Höhe der Winterverluste 2019/20 durch unlösbare Königinnenprobleme verursacht für die einzelnen Bundesländer und Österreich gesamt in Prozent ( $\pm 95\%$ CI).

#### 1.3.6.7.1 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 Vorjahren) entscheiden. Tabelle 1.10 zeigt die Angaben der TeilnehmerInnen seit 2013/14.

TeilnehmerInnen die diese Probleme „Häufiger“ beobachteten hatten signifikant höhere Verluste durch „Unlösbare Königinnenprobleme“ mit 6,8% (95% CI: 5,8-7,9%) im Vergleich zu den anderen Gruppen: Normal - 4,3% (95% CI: 4,0-4,8%), Seltener - 3,7% (95% CI: 3,2-4,2%), Weiß nicht - 3,8% (95% CI: 2,8-5,0%) (Abbildung 1.33-A). Auch bei den Winterverlusten (exklusive „Unlösbare Königinnenprobleme“) zeigte sich derselbe Trend mit signifikant höheren Verlusten für „Häufiger“ mit 11,2% (95% CI: 8,9-14,0%) im Vergleich zu den anderen Gruppen: Normal -

7,1% (95% CI: 6,2-8,1%); Seltener - 7,4% (95% CI: 6,2-8,7%). Nur die Gruppe „Weiß nicht“ zeigte hier keinen signifikanten Unterschied mit 10,8% (95% CI: 7,9-14,5%) (Abbildung 1.33-B).

Tabelle 1.10: Relative und absolute Häufigkeit der Antworten zu den Königinnenproblemen von 2013/14 bis 2019/20 (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
2017/18	72	6,6	529	48,4	332	30,3	162	14,8
2018/19	95	6,2	587	38,3	389	25,4	463	30,2
2019/20	127	10,4	570	46,9	354	29,1	165	13,6

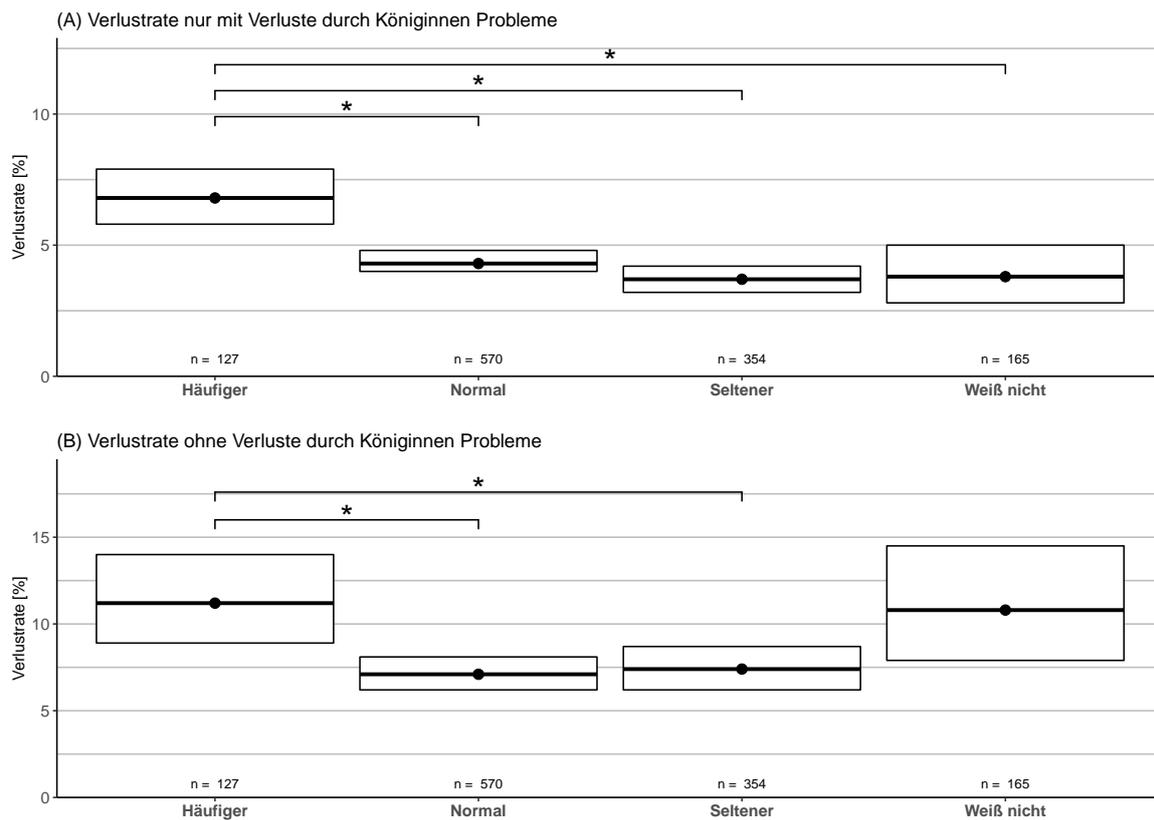


Abbildung 1.33: Höhe der Winterverluste 2019/20 im Zusammenhang mit den beobachteten Königinnenproblemen in Prozent ( $\pm 95\%$ CI). (A) nur Verluste durch unlösbare Königinnenprobleme. (B) Winterverluste exklusive den Verlusten durch unlösbare Königinnenprobleme. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

### 1.3.6.7.2 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 im Jahr 2019 begatteten Königin, im Vergleich zu Völkern mit einer älteren Königin unterscheiden. Hier gab sich in unserer Umfrage ein Anteil an jungen Königinnen von 53,1% 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 2019 begattete („junge“) Königin?“ beantwortet haben.

Beim Vergleich der Austauschraten mit Verlusten durch „Unlösbare Königinnenprobleme“ zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen: 0-25% (4,0% (95% CI: 3,1-5,1%)); 26-50% (4,4% (95% CI: 3,9-4,8%)); 51-75% (4,6% (95% CI: 4,2-5,1%)) und 76-100% (3,8% (95% CI: 3,2-4,6%)) (Abbildung 1.34 - A).

Ein signifikant positiver Effekt mit weniger Verlusten bei mehr eingesetzten jungen Königinnen zeigt sich aber für die Verlustraten exklusive „Unlösbare Königinnenprobleme“. Hier zeigt die Gruppe in der nur „0-25%“ Königinnen getauscht wurden statistisch signifikant höhere Verlustraten mit 15,3% (95% CI: 12,4-18,8%) im Gegensatz zu den Gruppen in denen prozentual mehr junge Königinnen eingesetzt wurden „26-50%“ (8,8% (95% CI: 7,8-9,9%)); „51-75%“ (6,0% (95% CI: 5,1-7,0%)) und „76-100%“ (8,0% (95% CI: 6,4-10,0%)). Zusätzlich hat die Gruppe „26-50%“ statistisch signifikant höhere Verlustraten als die Gruppe „51-75%“ (Abbildung 1.34 - B).

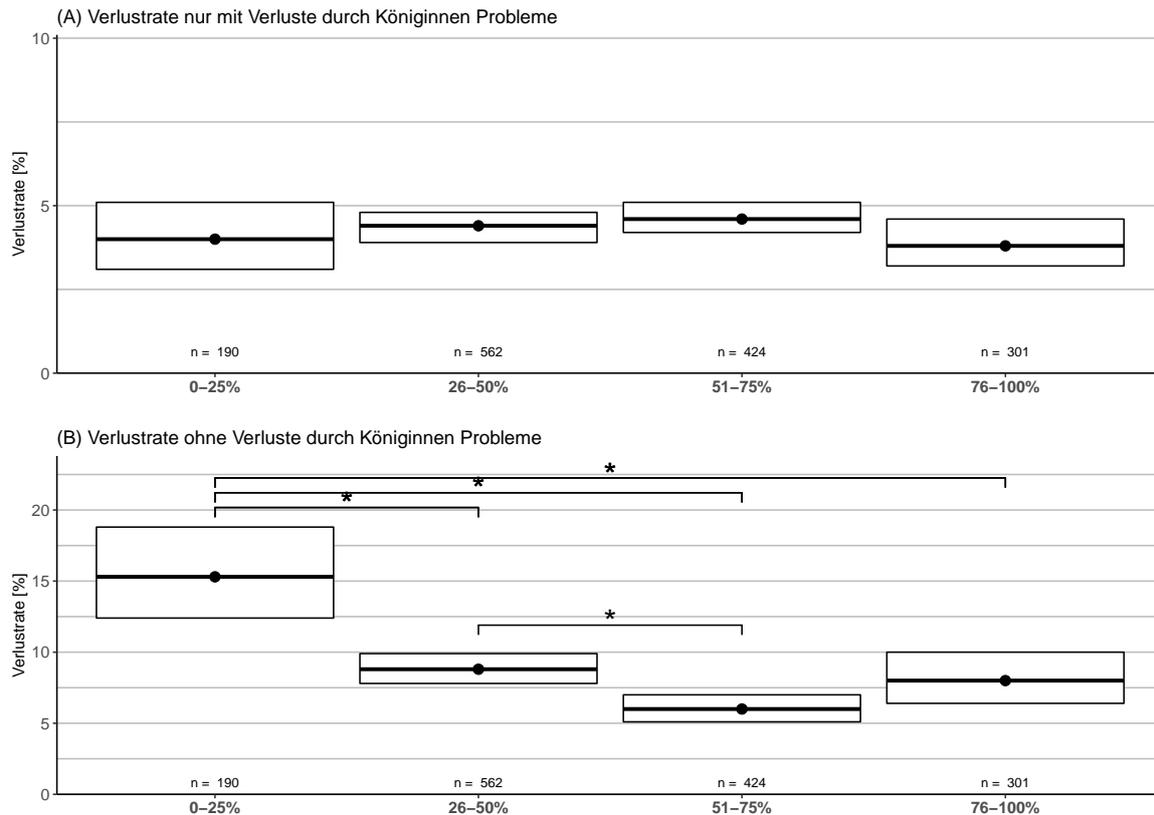


Abbildung 1.34: Höhe der Winterverluste 2019/20 in Prozent ( $\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit vom Prozentsatz junger Königinnen pro Imkerei. (A) nur Verluste durch unlösbare Königinnenprobleme. (B) Winterverluste exklusive den Verlusten durch unlösbare Königinnenprobleme. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

### 1.3.6.8 Verkrüppelte Flügel

In der Erhebung 2019/20 wurde nach dem Auftreten von Bienen mit verkrüppelten Flügeln während der Sammelsaison 2019 gefragt. Nur 2,0% der Imkereien beobachtete diese „Häufig“, die Gruppe hatte aber eine statistisch signifikant höhere Verlustrate mit 19,4% (95% CI: 15,3-24,3%) im Vergleich zur Gruppe „Wenig“ mit 12,6% (95% CI: 11,5-13,8%) sowie wenn verkrüppelte Flügel „Überhaupt nicht“ beobachtet wurden mit 11,5% (95% CI: 10,6-12,5%). Keinen signifikanten Unterschied gab es zu den Gruppen „Weiß nicht“ mit 17,3% (95% CI: 12,3-23,7%) und „keine Angaben“ mit 14,0% (95% CI: 9,3-20,4%) (Abbildung 1.35).

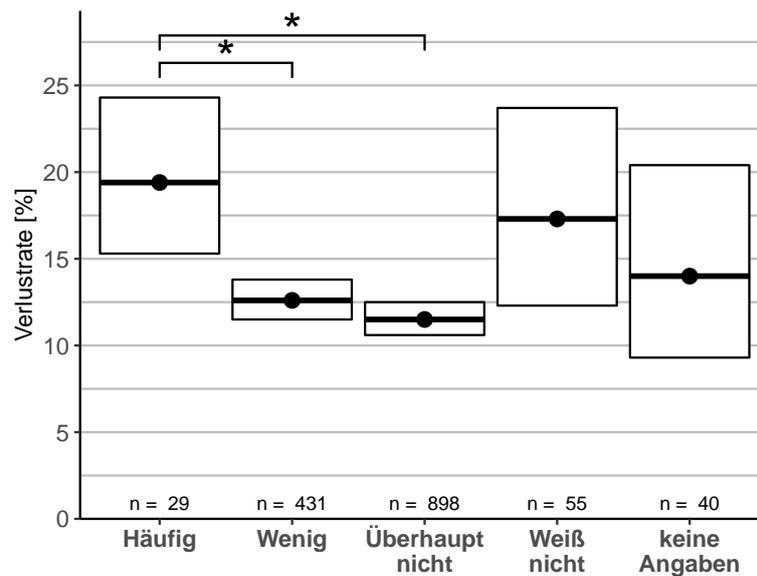


Abbildung 1.35: Höhe der Winterverluste 2019/20 in Prozent ( $\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Angabe wie häufig während der Sammelsaison 2019 Bienen mit verkrüppelten Flügeln in den Völkern bemerkt wurden. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

## 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 Bericht werden die Ergebnisse des Untersuchungsjahres 2019/20 zusammengefasst und zum Teil mit denen der Vorjahre verglichen. Die im Winter 2019/20 in Österreich erhobene Verlustrate von Bienenvölkern betrug 12,6% (95% CI: 11,9-13,3%), bei einer Teilnahme von 1539 Imkereien, was einer prozentualen Beteiligung von 5,1% aller österreichischen Imkereibetriebe entspricht. Diese stellten insgesamt Information über 30.724 eingewinterte Bienenvölker zur Verfügung, was wiederum 7,9% aller in Österreich gehaltenen Bienenvölker entspricht. Die Verlustrate liegt, verglichen mit den bisherigen Ergebnissen, im mittleren Bereich. Die laufende mittlere Verlustrate aller bisher in Österreich erhobenen Winterverlusten liegt bei 16,1%. 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 (van der Zee et al., 2013; Brodschneider et al., 2016, 2018c). Diese Art der Untersuchung ist ein Hilfsmittel, den Ursachen hoher Winterverluste auf den Grund zu gehen. Die Trends und Erkenntnisse der freiwilligen Umfrage sollen zusätzlich durch gezielte Probenentnahmen ergänzt werden (van der Zee et al., 2015).

## 1.4.1 Populationsdynamik in Österreich

Wie auch in den Jahren zuvor wird aus den Winterverlusten und dem Völkerstand im Frühjahr davor eine hypothetische Populationsdynamik der Bienenvölker vom Frühjahr 2013 bis zum Frühjahr 2020 modelliert (Abbildung 1.6). Dabei zeigt sich, dass eine Vermehrung über den Sommer, etwa durch eigene Nachschaffung oder Zukäufe, eine konstante, sogar steigende, Bienenpopulation in Österreich ermöglicht.

Im Jahr 2014/15 mit sehr hohen Winterverlusten waren die ImkerInnen in der Lage die verlorenen Bienenvölker über den Sommer wieder zu kompensieren. In den folgenden Jahren mit geringeren Winterverlusten, waren die ImkerInnen in der Lage, diese Verluste im Sommer auszugleichen und auch eine größere Anzahl an Bienenvölkern im folgenden Herbst einzuwintern.

Unser Modell ist aber nur begrenzt gültig — 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. Die Arbeit und Kosten für die Nachschaffung werden dabei vorwiegend von Kleinimkereien, welche den Großteil der Bienenpopulation in Österreich betreuen, getragen. Ökonomische Abschätzungen dieser Leistungen zum Erhalt einer starken Bienenpopulation 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, ca. 88,5%, haben wir online erhalten, wohingegen der Anteil derer, die den Fragebogen aus der Zeitschrift „Bienen Aktuell“ retournieren über die letzten Jahre immer geringer geworden ist. Dieses Jahr gab es jedoch im Vergleich zum Vorjahr eine erhöhte Teilnahme mittels Kurzfragebogen der Zeitschrift (+1,5%) welche in Summe 5,6% der TeilnehmerInnen in unserer Umfrage ausmacht. Eine mögliche Erklärung für die höhere Teilnahme mittels Zeitschrift könnte ein Nebeneffekt durch die Corona-bedingte Quarantäne im Frühjahr gewesen sein. Teilnehmer hatten vielleicht mehr Interesse und Zeit für die Zeitschrift und dabei auch dem Fragebogen mehr Beachtung geschenkt.

In diesem Jahr gab erstmalig 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-Teilnehmern. Da wir mit dem Umfragebogen in der Zeitschrift auch Personengruppen ohne Internetzugang ansprechen wollen, könnte dies auf ein Problem in der Repräsentativität hindeuten. Die langjährige Erfahrung und auch Stichprobenuntersuchungen von anderen Studien, die auch Winterverluste erhoben haben, zeigen aber, dass unsere jährlichen Verlustanalysen mit dem gewählten Konfidenzintervall bis dato immer repräsentativ waren. Wir werden weiterhin den verkürzten Fragebogen

in der Zeitschrift beibehalten, dennoch werden wir im Auge behalten ob dieser Unterschied auch in den folgenden Untersuchungen zu finden ist.

Die Verlustraten zwischen anonymer und nicht-anonymer Teilnahme war wie auch im Vorjahr ohne signifikanten Unterschied. Im Untersuchungsjahr 2019/20 haben 67,3% der TeilnehmerInnen freiwillig eine Kontaktmöglichkeit genannt, was zum einen von Vertrauen in die Untersuchung zeugt, uns aber auch die Möglichkeit gibt bei Unklarheiten nachzufragen.

Die durchschnittliche Völkeranzahl der an dieser Erhebung teilnehmenden Imkereien lag 2019/20 bei 20 eingewinterten Völkern, was etwas mehr ist als der in Österreich aufgrund der Angaben der Biene Österreich erwartete Mittelwert (13 Völker/Imkerei). Dazu trägt die Teilnahme von 19 großen Imkereien mit jeweils über 150 eingewinterten Völkern bei. Der Median der eingewinterten Völkerzahlen liegt jedoch bei 10 eingewinterten Völkern, was der erwarteten österreichischen Imkerei-Demographie durchaus entspricht. Auch daraus und durch die Verteilung der teilnehmenden Imkereien über ganz Österreich (Abbildung 1.4) folgern wir, dass die dieser Auswertung zugrundeliegenden Daten einer durchmischten und annähernd repräsentativen Gruppe der österreichischen Imkereien entstammen.

### 1.4.3 Bundesländer und Bezirke

Wie auch die Jahre davor sind die Winterverluste in Österreich nicht gleich verteilt. Dieses Jahr wurde besonders in Wien eine signifikant höhere Verlustrate beobachtet als in den anderen Bundesländern (Abbildung 1.7). Diese Variation zwischen den Bundesländern konnte auch in vorherigen Winterverlust-Analysen festgestellt werden (Brodtschneider et al., 2018b; Crailsheim et al., 2018; Brodtschneider et al., 2019b; Oberreiter und Brodtschneider, 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, 2010; Brodtschneider et al., 2019a). Eine mögliche Erklärung hierfür zeigen zwei österreichischen Studien in denen ein Zusammenhang zwischen Wetter (Switanek et al., 2017) 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 hatte. Die österreichweite Gesamtverlustrate von 12,6% (95% CI: 11,9-13,3%) im Jahr 2019/20 liegt unter dem langjährigen Durchschnitt und spiegelt sich größtenteils auch in den Bezirksergebnissen wider.

Durch die Analyse der unterschiedlichen Bezirke zeigen sich teilweise aber auch Gebiete mit potentiell sehr hohen Winterverlusten (Abbildung 1.9). Aus Gründen des Datenschutzes und der Repräsentativität werden nur jene Bezirke aufgelistet, bei denen mindestens Daten von fünf Imkereien zur Verfügung stehen. Hierbei zeigten sich besonders hohe Verluste mit einer Verlustwahrscheinlichkeit von über 20% für Wien (20,07%,  $n = 92$ ), Neunkirchen (NÖ) (29,22%,  $n = 16$ ), Wels-Land (OÖ) (21,43%,  $n = 14$ ) und Lienz (Tirol) (23,48%,  $n = 9$ ). Niedrige Verlustwahrscheinlichkeiten von unter 10% konnten in 18 Bezirken festgestellt werden, von denen die Bezirke Salzburg (5,88%,  $n = 5$ ), Hartberg-Fürstenfeld (Stmk) (5,96%,  $n = 16$ ) und Villach (Kärnten) (6,08%,  $n = 9$ ) die geringsten Verluste aufwiesen.

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 1.9) 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 dieses Jahr wieder ein epidemiologischer Zusammenhang zwischen dem Überwinterungserfolg von Bienenvölkern und der Seehöhe des Haupt-Überwinterungsbienenstandes nachgewiesen werden, wie ebenfalls im Jahr zuvor (Oberreiter und Brodschneider, 2020). 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 1.12).

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 Winterverlusterberhebungen bildet die Auswertung der Symptome der in Österreich verstorbenen Bienenvölker, über die wir anhand dieser Untersuchung detaillierte Informationen erhalten haben. 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.

Im Untersuchungsjahr 2019/20, sowie in den Jahren zuvor, war das häufigste gemeldete Symptom „keine oder nur wenige tote Bienen im oder vor dem Volk“ (Brodschneider et al., 2018b; Crailsheim et al., 2018; Brodschneider et al., 2019b). Dieses Symptom ist relativ 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, 2009; Williams et al., 2010; Steinhauer et

al., 2014).

Eines der relativ 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 relativ sicher 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. Dieser auch als Futterabbriss bezeichnete Winterverlust wurde 2019/20 fast doppelt so häufig gemeldet als das Verhungern. Die vorangegangenen Untersuchungen von uns zeigen ähnliche Ergebnisse und die relative Häufigkeit des Symptomes für Verhungern anhand von Futtermangel liegt über die Jahre konstant zwischen 5-10% (Brodtschneider et al., 2018b; Crailsheim et al., 2018; Brodtschneider et al., 2019b).

Nicht zuordenbare oder unbekannte Symptome wurden im Untersuchungsjahr 2019/20 und in den Jahren davor nur selten gemeldet (Brodtschneider et al., 2018b; Crailsheim et al., 2018; Brodtschneider et al., 2019b). Dadurch können wir erkennen, dass unser einfach gestaltete Symptomkatalog die meisten Fälle abdeckt und TeilnehmerInnen die Symptome leicht erkennen bzw. zuordnen können.

### 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 1.3), 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 wieder (Morawetz et al., 2019a).

Wie auch in den Jahren zuvor zeigen kleinere Betriebe mit weniger als 50 Völker eine Wahrscheinlichkeit für signifikant höhere Verlustraten (Abbildung 1.13) als größere Betriebe mit mehr als 50 Völkern. Hierbei handelt es sich mittlerweile um konstante, wiederholt aufgetretene Ergebnisse in Österreich wie auch im internationalen Vergleich (van der Zee et al., 2014; Brodtschneider et al., 2016, 2018c; Crailsheim et al., 2018; Gray et al., 2020; Oberreiter und Brodtschneider, 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) auf die Winterverlustrate getestet. Die höchste Anzahl an „Unsicher“ und „keine Angaben“ gab es bei der Frage „Kleine Brutzellen (5,1mm oder weniger)“. Am ausgeglichensten zwischen „Ja“ und „Nein“ waren die Fragen „Offener Gitterboden im Winter“ und „Kaufe Wachs zu (kein eigener Wachskreislauf)“ (Abbildung 1.14).

### 1.4.6.1 Wanderimker

In diesem Jahr hatten ImkerInnen die mit ihren Völkern zu Trachtangeboten wanderten signifikant geringere Verluste im Winter (Abbildung 1.15-B). Dieses Phänomen ist nicht jedes Jahr zu sehen, wurde aber dennoch schon öfters beobachtet, auch im internationalen Vergleich (Brodschneider et al., 2010, 2018c; Crailsheim et al., 2018; Gray et al., 2020; Oberreiter und Brodschneider, 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 (van der 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.

### 1.4.6.2 Fremdwachs und Naturwabenbau

Wie auch bereits im vorigen Winter zeigten Imkerereien die Wachs zukaufte signifikant höhere Winterverluste als Imkerereien mit einem eigenen Wachskreislauf (Abbildung 1.15-G) (Oberreiter und Brodschneider, 2020). Die Durchführung eines eigenen Wachskreislaufes kann für Professionalität des Imkereibetriebes sprechen. Zusätzlich ermöglicht das Verfahren aber auch eine bessere Kontrolle über Inhaltsstoffe des Waxes 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). 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. Ein weiteres Problem beim Zukauf könnte verfälschtes Bienenwachs sein. Alkassab et al., 2020 zeigen eine verzögerte Annahme, atypische Brutzyklen sowie geringere Populationsgrößen von Kunstschwärmen auf Wachsmittelwänden die mit 20% Stearin verfälscht waren.

Hierbei ist zu erwähnen, dass zwischen ImkerInnen die Naturwabenbau eingesetzt haben oder jenen die das nicht machten kein signifikanter Unterschied auftrat (Abbildung 1.15-H).

### 1.4.6.3 Varroatoleranz und kleine Brutzellen

In diesem Jahr zeigten ImkerInnen mit Königinnen aus einer „Zucht auf Varroa-Toleranz“ eine Wahrscheinlichkeit für signifikant niedrigere Verlusten im Vergleich zur Gruppe die in dieser Frage „Unsicher“ war. Dieser positive Effekt konnte in den vorherigen Umfragen noch nicht festgestellt werden. Der Vergleich zwischen „Ja“ und „Unsicher“ hat aber nur eine bedingte Aussagekraft (Abbildung 1.15-C).

Natürliche Abwehrmechanismen von westlichen Honigbienen gegen die parasitierende Varroamilbe wurden bereits sehr früh gefunden (Ruttner et al., 1984). Mondet et al., 2020 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; Mondet et al., 2020). 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 unerforschten Faktoren zusammenhängen könnte (Fanny et al., 2020; Mondet et al., 2020). 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). 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). Dieses Konzept muss aber je nach Region und Bedingungen angepasst werden um erfolgreich zu sein. Mondet et al., 2020 zeigen in ihrer Studie, dass es in Europa bereits mehrere Honigbienen-Populationen gibt die durch ihr Verhalten die Varroamilbe in ihrer Entwicklung aktiv behindern.

Interessanterweise zeigten TeilnehmerInnen die Angaben „kleine Brutzellen“ verwendet zu haben eine Wahrscheinlichkeit signifikant weniger Winterverluste zu erfahren (Abbildung 1.15-I). Sollte dieser Betriebsfaktor auch in Zukunft wieder einen Unterschied machen, wäre hier eine genauere Analyse dieser zwei Gruppen wahrscheinlich sinnvoll.

### 1.4.6.4 Bauart des Bienenstockes

Die Ausführung des Bienenstockes (Kunststoff-Beuten, Isolierte Beuten im Winter, offener Gitterboden im Winter) hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Winterverluste (Abbildung 1.15-D,E,F). Die gleichen Ergebnisse sind auch in vorangegangenen Umfragen zustande gekommen (Crailsheim et al., 2018; Oberreiter und Brodschneider, 2020).

#### 1.4.6.5 Zertifizierte Bio-Imkerei

Ob ein Imkereibetrieb in unserer Umfrage eine „Zertifizierte Bio-Imkerei“ war oder nicht hatte keinen statistischen Einfluss auf den Überwinterungserfolg. Im ersten Untersuchungsjahr 2016/17, in welchem diese Frage gestellt wurde, hatten zertifizierte Imkereien eine Wahrscheinlichkeit signifikant weniger Völker über den Winter zu verlieren (Crailsheim et al., 2018). In den Folgejahren konnte aber kein Unterschied zwischen den Gruppen mehr festgestellt werden (Brodschneider et al., 2018b; Oberreiter und Brodschneider, 2020).

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 (Thrasylvoulou 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 1.7), 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. Was jedoch keinen signifikanten Unterschied auf die Winterverluste in unserer Untersuchung zeigte, ausgenommen das Fremdwachs, wie bereits vorher diskutiert.

#### 1.4.6.6 Vereinigung von Völkern

Eine neue Betriebsweisen-Frage in unserer Umfrage 2019/20 war die Frage ob weiselrichtige aber schwache Völker bereits vor dem Winter vereinigt wurden. Insgesamt haben 13,7% der TeilnehmerInnen diese Praxis durchgeführt. Sie führte aber zu keinen statistisch signifikanten Unterschieden in den Winterverlusten (Abbildung 1.15-J). 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, wie bereits in einigen der vergangenen Jahre, keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Insgesamt über alle Untersuchungsjahre zeigt sich hier aber kein klares Bild (Crailsheim et al., 2018; Oberreiter und Brodschneider, 2020).

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. Koenig et al., 1986 zeigten in ihrer Arbeit den Einfluss von verschiedenen Brutwabentypen auf das Vorkommen von Kalkbrut in Honigbienenstöcken, 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 Bienenstöcken vermindern, diese Rückstände werden durch einschmelzen der Altwaben aber nicht entfernt (Calatayud-Vernich et al., 2018). Eine vollständige Rückstandsfreiheit des neuen Wabenmaterials kann in unserer Untersuchung mangels Überprüfung allerdings nicht als gegeben angenommen werden.

### 1.4.8 Trachtangebot

Rapstracht im Frühjahr 2019 zeigte einen negativen Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit im folgenden Winter (Abbildung 1.17-A). In vorherigen und internationalen Studien finden sich zu Raps in Zusammenhang mit den Winterverlusten widersprüchliche Ergebnisse (van der Zee et al., 2014; Gray et al., 2019; Oberreiter und Brodschneider, 2020), da in verschiedenen Ländern sowohl positive wie auch negative Effekte beobachtet worden sind. Raps (*Brassica napus*) liefert Nektar und Pollen in sehr hohen Mengen, aber potentiell vorkommende Pflanzenschutzmittel könnten einen negativen Effekt auf die Entwicklung der Honigbienenstöcke 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).

Diesen Winter hatte die Trachtpflanze Mais (*Zea mays*) wieder einen negativen Effekt auf die Winterverlustrate (Abbildung 1.17-B). Obwohl Mais keinen Nektar produziert, kann der Pollen von Honigbienen gesammelt werden. Auch in Österreich zeigten Untersuchungen, dass der Pollen aktiv von Bienen gesammelt wurde (Brodschneider 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 werden der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln und eine einseitige Ernährung diskutiert (Brodschneider und Crailsheim, 2013; van der 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 essentiellen 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 Bienenstöcke, 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.

Eine Sonnenblumentracht und spätblühende Zwischenfrüchte (zum Beispiel Ölrettich, Phacelia und Senf) zeigten dieses Jahr keine negativen Auswirkungen (Abbildung 1.17-C,D). Die spätblühenden Zwischenfrüchte befinden sich seit 2018 im COLOSS Fragebogen. Hier zeigt sich im Überwinterungsjahr 2017/18 (Gray et al., 2019) ebenfalls kein signifikanter Unterschied in Österreich. Im Jahr 2018/20 hatten ImkerInnen mit spätblühenden Zwischenfrüchten eine Wahrscheinlichkeit für signifikant höhere Winterverluste (Oberreiter und Brodschneider, 2020). Bei der Waldtracht gibt es dieses Jahr ein sehr interessantes Ergebnis. Hier zeigt sich bei Vorhandensein dieser Tracht eine Wahrscheinlichkeit für signifikant niedrigere Überwinterungsverluste (Abbildung 1.17). Bei der Waldtracht mit Melezitose (sogenannter Zementhonig), welcher die Brut- und Honigwaben mit schwerverdaulichem, kristallinem Honig füllt (Pechhacker et al., 1990), wurde hingegen kein statistischer Unterschied festgestellt. Der Grund hierfür könnte der Zeitpunkt der Tracht sein. 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).

Aus epidemiologischer Sicht können wir also einen signifikanten Zusammenhang mit bestimmten Trachtquellen festhalten, wobei diese Trachtquellen auch stellvertretend für andere (nicht abgefragte oder bisher unbekannt) abträgliche Standortverhältnisse stehen können. Es können keine kausalen Gründe für die erhöhten Verluste beim Vorhandensein bestimmter Trachten genannt werden. Diese 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). Die Auswirkungen und Erforschung von Pflanzenschutzmitteln auf Bienenvölkern ist noch immer ein sehr aktuelles Thema und Bienenvölker sind durch ihre Sammelaktivität ein wichtiger Bioindikator für die Umwelt was durch neue Methoden immer besser erforscht werden kann (Murcia-Morales et al., 2020).

### 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. Der Parasit hat einen großen Einfluss auf den Überwinterungserfolg von Bienenvölkern (Dahle, 2010), insbesondere auch dadurch, dass die Milbe als Vektor für andere Pathogene, wie Viren, dient (Rosenkranz et al., 2010; Noël et al., 2020). Deshalb waren nicht nur die Erhebungen über die verschiedenen Behandlungsmethoden, sondern auch über die Häufigkeit und den Zeitpunkt der Behandlungen wichtiger Bestandteil unserer Untersuchungen.

#### 1.4.9.1 Bestimmung des Varroabefalls

Der Großteil der teilnehmenden ImkerInnen (91%) hat eine Varroabefallskontrolle durchgeführt und am häufigsten war die Kontrolle in den Monaten Juli, August und September (Abbildung 1.21). Gruppieren nach Jahreszeit hat der Großteil im Sommer und Winter kontrolliert (Abbildung 1.22). Dieses Jahr konnte kein signifikanter Unterschied in den Winterverlusten festgestellt werden zwischen ImkerInnen die eine Bestimmung durchgeführt haben und denen, die keine durchführten (Abbildung 1.19). Auch die anspruchsvollere Auswertung auf Zeit und Dauer zeigt keine Unterschiede (Abbildungen 1.20 und 1.22). Im Vergleich zum Winter 2018/19 zeigten TeilnehmerInnen die eine Bestimmung durchgeführt haben, eine Wahrscheinlichkeit signifikant weniger Völker über den Winter zu verlieren (Oberreiter und Brodschneider, 2020). Obwohl die Kontrolle auf die Varroamilbe diese 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. Die Befallskontrolle ist daher 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 (Brodschneider et al., 2019a). In unserer Umfrage folgt der Großteil der Empfehlung der AGES (Moosbeckhofer et al., 2015) (Tabelle 1.7). Die Empfehlung ist eine Verdunstung von Ameisensäure im Sommer und eine Nachbehandlung im Winter bei Brutfreiheit mit Oxalsäure. Aber auch die Drohnenbrutentnahme als biotechnische Maßnahme ist noch immer eine weitverbreitete Methode. Um die Effektivität und Unterschiede zwischen den Behandlungsmethoden besser zu veranschaulichen wurden die Behandlungsmethoden zuerst zum Zeitpunkt ihrer Anwendung in die Gruppen „Frühling, Sommer, Winter“ eingeteilt (Abbildung 1.23).

Die einzelnen Methoden und auch die Kombinationen dieser werden in weiterer Folge näher betrachtet. Auf synthetische Behandlungsmethoden und den Einsatz von Milchsäure wird nicht näher eingegangen, weil die Stichproben in diesen Gruppen für eine sinnvolle, statistische Auswertung zu klein waren.

##### 1.4.9.2.1 Biotechnische Maßnahmen

Die Hyperthermie beruht auf dem Prinzip der unterschiedlichen Temperaturtoleranzen von *V. destructor* und der Honigbienenbrut. Verdeckelte Brutwaben werden aus dem Bienenvolk entnommen und einer Wärmebehandlung unterzogen. Es konnte in diesem Untersuchungsjahr und auch in den letzten kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden wenn diese Methode verwendet wurde (Crailsheim et al., 2018; Oberreiter und Brodschneider, 2020) (Abbildungen 1.24 und 1.25-B). Hierbei sei aber auf die relativ geringe Anzahl der TeilnehmerInnen,

welche die Methode verwendet haben, hingewiesen.

Drohnenbrutentnahme war die im Frühjahr am häufigsten eingesetzte Methode (Abbildung 1.24-A). Hier zeigt sich für TeilnehmerInnen die diese Methode angewandt haben eine Wahrscheinlichkeit signifikant weniger Völker über den Winter zu verlieren. Wenn man nur die Drohnenbrutentnahme und alle möglichen Kombinationen betrachtet, erkennt man einen Trend für weniger Verluste wenn diese Methode im Sommer und Frühling eingesetzt wurde im Gegensatz zu nur im Sommer. Dies zeigt aber keinen statistischen Unterschied (Abbildung 1.27). Die Häufigkeit der Anwendung hatte auch keinen statistischen Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Völker über den Winter (Abbildung 1.28). Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass sich eine Drohnenbrutentnahme im Frühjahr positiv auf den Überwinterungserfolg auswirkt (Brodschneider und Crailsheim, 2013; Crailsheim et al., 2018; Oberreiter und Brodschneider, 2020). Feldexperimente in den USA, mehrmaligen Entfernen der Drohnenbrut, 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 Drohnenbrutentnahme keine alleinige Behandlungsmethode darstellt, sei an dieser Stelle auf die oftmalige Verwendung mehrerer unterschiedlicher Bekämpfungsmaßnahmen in Kombination hingewiesen. Dieser Effekt wird durch den oben angeführten signifikanten positiven Effekt im Frühjahr sichtbar. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um TeilnehmerInnen die eine Drohnenbrutentnahme im Frühjahr mit einer weiteren erfolgreichen Strategie verbunden haben.

Wurde eine „andere biotechnische Maßnahme“ (exklusive Hyperthermie und Drohnenbrutentnahme) im Sommer durchgeführt, zeigte sich eine Wahrscheinlichkeit signifikant weniger Winterverluste zu erleiden (Abbildung 1.25-C). Solche biotechnische Maßnahmen zeigten bereits in den Wintern mit hohen Verlusten positive Effekte (Crailsheim et al., 2018). Auch im letzten Jahr 2018/19 konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Oberreiter und Brodschneider, 2020). 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.

#### 1.4.9.2.2 Ameisensäure

Ameisensäure ist die meistverbreitete Behandlungsmethode in unserer Umfrage. 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).

Dieses Jahr hatten TeilnehmerInnen die im Sommer eine Langzeitbehandlung mit Ameisensäure durchgeführt haben, eine Wahrscheinlichkeit signifikant weniger Winterverluste zu erleiden

(Abbildung 1.25-E). Bei der Kurzzeitbehandlung konnte kein Unterschied festgestellt werden. Betrachtet man TeilnehmerInnen die nur eine Kurzzeitbehandlung im Sommer durchgeführt haben, erkennt man eine signifikant höhere Verlustrate als der österreichische Durchschnitt (Abbildung 1.31-L). Hier sei aber das durch die geringe Stichprobenanzahl und mögliche große Schwankungen der einzelnen Verlustraten verursachte, breite Konfidenzintervall zu beachten. Diverse Kombinationen und die alleinige Anwendung von Ameisensäure in Kurzzeitbehandlung zeigten auch in der Untersuchung von 2018/19 potentiell höhere Verlustraten (Oberreiter und Brodschneider, 2020). Ein direkter Vergleich der Verlustraten zwischen Langzeitbehandlung und Kurzzeitbehandlung bei alleiniger Anwendung zeigt keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 1.31-D,L).

#### 1.4.9.2.3 Oxalsäure

Unsere Untersuchung hat gezeigt, dass ein Großteil der teilnehmenden ImkerInnen eine Form der Oxalsäurebehandlung im Winter zur sogenannten Restentmilbung eingesetzt haben (Abbildung 1.26-B,C). Dabei kann die Oxalsäure verdampft, geträufelt, gesprüht oder als Fertigmischung (Hive-clean/Bienenwohl/Varromed) eingesetzt werden. Zwischen den Methoden geträufelt, gesprüht oder Fertigmischung hat es keinen signifikanten Unterschied gegeben und es wurde deswegen in der Auswertung als „Oxalsäure - Träufeln“ zusammengefasst (Abbildung 1.29).

Als Winterbehandlung zeigt sich für die TeilnehmerInnen, welche Oxalsäure sublimiert haben, eine Wahrscheinlichkeit signifikant weniger Winterverluste zu erfahren (Abbildung 1.26-B). Beim direkten Vergleich der Verlustraten zwischen Träufeln und Sublimieren zeigt sich aber kein statistischer Unterschied (Abbildung 1.26-B,C). Eine Studie aus England zeigt, dass Verdampfen bereits bei einer geringen Menge an Oxalsäure äußerst effektiv gegen die Varroamilbe ist und im Frühjahr zeigten diese Bienenvölker auch größere Brutnester im Gegensatz zur Oxalsäurebehandlung mittels Träufeln oder Sprühen und auch im Vergleich zur Kontrolle (keine Behandlung) (Al Toufailia et al., 2015).

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. Zusätzlich 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.

#### 1.4.9.2.4 Thymol

TeilnehmerInnen die im Sommer Thymol angewandt haben, zeigten eine Wahrscheinlichkeit für signifikant höhere Winterverluste (Abbildung 1.25-I). Hier zeigt eine nähere Betrachtung der Frequenz der Anwendung, dass ImkerInnen die nur in einem Monat eine Thymolbehandlung

durchgeführt hatten eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für Verluste als die Gruppe ohne Thymolbehandlung. Bei ImkerInnen die in mehreren Monaten Thymol eingesetzt haben ist kein statistisch signifikanter Unterschied mehr zu erkennen (Abbildung 1.30). Es sei hier angemerkt, dass es sich nicht zwangsweise um eine alleinige Behandlung mit Thymol handelt, sondern diese wahrscheinlich mit anderen Behandlungsmethoden kombiniert wurde. Die Gruppe an TeilnehmerInnen, welche ausschließlich Thymol als Behandlungsstrategie eingesetzt hat ist zu klein um eine statisch sinnvolle Analyse durchzuführen.

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). Vermutlich spielen für den erfolgreichen Einsatz von Thymol zusätzlich noch andere Faktoren eine Rolle, wie zum Beispiel verschiedene Umweltbedingungen und genetische Unterschiede.

#### 1.4.9.2.5 Kombinationen

Um einen besseren Einblick in die angewandten Behandlungsmethoden in Kombination zu geben, haben wir zusätzlich verschiedene Behandlungskonzepte in Kombination direkt verglichen (Abbildung 1.31). Durch die Aufteilung ergeben sich sehr viele unterschiedliche Gruppen wobei hier nur Kombinationen mit mindestens 15 TeilnehmerInnen 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, dh. TeilnehmerInnen könnten noch zusätzlich eine Drohnenbrutentnahme gemacht haben.

Die mit Abstand am meisten genutzte Kombination in unserer Umfrage war eine Ameisensäure-Langzeitbehandlung im Sommer gefolgt von Oxalsäure-Träufeln oder Sublimieren im Winter (Abbildung 1.31-A,B). Ein statistischer Unterschied zwischen den zwei Kombinationen konnte nicht festgestellt werden. Die selben Ergebnisse wurden auch letztes Jahr beobachtet (Oberreiter und Brodschneider, 2020).

Kombinationen mit biotechnischen Methoden (exklusive Hyperthermie und Drohnenbrutentnahme) und Oxalsäurebehandlung im Sommer, gefolgt von einer Oxalsäurebehandlung im Winter zeigten Potenzial für geringere Winterverluste (Abbildung 1.31-E,P,Q). Eine Brutunterbrechung und Oxalsäurebehandlung im Sommer zeigt in einer europaweiten Feldstudie in den Jahren 2016/17 und 2017/18 hohe Effektivität gegen die Varroamilbe (Büchler et al., 2020). Durch die geringe Anzahl an Stichproben und die verschiedenen Möglichkeiten der biotechnischen Methoden ist eine genauere Analyse hier aber nicht möglich.

Eine Anwendung einer Ameisensäure-Kurzzeitbehandlung im Sommer führte zu einer Wahrscheinlichkeit für höhere Winterverluste im Vergleich zum österreichischen Durchschnitt (Abbildung 1.31-L). Dieser negative Effekt wurde im Abschnitt 1.4.9.2.2 Ameisensäure diskutiert.

### 1.4.10 Königinnen-Verluste

Wie auch in den letzten Jahren ist die Verlustrate an Bienenvölkern über den Winter durch „unlösbare Königinnenprobleme“ unter 5% (Abbildung 1.32) und scheint stabil sowohl in Öster-

reich als auch International zwischen ca. 3-5% zu liegen (Brodschneider et al., 2019a; Gray et al., 2019, 2020; Oberreiter und Brodschneider, 2020).

#### 1.4.10.1 Königinnenprobleme

Insgesamt gaben 10,4% der TeilnehmerInnen an, dass sie „Häufiger“ Königinnenprobleme im Vorjahr beobachten konnten. Diese Gruppe hatte, im Vergleich zur Gruppe „Normal“ und „Seltener“, eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit Bienenvölker durch unlösbare Königinnenprobleme sowie auch ohne Königinnenprobleme die Völker über den Winter zu verlieren (Abbildung 1.33). Dieser Faktor hatte auch in der Umfrage 2018/19 einen negativen Einfluss (Oberreiter und Brodschneider, 2020) und auch internationale Untersuchungen kamen zum selben Schluss (van der 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“)

Etwas mehr als die Hälfte der eingewinterten Völker haben in unserer Umfrage eine junge Königin (53,1%), vergleichbare Ergebnisse konnten auch bereits im Untersuchungsjahr 2018/19 festgestellt werden mit 52,3% (Oberreiter und Brodschneider, 2020). 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).

Zudem stellten mehrere Studien fest, dass junge Königinnen, genauer das heißt im Vorjahr begattete Königinnen, einen positiven Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Völker haben (Genersch et al., 2010; van der Zee et al., 2014; Giacobino et al., 2016; Morawetz et al., 2019a). Diesen Effekt können wir dieses Jahr wieder bestätigen. Es zeigt sich eine Wahrscheinlichkeit für signifikant geringere Verlustraten (exklusive Verluste durch Königinnenprobleme) wenn der Imkereibetrieb mehr als 25% der alten Königinnen vor dem Winter ausgewechselt hat. Interessanterweise hatte es aber keinen statistischen Einfluss auf Verlustraten durch Königinnenprobleme (Abbildung 1.34). Der positive Effekt auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Bienenvölker über den Winter durch junge Königinnen konnte für Österreich und weitere Länder in 2018/19 anhand einer internationalen Studie, sowie in der österreichischen Erhebung für 2019/20 beobachtet werden (Gray et al., 2020; Oberreiter und Brodschneider, 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“.

Insgesamt haben 29 Imkereien angegeben, solche verkrüppelten Flügel während der Bienensaison 2019 „Häufig“ beobachtet zu haben. Diese Betriebe hatten auch eine signifikant höhere Verlustrate an Bienenvölkern als die Gruppen „Wenig“ und „Weiß nicht“ (Abbildung 1.35). Die gleichen Ergebnisse konnten auch in der Untersuchung 2018/19 festgestellt werden (Oberreiter und Brodschneider, 2020). Daraus kann man schlussfolgern, dass ein vermehrtes Vorkommen von Bienen mit verkrüppelten Flügeln als Alarmsignal für hohe Winterverluste betrachtet werden kann (Morawetz et al., 2019a).

### 1.4.12 Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigt sich, dass hohe Winterverluste von Bienenvölkern, wie sie 2014/15 aufgetreten sind, zumindest in einem bestimmten Ausmaß durch eine zeitgemäße Bekämpfung der Varroamilbe, wie zum Beispiel mit Hilfe biotechnischer Methoden, reduziert werden können. Im Winter 2019/20 sind die Winterverluste im Vergleich zu den letzten Jahren eher als gering zu betrachten, obwohl es signifikante Unterschiede zwischen Bundesländern gibt. Die höchsten Winterverluste wurden beispielsweise in Wien verzeichnet. Bei den Betriebsweisen zeigten sich bereits bekannte Effekte vom Vorjahr, wie geringere Verluste für Wanderimker und der negative Effekt bei Verwendung von Fremdwachs. Es zeigte sich auch wieder, dass größere Betriebe eine geringere Wahrscheinlichkeit für Winterverluste haben.

Geringe Königinnenprobleme und junge Königinnen hatten auch wieder einen positiven Einfluss auf die Winterverluste. Des Weiteren konnten epidemiologisch auch Gründe die von außen wirken für höhere Verluste identifiziert werden, beispielsweise signifikante Einflüsse der Seehöhe des Bienenstands und der von Bienen laut ImkerInnen genutzten Trachtpflanzen.

Weiterhin nicht vollständig geklärt bleibt die Frage, warum in manchen Jahren sehr viele und in anderen Jahren sehr wenige Bienenvölker den Winter nicht überleben. In Ansätzen scheinen betriebsweisenunabhängige Faktoren wie das Wetter (Switanek et al., 2017) oder, eingeschränkt, weil weniger stark schwankend, die Landnutzung (Kuchling et al., 2018) für diesen Effekt verantwortlich zu sein.

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 Verlustraten 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. Deswegen ist es wichtig diese Studien jährlich zu wiederholen um Trends zu erkennen und diese auch mit Zahlen zu belegen. Diese Trends 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 immer deutlicherer Trend ist, dass mutmaßliche „professionellere Imkereien“ eine statistisch signifikante Wahrscheinlichkeit haben weniger Völker über den Winter zu verlieren.

## 1.5 Anhang

Tabelle 1.11: 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)
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)	-	

Tabelle 1.12: 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)
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; 1445)	11,32% (5; 106)	5,60% (30; 393)	6,60% (12; 303)	-
2016/17	17,34% (67; 1632)	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; 1015)	-

Tabelle 1.13: 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)
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; 1151)	14,62%	(16; 513)	-	-	19,71%	(15; 279)
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; 1408)	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)
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)	-	-
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)

Tabelle 1.14: 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)
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)
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)
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)				

Tabelle 1.15: 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)

Tabelle 1.16: 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)	*	*
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)
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)	*
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)	

Tabelle 1.17: 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)
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)	

Tabelle 1.18: 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)

Tabelle 1.19: 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)

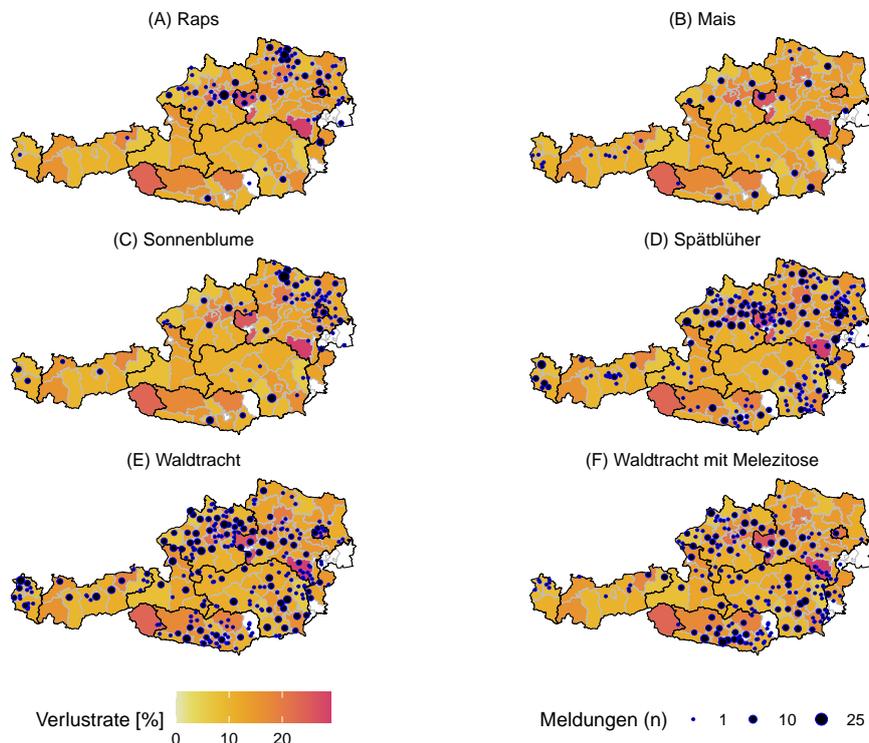


Abbildung 1.36: Die Karte zeigt die grobe Position der Hauptüberwinterungsstände der ImkerInnen mit der jeweiligen Tracht (ohne WanderimkerInnen). Hintergrundfarbe ist die mittlere Verlustrate der Bezirke, weiße Bezirke haben weniger als 5 Meldungen.

## 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).

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. Dieses stammt aus Vorläuferprojekten; meist von Bienen- und Brutproben aus abgestorbenen, kranken und zusammenbrechenden Völkern und von Völkern mit Vergiftungssymptomen (Berényi et al., 2006; Köglberger et al., 2009; Girsch und Rudolf Moosbeckhofer, 2012; Rudolf Moosbeckhofer und Mayr, 2014). 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). Die Ergebnisse der Vorprojekte erlauben somit 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 (Stephen J. Martin et al., 2012; Mordecai et al., 2016). Im vorliegenden Projekt werden bei DWV die zwei Typen A und B unterschieden (Stephen J. 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 Bienenviren 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).

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“ wird 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). Es ist geplant, dass diese über den gesamten Zeitraum an dem Projekt teilnehmen. Eventuelle Ausfälle werden im Frühsommer des jeweiligen Jahres durch Interessentinnen und Interessenten von der Warteliste ersetzt.

Das Virenmonitoring läuft in allen drei Jahren ident ab (Abbildung 2.1). Ende August werden die Materialien zur Durchführung der Probenahme von der Abteilung Bienenkunde und Bienenschutz (BIEN) an die Teilnehmerinnen und Teilnehmer verschickt. In den ersten Septemberwochen führen die Teilnehmerinnen und Teilnehmer die Probenahme gemäß der beigelegten Arbeitsanleitung durch (siehe Abschnitt 2.2.4) und verschicken die Bienen danach lebend in Königinnenversandkäfigen an die Abteilung BIEN. Sofort nach Eintreffen werden die Proben bei  $-18^{\circ}\text{C}$  tiefgekühlt und gelagert (siehe Abschnitt 2.2.5). Im weiteren Verlauf werden die Proben dann für die Virusanalytik vorbereitet.

Die Probenanalyse auf die acht zu untersuchenden Bienenviren wird 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 werden jedes Jahr voraussichtlich im auf die Probenahme folgenden Februar über die Ergebnisse der Virusanalyse informiert. Im darauffolgenden Frühling melden 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 werden für die Prüfung möglicher statistischer Zusammenhänge zwischen der Virusprävalenz / der Höhe der Virusbelastung (Virustiter) und Winterausfällen verwendet.

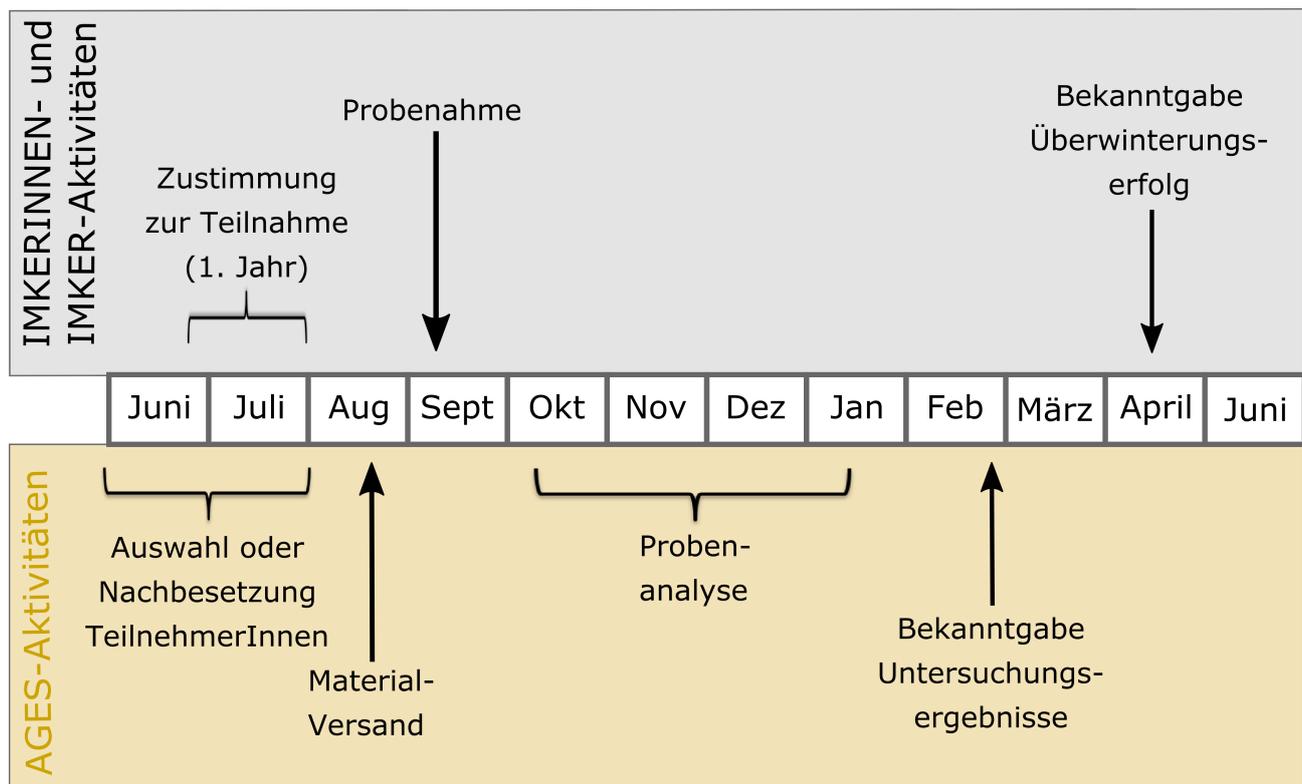


Abbildung 2.1: Schematischer Ablauf des Virenmonitorings pro Versuchsjahr.

## 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 (van der 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 des Virenmonitorings heranzuziehen. Stattdessen wurde in der Imkerschaft für die Teilnahme am „Virenmonitoring“ geworben.

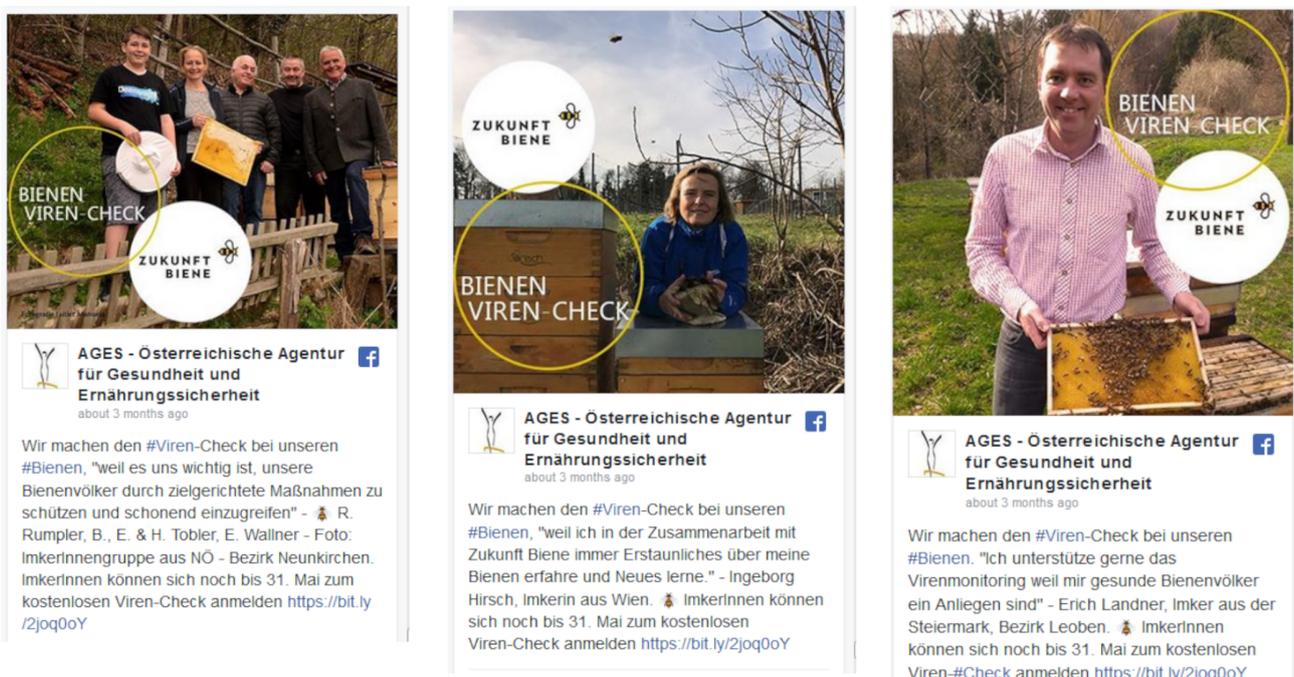


Abbildung 2.2: Beispiele der Werbung für das Virenmonitoring auf Facebook und Twitter.

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

<b>Internet</b>	
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)
<b>Bienen aktuell</b>	
März 2018	Artikel in „Bienen aktuell“
Mai 2018	Erinnerung in „Bienen aktuell“
<b>Vortrag/Werbung</b>	
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
<b>E-Mail-Aufrufe</b>	
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 Vi-

rusaufkommens 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. Um die Sensitivität des Monitorings derart zu erhöhen um Prävalenzunterschiede zwischen den Versuchsjahren von 10% erkennen zu 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.

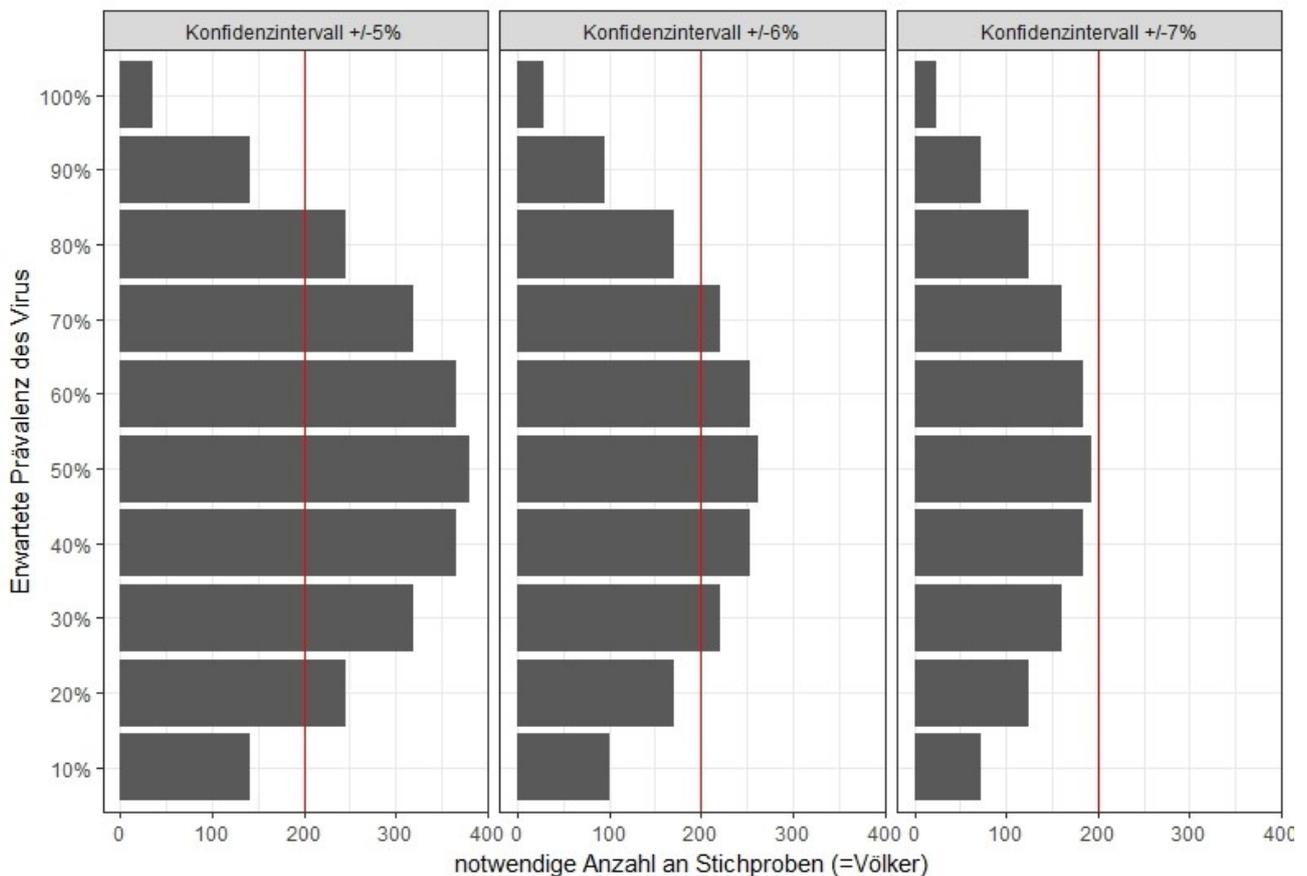


Abbildung 2.3: Berechnung der notwendigen Stichprobengröße, um bei einer binomialen Verteilung der unterschiedlichen zu erwartenden Prävalenzen ein 95% Konfidenzintervall von  $\pm 5\%$ ,  $\pm 6\%$  und  $\pm 7\%$  zu erreichen. Basis der Berechnung ist das Wilson-Konfidenzintervall, Berechnung durchgeführt 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 Bienenständen des Bundeslandes an der Gesamtanzahl der österreichischen Bienenstände entsprach (Tabelle 2.2).

Für das hier berichtete zweite Probenjahr 2019 wurden insgesamt fünf Imkerinnen und Imker nachbesetzt, die während und nach dem ersten Probenjahr aus der Studie ausgeschieden sind. 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 (Interessenten), der teilnehmenden Bienenstände und erhaltenen Proben im Monitoringjahr 2019. Für die Berechnungen anhand der VIS-Daten wurde nur auf Bienenstände zurückgegriffen, die mit mindestens einem Volk im VIS registriert waren.

Bundesländer	Bienenst. Österreich Prozent	Interessenten Anzahl	Bienenst. 2019 Anzahl (Prozent)	Proben 2019 Anzahl (Prozent)
Burgenland	3%	13	6 (3,0%)	6 (3,1%)
Kärnten	12%	38	23 (11,5%)	22 (11,4%)
NÖ	20%	64	39 (19,5%)	35 (18,1%)
OÖ	22%	60	43 (21,5%)	42 (21,8%)
Salzburg	7%	21	14 (7,0%)	14 (7,3%)
Steiermark	18%	37	37 (18,5%)	35 (18,1%)
Tirol	10%	30	20 (10,0%)	20 (10,4%)
Vorarlberg	6%	16	11 (5,5%)	10 (5,2%)
Wien	3%	18	7 (3,5%)	9 (4,7%)
Gesamt	100%	297	200 (100%)	193 (100%)

## 2.2.4 Durchführung der Probenahme

Die Probenahme wird jeweils im September der drei Versuchsjahre von den Imkerinnen und Imkern selbst durchgeführt (Abbildung 2.4). Dafür werden 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, wird es durch ein anderes Volk des Bienenstandes ersetzt.

Die Bienenproben werden aus jener Zarge entnommen, in der sich die Brut befindet, oder aus der Zarge des Bienensitzes, falls keine Brut vorhanden ist. Sie wird auf jener brutfreien Wabe genommen, die an die äußerste Brutwabe anschließt (Abbildung 2.4a). Falls keine Brut vorhanden ist, wird die Probe von einer äußeren Wabe des Bienensitzes genommen. Pro Probenvolk wird ein Königinnenversandkäfig mit zehn Bienen gefüllt (Abbildung 2.4b). Als optionale Zusatzaufgabe bitten 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 sind 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 werden gemeinsam mit dem ausgefüllten Fragebogen in das vorfrankierte Rücksende-Kuvert gegeben (Abbildung 2.4c). Das Kuvert ist entsprechend dem PRIO-Tarif der österreichischen Post für Päckchen frankiert, der einen raschen Versand mit Zustellung am nächsten Tag verspricht. Das Kuvert wird noch am selben oder am nächsten Tag bei der Post aufgegeben. Wir ersuchen 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 werden diese auf  $-18^{\circ}\text{C}$  gekühlt und die Bienen somit schnell abgetötet.

Zusätzlich werden die Teilnehmerinnen und Teilnehmer ersucht den beigelegten Fragebogen aus zehn Fragen zu beantworten (Abschnitt 2.5.2). Dieser enthält allgemeine Fragen zu Imkerbetrieb und Bienenstand, sowie Fragen zu Hygienemaßnahmen und Volksgesundheit. Zusätzlich wird

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 (Ambion) dazupipettiert (3 mL pro 10 Bienen). Eventuell vorhandene Drohnen wurden aussortiert. Im Jahr 2019 waren bei 39 Proben zu wenige Arbeiterinnen in den Käfigen (durchschnittliche Anzahl Bienen:  $49,5 \pm 1,4$  Standardabweichung; minimale Anzahl Bienen: 39). Dies wurde vermerkt und die Menge an DEPC-Wasser angepasst. Vier Einsendungen enthielten vier anstatt fünf Käfige; 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, leere 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 (Brodschneider et al., 2016, 2018c, 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 ausgeschickt. In Ausnahmefällen erfolgte die Abfrage per Telefon.

## 2.2.7 Virusanalytik

Die Bienenproben wurden an der AGES, Abteilung für Molekularbiologie (MOBI), des Instituts 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.

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

### 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).

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 (Blanchard et al., 2008) ca. 100 µL	IAPV
856-6 (2018)	IT- IAPV- cDNA	cDNA aus Isolat 57-2 (Blanchard et al., 2008) ca. 40 µL	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 (Siede et al., 2005) aus Deutschland, ca. 100 µL	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> DH5 $\alpha$ <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<sup>TM</sup> Universal Isolation Kit mit dem Protokoll „RNA purification from total blood & serum“ auf dem KingFisher<sup>TM</sup> 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<sup>®</sup> 96 Virus Core Kit (Macherey-Nagel) auf der Freedom EVO<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 96 Virus Core Kit erfolgte die Extraktion aus 100 µL Homogenat und die Elution in 100 µL 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 Bienen-virus 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 Probendurchsatz, 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- $\beta$ -actin-F und Apis- $\beta$ -actin-R (je 400 nmol), sowie die Sonde Apis- $\beta$ -actin-Sonde (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/10 s 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<sub>10</sub> (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™ 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™ Flex wurden alle vier Proben mit einer Abweichung von unter einer log<sub>10</sub> 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 (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 (TM) 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 193 Projektproben wurden während der Homogenisierung der Proben in der Abteilung BIEN elf Wasserproben als Prozesskontrollen 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™ Universal Isolation Kit auf dem KingFisher™ 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. 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  $LOD_{PCR}/LOQ_{PCR}$  von 100 Kopien/Reaktion ( $=1,6 \times 10^4$  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 folgenden Auswertungen wurden mit dem Statistikprogramm R Version 3.5.2. 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 zwischen den verschiedenen Gruppen (Bundesländer, Seehöhe, etc.) wurde mittels  $\chi^2$ -Test getestet. Diese Berechnung des

Konfidenzintervalls unterscheidet sich von der Berechnungsmethode im ersten Zwischenbericht, in dem ein General Linear Model mit einer quasibinomialen Verteilung berechnet wurde (van der Zee et al., 2013). Das früher verwendete Modell hatte Probleme, wenn eine sogenannte „total separation“ auftrat, also wenn entweder alle Fälle positiv oder negativ waren. Bei derart verteilten Daten konnte kein aussagekräftiges Konfidenzintervall berechnet werden. Da eine „total separation“ in unserem Datensatz häufig auftritt, wurde die Berechnungsmethode geändert.

Zur Auswertung möglicher Zusammenhänge zwischen den genannten Faktoren und dem Virustiter wurden die nicht-parametrischen statistischen Methoden Wilcoxon-Mann-Whitney-Test und Kruskal-Wallis-Test angewandt. Aufgrund der fehlenden Normalverteilung in der Variable Virustiter wurden diese 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.

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

### 2.2.8.2 Einflussfaktoren auf die Winterverluste

Ziel war es, die Winterverluste an den Bienenständen anhand verschiedener Einflussgrößen vorherzusagen. Um das ideale Verfahren für die Datenlage auszuwählen, wurden vier verschiedene statistische Verfahren getestet und in ihrer Eignung miteinander verglichen. Die Prinzipien der einzelnen Verfahren werden in der Folge kurz erläutert.

Für alle statistischen Verfahren wurde der selbe Datensatz mit den Daten aus den Versuchsjahren 2018 und 2019 verwendet (2018: n=198; 2019: n=192; für 2019 fehlte eine Rückmeldung zu den Winterverlusten). 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: 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. Sämtliche Auswertungen wurden mit dem Statistikprogramm R Version 4.0.2 (R Core Team, 2020) durchgeführt.

### *Logistische Regression*

Es wurde eine logistische Regression mit quasibinomiale Verteilung verwendet. Die logistische Regression 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. Im vorliegenden Fall ist die Wintersterblichkeitsrate der Outcome und die gemessenen Virustiter sowie die anderen im vorigen Abschnitt erwähnten Prädiktoren die Features.

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 (Brodschneider 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).

Für die Berechnung des Regression Trees wurde das package „rpart“ verwendet (Therneau und Atkinson, 2019). Für die grafische Darstellung des Regression Trees wurde das package „rpart.plot“ verwendet (Milborrow, 2020).

### *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 des 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).

### *Stacking*

Das Stacking Verfahren gehört wie auch der Random Forest zu den Ensemble Methoden. Stacking kann jedoch beliebige Modelle, sowohl klassische statistische Modelle als auch Modelle aus dem Bereich des maschinellen Lernens, miteinander kombinieren. Dazu wird ein sogenannter Meta-Learner benutzt, ein Algorithmus, der die optimale Kombination der Modelle finden soll, um so die Vorhersage zu verbessern (Breiman, 1996). Im Rahmen der vorliegenden Analyse wurde ein Random Forest-Modell mit einer logistischen Regression gestackt. Es wurde sowohl ein Modell mit dem Meta-Learner nach Breiman als auch dem Meta-Learner Ridge Regression with positivity constraints berechnet. Für die Erstellung der Stacking Modelle wurden die packages „penalized“ und „quadprog“ verwendet (Goeman, 2010; Turlach und Weingessel, 2019).

### *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 Projektfortschritt

#### 2.3.1.1 Kontakt mit den ProjektteilnehmerInnen

##### *Probenahme 2019*

Im Jahr 2019 schickten 193 teilnehmende Imkerinnen und Imker ihre Proben ein (97% der 200 ausgeschickten Probensets, Tabelle 2.2). Die Gründe der Ausfälle waren unterschiedlich: Krankheitsfälle (2 ImkerInnen), unerwartet auftretende Bienengiftallergie (1 ImkerIn), keine Bienen mehr (1 ImkerIn) und unerklärtes Ausbleiben der Proben (3 ImkerInnen). Wie in 2018 kam es zu einer geringfügigen Verschiebung der Anteile der Bundesländer, da einige Imkerinnen und Imker einen Bienenstand in einem anderen Bundesland als dem ursprünglich angegebenen Bundesland gewählt hatten (Tabelle 2.2: Vergleich „Anzahl ausgewählter Bienenstände“, „Anzahl erhaltener Proben“).

Die Proben wurden zwischen 28. August 2019 und 13. Oktober 2019 genommen, wobei 165 der TeilnehmerInnen (85%) die Proben im anvisierten Zeitfenster zwischen 31. August und 15. September 2019 genommen haben. Weitere 25 Proben trafen in den restlichen zwei Septemberwochen ein und zwei Proben im Oktober 2019.

Vier der ImkerInnen haben nur von vier Völkern - statt wie geplant von fünf Völkern - Proben eingeschickt. Dies lag daran, dass alle genau fünf Völker an dem Probenahme-Bienenstand aufgestellt hatten und eines dieser Völker kurz vor der Probenahme abgestorben war. Wir haben entschieden, diese vier Proben in die Analyse aufzunehmen, um die Messreihe der drei Jahre nicht zu unterbrechen.

Die Fragebögen wurden 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 von 161 der Imkerinnen und Imker vollständig durchgeführt (83,4% von 193). Weitere 10 ImkerInnen gaben zu einem Teil der Symptome Beobachtungen an. 22 ImkerInnen führten zum Probenahmezeitpunkt keine Völkerdurchsicht auf die ausgewählten Krankheitssymptome durch.

##### *Mitteilung der Ergebnisse der Probenahme 2019*

Die teilnehmenden ImkerInnen erhielten Anfang März 2019 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 fünf ImkerInnen, die im Jahr 2019 das erste Mal an der Probenahme teilgenommen haben, wurde das Informationsdokument vom Vorjahr mit Basiswissen zu den untersuchten Bienenviren zugeschickt (Abschnitt 2.5.4).

#### *Abfrage Winterverluste 2019/20*

Die Umfrage zu den Winterverlusten 2019/20 wurde allen 193 ImkerInnen, die im September 2019 Proben eingeschickt hatten, Anfang April 2020 per E-Mail-Link oder Brief zugeschickt. ImkerInnen, die noch keine Winterverluste gemeldet hatten, wurden im Monats-Rhythmus per E-Mail oder Telefon daran erinnert, uns die Daten zukommen zu lassen. Mit 13. Juli 2020 hatten 192 TeilnehmerInnen ihre Überwinterungsergebnisse gemeldet. Ein Imker/einer Imkerin hat keine Daten zu den Winterverlusten geliefert. Da diese Person nicht mehr per Telefon oder E-Mail erreichbar war, wurde sie aus dem Projekt ausgeschieden.

### 2.3.1.2 Datenauswertung

Für das Monitoringjahr 2019 wurden die Virusprävalenz und die Virustiter der acht gemessenen Bienenviren für Gesamtösterreich und die neun Bundesländer ausgewertet. Zusätzlich wurden Korrelation zwischen Virusauftreten und Seehöhe bzw. Virussympomatik erstellt. Der Zusammenhang zwischen den Winterverlusten der Probenvölker und den Virustitern sowie acht weiteren Risikofaktoren wurde berechnet.

### 2.3.2 Kennwerte der teilnehmenden Imkereibetriebe

Die Betriebsgröße der im Jahr 2019 teilnehmenden Imkereibetriebe bewegte sich zwischen fünf und 350 Völkern pro Betrieb. Im Mittel besaß ein teilnehmender Betrieb 38,1 Völker (Standardabweichung:  $\pm 50,2$  Völker). Die Stichprobe bestand aus 84 Betrieben mit bis zu 20 Völkern, 79 Betrieben mit 21 bis 50 Völkern und 30 Betrieben mit über 50 Völkern (43,5%; 40,9% und 15,6% der 193 teilnehmenden Betriebe).

Die im Jahr 2019 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 16,6 Jahre Imkereierfahrung (Standardabweichung:  $\pm 15,1$  Jahre). Der Anteil der ImkerInnen mit wenigen Erfahrungsjahren überwog: 54,4% der ImkerInnen hatten bis zu 10 Erfahrungsjahre (105 von 193 TeilnehmerInnen), weitere 26,9% zwischen 11 und 30 Jahre (52 von 193) und die restlichen 18,7% der TeilnehmerInnen imkerten schon über 30 Jahre (36 von 193).

Die TeilnehmerInnen der Probenahme 2019 betrieben zu 71,5% konventionelle Imkerei (138 Betriebe) und zu 24,9% imkerten sie mit einem Bio-Zertifikat (48 Betriebe). 3,6% der konventionellen Betriebe wurden unter „in Umstellung“ geführt (7 Betriebe), da sie angaben in Umstellung zum Biobetrieb zu sein. Sie könnten daher eventuell im nächsten Jahr in die Gruppe der bio-zertifizierten Betriebe eingereiht werden.

## 2.3.3 Ergebnisse Virusdiagnostik

### 2.3.3.1 Prozesskontrollen

Im Zuge der Probenaufarbeitung wurden elf Wasserproben als Prozesskontrollen mitgeführt. Alle Prozesskontrollen waren 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 (n=14) wurden je nach Virus geringe Anteile an positiven Virusnachweisen beobachtet. Diese betrafen bei ABPV 14% und bei DWV-B 7% der Negativextraktionskontrollen. In allen Fällen blieben diese Nachweise in einem sehr niedrigen Konzentrationsbereich, unterhalb des  $LOQ_{PCR}$ . Die anderen getesteten Viren (BQCV, CBPV, DWV-A, SBV, 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 193 Projektproben eindeutig mit Ct-Werten von 16 bis 24 nachweisbar, was auf eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion und die Abwesenheit nennenswerter Anteile an inhibitorischen Substanzen in den Nukleinsäureextrakten hinweist.

## 2.3.4 Virusprävalenz und Viruskonzentration

Im September 2019 wurden sechs der acht untersuchten Viren in den 193 untersuchten Proben gefunden (Abbildung 2.5). IAPV und KBV wurden in keiner Probe gefunden. Drei Viren traten in über 80% der Proben auf (BQCV, DWV-B, SBV) und waren damit sehr häufig. Die anderen

drei Viren traten in weniger als einem Drittel der Proben auf und waren damit eher selten (ABPV, CBPV, DWV-A).

BQCV war am häufigsten und trat mit einer Prävalenz von 99,0% (95% CI: 96,3-99,7%) auf (Abbildung 2.5). DWV-B hatte mit 88,6% (95% CI: 83,3-92,4%) das zweithöchste und SBV mit 80,8% (95% CI: 74,7-85,8%) das dritthöchste Auftreten. ABPV kam mit einer Prävalenz von 33,7% (95% CI: 27,4-40,6%) deutlich seltener vor. CBPV hatte eine Prävalenz von 7,3% (95% CI: 4,4-11,8%). DWV-A kam in nur einer von 193 Proben vor und hatte daher eine Prävalenz von 0,5% (95% CI: 0,1-2,9%). Die beiden nicht nachgewiesenen Viren KBV und IAPV hatten die idente Prävalenz von 0,0% (95% CI: 0,0-2,0%).

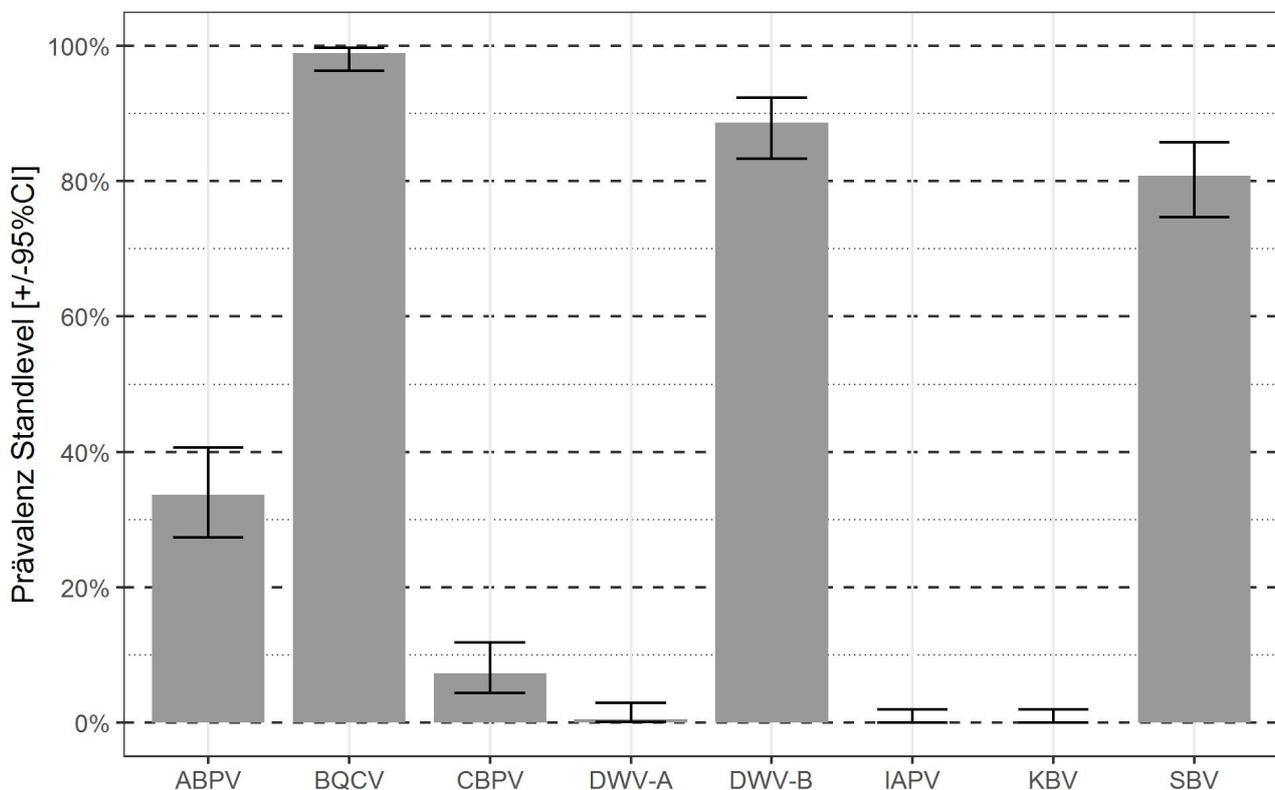


Abbildung 2.5: Prävalenz der acht untersuchten Viren in Bienenproben vom Herbst 2019 ( $\pm 95\%CI$ ). Stichprobenumfang: 193 Proben.

In 99% der untersuchten Proben wurde zumindest ein Virus gefunden (191 von 193 Proben). Die maximale Anzahl an gemessenen Viren pro Probe waren fünf (2% der Proben). In den meisten Proben wurden entweder drei Viren (49% der Proben) oder vier Viren (30%) nachgewiesen. In 17% der Proben wurden zwei Viren nachgewiesen, sehr selten nur ein einziger Virus (2% der Proben). Im Mittel wurden 3,1 Viren (Standardabweichung:  $\pm 0,85$  SD) 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  $10^{11}$  RNA-Kopien/mL Homogenat (Tabelle 2.6, Abbildung 2.5). Anders ausgedrückt, wurden in den Proben zwischen Zehntausenden und Hundert Millionen RNA-Kopien/mL Homogenat gemessen. Die drei Viren ABPV, BQCV und SBV hatten die geringsten Titer (Median unter  $10^6$ ). Bei diesen drei Virusarten wurden jedoch auch Werte von über  $10^9$  RNA-Kopien/mL Homogenat gemessen. Bei CBPV lag der Median um eine Zehnerpotenz höher bei  $8,8 \times 10^6$  RNA-Kopien/mL Homogenat. Der mediane Virustiter von DWV-B lag bei etwa  $10^8$  RNA-Kopien/mL Homogenat und war mit Abstand am höchsten. Entsprechend hatten auch etwa 25% der positiven Proben von CBPV und DWV-B einen Virustiter über  $10^9$  RNA-Kopien/mL Homogenat. Die statistischen Angaben zum Virus DWV-A sind aufgrund der geringen Stichprobenanzahl von nur einer positiven Proben nicht aussagekräftig.

Tabelle 2.6: Virustiter der sechs in den 193 untersuchten Proben nachgewiesenen Viren im Herbst 2019. Anzahl = Anzahl positiver Proben.

Virus	Anzahl	Median	unteres Quartil	oberes Quartil	Minimum	Maximum
ABPV	65	$4,46 \times 10^5$	$3,43 \times 10^4$	$2,24 \times 10^8$	$1,63 \times 10^4$	$2,73 \times 10^{10}$
BQCV	191	$6,30 \times 10^5$	$2,72 \times 10^5$	$2,23 \times 10^6$	$1,80 \times 10^4$	$3,09 \times 10^9$
CBPV	14	$8,81 \times 10^6$	$1,40 \times 10^5$	$9,27 \times 10^8$	$2,46 \times 10^4$	$2,56 \times 10^{10}$
DWV-A	1	$3,30 \times 10^7$				
DWV-B	171	$1,03 \times 10^8$	$4,76 \times 10^6$	$5,81 \times 10^8$	$1,76 \times 10^4$	$2,18 \times 10^{10}$
SBV	156	$4,19 \times 10^5$	$7,34 \times 10^4$	$3,58 \times 10^7$	$1,61 \times 10^4$	$2,54 \times 10^{10}$

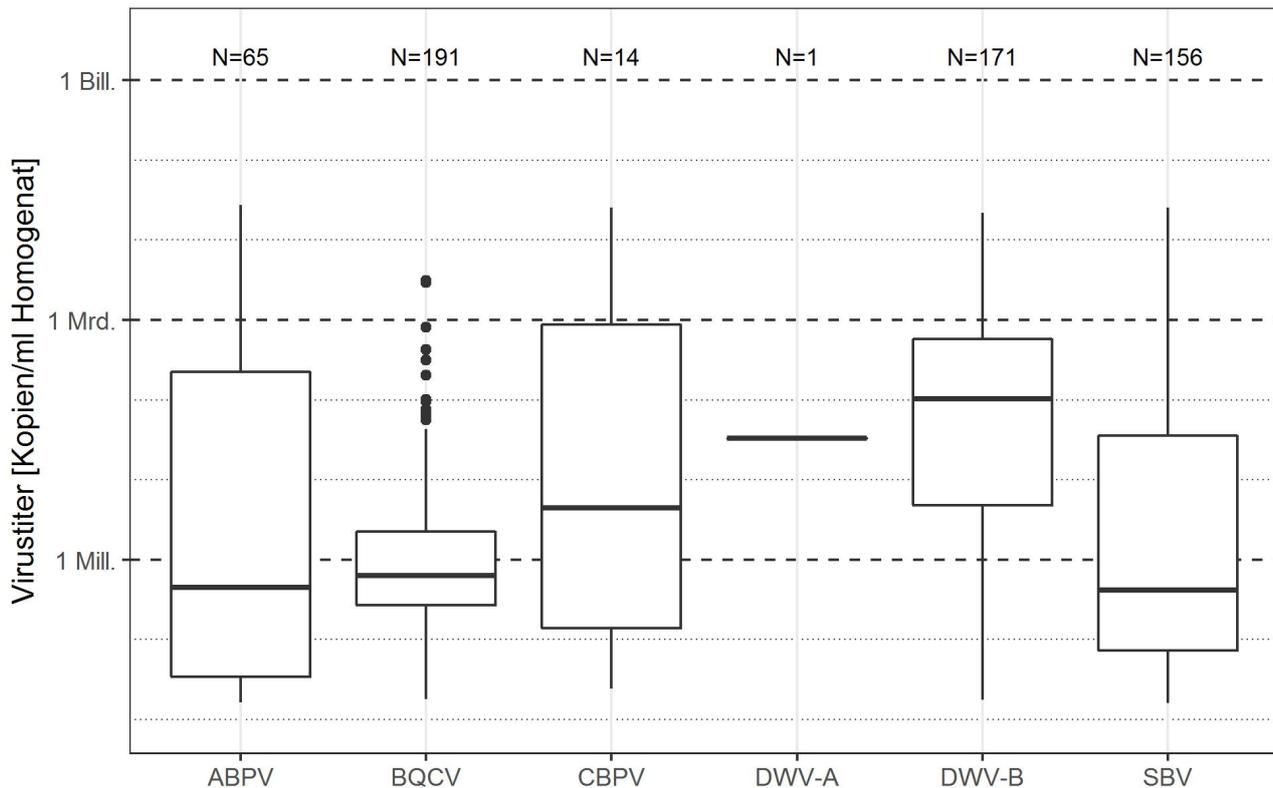


Abbildung 2.6: Virustiter der sechs nachgewiesenen Viren im Herbst 2019. Es sind nur die Werte der positiven Proben gezeigt (N= Anzahl der positiven Proben). „Mill.“ Million (=10<sup>6</sup>); „Mrd.“ Milliarde (=10<sup>9</sup>), „Bill.“ Billion (=10<sup>12</sup>). Darstellung als Boxplot Diagramm: dicker Mittelstrich: Median; untere/obere Grenze der Box: unteres/oberes Quartil; Antennen: maximal 1,5-facher Interquartilsabstand.

## 2.3.5 Geographische Varianz in der Virusprävalenz und Viruskonzentration

### 2.3.5.1 Bundesländer

Die Virusprävalenz von drei der gefundenen Viren unterschied sich signifikant zwischen den einzelnen Bundesländern (ABPV, DWV-B, SBV; Abbildung 2.7 und Tabelle 2.7). Für BQCV und CBPV wurde kein Zusammenhang zwischen Virusprävalenz und Bundesland gemessen. DWV-A wurde aufgrund der geringen Stichprobe von einem positiven Wert nicht statistisch ausgewertet. Bei ABPV und DWV-B variierte auch der Virustiter der positiven Proben zwischen den Bundesländern (Abbildung 2.8).

Die Virusprävalenz und der Virustiter von ABPV unterschieden sich signifikant zwischen den neun Bundesländern (Prävalenz:  $\chi^2=21,91$ ;  $df=8$ ;  $P=0,005$ ; Titer:  $H=15,81$ ;  $df=7$ ;  $P=0,027$ ). ABPV ist in Wien mit 66,7% (95% CI: 35,4-87,9%) am häufigsten aufgetreten. Der höchste Virustiter wurde im Burgenland gemessen mit einem Median von  $7,53 \times 10^8$  RNA-Kopien/mL Homogenat (Q1-Q3:

$3,77 \times 10^8$ - $1,05 \times 10^9$  RNA-Kopien/mL Homogenat) gemessen. Die minimale Prävalenz wurde in Tirol gemessen, hier betrug die Prävalenz 0,0% (95% CI: 0,0-16,1%). Der geringste Virustiter wurde in Salzburg gemessen und betrug im Median  $2,34 \times 10^4$  RNA-Kopien/mL Homogenat (Q1-Q3:  $2,25 \times 10^4$ - $5,60 \times 10^4$  RNA-Kopien/mL Homogenat).

Weder Prävalenz noch Titer von BQCV unterschieden sich zwischen den neun Bundesländern (Prävalenz:  $\chi^2=5,64$ ; df=8; P=0,687; Titer: H=11,26; df=8; P=0,187). In sieben Bundesländern waren alle Proben positiv auf BQCV (Prävalenz 100%). Nur in Niederösterreich und Tirol waren einige der Proben negativ.

Die Prävalenz von CBPV unterschied sich nicht signifikant zwischen den Bundesländern (Prävalenz:  $\chi^2=9,67$ ; df=8; P=0,289). Die maximale Prävalenz wurde in Vorarlberg mit 20,0% (95% CI: 5,7-51,0%) gemessen. Am geringsten war die Prävalenz im Burgenland und Niederösterreich. In beiden Bundesländern wurden keine positiven Proben gefunden (Prävalenz Bgl. 0,0% (95% CI: 0,0-39,0%); Prävalenz NÖ.: 0,0% (95% CI: 0,0-9,9%)). Aufgrund der geringen positiven Probenanzahl in den einzelnen Bundesländern wurde keine Auswertung des Virustiters durchgeführt (siehe Stichprobenzahlen in Abbildung 2.7).

DWV-A wurde aufgrund der geringen Stichprobe von einem positiven Wert nicht statistisch ausgewertet.

Bei DWV-B unterschieden sich Prävalenz und Virustiter signifikant zwischen den Bundesländern (Prävalenz:  $\chi^2=25,79$ ; df=8; P=0,001; Titer: H=18,48; df=8; P=0,018). Die höchste Prävalenz wurde im Burgenland und in Wien mit 100% erreicht (Burgenland: 100,0% (95% CI: 61,0-100,0%); Wien: 100,0% (95% CI: 70,1-100,0%)). Die geringste Prävalenz wurde in Salzburg mit 64,3% (95% CI: 38,8-83,7%) gemessen. In Wien wurde der höchste mediane Virustiter gemessen ( $1,57 \times 10^9$  RNA-Kopien/mL Homogenat; Q1-Q3:  $5,51 \times 10^7$ - $2,68 \times 10^9$  RNA-Kopien/mL Homogenat). Der geringste mediane Titer wurde in Tirol gemessen und betrug  $4,86 \times 10^6$  RNA-Kopien/mL Homogenat (Q1-Q3:  $1,05 \times 10^5$ - $8,61 \times 10^7$  RNA-Kopien/mL Homogenat).

Die Prävalenz von SBV unterschied sich signifikant zwischen den neun Bundesländern ( $\chi^2=31,48$ ; df=8; P<0,001). Burgenland und Vorarlberg wiesen die höchste Prävalenz auf; alle Proben aus diesen beiden Bundesländern waren positiv auf SBV (Burgenland: 100,0% (95% CI: 61,0-100,0%); Vorarlberg: 100,0% (95% CI: 72,2-100,0%)). Die geringste Prävalenz hatten die Proben aus Kärnten mit einer Prävalenz von 40,9% (95% CI: 23,3-61,3%). Der Virustiter unterschied sich nicht signifikant zwischen den Proben aus den unterschiedlichen Bundesländern (H=8,57; df=8; P=0,380).

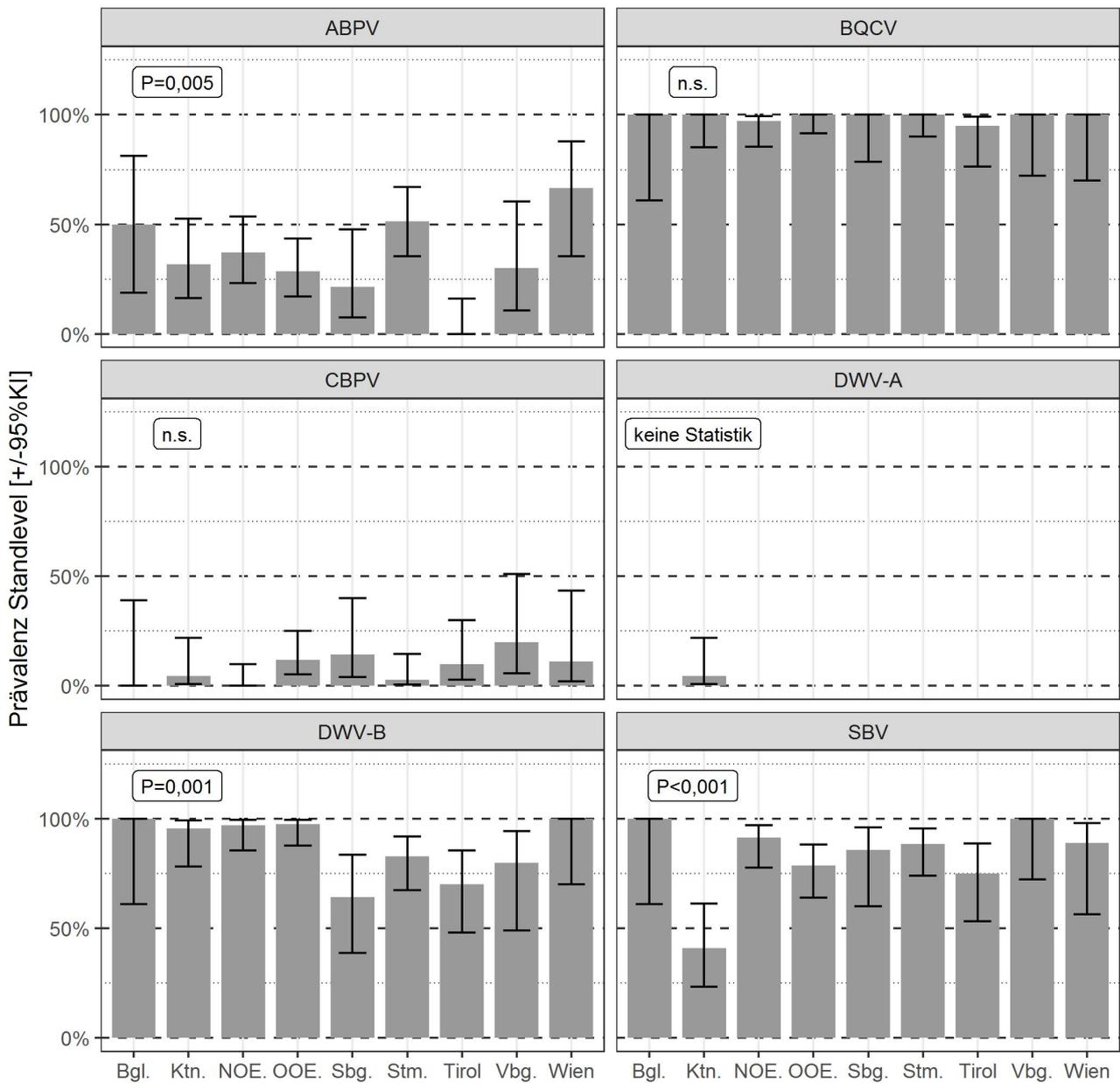


Abbildung 2.7: Virusprävalenz in den neun Bundesländern ( $\pm 95\%$ CI). Anzahl Stände pro Bundesland: Bgl. N=6; Ktn. N=22; NÖ. N=35; OÖ. N=42; Sbg. N=14; Stm. N=35; Tirol N=20; Vbg. N=10; Wien N=9.

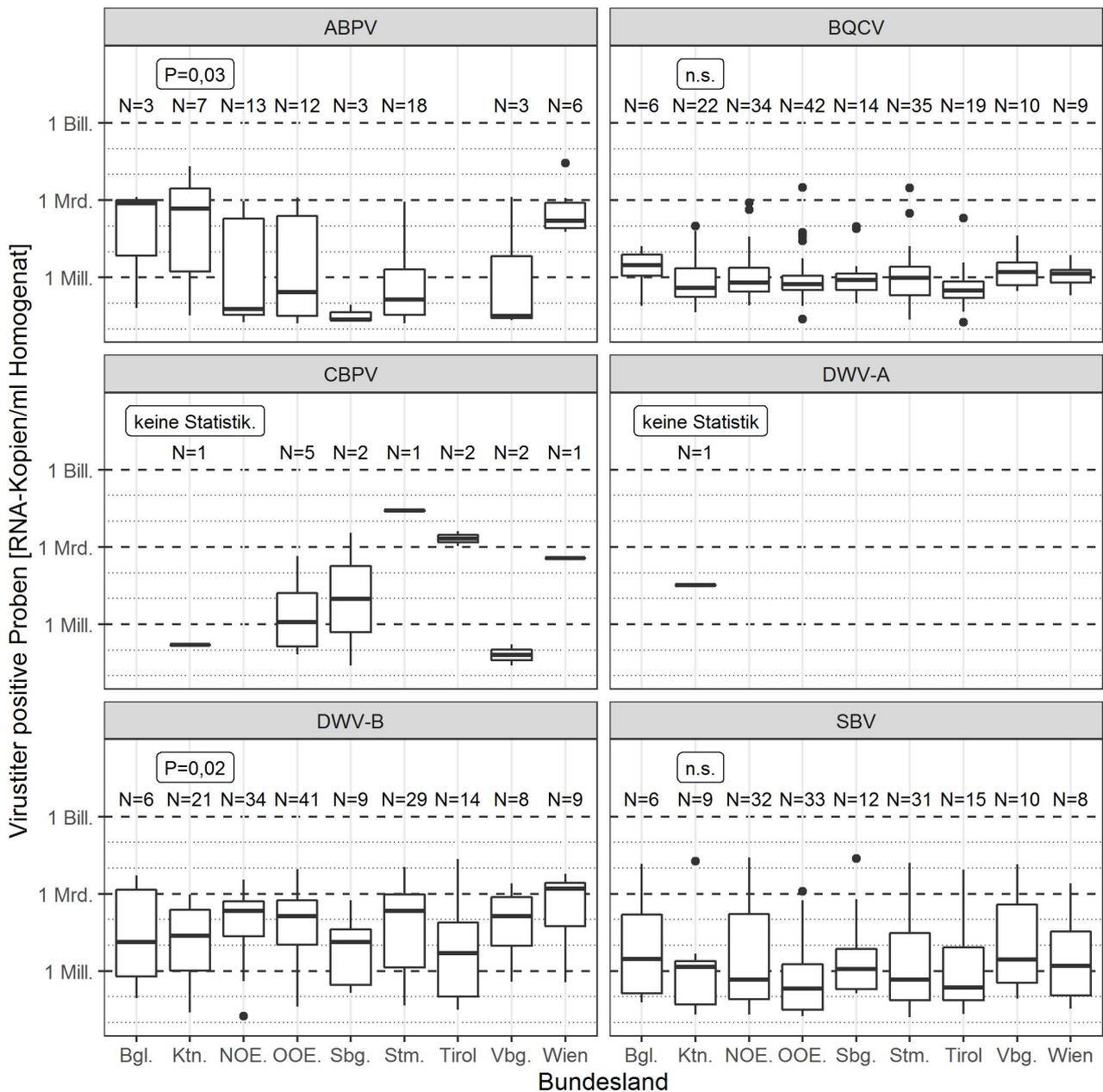


Abbildung 2.8: Virustiter der sechs nachgewiesenen Viren in den positiven Proben in den neun Bundesländern (N=Anzahl der positiven Proben). „Mill.“ Million (=10<sup>6</sup>); „Mrd.“ Milliarde (=10<sup>9</sup>), „Bill.“ Billion (=10<sup>12</sup>). Statistik in der Grafik: Kruskal-Wallis-Test. Darstellung als Boxplot Diagramm: dicker Mittelstrich: Median; untere/obere Grenze der Box: unteres/oberes Quartil; Antennen: maximal 1,5-facher Interquartilsabstand.

Tabelle 2.7: Vergleich der Virusprävalenz [%] ( $\pm 95\%$  Konfidenzintervall) von den sechs nachgewiesenen Viren zwischen den Bundesländern und für Österreich (AUT) gesamt, im September 2019.

Bundesland	ABPV		BQCV		CBPV	
<b>AUT</b>	<b>33,7</b>	<b>(27,4-40,6)</b>	<b>99,0</b>	<b>(96,3-99,7)</b>	<b>7,3</b>	<b>(4,4-11,8)</b>
Bgl.	50,0	(18,8-81,2)	100,0	(61,0-100,0)	0,0	(0,0-39,0)
Ktn.	31,8	(16,4-52,7)	100,0	(85,1-100,0)	4,5	(0,8-21,8)
NÖ.	37,1	(23,2-53,7)	97,1	(85,5-99,5)	0,0	(0,0-9,9)
OÖ.	28,6	(17,2-43,6)	100,0	(91,6-100,0)	11,9	(5,2-25,0)
Sbg.	21,4	(7,6-47,6)	100,0	(78,5-100,0)	14,3	(4,0-39,9)
Stm.	51,4	(35,6-67,0)	100,0	(90,1-100,0)	2,9	(0,5-14,5)
Tirol	0,0	(0,0-16,1)	95,0	(76,4-99,1)	10,0	(2,8-30,1)
Vbg.	30	(10,8-60,3)	100,0	(72,2-100,0)	20,0	(5,7-51,0)
Wien	66,7	(35,4-87,9)	100,0	(70,1-100,0)	11,1	(2,0-43,5)

Bundesland	DWV-A		DWV-B		SBV	
<b>AUT</b>	<b>0,5</b>	<b>(0,1-2,9)</b>	<b>88,6</b>	<b>(83,3-92,4)</b>	<b>80,8</b>	<b>(74,7-85,8)</b>
Bgl.	0,0		100,0	(61,0-100,0)	100,0	(61,0-100,0)
Ktn.	4,5	(0,8-21,8)	95,5	(78,2-99,2)	40,9	(23,3-61,3)
NÖ.	0,0		97,1	(85,5-99,5)	91,4	(77,6-97,0)
OÖ.	0,0		97,6	(87,7-99,6)	78,6	(64,1-88,3)
Sbg.	0,0		64,3	(38,8-83,7)	85,7	(60,1-96,0)
Stm.	0,0		82,9	(67,3-91,9)	88,6	(74,0-95,5)
Tirol	0,0		70,0	(48,1-85,5)	75,0	(53,1-88,8)
Vbg.	0,0		80,0	(49,0-94,3)	100,0	(72,2-100,0)
Wien	0,0		100,0	(70,1-100,0)	88,9	(56,5-98,0)

### 2.3.5.2 Seehöhe

Aufgrund der orographischen Gegebenheiten in Österreich weisen die Bienenstände signifikante Unterschiede in der Seehöhe zwischen den unterschiedlichen Bundesländern auf ( $H=92,05$ ;  $df=8$ ;  $P<0,001$ ; Abbildung 2.9). Die beschriebenen Unterschiede im Virenaufreten zwischen den Bundesländern könnten auch mit den Unterschieden in der Seehöhe zusammenhängen. Daher wurde diese als zusätzlicher Faktor ausgewertet.

Bei drei der sechs gemessenen Bienen-viren war ein Zusammenhang zwischen der Prävalenz des Virus und der Seehöhe des entsprechenden Bienenstandes nachweisbar (ABPV, DWV-B, SBV; Tabelle 2.8 und 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 Stichprobe nicht ausgewertet. Bei DWV-B war zusätzlich ein Zusammenhang zwischen der Höhe des Virustiters und der Seehöhe des Bienenstandes nachweisbar (Abbildung 2.11).

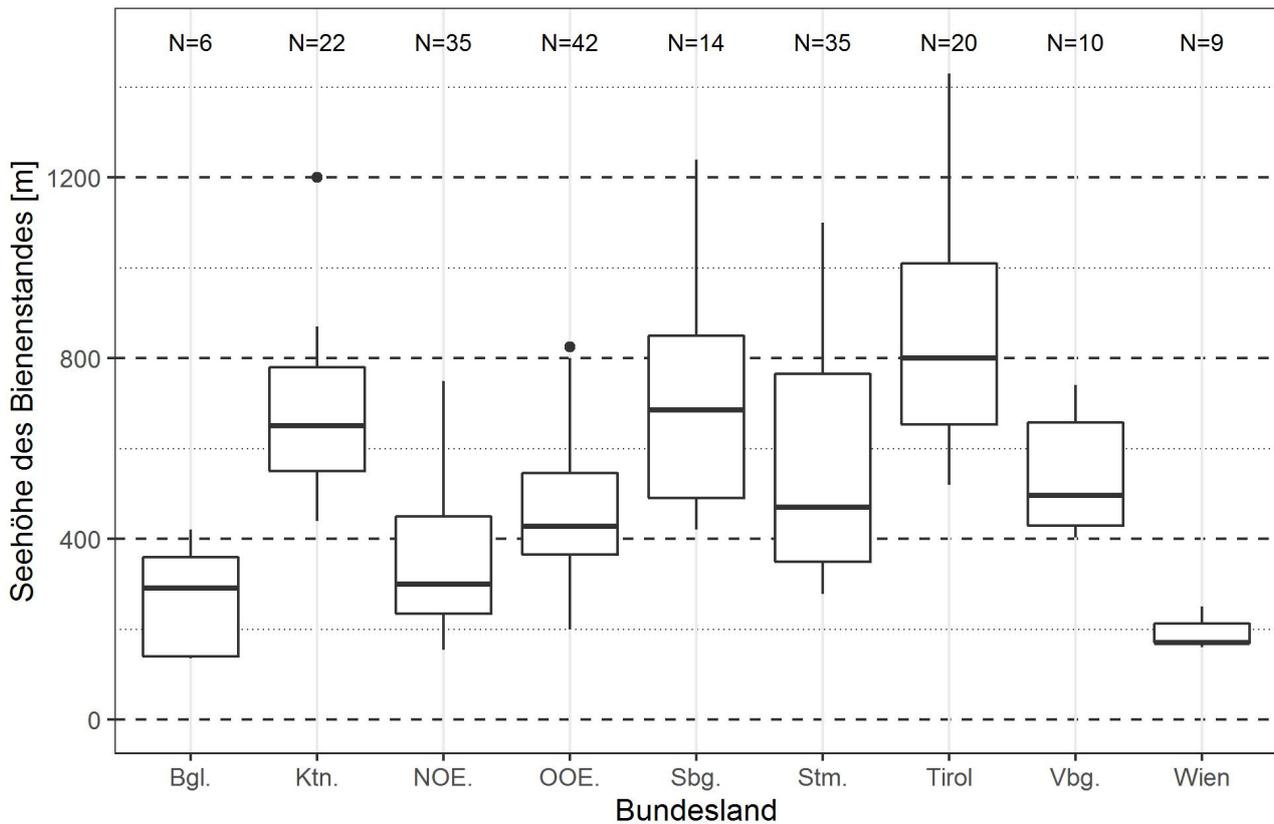


Abbildung 2.9: Seehöhe der Bienenstände nach Bundesländern. N=Anzahl der Proben. Darstellung als Boxplot Diagramm: dicker Mittelstrich: Median; untere/obere Grenze der Box: unteres/oberes Quartil; Antennen: maximal 1,5-facher Interquartilsabstand.

ABPV trat umso seltener auf, je höher der Bienenstand gelegen war ( $\chi^2=22,99$ ;  $df=4$ ;  $P<0,001$ ). Auf Bienenständen der Gruppe  $\leq 200$  m war die Prävalenz mit 69,2% (95% CI: 42,4-87,3%) am höchsten. Die geringste Prävalenz wurde in der Gruppe 601-800m gemessen und betrug 9,8% (95% CI: 3,9-22,5%). Es war kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Seehöhe des Bienenstandes und dem Virustiter von ABPV-positiven Proben feststellbar ( $H=9,46$ ;  $df=4$ ,  $P=0,051$ ). Der P-Wert liegt nur knapp über der Signifikanzgrenze. Es könnte daher sein, dass ein möglicher vorhandener Effekt aufgrund der niedrigen Stichprobenzahlen für die Gruppe  $\leq 200$  m nicht gezeigt werden kann (siehe Stichprobenzahl in Abbildung 2.11).

Für BQCV wurde weder ein Zusammenhang zwischen der Seehöhe und der Prävalenz des Virus noch der Seehöhe und der Höhe des Virustiters für die BQCV-positiven Proben festgestellt (Prävalenz:  $\chi^2=4,11$ ;  $df=4$ ;  $P=0,392$ ; Titer:  $H=6,78$ ;  $df=4$ ;  $P=0,148$ ).

Für CBPV wurden keine Unterschiede in der Virusprävalenz zwischen den verschiedenen Seehöhen festgestellt ( $\chi^2=0,86$ ;  $df=4$ ;  $P=0,931$ ). 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 einem positiven Wert nicht statistisch ausgewertet.

Für DWV-B wurde ein Zusammenhang zwischen der Seehöhe des Bienenstandes und der Virusprävalenz sowie des Virustiters festgestellt (Prävalenz:  $\chi^2=41,16$ ;  $df=4$ ;  $P<0,001$ ; Titer:  $H=16,76$ ;  $df=4$ ;  $P=0,002$ ). Dabei sank sowohl die Prävalenz als auch der Titer umso mehr ab, desto höher der beprobte Bienenstand gelegen war. In allen Proben der Gruppe  $\leq 200$  m war DWV-B nachweisbar, die Prävalenz lag daher bei 100,0% (95% CI: 77,2-100,0%). Ebenso war der Virustiter in dieser Gruppe 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 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  $1,46 \times 10^7$  RNA-Kopien/mL Homogenat (Q1-Q3:  $1,81 \times 10^6$ - $1,18 \times 10^8$  RNA-Kopien/mL Homogenat).

Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von SBV nahm ebenfalls umso mehr ab, je höher der Bienenstand gelegen war ( $\chi^2= 12,74$ ;  $df=4$ ;  $P=0,013$ ). Die maximale Prävalenz wurde für die Gruppe 201-400m gemessen und betrug 93,3% (95% CI: 84,1-97,4%). Die geringste Prävalenz wurde in der Gruppe 601-800m gemessen und betrug 68,3% (95% CI: 53,0-80,4%). Für SBV wurde zwischen den verschiedenen Seehöhen kein Unterschied im Virustiter festgestellt ( $H=6,13$ ;  $df=4$ ;  $P=0,190$ ).

Tabelle 2.8: Virusprävalenz der Bienenstände [%] ( $\pm 95\%$  Konfidenzintervall) von den sechs nachgewiesenen Viren auf unterschiedlichen Seehöhen und für Österreich (AUT) gesamt, im September 2019.

Seehöhe	ABPV		BQCV		CBPV	
<b>AUT</b>	<b>33,7</b>	<b>(27,4-40,6)</b>	<b>99,0</b>	<b>(96,3-99,7)</b>	<b>7,3</b>	<b>(4,4-11,8)</b>
$\leq 200$ m	69,2	(42,4-87,3)	100,0	(77,2-100,0)	7,7	(1,4-33,3)
201 – 400m	46,7	(34,6-59,1)	100,0	(94,0-100,0)	6,7	(2,6-15,9)
401 – 600m	32,1	(21,1-45,5)	100,0	(93,2-100,0)	9,4	(4,1-20,3)
601 – 800m	9,8	(3,9-22,5)	97,6	(87,4-99,6)	7,3	(2,5-19,4)
$> 800$ m	26,9	(13,7-46,1)	96,2	(81,1-99,3)	3,8	(0,7-18,9)
Seehöhe	DWV-A		DWV-B		SBV	
<b>AUT</b>	<b>0,5</b>	<b>(0,1-2,9)</b>	<b>88,6</b>	<b>(83,3-92,4)</b>	<b>80,8</b>	<b>(74,7-85,8)</b>
$\leq 200$ m	0,0		100,0	(77,2-100,0)	92,3	(66,7-98,6)
201 – 400m	0,0		98,3	(91,1-99,7)	93,3	(84,1-97,4)
401 – 600m	0,0		98,1	(90,1-99,7)	77,4	(64,5-86,5)
601 – 800m	2,4	(0,4-12,6)	78,0	(63,3-88,0)	68,3	(53,0-80,4)
$> 800$ m	0,0		57,7	(38,9-74,5)	73,1	(53,9-86,3)

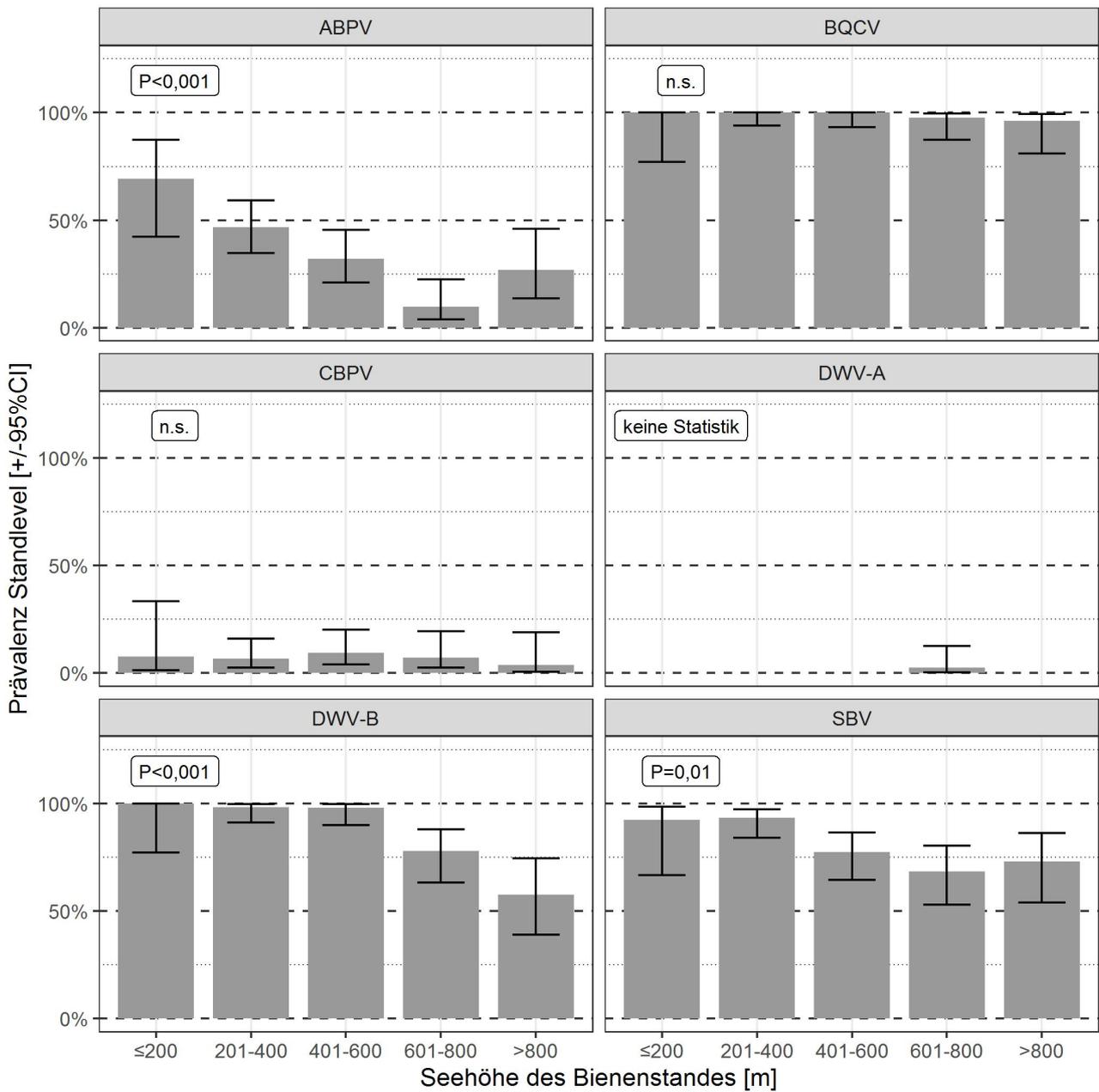


Abbildung 2.10: Virusprävalenz der Bienenstände auf unterschiedlichen Seehöhen ( $\pm 95\text{CI}$ ). Anzahl Stände pro Kategorie:  $\leq 200\text{m}$  N=13; 201-400m N=16; 401-600m N=53;  $\leq 800\text{m}$  N=41;  $> 800\text{m}$  N=26

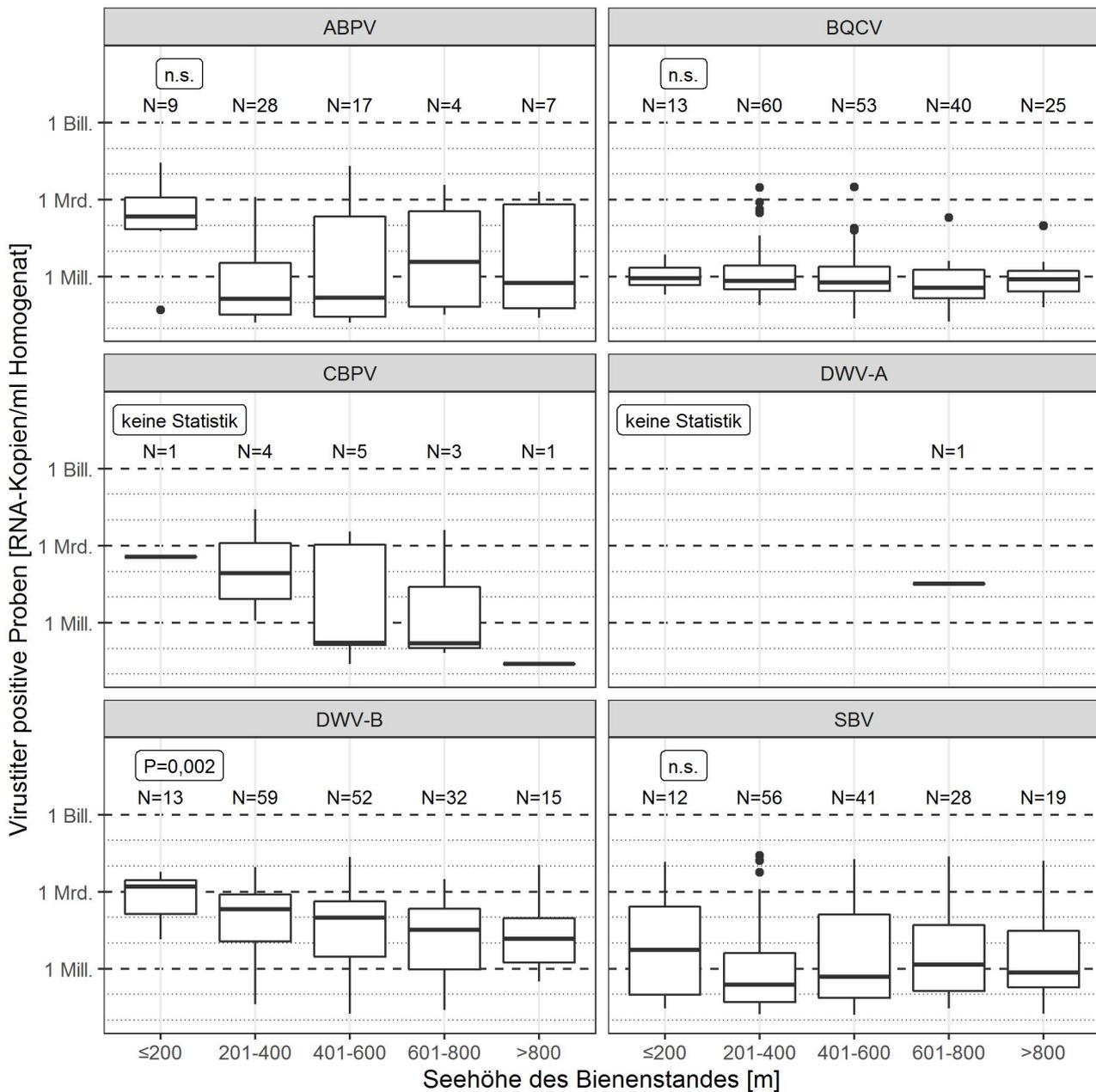


Abbildung 2.11: Virustiter der sechs nachgewiesenen Viren in den positiven Proben in den fünf Kategorien für Seehöhe (N=Anzahl der positiven Proben). „Mill.“ Million (=10<sup>6</sup>); „Mrd.“ Milliarde (=10<sup>9</sup>), „Bill.“ Billion (=10<sup>12</sup>). Statistik in der Grafik: Kruskal-Wallis-Test. Darstellung als Boxplot Diagramm: dicker Mittelstrich: Median; untere/obere Grenze der Box: unteres/oberes Quartil; Antennen: maximal 1,5-facher Interquartilsabstand.

### 2.3.6 Zusammenhang Viruskonzentration und Winterverluste

Die Winterverluste (tote Völker) unter den Probenvölkern betragen 13,6% (95% CI: 10,7-16,8%) und unterschieden sich nicht von den Winterverlusten der Monitoringstände (=Stände, auf

dem die Probenahme durchgeführt wurde; Tabelle 2.9). Zur besseren Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen von Modul U sind die Winterverluste auch als „tote + weisellose Völker“ dargestellt.

Tabelle 2.9: Winterverluste unter den Probenvölkern (4-5 pro Stand) und auf den Monitoringständen (n=192 Stände).

Art der Berechnung der Winterverluste	Gruppe	Eingewintert (Anzahl Völker)	Winterverluste (Anzahl Völker)	Winterverluste (95% CI)	
<b>nur tote Völker</b>	Probenvölker	956	130	13,6%	(10,7-16,8%)
	Monitoringstand	2931	338	11,5%	(9,3-14,1%)
<b>tote + weisellose Völker</b>	Probenvölker	956	172	18,0%	(14,8-21,5%)
	Monitoringstand	2931	487	16,6%	(14,2-19,3%)

### 2.3.6.1 Logistische Regression

Bei der logistischen Regression erwiesen sich die Faktoren DWV-B, das Symptom „Varroamilben auf Bienen“ und die Gesamtanzahl der Völker des Imkereibetriebes als statistisch signifikant (Tabelle 2.10). Völker, in deren Proben DWV-B mit einer hohen Konzentration gefunden wurde, hatten eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit über den Winter abzusterben, als die Völker, in deren Proben kein DWV-B nachgewiesen werden konnte. Eine geringe oder mittlere Konzentration von DWV-B führte jedoch nicht zu einer signifikant erhöhten Sterblichkeit der Bienenvölker. Wenn bei mindestens einem Probenvolk im Herbst das Symptom „Varroamilben auf Bienen“ beobachtet wurde, stieg die Wahrscheinlichkeit eines Absterbens der Völker signifikant im Vergleich zu Sammelproben, in deren Völkern das Symptom nicht beobachtet wurde. Die Wahrscheinlichkeit der Wintersterblichkeit unterschied sich nicht zwischen Sammelproben ohne Symptome und Sammelproben, von deren Völkern keine Angaben zu den Symptomen gemacht wurden. Die Wahrscheinlichkeit eines Absterbens der Monitoringvölker sank mit zunehmender Völkerzahl des Imkereibetriebes.

Tabelle 2.10: Multivariates Modell (GLM mit quasibinomischer Verteilung): Einfluss auf die Wintersterblichkeit von Bienenvölkern. Prädiktoren: Virustiter von DWV-B im September vor der Einwinterung (Vergleichskategorie: negativ, K = Konzentration), Symptom „Varroamilben auf Bienen“ im September gesehen (Vergleichskategorie: Symptom nicht gesehen) und Gesamtanzahl der Völker des Imkereibetriebes (Anzahl Völker). n=390 Proben.

Prädiktor	Schätzer	Standardfehler	P-Wert
DWV-B geringe K	-0,039	0,360	0,913
DWV-B mittlere K	0,502	0,337	0,137
DWV-B hohe K	1.204	0,355	<0,001
Varroa - gesehen	0,680	0,212	0,001
Varroa - keine Angabe	0,057	0,317	0,858
Anzahl Völker	-0,003	0,002	0,050

Die folgenden Faktoren wurden nicht in das Modell eingebaut, da sie die Vorhersage des Modells nicht verbesserten: Virustiter von ABPV, BQCV, CBPV, SBV, das Auftreten des Symptoms „deformierte Flügel bei Bienen“, das Untersuchungsjahr, die Anzahl der schwachen Monitoringvölker, die Seehöhe des Bienenstandes, die Jahre an imkerlicher Erfahrung und das Vorhandensein eines Bio-Zertifikats.

### 2.3.6.2 Regression Tree

In der vorliegenden Analyse wiesen die Regression Trees eine hohe Varianz auf. Das heißt, die verschiedenen erstellten Bäume und daher auch ihre Aussagen unterschieden sich stark voneinander. Deshalb wurde dieser Ansatz nicht bis ins Detail weiter verfolgt und es wurde stattdessen auf die varianzreduzierende Methode des Random Forest-Modells zurückgegriffen. Beispielhaft ist in der Abbildung 2.12 einer der berechneten Regression Trees dargestellt. Als relevantestes Feature wurde DWV-B identifiziert. Höhere Werte des Virustiters gehen tendenziell mit einer höheren Wintersterblichkeit einher. Weiters wurden ABPV, BQCV, SBV, Seehöhe und die Jahre an imkerlicher Erfahrung für die Durchführung der Splits verwendet

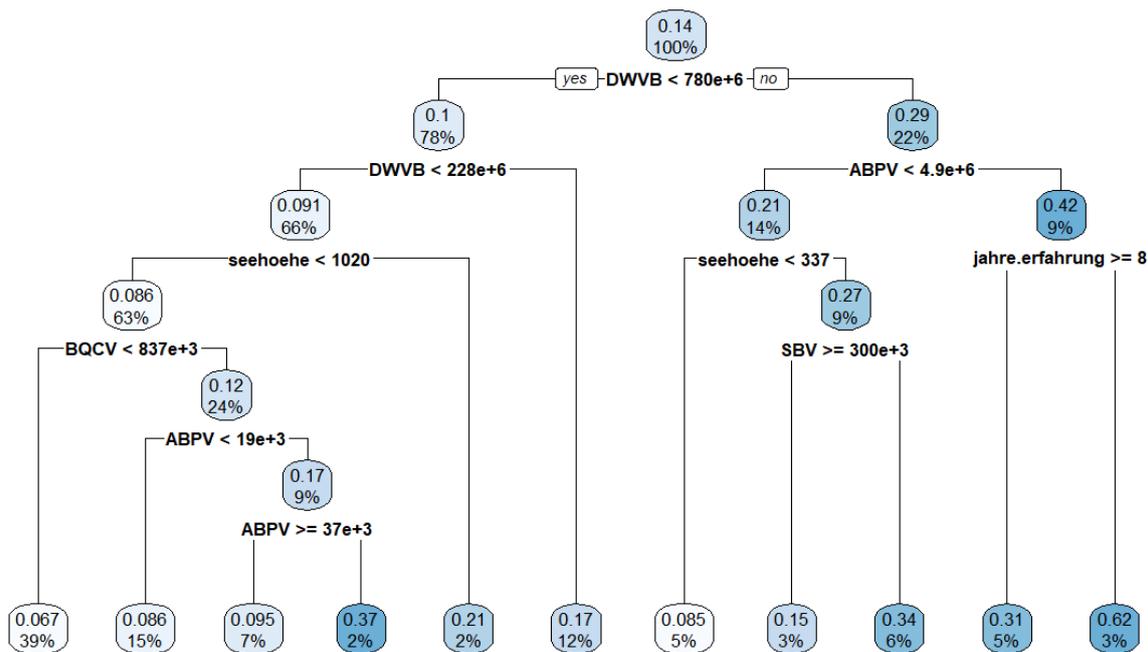


Abbildung 2.12: Exemplarischer Regression Tree zu den Einflussfaktoren auf die Winterverluste der Monitoringvölker (n=390 Proben). In der Mitte jedes Splits steht die entsprechende Bedingung. Die linke Abzweigung stellt die Untergruppe dar, auf die die Bedingung zutrifft („yes“) und die rechte Abzweigung stellt die Untergruppe dar, auf die die jeweilige Bedingung nicht zutrifft („no“). Die Ergebniskästchen geben in der oberen Zeile die mittlere Höhe der Winterverluste in der entsprechenden Gruppe (0.00 = 0% Winterverlust; 1.00 = 100% Winterverlust) und in der unteren Zeile den Anteil der Stichproben, die in diese Gruppe fallen, an.

### 2.3.6.3 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, zweitgereiht wird ABPV geführt (Abbildung 2.13). Nach diesen zwei Prädiktoren bricht die Importance stark ein, die weiteren Prädiktoren tauchen weit seltener als wichtige Faktoren in den Regression Trees auf. Die Reihung der restlichen Prädiktoren unterscheidet sich zwischen den beiden Kennwerten. Auch dies lässt auf eine unklare Datenlage schließen.

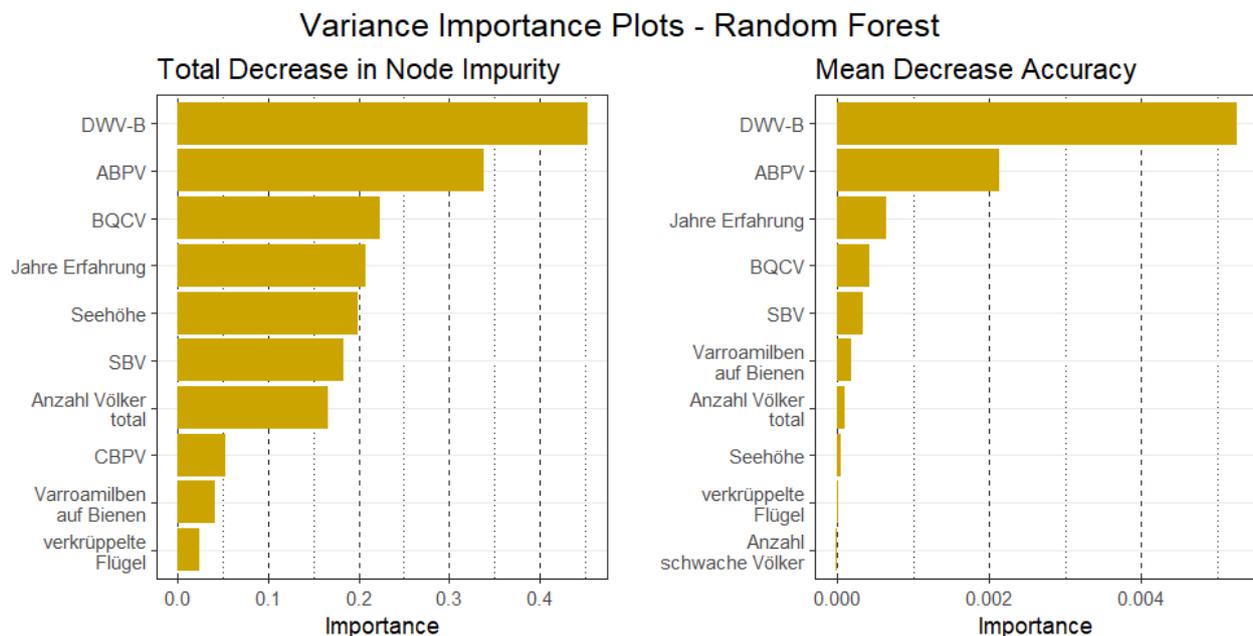


Abbildung 2.13: Einflussfaktoren auf die Winterverluste: Ergebnisse des Random Forest-Modells.

Für die zwei wichtigsten Faktoren wurde die Vorhersage des Modells im Detail dargestellt (Abbildung 2.14). Bei beiden 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 21% vorhergesagte Wintersterblichkeit bei  $10^9$  RNA-Kopien/mL Homogenat. Im Gegensatz stieg bei ABPV die Wahrscheinlichkeit eines Winterverlustes kontinuierlich mit Erhöhung des Virustiters. Zu beachten ist auch die Streuung der vorhergesagten Wintersterblichkeit bei einem negativen Virustiter. Vorhersagen erreichten hier Maximalwerte von 18% bei DWV-B und 32% bei ABPV.

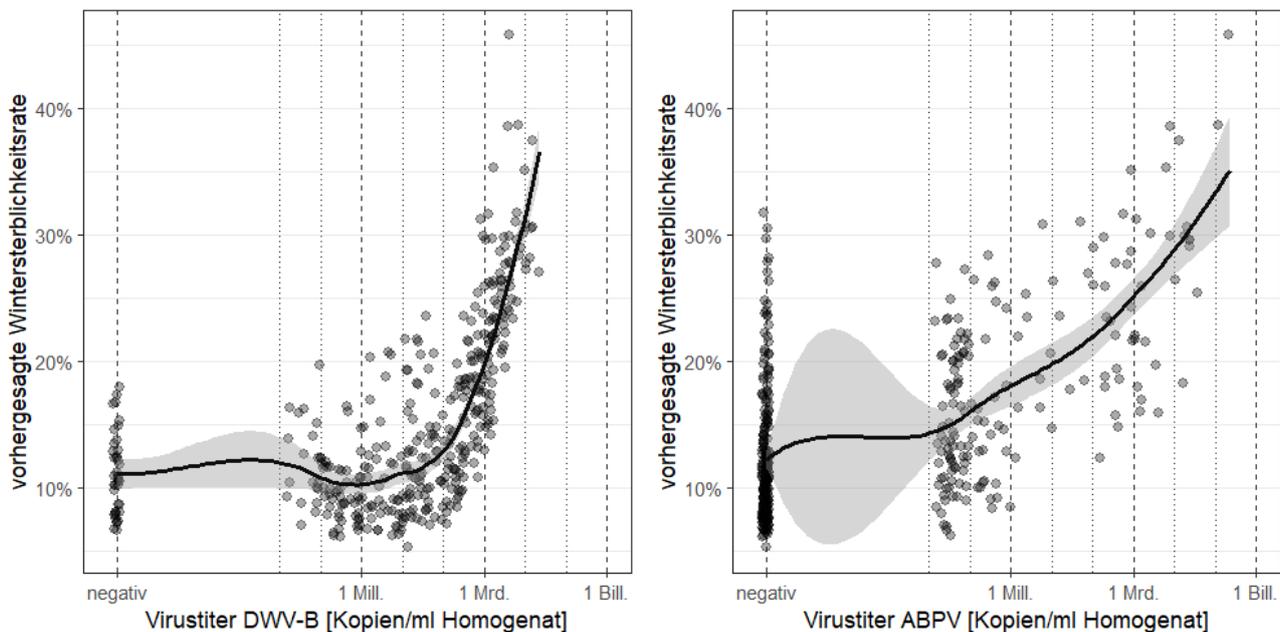


Abbildung 2.14: Vorhersage der Wintersterblichkeit durch das Random Forest-Modell. Dargestellt sind die zwei einflussreichsten Prädiktoren des Modells: der Virustiter von DWV-B (links) und ABPV (rechts) im September vor der Auswinterung (n=390). „Mill.“ Million (=10<sup>6</sup>); „Mrd.“ Milliarde (=10<sup>9</sup>), „Bill.“ Billion (=10<sup>12</sup>).

### 2.3.6.4 Stacking

Für die Stacking Modelle wurden Vorhersagen anhand einer Kombination des Random Forest-Modells und des logistischen Regressionsmodells erstellt. Die Meta-Lerner ermittelten für jedes der Modelle einen Gewichtungskoeffizienten. Je höher der Koeffizient eines Modells ist, desto stärker wurden dessen Vorhersagen in der endgültigen Vorhersage berücksichtigt. Wie in Tabelle 2.11 zu sehen ist, beziehen beide Meta-Lerner die Logistische Regression etwas stärker in das Stacking Modell ein als das Random Forest-Modell. Die Unterschiede in den Koeffizienten sind jedoch gering. Dies heißt, dass beide Stacking Modelle empfehlen, die Ergebnisse des Random Forest-Modell und der Logistischen Regression in der Interpretation zu kombinieren und als gleichwertig zu betrachten.

Tabelle 2.11: Stacking Modelle: Einfluss auf die Wintersterblichkeit von Bienenvölkern. Es wurden das Random Forest-Modell (Abbildung 2.13) und die logistische Regression (Tabelle 2.10) gestackt.

Meta-Lerner	Koeffizient Random Forest	Koeffizient Log. Regression
Breiman	0,499	0,501
Ridge Regression	0,440	0,480

### 2.3.6.5 Vergleich der Vorhersagekraft der Winterverlust-Modelle

Um die Güte der unterschiedlichen Modelle zu bewerten, wurde eine Kreuzvalidierung durchgeführt (Tabelle 2.12). 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 2.12). Den niedrigsten RMSE-Wert im Trainingsdatensatz hatte der Regression Tree, die Anwendung auf den Testdatensatz zeigte hingegen keine Verbesserung gegenüber dem Basismodell. Insgesamt schneidet das Random Forest-Modell am besten ab, da es sowohl im Trainingslauf als auch im Testlauf einen sehr geringen RMSE-Wert hatte. Am zweitbesten wurden die beiden Stacking Modelle bewertet. 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 2.12: 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	0,209	0,240
Regression Tree	0,168	0,240
Random Forest	0,174	0,214
Logistische Regression	0,194	0,228
Stacking nach Breiman	0,198	0,219
Stacking mit Ridge Regression	0,198	0,220

Es zeigt sich, dass durch das Stacking keine weitere Verbesserung in der Vorhersage der Wintersterblichkeit erreicht werden konnte. Das Einzelmodell des Random Forest zeigt die beste Vorhersagegüte. Die Variable-Importance-Plots legen nahe, dass vor allem DWV-B einen Einfluss auf die Wintersterblichkeit der Bienenvölker hat. Dies wird auch in allen anderen Modellen bestätigt. Sowohl im Random Forest-Modell als auch im logistischen Regressionsmodell sieht man, dass vor allem ein DWV-B Titer über  $10^9$  RNA-Kopien/mL Homogenat die Wintersterblichkeit erhöht (Tabelle 2.10 und Abbildung 2.14). Das Random Forest-Modell zeigt zusätzlich einen Zusammenhang zwischen einem erhöhtem ABPV Titer und einem Ansteigen der Wintersterblichkeit. Weitere mögliche Einflussfaktoren sind laut logistischer Regression das Auftreten des Symptoms „Varroamilben auf Bienen“ und die Größe des Imkereibetriebes.

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

171 Imker und Imkerinnen sahen im September 2019 ihre Probenvölker auf Symptome von Viruserkrankungen durch (88,6% von 193 TeilnehmerInnen). Dabei gaben 161 ImkerInnen Informationen zu allen fünf abgefragten Symptomen und 10 ImkerInnen Informationen zu einem Teil der abgefragten Symptome. In 50,3% aller Rückmeldungen wurden keine Symptome beobachtet (86 von 171 ImkerInnen), in 35,7% der Rückmeldungen wurde ein Symptom beobachtet (61 ImkerInnen), in 10,5% der Rückmeldungen wurden zwei Symptome beobachtet (18 ImkerInnen) und in 3,5% drei Symptome beobachtet (6 ImkerInnen). Auf keinem Bienenstand wurden mehr als drei Symptome beobachtet. Dabei wurden „schwarz-glänzende Bienen“ bei weitem am häufigsten beobachtet (37,5% der Meldungen positiv). Die Symptome „Varroamilben auf Bienen“ und „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ waren von etwa einem Zehntel aller TeilnehmerInnen beobachtet worden (13,7% und 10,7% der Meldungen positiv). Die Symptome „Totenfall vor dem Bienenvolk“ und „Sackbrutsymptome“ wurden sehr selten beobachtet (3,5% und 3,0% der Meldungen positiv).

### 2.3.7.1 Totenfall vor dem Bienenvolk

Es haben 88% der teilnehmenden ImkerInnen Angaben zu dem Symptom „Totenfall vor dem Bienenvolk“ gemacht (170 ImkerInnen von 193). Dieses Symptom wurde auf 6 Monitoringständen beobachtet und ist daher auf 3,5% der Stände aufgetreten. 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.

### 2.3.7.2 Varroamilben auf Bienen

Zu dem Symptom „Varroamilben auf Bienen“ haben 87,0% ImkerInnen Angaben gemacht (168 von 193 TeilnehmerInnen). 13,7% der Meldungen berichteten von „Varroamilben auf Bienen“ in mindestens einem der Völker (23 von 168). „Varroamilben auf Bienen“ sind ein Hinweis auf einen hohen Varroabefall der Bienen und damit auf eine akute Infektion mit DWV. Daher wurde ein Zusammenhang zwischen den Beobachtungen und dem Auftreten von DWV-B untersucht. DWV-A wurde nur in einer Probe gefunden und daher ist die Stichprobe hier zu klein für eine statistische Untersuchung.

Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von DWV-B und der Beobachtung von „Varroamilben auf Bienen“ ( $\chi^2=1,85$ ;  $df=1$ ;  $P=0,174$ ; Abbildung 2.15). In den 23 Fällen mit Beobachtungen von „Varroamilben auf Bienen“ wurde auch in jeder zugehörigen Probe DWV-B festgestellt, die Prävalenz betrug daher 100,0% (95% CI: 85,7-100,0%). Wurden keine „Varroamilben auf Bienen“ beobachtet, lag die Prävalenz von DWV-B bei 88,3% (95% CI: 82,0-92,5%).

Der Titer von DWV-B war doppelt so hoch, wenn in den Probenvölkern „Varroamilben auf Bienen“ beobachtet wurden, wie wenn das Symptom nicht beobachtet wurde (Abbildung 2.15). Dieser Unterschied ist signifikant ( $W=1242$ ;  $P=0,050$ ). In Proben von Völkern mit dem Symptom wurde im Median ein DWV-B Titer von  $2,11 \times 10^8$  RNA-Kopien/mL Homogenat (Q1-Q3:  $1,85 \times 10^7$ - $1,35 \times 10^9$  RNA-Kopien/mL Homogenat) gemessen. In Proben von Völkern, in denen keine „Varroamilben auf Bienen“ beobachtet wurden, wurde im Median ein DWV-B Titer von  $1,04 \times 10^8$  RNA-Kopien/mL Homogenat (Q1-Q3:  $4,55 \times 10^6$ - $5,73 \times 10^8$  RNA-Kopien/mL Homogenat) gemessen.

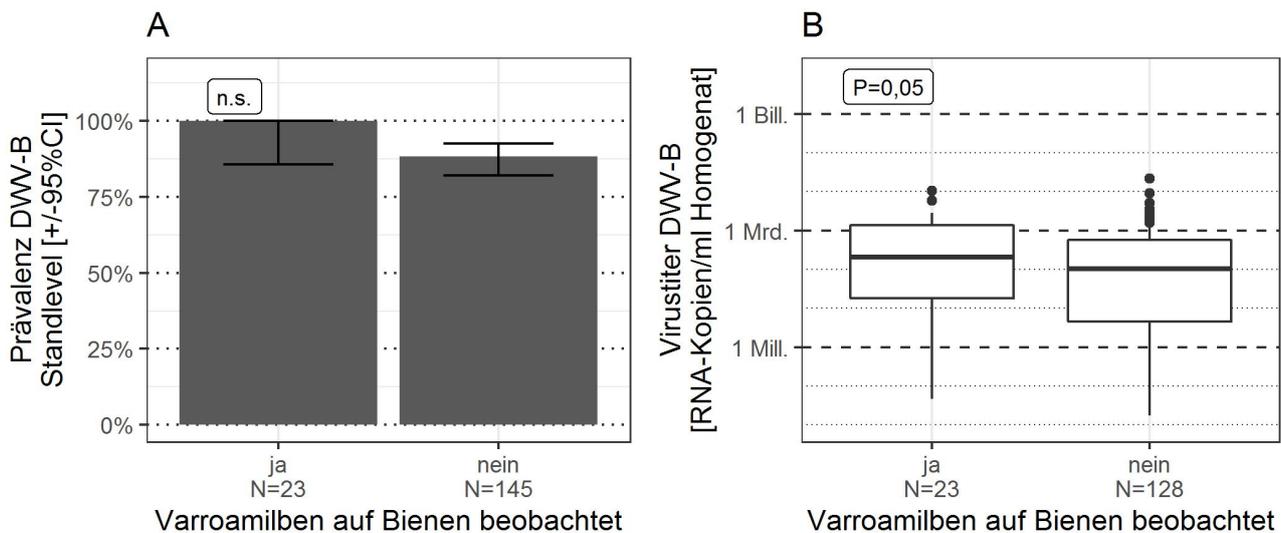


Abbildung 2.15: Zusammenhang zwischen der (A) Prävalenz von DWV-B bzw. (B) dem Titer der DWV-B positiven Proben mit dem Auftreten des Symptoms „Varroamilben auf Bienen“. „ja“: in zumindest einem der fünf Probenvölker Symptom beobachtet; „nein“ in keinem der fünf Probenvölker Symptom beobachtet; „n“ Probenanzahl; „Mill.“ Million ( $=10^6$ ); „Mrd.“ Milliarde ( $=10^9$ ); „Bill.“ Billion ( $=10^{12}$ ). Statistik in der Grafik: (A)  $\chi^2$ -Test; (B) Kruskal-Wallis-Test. Boxplot Diagramm: dicker Mittelstrich: Median; untere/obere Grenze der Box: unteres/oberes Quartil; Antennen: maximal 1,5-facher Interquartilsabstand.

### 2.3.7.3 Bienen mit verkrüppelten Flügeln

87,6% ImkerInnen machten Angaben zum Symptom „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ (169 von 193 TeilnehmerInnen). Davon gaben 10,7% der ImkerInnen an, dass sie das Symptom bei mindestens einem Volk beobachtet hatten. „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 einer Probe gefunden und wurde daher nicht statistisch ausgewertet.

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 ( $\chi^2=1,18$ ;  $df=1$ ;  $P=0,277$ ; Abbildung 2.16). Das Virus war in allen Proben aus Völkern mit „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ vorhanden und hatte eine Prävalenz von 100,0%

(95% CI: 82,4-100,0%). In der Gruppe ohne Anzeichen von „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ lag die Prävalenz von DWV-B bei 88,7% (95% CI: 82,7-92,9%).

Der DWV-B Titer unterschied sich signifikant zwischen den Proben aus Völkern mit „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ und den Proben aus Völkern ohne Symptom ( $W=776$ ;  $P=0,003$ ; Abbildung 2.16). Dabei lag der Titer von DWV-B bei Proben aus Völkern mit Symptom im Median bei  $5,11 \times 10^8$  RNA-Kopien/mL Homogenat (Q1-Q3:  $3,73 \times 10^7$ - $2,03 \times 10^9$  RNA-Kopien/mL Homogenat). In Proben von Völkern ohne „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ wurde im Median ein DWV-B Titer von  $9,55 \times 10^7$  RNA-Kopien/mL Homogenat (Q1-Q3:  $3,07 \times 10^6$ - $4,96 \times 10^8$  RNA-Kopien/mL Homogenat) gemessen.

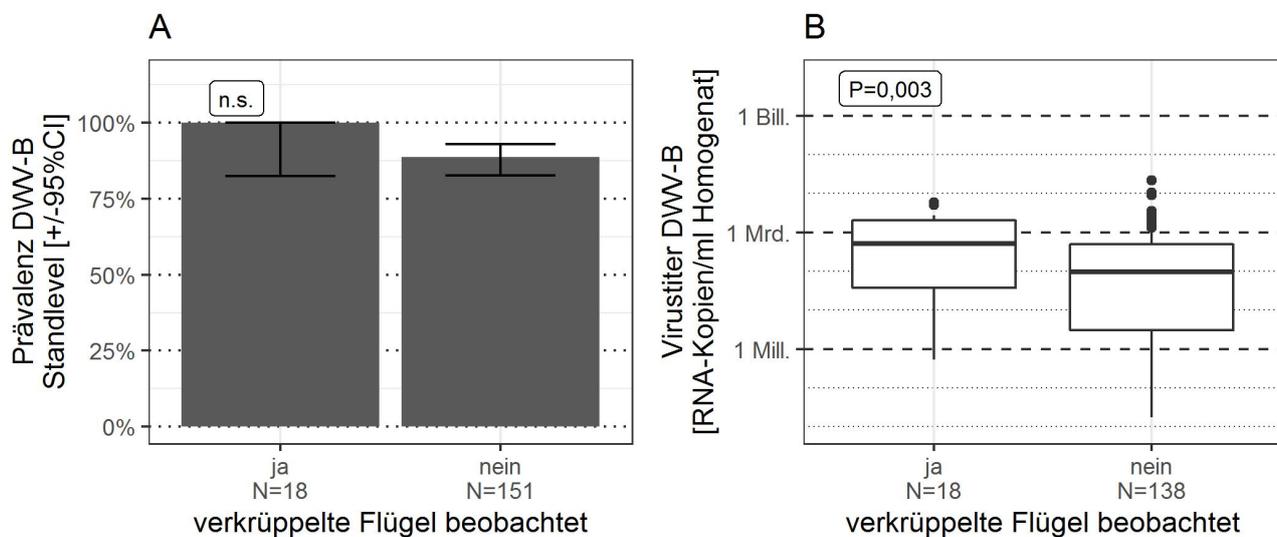


Abbildung 2.16: Zusammenhang zwischen der (A) Prävalenz von DWV-B bzw. (B) dem Titer der DWV-B positiven Proben mit dem Auftreten des Symptoms „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“. „ja“: Symptom in zumindest einem der fünf Probenvölker beobachtet; „nein“ Symptom in keinem der fünf Probenvölker beobachtet; „n“ Probenanzahl; „Mill.“ Million (=10<sup>6</sup>); „Mrd.“ Milliarde (=10<sup>9</sup>); „Bill.“ Billion (=10<sup>12</sup>). Statistik in der Grafik: (A)  $\chi^2$ -Test; (B) Kruskal-Wallis-Test. Boxplot Diagramm: dicker Mittelstrich: Median; untere/obere Grenze der Box: unteres/oberes Quartil; Antennen: maximal 1,5-facher Interquartilsabstand.

#### 2.3.7.4 Schwarz-glänzende Bienen

87,0% der teilnehmenden ImkerInnen machten Angaben zum Symptom „schwarz-glänzende Bienen“ (168 von 193 TeilnehmerInnen). Dabei wurde in 37,5% der Fälle angegeben, dass das Symptom in zumindest einem der fünf Probenvölker beobachtet wurde (63 von 168). Da schwarz-glänzende Bienen ein Symptom für CBPV sein können, wurden die Daten auf Korrelation zwischen CBPV und der beobachteten Symptomatik ausgewertet.

Es gab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von „schwarz-glänzenden Bienen“ und der Prävalenz von CBPV ( $\chi^2=1,53$ ;  $df=1$ ;  $P=0,216$ ; Abbildung 2.17). Die Prävalenz betrug bei Proben aus Völkern mit „schwarz-glänzenden Bienen“ 11,1% (95% CI: 5,5-21,2%) und bei Völkern ohne beobachtetem Symptom 4,8% (95% CI: 2,1-10,7%). Daher war die Prävalenz

von CBPV zwar doppelt so hoch, 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.

Es gab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von „schwarz-glänzenden Bienen“ und der Höhe des Virustiters bei CBPV-positiven Proben ( $W=27$ ;  $P=0,149$ ; Abbildung 2.17). Für die Proben aus Völkern mit dem Symptom betrug der CBPV-Titer im Median  $1,34 \times 10^5$  RNA-Kopien/mL Homogenat (Q1-Q3:  $4,59 \times 10^4$ - $1,83 \times 10^8$  RNA-Kopien/mL Homogenat) und für die Proben aus symptomfreien Völkern betrug er im Median  $1,64 \times 10^7$  RNA-Kopien/mL Homogenat (Q1-Q3:  $1,20 \times 10^7$ - $4,50 \times 10^8$  RNA-Kopien/mL Homogenat).

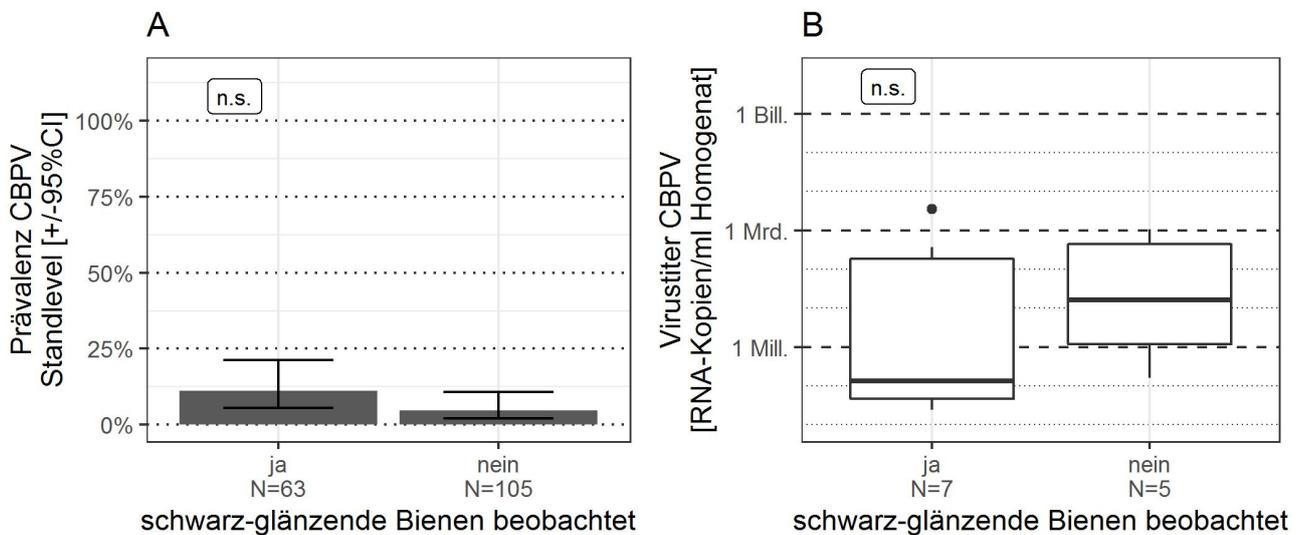


Abbildung 2.17: Zusammenhang zwischen der (A) Prävalenz von CBPV bzw. (B) dem Titer der CBPV positiven Proben mit dem Auftreten des Symptoms „schwarz-glänzende Bienen“. „ja“: Symptom in zumindest einem der fünf Probenvölker beobachtet; „nein“ Symptom in keinem der fünf Probenvölker beobachtet; „n“ Probenanzahl; „Mill.“ Million ( $=10^6$ ); „Mrd.“ Milliarde ( $=10^9$ ); „Bill.“ Billion ( $=10^{12}$ ). Statistik in der Grafik: (A)  $\chi^2$ -Test; (B) Kruskal-Wallis-Test. Boxplot Diagramm: dicker Mittelstrich: Median; untere/obere Grenze der Box: unteres/oberes Quartil; Antennen: maximal 1,5-facher Interquartilsabstand.

### 2.3.7.5 Sackbrutsymptome

Insgesamt haben 87% der TeilnehmerInnen Angaben zu Sackbrut-Symptomen gemacht (168 von 193 TeilnehmerInnen). Sackbrutsymptome wurden auf fünf Ständen in mindestens einem Probenvolk beobachtet und sind damit auf 3,0% der Stände aufgetreten. Aufgrund des seltenen Auftretens des Symptoms war eine Auswertung auf Zusammenhang mit SBV nicht möglich.

## 2.4 Diskussion

### 2.4.1 Repräsentativität der StudienteilnehmerInnen

Im Vergleich zum ersten Versuchsjahr kam es zu einer geringfügigen Änderung in der Gruppe der TeilnehmerInnen. Zehn TeilnehmerInnen aus dem ersten Versuchsjahr fielen aus. Fünf TeilnehmerInnen kamen als Ersatz für die ausgefallenen TeilnehmerInnen, die schon frühzeitig abgesagt hatten, neu hinzu.

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 zu geringfügigen Änderungen in der Bundesländer-Verteilung der Bienenstände zwischen der Planung und den tatsächlich eingesandten Proben. Diese Verschiebung kam teilweise durch den Ausfall von sieben Bienenständen zustande. Zusätzlich wählten einige ImkerInnen Bienenstände in anderen Bundesländern als anfangs angegeben zur Teilnahme aus (Verschiebung von Niederösterreich nach Wien).

Im vorliegenden Versuchsjahr lagen die Winterverluste der Virenmonitoring-TeilnehmerInnen 4% über den Winterverlusten der COLOSS-Studie (=Ergebnisse des Moduls U des vorliegenden Berichts). Der Unterschied zwischen den beiden Winterverlust-Berechnungen wird auch anhand der nicht überlappenden Konfidenzintervalle ersichtlich. An der COLOSS-Studie hatten 1.539 Imkereibetriebe mit 30.724 Völkern teilgenommen und es wurde ein Winterverlust von 12,6% (95% CI: 11,9-13,3%) gemeldet (Abschnitt 1.3.3.1). Im Vergleich dazu wurde auf den Monitoringständen des Virenmonitorings ein Winterverlust von 16,6% (95% CI: 14,2-19,3%) gemeldet (tote + weisellose Völker, Details siehe Tabelle 2.9).

Dieser Unterschied spielt jedoch aufgrund der unterschiedlichen Zielsetzungen der beiden Projektmodule nur eine untergeordnete Rolle. Ziel der COLOSS-Studie ist es, die Winterverluste in Österreich im Detail zu erfassen. Die Eingabe der Daten erfolgt durch eine möglichst große Anzahl von zum Teil anonymen TeilnehmerInnen (Winter 2019/20: 1.539 Betriebe mit 30.124 Völker). 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 (Winter 2019/20: 193 Bienenstände mit 2.931 Völker). Es ist nicht verwunderlich, dass die geringe TeilnehmerInnenzahl und größere Teilnahmehürde im Modul A zu Unterschieden in den Winterverlusten führt. Diese waren jedoch gering und kamen erst im zweiten Untersuchungsjahr vor.

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 Imkererfahrung aufweisen. Ebenso sind die Imkereibetriebe mit weniger als 20 Völkern im Vergleich zu COLOSS-Studien unterrepräsentiert (Virenmonitoring: 43,5% der TeilnehmerInnen; COLOSS-Studien: >70%, Brodschneider et al., 2018a, 2019b, Abschnitt 1.3.6.2). Der Anteil an zertifizierten Bio-Imkereien scheint mit 24,9% der TeilnehmerInnen ebenso über dem österreichweiten Schnitt zu liegen. 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) durchführen müssen. Dies war leider aus rechtlichen Gründen nicht möglich.

## 2.4.2 Prävalenzlevel

Die errechneten Prävalenzwerte sind Prävalenzwerte 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 den im September 2019 untersuchten Bienenproben waren sechs Bienenviren nachweisbar (ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A, DWV-B, SBV; Abbildung 2.5). Zwei weitere getestete Viren wurden nicht entdeckt (IAPV, KBV). Das gefundene Virenspektrum stimmt damit sowohl mit den Ergebnissen des ersten Untersuchungsjahrs als auch mit den Ergebnissen des Vorprojekts „Zukunft Biene“ überein (Brodschneider et al., 2018a, 2019b). 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 großteils über die beiden Untersuchungsjahre 2018 und 2019 konstant (Brodschneider et al., 2019b; Morawetz et al., 2019b). In beiden Jahren war BQCV mit einer Prävalenz knapp unter 100% das häufigste Virus, gefolgt von DWV-B, das in beiden Jahren in über 85% der Proben vorkam. Auch die seltenen Viren CBPV und DWV-A traten in beiden Jahren mit einer ähnlichen Häufigkeit auf, bei beiden blieb die Prävalenz unter 10%. Interessanterweise kam es jedoch zu Unterschieden in der Prävalenz der Viren ABPV und SBV. ABPV kam im Untersuchungsjahr 2019 um 30% seltener vor als im Jahr zuvor (Prävalenz 2018 54% (95% CI: 47-60%)). SBV hingegen kam im Jahr 2019 um 30% häufiger vor als im Vorjahr (Prävalenz 2018: 62% (95% CI: 55-69%)).

Schwankungen in der Häufigkeit lassen sich auch im Vergleich zu anderen österreichischen Studien beobachten. 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). Ein Vergleich der absoluten Häufigkeiten mit den Vorgängerstudien ist nicht sinnvoll, da diese das Virusauftreten in Einzelvölkern gemessen haben und damit nicht mit den Daten aus Sammelproben des vorliegenden Projektes vergleichbar sind. Auch sind die Ergebnisse zwischen den verschiedenen Studien aufgrund der unterschiedlichen angewandten PCR-Methoden nicht uneingeschränkt vergleichbar.

Die drei Viren ABPV, DWV-B, SBV unterschieden sich in der Prävalenz zwischen den neun Bundesländern (Abbildung 2.7 und Tabelle 2.7). Dabei waren ABPV in Tirol mit der geringsten Prävalenz vertreten, DWV-B in Salzburg und SBV in Kärnten. In Wien und dem Burgenland wurden hingegen bei allen drei Viren sehr hohe Prävalenzwerte gemessen. Ähnliche Muster wurden schon im Vorjahr beobachtet: im Jahr 2018 waren die Prävalenzwerte der Viren ABPV, BQCV, DWV-B und SBV für Stände in Tirol und Kärnten im Vergleich niedrig, während in Wien und dem Burgenland sehr hohe Prävalenzen gemessen wurden (Brodschneider et al., 2019b). Diese Unterschiede stehen wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Seehöhe, da die teilnehmenden Bienenstände in Tirol, Salzburg 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 und Tabelle 2.8).

Der Zusammenhang zwischen der Virus-Prävalenz und der Seehöhe konnte nun in zwei 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 oder SBV im Bienenvolk (Sumpter und S. J. Martin, 2004; McMenamin 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).

Es wurde kein Zusammenhang zwischen den von den ImkerInnen beobachteten Virussympptomen und der Prävalenz des entsprechenden Virus gefunden (Abschnitt 2.3.7). Auch im Vorjahr wurde nur bei einem Symptom ein signifikanter Zusammenhang mit der Prävalenz hergestellt (DWV-B und „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“). Es besteht also kein oder kaum ein Zusammenhang zwischen der reinen Nachweisbarkeit des Virus und den sichtbaren Symptomen der dem Virus entsprechenden Virose in den beprobten Völkern. Das Phänomen, dass ein Virus ohne Krankheitssymptome nachweisbar ist, ist bei Bienenviren schon länger bekannt. Man spricht hier von verdeckten (covert) und offenen (overt) Infektionen (Yue et al., 2007). Bei verdeckten Infektionen ist das Virus in geringer Konzentration nachweisbar, doch die Biene zeigt keine Krankheitssymptome, während bei offenen Infektionen hohe Virustiter nachweisbar sind und die Biene klare Symptome der entsprechenden Virose zeigt (Zioni et al., 2011; Schurr et al., 2019).

### 2.4.3 Höhe Virustiter

Der Virustiter bewegte sich bei fünf der positiv getesteten Viren in einer sehr großen Spannweite zwischen fünf und sechs Zehnerpotenzen (DWV-A: nur eine Probe). 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). 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 verdeckter und einer offener Infektion variieren kann.

Ein Anzeichen für eine offene Infektion ist die Beobachtung von Symptomen der entsprechenden Virose in den Monitoringvölkern. Bei DWV-B war das Auftreten einer offenen Infektion mit einem signifikant erhöhten Virustiter verbunden. „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ und „Varroamilben auf Bienen“ sind Symptome für eine offene DWV Infektion (Bowen-Walker et al., 1999). Wirklich war die Beobachtung der beiden Symptome jeweils mit einem signifikant erhöhten Virustiter verbunden (Abbildungen 2.15 und 2.16). Für das Symptom „Bienen mit verkrüppelten Flügeln“ konnte auch schon Datensatz des Vorjahres ein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden (Brodschneider et al., 2019b).

Bei CBPV wurde kein Zusammenhang zwischen der Höhe des Virustiters und zwei Symptomen für CBPV festgestellt (Abbildung 2.17). Dies deckt sich mit den Ergebnissen des Vorjahres. Symptome für eine offene CBPV-Infektion sind unter anderem schwarz-glänzende Bienen und ein erhöhter Totenfall vor dem Volk (Rivière et al., 2010). Die Beobachtung des Symptoms 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. 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 ebenfalls zu selten beobachtet um sie aussagekräftig auszuwerten.

## 2.4.4 Winterverluste

In allen gerechneten Modellen hat sich die Höhe des DWV-B Titers als wichtigster Einflussfaktor auf die Wahrscheinlichkeit eines Winterverlustes erwiesen. Zusätzlich hat das aussagekräftigste Modell, das Random Forest-Modell, den ABPV Titer als wichtigen Einflussfaktor identifiziert (Abbildung 2.13 und Tabelle 2.12). Die logistische Regression, ein etwas weniger aussagekräftiges Modell, ergab zusätzlich noch die Faktoren „Varroamilben auf Bienen“ und Anzahl der Völker des Betriebs als weitere Einflussfaktoren (Tabelle 2.10).

### 2.4.4.1 DWV-B

Die Aufgliederung von DWV in seine unterschiedlichen Typen wurde erst in den letzten Jahren standardmäßig durchgeführt und berichtet (Stephen J. Martin et al., 2012; Mordecai et al., 2016). Daher bezieht sich der folgende Text meist allgemein auf DWV, da in den zugrundeliegenden Publikationen meist 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). Aufgrund der Modellierungen der Daten der letzten beiden Jahre 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 2.14). Dies 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 für das Probenjahr 2019 im Median zwischen  $10^8$  und  $10^9$  RNA-Kopien/mL

Homogenat. Unsere Daten würden die Schwelle daher um zumindest eine 10er Potenz höher einschätzen als die bisherige Literatur. Es bleibt jedoch noch abzuwarten, ob die Daten des dritten Probenjahres noch Änderungen in der Einschätzung hervorrufen oder die derzeitige Datenlage bestätigen.

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 2.15 und 2.16). Im logistischen Modell ist der Faktor „Varroamilben auf Bienen“ sogar ein zusätzlicher Faktor, dessen Auftreten eine erhöhte Wintersterblichkeit vorhersagt.

#### 2.4.4.2 ABPV

Ein hoher ABPV Titer führte auf den Monitoringständen zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit an Winterverlusten (Abbildung 2.14). Der Zusammenhang zwischen Winterverlust und ABPV ist bereits für umliegende Ländern gezeigt worden (Berthoud et al., 2010; Genersch et al., 2010). Im Vorgängerprojekt „Zukunft Biene“ konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen ABPV und Winterverlusten für Österreich festgestellt werden (Morawetz et al., 2018). Höhere Titerwerte in der vorliegenden Studie und neue Modellierungsansätze lassen zwei Vermutungen zu, wie es zu diesen unterschiedlichen Ergebnissen gekommen ist. Entweder war im Untersuchungsjahr der Vorläuferstudie ABPV wirklich aufgrund der geringen Titerwerte kein Einflussfaktor auf die Winterverluste. Oder das neue Random Forest-Modell ist in der Lage, Muster zu erkennen, die dem logistischen Modell verborgen bleiben. Die zweite Annahme ist auch durch die Tatsache gestützt, dass auch das logistische Modell in der aktuellen Untersuchung keinen Effekt von ABPV ausgibt (Tabelle 2.10).

Der Virustiter, ab dem ABPV fördernd für Winterverluste anzusehen ist, ist schwerer zu bestimmen als für 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 2.14). Gleichzeitig sagt das Modell auch eine hohe Wahrscheinlichkeit voraus, im Winter abzusterben, ohne dass ABPV gefunden wurde. Dies weist darauf hin, dass viele der Winterverluste durch andere (bekannte oder unbekannte) Faktoren zustande kommen. Beide Gegebenheiten mögen auch die Gründe dafür sein, dass der ABPV-Titer nicht als Einflussfaktor im logistischen Modell auftritt. Es bleibt abzuwarten, ob die Vergrößerung des Datensatzes im dritten Untersuchungsjahr die Datenlage verbessert und damit eine klare Aussage zu einer Gefährdungsschwelle bei ABPV ermöglicht.

### 2.4.4.3 Imkererfahrung

Das logistische Modell benennt die gesamte Anzahl an Völkern im Imkereibetrieb als Einflussfaktor für Winterverluste. Je mehr Völker in einem Betrieb vorhanden sind, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Probenvölker absterben. Dieses Phänomen ist aus anderen internationalen Studien, aber auch aus der österreichischen COLOSS-Studie bekannt (van der Zee et al., 2014; Lee et al., 2015; Brodschneider et al., 2016; Jacques et al., 2017; Oberreiter und Brodschneider, 2020). Die Größe des Betriebes ist eine Kennzahl für die Professionalität des Imkereibetriebs (Jacques et al., 2017). Andere Kennzahlen der Professionalität, die mit Verbesserung der Überwinterungsrate einhergehen, sind die imkerlichen Erfahrungsjahre und das Alter des Imkers/der Imkerin (Jacques et al., 2017; Morawetz et al., 2019a). Die Professionalität steigt dabei mit den Erfahrungsjahren, sinkt jedoch ab einem gewissen Lebensalter wieder ab. Diese Ergebnisse betonen den positiven Einfluss, den eine gute Schulung der Imkerschaft und die dadurch entstehende Professionalität auf die Überwinterung von Bienenvölkern hat.

### 2.4.4.4 Vollständigkeit der Modelle

In der Kreuzvalidierung der gerechneten Modelle zeigte sich, dass die verschiedenen Modelle nur einen gewissen Anteil der Winterverlust-Wahrscheinlichkeit erklären (Abschnitt 2.3.6.5). 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 wie Amerikanische Faulbrut oder Nosema, oder Effekte der imkerlichen Betriebsführung (Chauzat et al., 2016; Switanek et al., 2017; Brodschneider et al., 2018c; Morawetz et al., 2019a). 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 10 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 Genauigkeitsgewinn 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.

## 2.4.5 Zusammenfassung und Ausblick

Nach nun zwei von drei Versuchsjahren ermöglichen die Daten schon verlässlichere Aussagen zur Virusprävalenz in Österreichs Bienenvölkern. Es hat sich gezeigt, dass es zwar zu Prävalenzschwankungen zwischen den Jahren kommt, aber das allgemeine Prävalenzlevel trotzdem recht konstant bleibt. Es gibt Viren, die im Herbst nahezu überall zu finden sind (BQCV, DWV-B), häufige Viren (ABVP, SBV) und seltene Viren (CBPV, DWV-A). Es wird sich zeigen, ob die Daten des dritten Versuchsjahres 2020 dieses Muster weiter bestätigen und bei welchen Viren es im dritten Jahr zu Schwankungen in der Prävalenz kommen wird. Dies wird vor allem daher spannend, da im Frühling 2020 von Imkerinnen und Imkern vermehrt über Erkrankungen an Chronischer Bienenparalyse berichtet wurde. Es bleibt abzuwarten, ob sich dies auch in den Ergebnissen des Virenmonitorings niederschlägt.

Die Analyse des Zusammenhangs zwischen Viruskonzentration und Winterverlusten mittels statistischer Modelle wurde im Vergleich zum letzten Bericht erweitert. Durch den größeren Datensatz von zwei Jahren und durch die Verwendung von neuen Modellierungsansätzen konnten neue Zusammenhänge beschrieben werden. Nach dem schon im Vorjahr identifizierten Einflussfaktor DWV-B konnten nun auch ABPV als Einflussfaktor auf Winterverluste in Österreich beschrieben werden.

Nun folgt das dritte und letzte Probejahr, wobei die Probenahme schon mit Ende September 2020 erfolgreich abgeschlossen wurde. In den folgenden Monaten wird die molekularbiologische Analyse des dritten Probensets mittels der im ersten Jahr validierten Methoden erfolgen. Im Frühjahr 2021 wird das vollständige Datenset vorliegen und eine abschließende zusammenfassende Analyse der Ergebnisse der drei Projektjahre ermöglichen.

## 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**

Beproben 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 2.18: 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 2.19: 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 2.20: 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 2.21: 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 2.22: 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 2.23: 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 2.13 und Abbildung 2.24 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 2.13: 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 2.24 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

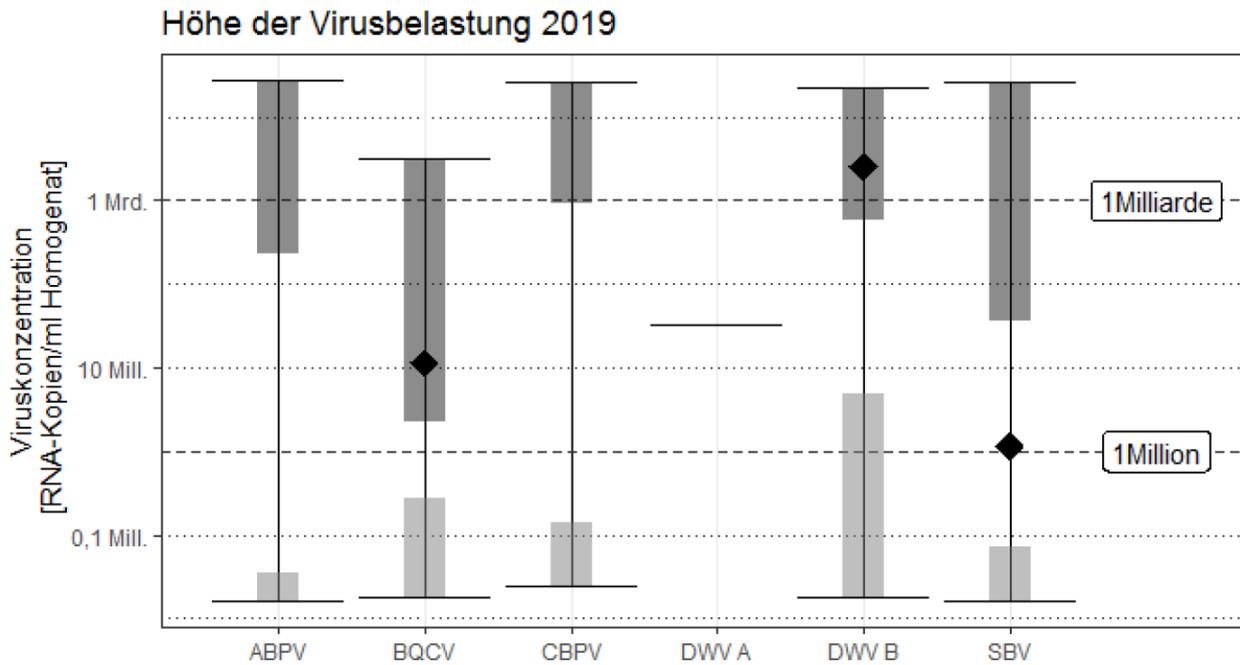


Abbildung 2.24: Ergebnis Bienenstand VIM\*\*\*

### Legende zur Grafik

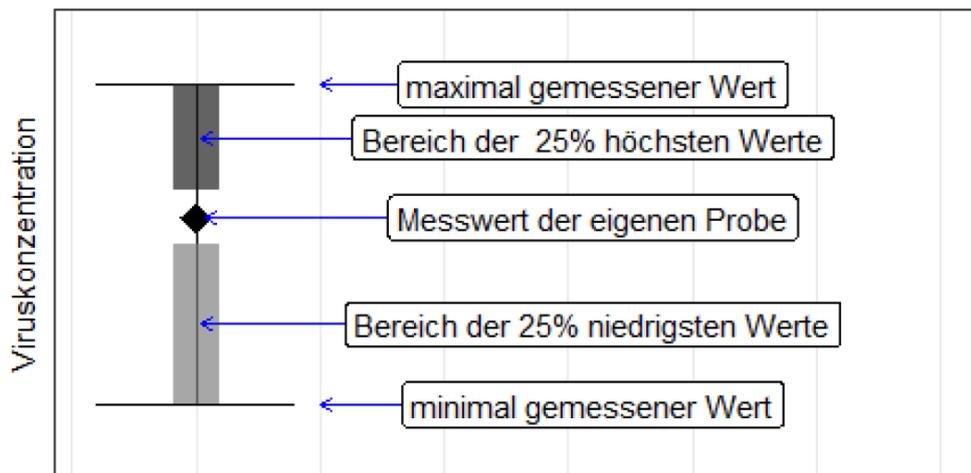


Abbildung 2.25: Legende zum Ergebnis

## 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 Probekäfige 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 Bienengenerationen.  
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?*

Tabelle 2.14: 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

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 2.14 sehen Sie den Zusammenhang zwischen Symptomen mit den untersuchten Viren.

*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 Futtermaterialien, 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 Futterversorgung 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 systeme“) 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 Methodik

Antikörper sind die Schlüsselreagenzien für die Etablierung der ELISA. Nach Virusanzucht in Bienenpuppen und Präparation der Virionen mittels Ultrazentrifugation können die Viruspartikel von ABPV, DWV und SBV gereinigt werden. Zusätzlich werden außerdem die Strukturproteine der Viren rekombinant in *E. Coli* exprimiert und 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 Virusneutralisations-Experimenten, Westernblot und Immunfluoreszenztest validiert und in der Kreuzkompetition getestet. Durch rekombinante Expression werden außerdem geeignete Boost-Antigene und Positivkontrollen generiert. 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 werden zur Etablierung diagnostischer ELISA genutzt. Dabei werden Probenlysis (Puffer, Zerkleinerung, Probenmaterial) und verschiedene ELISA-Systeme untersucht. Mit Hilfe von Feldproben, die vom Kooperationspartner AGES (Modul A) bereitgestellt werden sollen, werden die Verfahren optimiert und validiert.

### 3.2.1 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 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. Zur rekombinanten Expression von ABPV Strukturproteinen und der Produktion von ABPV wurden bereits Vorarbeiten geleistet.

## 3.3 Ergebnisse

### 3.3.1 Antigene

Bislang wurden Virusstocks von DWV, SBV und ABPV produziert, um die saisonale Bruttätigkeit der Honigbienen möglichst gut auszunutzen. Außerdem wurden rekombinante Proteine der verwendeten SBV und ABPV Stämme in bakteriellen Expressionssystemen (*E. Coli* Stamm: BL21 Rosetta) generiert. Um die Viren aus Feldproben möglichst effizient detektieren zu können, wurden die viralen Strukturproteine für die Proteinexpression ausgewählt. Das Strukturprotein VP1 des SBV sowie die Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 des ABPV konnten erfolgreich in Bakterien exprimiert und mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Das gereinigte Antigen VP1 des SBV wurde im Anschluss dazu verwendet, Mäuse zu immunisieren. Da es in diesem Versuch nicht gelang geeignete Antikörper Kandidaten zu identifizieren, wurde das Expressionskonstrukt modifiziert. Um ein stabileres und löslicheres Protein zu erhalten, wurde ein Fluoreszenzprotein (*mCherry*) an das virale Strukturprotein angeknüpft (Abbildung 3.1).

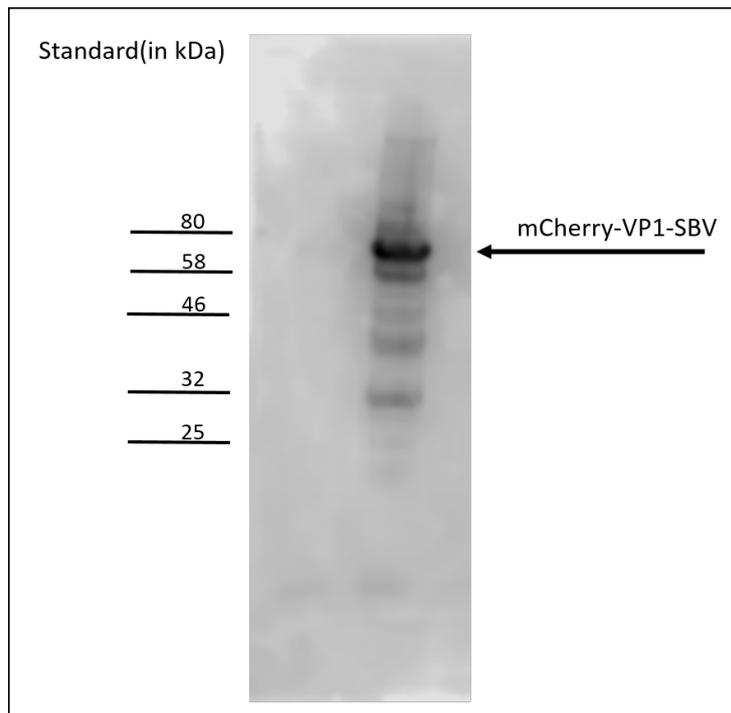


Abbildung 3.1: Proteinexpression des rekombinanten Fusionsproteins mCherry-VP1 des Sackbrutvirus (SBV).

Das modifizierte Antigen konnte erfolgreich exprimiert, gereinigt und zur Immunisierung von zwei Mäusen herangezogen werden (s.u.).

Für ABPV wurden insgesamt drei Strukturproteine (VP1, VP2 und VP3) exprimiert (Abbildung 3.2). Diese Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen (8M Urea) chromatographisch aufgereinigt. Mittels Dialyse wurden sie in einen, für die Immunisierung geeigneten, Puffer (PBS) verbracht und dabei langsam partiell renaturiert (Abbildung 3.3). Im Anschluss wurden die gereinigten Antigene zur Immunisierung zweier Versuchsmäuse herangezogen.

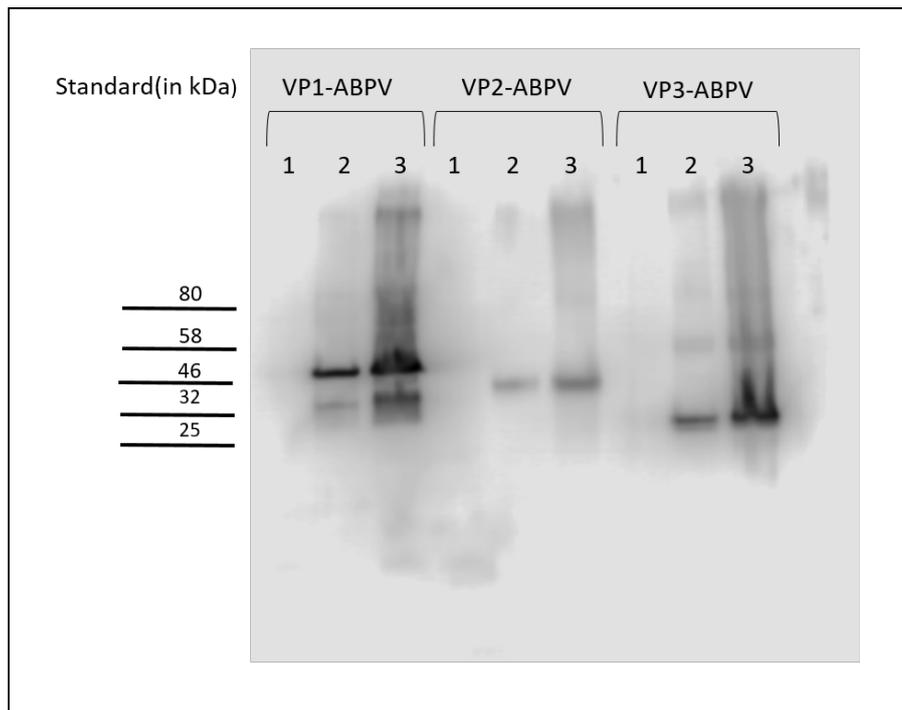


Abbildung 3.2: Proteinexpression der rekombinanten Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 des akuten Bienenparalysevirus (ABPV); 1 – nicht induzierte Bakterienkultur, 2 – induzierte Bakterienkultur nach 2.5h, 3 – induzierte Bakterienkultur nach 3.5h

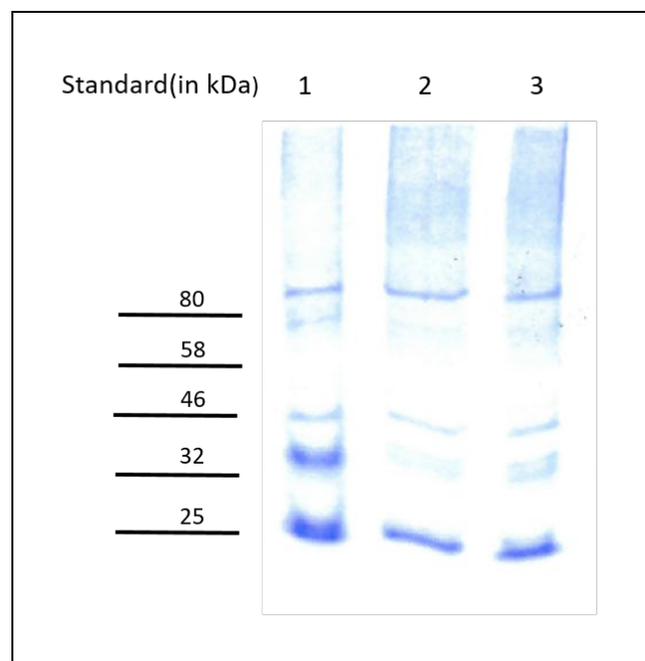


Abbildung 3.3: SDS-PAGE-Proteingel der rekombinanten Strukturproteine VP1, VP2, VP3 des ABPV, gefärbt mit Coomassie-Brilliant-Blau; 1 - Strukturproteine in 8M Urea, 2 - Strukturproteine in 2M Urea, 3 - Strukturproteine in PBS

Als Ergänzung zu den rekombinanten Proteinen wurde ein weiterer Ansatz für die Präparation der Virionen und das nachfolgende Screening der Antikörper gewählt. Dadurch können hochspezifische Antikörper gegen Bienenviren produziert werden, die ohne Denaturierung des Antigens in der Bienenprobe funktionieren sollen. Dieser Ansatz hat den Vorteil, dass die Probenaufarbeitung für den Imker vereinfacht wird. Das Problem bei früheren Viruspräparationen mit kontaminierenden Proteinen aus den Bienenlysaten wird dabei durch eine andere Art der Virusaufreinigung gelöst.

Dafür wurden neue Virusstocks von DWV, SBV und ABPV durch Infektion von Bienenbrut erzeugt (jeweils ca. 400 Bienenpuppen). 96h nach der Infektion wurden die Larven und Puppen mechanisch lysiert, zentrifugiert und das Lysat 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. Dazu wurden die sichtbaren Fraktionen einzeln mit einer Kanüle aus dem Zentrifugenröhrchen abgenommen und auf ein SDS-PAGE-Proteingel aufgetragen und mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt (Abbildung 3.5). Die gereinigten Virusantigene wurden im Anschluss zur Immunisierung von Mäusen herangezogen (s.u.) und sollen außerdem als Testantigene Verwendung finden.

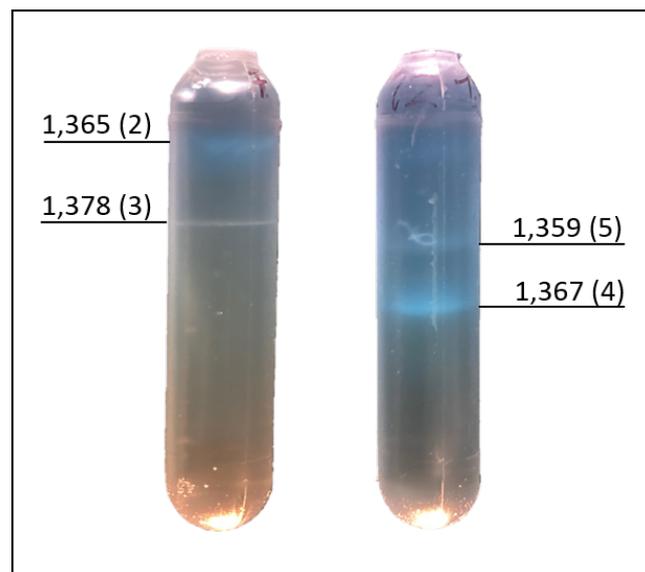


Abbildung 3.4: Präparation von ABPV mit Hilfe eines selbstformierenden Cäsiumchlorid Gradienten (1,4g/ml, 14h, 55.000 rpm). Die einzelnen Banden wurden im Anschluss abgenommen und getrennt auf ein SDS-PAGE-Proteingel aufgetragen und mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt. Dabei entsprechen die Zahlen in Klammern (2-5) den Spalten in Abbildung 3.5.

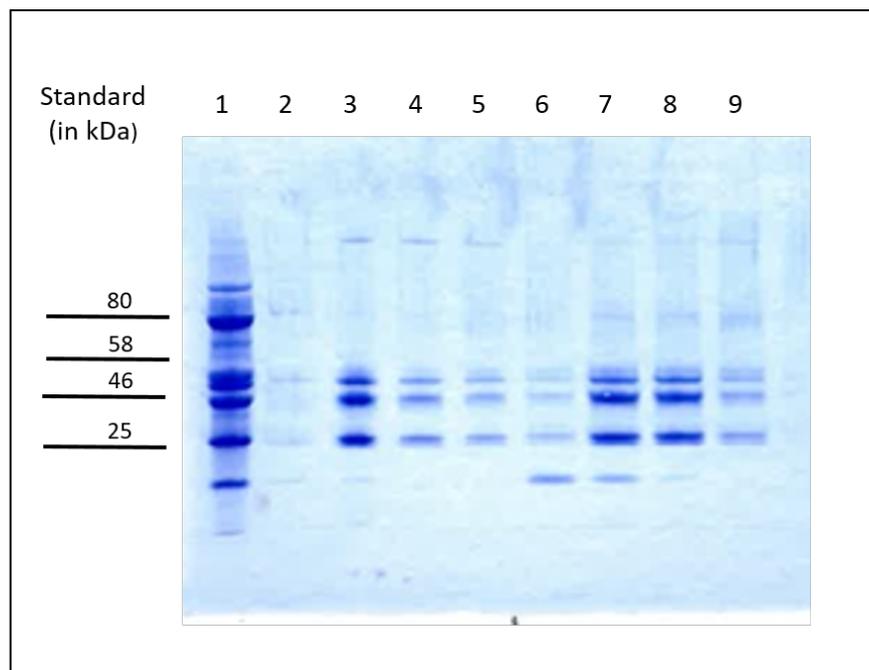


Abbildung 3.5: Präparation von ABPV, aufgetragen auf einem SDS-PAGE-Gel, gefärbt mit Coomassie-Brilliant-Blau. 1 - Viruspräparation nach einer ersten Zentrifugation. Diese wurde anschließend mittels selbstformierenden CsCl-Gradienten weiter aufgereinigt und die einzelnen Fraktionen auf das Gel aufgetragen (2-9). Die Virusproteine (VP1, VP2, VP3) sind deutlich zu erkennen, außerdem kann man auch das kleinste Strukturprotein (VP4) erkennen (6-8).

## 3.3.2 Immunisierungen

### 3.3.2.1 Sackbrutvirus (SBV)

Eine Maus wurden 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 kann 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 (sp2/0) fusioniert und Hybridomzellklone gewonnen.

Zusätzlich wurden zwei Mäuse mit der Viruspräparation von SBV immunisiert. Eine Serokonversion konnte nach vierwöchiger Immunisierung mit Antigen und Adjuvans im Westernblot bestätigt werden. Somit stehen diese Mäuse in Kürze zur finalen Boosterung und Fusion bereit.

### 3.3.2.2 Akutes Bienenparalysevirus (ABPV)

Zwei Mäuse wurden mit der Viruspräparation von ABPV (siehe Abbildung 3.4 sowie Abbildung 3.5) immunisiert. Die Immunisierung erfolgte über einen Zeitraum von vier Wochen mit dem Antigen und einem kommerziell erhältlichem Adjuvans. Im Anschluss wurde die Serokonversion mittels Blutentnahme im Westernblot bestätigt. Nach einer täglichen Boosterung der Mäuse in der sechsten Woche über insgesamt drei Tage, wurden die B-Lymphozyten der zwei Mäuse mit sp2/0-Zellen fusioniert und stehen für das Screening bereit.

Zusätzlich wurden zwei weitere Mäuse mit den rekombinanten, gereinigten ABPV Antigenen (VP1, VP2, VP3) über einen Zeitraum von vier Wochen immunisiert. Die Serokonversion konnte auch hier mittels Blutentnahme im Westernblot bestätigt werden (siehe Abbildung 3.6). Die Mäuse wurden mit sp2/0 Zellen fusioniert und befinden sich derzeit in Selektion.

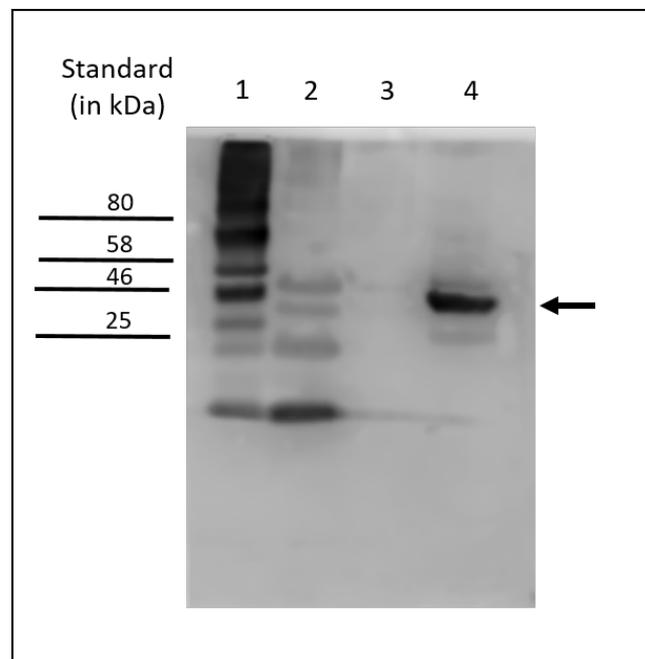


Abbildung 3.6: Westernblot mit dem Serum (1:2000 verdünnt) einer der mit rekombinanten VP1, VP2 und VP3 immunisierten Mäuse; 1: rekombinante Proteine (VP1, VP2, VP3) 2: Lysat aus *E. coli* 3: Negativkontrolle 4: gereinigte ABPV Viruspräparation; insbesondere die Reaktivität des Serums gegen VP1 (Pfeil) zeigt ein besonders deutliches Signal.

## 3.3.3 Antikörper

### 3.3.3.1 Flügeldeformationsvirus (DWV)

Eine Testung und Produktion der vielversprechendsten anti-DWV Immunglobuline wurde gestartet. Die entsprechenden Hybridome wurden in Kultur genommen und es wurde begonnen, serumfreie Zellkulturen dieser Hybridome zu etablieren. Zur Reinigung der betreffenden IgG1 Antikörper der Maus mittels Protein-G-Affinitätschromatographie ist eine serumfreie Kultur

Voraussetzung, da ansonsten kontaminierende IgGs aus dem Kälberserum mit gereinigt werden. Gleichzeitig wurden die Nukleotid-Sequenzen der Immunglobuline zweier Hybridome (DWV-VP1A1 und DWV-VP1B1) bestimmt, um eine rekombinante Expression der Antikörper und eine Manipulation der Moleküle zu ermöglichen. Zur Etablierung der gewünschten Sandwich-ELISA sollen rekombinante Moleküle mit anderen FC-Regionen erzeugt werden, um kostengünstige, kommerziell erhältliche Sekundärantikörper verwenden zu können. Erste bakterielle Plasmide, die chimäre Immunglobuline kodieren, wurden bereits generiert. Erste Ergebnisse zur Reaktivität der chimären Antikörper zeigen eine hohe Reaktivität mit den authentischen Virusproteinen von DWV im Westernblot und in Immunfluoreszenz-Assays. Eine präparative Expression und Reinigung der Antikörper von den betreffenden Klonen (anti-DWV VP1A1 und anti-DWV VP1B1) wurden vorbereitet.

### 3.3.3.2 Sackbrutvirus (SBV)

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. Sie werden derzeit auf  $-150^{\circ}\text{C}$  gelagert und nach Aufreinigung des o.g. SBV Virusstocks weiter charakterisiert.

### 3.3.3.3 Akutes Bienenparalysevirus (ABPV)

#### 3.3.3.3.1 Antikörper gegen das hochreine Virus

Die Fusion der B-Lymphozyten zweier Mäuse mit Myelomzellen (sp2/0) wurde planmäßig durchgeführt. Dabei konnten insgesamt 11 96-well Zellkulturplatten mit jeweils mindestens einem Hybridomzellklon hochgezogen werden. Aufgrund der Immunisierung mit der gereinigten Viruspräparation kann das Screening nicht mittels ELISA erfolgen, da es unter Umständen erneut zu unerwünschten Kreuzreaktionen (und damit falsch positiven Zellklonen) mit Bienenproteinen kommen könnte. Außerdem bindet das Virus nur unzureichend an ELISA-Platten.

Daher wird für das Screening ein anderes Verfahren eingesetzt. Das Grundprinzip des Screenings basiert auf dem spezifischen Fangen von Virus mithilfe immobilisierter Antikörper aus den Hybridomüberständen und die anschließende Analyse der gebundenen Virusmenge mittels RT-qPCR. Dazu werden die Antikörper aus dem Hybridomüberstand an magnetische Beads, die mit rekombinanten Protein A/G gekoppelt sind, gebunden. Die gebundenen Antikörper werden mit Virus inkubiert, gewaschen und der Antikörper-Antigen-Komplex von den Beads eluiert. Im Anschluss wird die gebundene Virusmenge mittels RT-qPCR analysiert.

Die grundsätzliche Durchführbarkeit ("proof of principle") dieser Methode wurde bereits mit dem Serum der immunisierten Mäuse erfolgreich getestet und die Hybridomzellen werden in Kürze gescreent. Da Protein A/G die Eigenschaft hat, Immunglobulin G verschiedener Tierarten zu binden, wurden die Hybridome bereits an ein Zellkulturmedium, das fetales Kälberserum (FKS) mit einem extrem niedrigen bovinen IgG-Gehalt enthält, adaptiert. Damit kann beim Screening die Konkurrenz um die Bindungsstellen verringert werden.

### 3.3.3.3.2 Antikörper gegen die rekombinanten Strukturproteine VP1, VP2 und VP3

Zwei Mäuse wurden über einen Zeitraum von 4 Wochen mit den rekombinanten Antigenen und Adjuvans immunisiert und die Serokonversion wurde mittels Blutentnahme im Westernblot bestätigt. Anschließend erfolgte die Fusion mit den Myelomzellen und die Hybridome befinden sich derzeit im Selektionsmedium und können in Kürze initial mit ELISA gescreent werden.

### 3.3.4 ELISA-Tests mit definierten Proben

Es wurden noch keine ELISA-Tests mit im Labor erzeugten, Antigen-definierten Proben aus Virusinfektionen durchgeführt. Allerdings wurden die entsprechenden, definierten Proben erzeugt (s.o.).

### 3.3.5 ELISA-Tests mit Feldproben

Es wurden noch keine ELISA-Tests mit Feldproben durchgeführt.

## 3.4 Diskussion

Nach gegenwärtigem Stand der Forschung sind 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. Die Belastung mit diesen Varroa-assoziierten Viren lässt sich daher auch als ein prädiktiver Marker für den Zusammenbruch eines Bienenvolkes verwenden. Die Virusdiagnostik basiert auf sehr sensitiven molekularbiologischen RT-qPCR Methoden, bei denen jedoch hohe Laborkosten von mindestens 20 € für die Nukleinsäure-Extraktion und 15-20 € je Virusnachweis entstehen (je nach Sensitivität). Eine Untersuchung auf die drei Viren würde also mindestens 65 bis 80 € kosten. Trotz des vergleichsweise hohen Wertes eines Bienenvolkes von mehr als 200 € bei starken Kolonien mit Reinzuchtkönigin ist eine Untersuchung der Virenbelastung daher unwirtschaftlich. In Massentests zur Diagnostik in der Humanmedizin und auch zur Tierseuchenbekämpfung werden meist serologische Verfahren genutzt, da sie unempfindlich gegenüber der Probenlagerung, sehr sensitiv und wesentlich kostengünstiger sind.

In dem hier vorgestellten Projekt werden bereits vorhandene Reagenzien gegen Struktur- und Nichtstrukturproteine von DWV genutzt und neue Reagenzien gegen SBV und ABPV generiert, um serologische Testverfahren zu etablieren. Ziel des Projektes ist die Entwicklung plattenbasierter Hochdurchsatztests, die im Massentest Analysen zu einem Preis zwischen 5 und 10 € ermöglichen. Die Entwicklung handelsüblicher „On-site“ Tests im Lateral-Flow-Format (z.B. COVID-19 Schnelltest, Schwangerschaftstest) soll dem Imker die Möglichkeit eröffnen, die Kolonien im Verdachtsfall vor Ort zu testen. Da bei der Diagnostik am Stock Versand- und Transportaufwand entfallen und der Imker unmittelbar vor Ort handeln kann, werden solche Testverfahren trotz höherer Assaykosten (ca. 20-30 € pro Schnelltest) sehr hilfreich sein. Erste Versuche mit den bereits vorhandenen Reagenzien gegen DWV ergaben, dass einige der Antikörper in Immun-Fluoreszenzmarkierungen und Westernblot-Applikationen die viralen Antigene hochspezifisch binden (Lamp et al., 2016). Die neuen Reagenzien und Testverfahren sollen helfen, die Verluste der Imkereien einzudämmen, da positive Untersuchungsergebnisse im Spätsommer eine Sanierung (z. B. Kunstschwarmbildung mit neuer Königin) oder eine Auflösung der Völker ermöglichen, bevor sichtbare Schäden auftreten.

## Veröffentlichungen und Vortragstätigkeit im Zeitraum der Projektdauer (22. Dezember 2017 bis 30. Oktober 2020)

### Projektbezogene Publikationen:

- Linde Morawetz, Hemma Köglberger, Antonia Griesbacher, Irmgard Derakhshifar, Karl Crailsheim, Robert Brodschneider und Rudolf Moosbeckhofer (2019a). „Health Status of Honey Bee Colonies (*Apis Mellifera*) and Disease-Related Risk Factors for Colony Losses in Austria“. In: *Plos One* 14.7, e0219293. DOI: [10.1371/journal.pone.0219293](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219293)
- Robert Brodschneider, Kristina Gratzer, 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“. In: *Scientific Reports* 9.1, S. 16633. ISSN: 2045-2322. 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“. In: *Diversity* 12.3, S. 99. ISSN: 1424-2818. 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“. In: *Journal of Apicultural Research*, S. 1–8. ISSN: 0021-8839, 2078-6913. DOI: [10.1080/00218839.2020.1797272](https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1797272)

### 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

#### Projektbezogene Vorträge Science to Stakeholders

- 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, Altlangbach 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

### 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;

### 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://citizen-science.at)
- derstandard.at. 13.06.2019. So schlimm steht es wohl doch nicht um unser liebstes Insekt. [derstandard.at](https://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://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)

## Abkürzungsverzeichnis

- ABCDS** Die fünf Viren ABPV, BQCV, CBPV, DWV und SBV zusammengefasst
- ABPV** Akute Bienenparalyse Virus
- AGES** Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit
- 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
- EU-RL** EU-Referenzlabor
- GLZM** Generalisiertes Lineares Modell
- IAPV** Israelisches Akute Bienenparalyse-Virus
- KBV** Kashmir-Bienenvirus
- LOD und LOQ** Limit of Detection, Limit of Quantifikation
- MOBI** Abteilung für Molekularbiologie des Institutes für veterinärmedizinische Untersuchungen  
Mödling der AGES
- Q1** Unteres Quartil, 25% der Werte eines Datensatzes liegen darunter
- Q3** Oberes Quartil, 25% der Werte eines Datensatzes liegen darüber
- RT-qPCR** Reverse Transkriptase quantitative PCR
- SBV** Sackbrutvirus
- SOP** Standard operating procedure
- VDV-1** *Varroa destructor* Virus-1 (=DWV-B)

# Literatur

- Al Toufailia, Hasan, Luciano Scandian und Francis L W Ratnieks (2015). „Towards Integrated Control of Varroa: 2) Comparing Application Methods and Doses of Oxalic Acid on the Mortality of Phoretic *Varroa Destructor* Mites and Their Honey Bee Hosts“. In: *Journal of Apicultural Research* 54.2, S. 108–120. ISSN: 0021-8839, 2078-6913. DOI: [10.1080/00218839.2015.1106777](https://doi.org/10.1080/00218839.2015.1106777) (siehe S. 66).
- Alburaki, M. et al. (2017). „Performance of Honeybee Colonies Located in Neonicotinoid-Treated and Untreated Cornfields in Quebec“. In: *Journal of Applied Entomology* 141.1-2, S. 112–121. ISSN: 09312048. DOI: [10.1111/jen.12336](https://doi.org/10.1111/jen.12336) (siehe S. 9).
- Alkassab, Abdulrahim T. et al. (2020). „Effect of Contamination and Adulteration of Wax Foundations on the Brood Development of Honeybees“. In: *Apidologie* 51.4, S. 642–651. ISSN: 0044-8435, 1297-9678. DOI: [10.1007/s13592-020-00749-2](https://doi.org/10.1007/s13592-020-00749-2) (siehe S. 59).
- 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?“. In: *Journal of Economic Entomology* 97.3, S. 741–747. ISSN: 1938-291X, 0022-0493. DOI: [10.1093/jee/97.3.741](https://doi.org/10.1093/jee/97.3.741) (siehe S. 8, 75).
- Amiri, Esmail et al. (2015). „Four Categories of Viral Infection Describe the Health Status of Honey Bee Colonies“. In: *PLOS ONE* 10.10, e0140272. DOI: [10.1371/journal.pone.0140272](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140272) (siehe S. 75, 121, 122).
- 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“. In: *Insects* 8.2, S. 22–26. ISSN: 20754450. DOI: [10.3390/insects8020048](https://doi.org/10.3390/insects8020048) (siehe S. 68).
- Amiri, Esmail et al. (2020). „Honey Bee Queens and Virus Infections“. In: *Viruses* 12.3, S. 322. ISSN: 1999-4915. DOI: [10.3390/v12030322](https://doi.org/10.3390/v12030322) (siehe S. 68).
- Anderson, Denis L. (1984). „A comparison of serological techniques for detecting and identifying honeybee viruses“. In: *Journal of Invertebrate Pathology* 44, S. 233–243 (siehe S. 139).
- Auguie, Baptiste (2017). *gridExtra: Miscellaneous Functions for "Grid" Graphics*. R package version 2.3. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=gridExtra> (siehe S. 94).
- 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“. In: *Frontiers in Microbiology* 10 (June). DOI: [10.3389/fmicb.2019.01331](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01331) (siehe S. 10, 122, 123).
- Belsky und Joshi (2019). „Impact of Biotic and Abiotic Stressors on Managed and Feral Bees“. In: *Insects* 10.8, S. 233. ISSN: 2075-4450. DOI: [10.3390/insects10080233](https://doi.org/10.3390/insects10080233) (siehe S. 6, 7).
- Benaets, Kristof et al. (2017). „Covert Deformed Wing Virus Infections Have Long-Term Deleterious Effects on Honeybee Foraging and Survival“. In: *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 284.1848, S. 20162149. ISSN: 0962-8452, 1471-2954. DOI: [10.1098/rspb.2016.2149](https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2149) (siehe S. 8).
- Berényi, Olga et al. (2006). „Occurrence of Six Honeybee Viruses in Diseased Austrian Apiaries“. In: *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. 75, 76).

- Berry, Jennifer A. und Keith S. Delaplane (2001). „Effects of Comb Age on Honey Bee Colony Growth and Brood Survivorship“. In: *Journal of Apicultural Research* 40.1, S. 3–8. ISSN: 20786913. DOI: [10.1080/00218839.2001.11101042](https://doi.org/10.1080/00218839.2001.11101042) (siehe S. 61).
- Berthoud, Hélène et al. (2010). „Virus infections and winter losses of honey bee colonies (*Apis mellifera*)“. In: *Journal of Apicultural Research* 49.1, S. 60–65. ISSN: 0021-8839. DOI: [10.3896/IBRA.1.49.1.08](https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.08) (siehe S. 75, 122, 123).
- Bieńkowska, Małgorzata, Aleksandra Łoś und Paweł Węgrzynowicz (2020). „Honey Bee Queen Replacement: An Analysis of Changes in the Preferences of Polish Beekeepers Through Decades“. In: *Insects* 11.8, S. 544. ISSN: 2075-4450. DOI: [10.3390/insects11080544](https://doi.org/10.3390/insects11080544) (siehe S. 68).
- Biesmeijer, J. C. (2006). „Parallel Declines in Pollinators and Insect-Pollinated Plants in Britain and the Netherlands“. In: *Science* 313.5785, S. 351–354. ISSN: 0036-8075, 1095-9203. DOI: [10.1126/science.1127863](https://doi.org/10.1126/science.1127863) (siehe S. 6).
- 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“. In: *Journal of Virological Methods* 141.1, S. 7–13. ISSN: 0166-0934. DOI: [10.1016/j.jviromet.2006.11.021](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.021) (siehe S. 87, 88).
- 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“. In: *Journal of Invertebrate Pathology* 97.2, S. 182–185. ISSN: 0022-2011. DOI: [10.1016/j.jip.2007.07.003](https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.07.003) (siehe S. 85, 90).
- 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“. In: *Journal of Virological Methods* 197. Supplement C, S. 7–13. ISSN: 0166-0934. DOI: [10.1016/j.jviromet.2013.09.012](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.09.012) (siehe S. 87, 88).
- Bowen-Walker, P. L., S. J. Martin und A. Gunn (1999). „The Transmission of Deformed Wing Virus between Honeybees (*Apis mellifera* L.) by the Ectoparasitic Mite *Varroa jacobsoni*“. In: *Journal of Invertebrate Pathology* 73.1, S. 101–106. ISSN: 1096-0805 (Electronic) 0022-2011 (Linking). DOI: [10.1006/jipa.1998.4807](https://doi.org/10.1006/jipa.1998.4807) (siehe S. 75, 121, 123).
- Breiman, Leo (1996). „Stacked regressions“. In: *Machine learning* 24.1, S. 49–64 (siehe S. 94).
- Breiman, Leo et al. (1984). *Classification and Regression Trees*. Boca Raton: Repr. Chapman & Hall (siehe S. 93).
- Brodtschneider, Robert, Jan Brus und Jiří Danihlík (2019a). „Comparison of Apiculture and Winter Mortality of Honey Bee Colonies (*Apis Mellifera*) in Austria and Czechia“. In: *Agriculture, Ecosystems & Environment* 274, S. 24–32. ISSN: 0167-8809. DOI: [10.1016/J.AGEE.2019.01.002](https://doi.org/10.1016/J.AGEE.2019.01.002) (siehe S. x, 7, 10, 56, 64, 68).
- Brodtschneider, Robert und Karl Crailsheim (2011). „Völkerverluste Der Honigbiene: Risikofaktoren Für Die Bestäubungssicherheit in Österreich“. In: *Entomologica Austriaca* 18, S. 73–86 (siehe S. 8, 9).
- Brodtschneider, Robert und Karl Crailsheim (2013). „Fünf Jahre Untersuchung des Bienensterbens in Österreich.“ In: *Entomologica Austriaca* 20, S. 195–205 (siehe S. 7, 9, 10, 12, 62, 65).
- Brodtschneider, Robert, Elfriede Kalcher-Sommersguter und S. Klinger (2018a). *Zukunft Biene - Endbericht, Forschungsnummer: 100972*. URL: <http://www.zukunft-biene.at/> (siehe S. 119).

- Brodschneider, 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“. In: *Journal of Apicultural Research* 49.1, S. 23–30. ISSN: 0021-8839. DOI: [10.3896/ibra.1.49.1.04](https://doi.org/10.3896/ibra.1.49.1.04) (siehe S. 7, 10, 59).
- Brodschneider, Robert, Linde Morawetz und Benjamin Lamp (2018b). *Zukunft Biene 2 - 1. Zwischenbericht, Forschungsnummer: 101295*. URL: <http://www.zukunft-biene.at/> (siehe S. 56–58, 61).
- Brodschneider, Robert, Linde Morawetz und Benjamin Lamp (2019b). *Zukunft Biene 2 - 2. Zwischenbericht, Forschungsnummer: 101295*. URL: <http://www.zukunft-biene.at/> (siehe S. 56–58, 83, 93, 119–121).
- Brodschneider, Robert et al. (2016). „Preliminary Analysis of Loss Rates of Honey Bee Colonies during Winter 2015/16 from the COLOSS Survey“. In: *Journal of Apicultural Research* 55.5, S. 375–378. ISSN: 0021-8839. DOI: [10.1080/00218839.2016.1260240](https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1260240) (siehe S. 7, 10, 54, 58, 83, 124).
- Brodschneider, Robert et al. (2018c). „Multi-Country Loss Rates of Honey Bee Colonies during Winter 2016/2017 from the COLOSS Survey“. In: *Journal of Apicultural Research* 57.3, S. 452–457. ISSN: 20786913. DOI: [10.1080/00218839.2018.1460911](https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1460911) (siehe S. 7, 10, 54, 58, 59, 83, 124).
- Brodschneider, Robert et al. (2019c). „A Citizen Science Supported Study on Seasonal Diversity and Monoflorality of Pollen Collected by Honey Bees in Austria“. In: *Scientific Reports* 9.1, S. 16633. ISSN: 2045-2322. DOI: [10.1038/s41598-019-53016-5](https://doi.org/10.1038/s41598-019-53016-5) (siehe S. x, 62, 150).
- Büchler, R. et al. (2020). „Summer Brood Interruption as Integrated Management Strategy for Effective Varroa Control in Europe“. In: *Journal of Apicultural Research*, S. 1–10. ISSN: 0021-8839, 2078-6913. DOI: [10.1080/00218839.2020.1793278](https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1793278) (siehe S. 60, 65, 67).
- Budge, Giles et al. (2015a). „Evidence for Pollinator Cost and Farming Benefits of Neonicotinoid Seed Coatings on Oilseed Rape“. In: *Scientific Reports* 5.1, S. 12574. ISSN: 2045-2322. DOI: [10.1038/srep12574](https://doi.org/10.1038/srep12574) (siehe S. 7).
- Budge, Giles et al. (2015b). „Pathogens as Predictors of Honey Bee Colony Strength in England and Wales“. In: *PLOS ONE* 10.7. Hrsg. von Olav Rueppell, e0133228. ISSN: 1932-6203. DOI: [10.1371/journal.pone.0133228](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133228) (siehe S. 7, 8).
- Calatayud-Vernich, Pau et al. (2018). „Pesticide Residues in Honey Bees, Pollen and Beeswax: Assessing Beehive Exposure“. In: *Environmental Pollution* 241, S. 106–114. ISSN: 18736424. DOI: [10.1016/j.envpol.2018.05.062](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.062) (siehe S. 59, 62).
- Calderone, N. 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. In: *Journal of Economic Entomology* 98.3, S. 645–650. ISSN: 00220493, 00220493. DOI: [10.1603/0022-0493-98.3.645](https://doi.org/10.1603/0022-0493-98.3.645) (siehe S. 65).
- Cameron, S. A. et al. (2011). „Patterns of Widespread Decline in North American Bumble Bees“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.2, S. 662–667. ISSN: 0027-8424, 1091-6490. DOI: [10.1073/pnas.1014743108](https://doi.org/10.1073/pnas.1014743108) (siehe S. 6).
- Carreck, Norman L., Brenda V. Ball und Stephen J. Martin (2010). „Honey bee colony collapse and changes in viral prevalence associated with *Varroa destructor*“. In: *Journal of Apicultural Research* 49.1, S. 93–94 (siehe S. 75).
- Castillos, Dayson et al. (2019). „Bee Colony Losses in Brazil: A 5-Year Online Survey“. In: *Apidologie*. ISSN: 0044-8435. DOI: [10.1007/s13592-019-00642-7](https://doi.org/10.1007/s13592-019-00642-7) (siehe S. 7).

- 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.“ In: *Journal of Invertebrate Pathology* 91, S. 69–73 (siehe S. 87–89).
- Charrière, J. et al. (1998). „Ausschneiden von Drohnenbrut: Eine Wirksame Massnahme Zur Reduktion Des Varroabefalls“. In: *Schweizerisches Zentrum fuer Bienenforschung*, S. 1–10 (siehe S. 65).
- Chauzat, Marie-Pierre et al. (2016). „Risk Indicators Affecting Honeybee Colony Survival in Europe: One Year of Surveillance“. In: *Apidologie* 47.3, S. 348–378. ISSN: 0044-8435, 1297-9678. DOI: [10.1007/s13592-016-0440-z](https://doi.org/10.1007/s13592-016-0440-z) (siehe S. 7, 124).
- 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.)“ In: *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. 88).
- 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. 75).
- Chen, Yan Ping et al. (2004). „Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*“. In: *Apidologie* 35.4, S. 441–448. DOI: [10.1051/apido:2004031](https://doi.org/10.1051/apido:2004031) (siehe S. 75).
- 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“. In: *Journal of Apicultural Science* 59.1, S. 59–73. ISSN: 2299-4831. DOI: [10.1515/jas-2015-0005](https://doi.org/10.1515/jas-2015-0005) (siehe S. 6).
- Colin, Théotime et al. (2019). „Effects of thymol on European honey bee hygienic behaviour“. In: *Apidologie* 50.2, S. 141–152. ISSN: 12979678. DOI: [10.1007/s13592-018-0625-8](https://doi.org/10.1007/s13592-018-0625-8) (siehe S. 67).
- Cornman, R. Scott et al. (2012). „Pathogen Webs in Collapsing Honey Bee Colonies“. In: *PLoS ONE* 7.8. Hrsg. von Sarah K. Highlander, e43562. ISSN: 1932-6203. DOI: [10.1371/journal.pone.0043562](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043562) (siehe S. 6).
- Cox-Foster, Diana L. et al. (2007). „A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder“. In: *Science* 318.5848, S. 283–287. DOI: [10.1126/science.1146498](https://doi.org/10.1126/science.1146498) (siehe S. 75, 89).
- Crailsheim, Karl et al. (2018). *Future of Honey Bees - Basic Research for Project for Honey Bee Health and Bee Protection* (siehe S. 7, 56–61, 64, 65).
- Dahle, Bjørn (2010). „The Role of *Varroa Destructor* for Honey Bee Colony Losses in Norway“. In: *Journal of Apicultural Research* 49.1, S. 124–125. ISSN: 0021-8839. DOI: [10.3896/ibra.1.49.1.26](https://doi.org/10.3896/ibra.1.49.1.26) (siehe S. 8, 63).
- Dainat, Benjamin und Peter Neumann (2013). „Clinical signs of deformed wing virus infection are predictive markers for honey bee colony losses“. In: *Journal of Invertebrate Pathology* 112.3, S. 278–280. ISSN: 0022-2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.12.009> (siehe S. 123).
- Dainat, Benjamin et al. (2012). „Predictive Markers of Honey Bee Colony Collapse“. In: *PLoS ONE* 7.2. Hrsg. von Patricia V. Aguilar, e32151. ISSN: 1932-6203. DOI: [10.1371/journal.pone.0032151](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032151) (siehe S. 57, 75, 122, 139).
- De Miranda, Joachim R., Guido Cordoni und Giles Budge (2010). „The Acute bee paralysis virus–Kashmir bee virus–Israeli acute paralysis virus complex“. In: *Journal of Invertebrate*

- Pathology* 103, Supplement.0, S30–S47. ISSN: 0022-2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.014> (siehe S. 89, 90).
- 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. 76).
- 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. 121).
- DeGrandi-Hoffman, Gloria und Yanping Chen (2015). „Nutrition, Immunity and Viral Infections in Honey Bees“. In: *Current Opinion in Insect Science* 10, S. 170–176. ISSN: 22145745. DOI: [10.1016/j.cois.2015.05.007](https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.007) (siehe S. 9, 121).
- Di Pasquale, Garance et al. (2016). „Variations in the Availability of Pollen Resources Affect Honey Bee Health“. In: *PLoS ONE* 11.9, S. 1–15. ISSN: 19326203. DOI: [10.1371/journal.pone.0162818](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162818) (siehe S. 62).
- Di Prisco, G. et al. (2013). „Neonicotinoid Clothianidin Adversely Affects Insect Immunity and Promotes Replication of a Viral Pathogen in Honey Bees“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.46, S. 18466–18471. ISSN: 0027-8424, 1091-6490. DOI: [10.1073/pnas.1314923110](https://doi.org/10.1073/pnas.1314923110) (siehe S. 9).
- Döke, Mehmet Ali, Maryann Frazier und Christina M Grozinger (2015). „Overwintering Honey Bees: Biology and Management“. In: *Current Opinion in Insect Science* 10, S. 185–193. ISSN: 22145745. DOI: [10.1016/j.cois.2015.05.014](https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.014) (siehe S. 7).
- 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. 91).
- Dussaubat, Claudia et al. (2016). „Combined Neonicotinoid Pesticide and Parasite Stress Alter Honeybee Queens’ Physiology and Survival“. In: *Scientific Reports* 6.1, S. 31430. ISSN: 2045-2322. DOI: [10.1038/srep31430](https://doi.org/10.1038/srep31430) (siehe S. 7).
- 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“. In: *PLoS ONE* 14.5. Hrsg. von James C. Nieh, e0216286. ISSN: 1932-6203. DOI: [10.1371/journal.pone.0216286](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216286) (siehe S. 57, 60).
- El Agrebi, Noémie et al. (2020). „Pesticide and Veterinary Drug Residues in Belgian Beeswax: Occurrence, Toxicity, and Risk to Honey Bees“. In: *Science of The Total Environment* 745, S. 141036. ISSN: 00489697. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2020.141036](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141036) (siehe S. 59).
- Fanny, Mondet et al. (2020). „Honey Bee Survival Mechanisms against the Parasite *Varroa Destructor*: A Systematic Review of Phenotypic and Genomic Research Efforts“. In: *International Journal for Parasitology*, S002075192030093X. ISSN: 00207519. DOI: [10.1016/j.ijpara.2020.03.005](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.03.005) (siehe S. 60).
- 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“. In: *Chemosphere*, S. 127735. ISSN: 00456535. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2020.127735](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127735) (siehe S. 62).
- Flügel, Hans-Joachim (2015). „Von Columella Bis CCD - Das Bienensterben Im Wandel Der Zeit (Hymenoptera: Apidae).“ In: *Entomologische Zeitschrift* 125, S. 27–40 (siehe S. 6, 7).

- Forfert, Nadège et al. (2015). „Parasites and Pathogens of the Honeybee (*Apis mellifera*) and Their Influence on Inter-Colonial Transmission“. In: *PLOS ONE* 10.10, e0140337. DOI: [10.1371/journal.pone.0140337](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140337) (siehe S. 121).
- Forfert, Nadège et al. (2016). „Viral Prevalence Increases with Regional Colony Abundance in Honey Bee Drones (*Apis Mellifera* L)“. In: *Infection, Genetics and Evolution* 44, S. 549–554. ISSN: 15671348. DOI: [10.1016/j.meegid.2016.07.017](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.07.017) (siehe S. 9, 57, 60, 121).
- Fries, Ingemar und Scott Camazine (2001). „Implications of Horizontal and Vertical Pathogen Transmission for Honey Bee Epidemiology“. In: *Apidologie* 32.3, S. 199–214. ISSN: 0044-8435, 1297-9678. DOI: [10.1051/apido:2001122](https://doi.org/10.1051/apido:2001122) (siehe S. 9, 57, 60).
- Gallai, Nicola et al. (2009). „Economic Valuation of the Vulnerability of World Agriculture Confronted with Pollinator Decline“. In: *Ecological Economics* 68.3, S. 810–821. ISSN: 0921-8009. DOI: [10.1016/J.ECOLECON.2008.06.014](https://doi.org/10.1016/J.ECOLECON.2008.06.014) (siehe S. 6).
- Genersch, Elke et al. (2010). „The German Bee Monitoring Project: A Long Term Study to Understand Periodically High Winter Losses of Honey Bee Colonies“. In: *Apidologie* 41.3, S. 332–352. ISSN: 0044-8435. DOI: [10.1051/apido/2010014](https://doi.org/10.1051/apido/2010014) (siehe S. 7, 8, 68, 75, 122, 123).
- GeoNames (o.D.). *GeoNames*. URL: <https://www.geonames.org/> (siehe S. 12).
- Giacobino, Agostina et al. (2016). „Queen Replacement: The Key to Prevent Winter Colony Losses in Argentina“. In: *Journal of Apicultural Research* 55.4, S. 335–341. ISSN: 0021-8839. DOI: [10.1080/00218839.2016.1238595](https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1238595) (siehe S. 68).
- 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“. In: *Final report („MELISSA“; Dafne Proj. Nr. 100472)* (siehe S. 75, 76, 120).
- Gisder, Sebastian, Pia Aumeier und Elke Genersch (2009). „Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*)“. In: *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. 123).
- Goeman, Jelle J (2010). „L1 penalized estimation in the Cox proportional hazards model“. In: *Biometrical Journal* 52 (1), S. 70–84 (siehe S. 94).
- Goulson, Dave (2013). „REVIEW: An Overview of the Environmental Risks Posed by Neonicotinoid Insecticides“. In: *Journal of Applied Ecology* 50.4. Hrsg. von David Kleijn, S. 977–987. ISSN: 00218901. DOI: [10.1111/1365-2664.12111](https://doi.org/10.1111/1365-2664.12111) (siehe S. 6).
- Goulson, Dave et al. (2015). „Bee Declines Driven by Combined Stress from Parasites, Pesticides, and Lack of Flowers“. In: *Science*. ISSN: 10959203. DOI: [10.1126/science.1255957](https://doi.org/10.1126/science.1255957) (siehe S. 7, 10, 62).
- 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“. In: *Journal of Apicultural Research* 0.0, S. 1–7. ISSN: 0021-8839. DOI: [10.1080/00218839.2019.1615661](https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1615661) (siehe S. 7, 62, 63, 68).
- 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“. In: *Journal of Apicultural Research*, S. 1–8. ISSN: 0021-8839, 2078-6913. DOI: [10.1080/00218839.2020.1797272](https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1797272) (siehe S. 58, 59, 68, 150).
- 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. 94).

- Hall, Thomas A (1999). „BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.“ In: *Nucleic Acids Symposium Series* 41, S. 95–98 (siehe S. 89).
- Hallmann, Caspar A. et al. (2017). „More than 75 Percent Decline over 27 Years in Total Flying Insect Biomass in Protected Areas“. In: *PLOS ONE* 12.10. Hrsg. von Eric Gordon Lamb, e0185809. ISSN: 1932-6203. DOI: [10.1371/journal.pone.0185809](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185809) (siehe S. 6).
- Harriet, Jorge et al. (2017). „Agricultural Pesticides and Veterinary Substances in Uruguayan Beeswax“. In: *Chemosphere* 177, S. 77–83. ISSN: 18791298. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2017.02.131](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.131) (siehe S. 59).
- Highfield, Andrea C. et al. (2009). „Deformed Wing Virus Implicated in Overwintering Honeybee Colony Losses“. In: *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. 75).
- Höcherl, Nicole et al. (2012). „Evaluation of the nutritive value of maize for honey bees“. In: *Journal of Insect Physiology* 58.2, S. 278–285. ISSN: 00221910. DOI: [10.1016/j.jinsphys.2011.12.001](https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.12.001) (siehe S. 62).
- Ibrahim, Abdullah, Gary S. Reuter und Marla Spivak (2007). „Field trial of honey bee colonies bred for mechanisms of resistance against *Varroa destructor*“. In: *Apidologie* 38. DOI: [10.1051/apido:2006065](https://doi.org/10.1051/apido:2006065) (siehe S. 60).
- Imdorf, A., S. Bogdanov und V. Kilchenmann (1985). „Zementhonig im Honig- und Brutraum - was dann? - Schweizerisches Zentrum für Bienenforschung“. In: *Schweizer Bienenzeitung* 108.10, S. 534–544 (siehe S. 63).
- Jacques, Antoine et al. (2017). „A Pan-European Epidemiological Study Reveals Honey Bee Colony Survival Depends on Beekeeper Education and Disease Control“. In: *PLOS ONE* 12.3. Hrsg. von Nicolas Chaline, e0172591. ISSN: 1932-6203. DOI: [10.1371/journal.pone.0172591](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172591) (siehe S. 6, 7, 124).
- Jamnjar 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“. In: *Journal of Virological Methods* 184.1, S. 63–68. ISSN: 0166-0934. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.05.010> (siehe S. 87).
- Kearns, Carol A., David W. Inouye und Nickolas M. Waser (1998). „ENDANGERED MUTUALISMS: The Conservation of Plant-Pollinator Interactions“. In: *Annual Review of Ecology and Systematics* 29.1, S. 83–112. ISSN: 0066-4162. DOI: [10.1146/annurev.ecolsys.29.1.83](https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.83) (siehe S. 6).
- Kielmanowicz, Merav Gleit et al. (2015). „Prospective Large-Scale Field Study Generates Predictive Model Identifying Major Contributors to Colony Losses“. In: *PLoS Pathogens* 11, e1004816 (siehe S. 139).
- Koenig, John P., G. Mallory Boush und E. H. Erickson (1986). „Effect of Type of Brood Comb on Chalk Brood Disease in Honeybee Colonies“. In: *Journal of Apicultural Research* 25.1, S. 58–62. ISSN: 20786913. DOI: [10.1080/00218839.1986.11100694](https://doi.org/10.1080/00218839.1986.11100694) (siehe S. 62).
- Köglberger, Hemma et al. (2009). „Das Auftreten von Viren und anderen Krankheitserregern der Honigbiene im Jahresverlauf“. In: *Bienen Aktuell* 2009.11, S. 15–19 (siehe S. 75, 76, 120).
- Kralj, Jasna und Stefan Fuchs (2006). „Parasitic *Varroa destructor* Mites Influence Flight Duration and Homing Ability of Infested *Apis mellifera* Foragers“. In: *Apidologie* 37.5, S. 577–587. ISSN: 0044-8435, 1297-9678. DOI: [10.1051/apido:2006040](https://doi.org/10.1051/apido:2006040) (siehe S. 8).

- Kralj, Jasna et al. (2007). „The Parasitic Mite *Varroa destructor* Affects Non-Associative Learning in Honey Bee Foragers, *Apis mellifera* L.“ In: *Journal of Comparative Physiology A* 193.3, S. 363–370. ISSN: 0340-7594, 1432-1351. DOI: [10.1007/s00359-006-0192-8](https://doi.org/10.1007/s00359-006-0192-8) (siehe S. 8).
- Kuchling, Sabrina et al. (2018). „Investigating the Role of Landscape Composition on Honey Bee Colony Winter Mortality: A Long-Term Analysis“. In: *Scientific Reports* 8.1. ISSN: 20452322. DOI: [10.1038/s41598-018-30891-y](https://doi.org/10.1038/s41598-018-30891-y) (siehe S. 10, 56, 57, 61, 63, 69).
- Kuhn, Max (2020). *caret: Classification and Regression Training*. R package version 6.0-86. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=caret> (siehe S. 94).
- Lamp, Benjamin et al. (2016). „Construction and rescue of a molecular clone of Deformed wing virus (DWW)“. In: *PLoS ONE* 11, e0164639 (siehe S. 141, 149).
- Lee, Kathleen V. et al. (2015). „A National Survey of Managed Honey Bee 2013–2014 Annual Colony Losses in the USA“. In: *Apidologie* 46.3, S. 292–305. ISSN: 0044-8435, 1297-9678. DOI: [10.1007/s13592-015-0356-z](https://doi.org/10.1007/s13592-015-0356-z) (siehe S. 7, 9, 58, 124).
- Locke, Barbara (2016). „Natural *Varroa* Mite-Surviving *Apis Mellifera* Honeybee Populations“. In: *Apidologie* 47.3, S. 467–482. ISSN: 0044-8435, 1297-9678. DOI: [10.1007/s13592-015-0412-8](https://doi.org/10.1007/s13592-015-0412-8) (siehe S. 60).
- Lodesani, Marco, Simone Franceschetti und Raffaele Dall’Olio (2019). „Evaluation of early spring bio-technical management techniques to control varroosis in *Apis mellifera*“. In: *Apidologie* 50.2, S. 131–140. ISSN: 12979678. DOI: [10.1007/s13592-018-0621-z](https://doi.org/10.1007/s13592-018-0621-z) (siehe S. 65).
- López, Javier Hernández et al. (2017). „Sublethal Pesticide Doses Negatively Affect Survival and the Cellular Responses in American Foulbrood-Infected Honeybee Larvae“. In: *Scientific Reports* 7.1, S. 40853. ISSN: 2045-2322. DOI: [10.1038/srep40853](https://doi.org/10.1038/srep40853) (siehe S. 9).
- Maori, Eyal, Edna Tanne und Ilan Sela (2007). „Reciprocal sequence exchange between non-retroviruses and hosts leading to the appearance of new host phenotypes“. In: *Virology* 362.2, S. 342–349. ISSN: 0042-6822. DOI: [10.1016/j.virol.2006.11.038](https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.11.038) (siehe S. 89, 90).
- Martin, Stephen J. et al. (2012). „Global Honey Bee Viral Landscape Altered by a Parasitic Mite“. In: *Science* 336.6086, S. 1304–1306. DOI: [10.1126/science.1220941](https://doi.org/10.1126/science.1220941) (siehe S. 75, 122).
- McMenamin, Alexander J. und Elke Genersch (2015). „Honey bee colony losses and associated viruses“. In: *Current Opinion in Insect Science* 8, S. 121–129. ISSN: 2214-5745. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2015.01.015> (siehe S. 121).
- Milborrow, Stephen (2020). *rpart.plot: Plot 'rpart' Models: An Enhanced Version of 'plot.rpart'*. R package version 3.0.9. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=rpart.plot> (siehe S. 93).
- 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“. In: *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. 122).
- Monceau, Karine, Olivier Bonnard und Denis Thiéry (2014). „*Vespa Velutina*: A New Invasive Predator of Honeybees in Europe“. In: *Journal of Pest Science* 87.1, S. 1–16. ISSN: 1612-4758, 1612-4766. DOI: [10.1007/s10340-013-0537-3](https://doi.org/10.1007/s10340-013-0537-3) (siehe S. 9).
- Mondet, Fanny et al. (2020). „Evaluation of Suppressed Mite Reproduction (SMR) Reveals Potential for *Varroa* Resistance in European Honey Bees (*Apis Mellifera* l.)“. In: *Insects* 11.9. ISSN: 2075-4450. DOI: [10.3390/insects11090595](https://doi.org/10.3390/insects11090595) (siehe S. 60).

- Moosbeckhofer, Rudolf und Josef Mayr (2014). „Untersuchungen zur Identifizierung einer möglichen Exposition von Honigbienen gegenüber den Wirkstoffen Clothianidin, Thiamethoxam, Imidacloprid und Fipronil unter Feldbedingungen“. In: *Final report* („Bienexpo 13“) (siehe S. 75, 120).
- Moosbeckhofer, R et al. (2015). *Varroa-Bekämpfung Einfach-Sicher-Erfolgreich. 2 Völlig Neu Bearbeitete Auflage* (siehe S. 64).
- 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. 75, 76, 88, 120, 122, 123).
- Morawetz, Linde et al. (2019a). „Health Status of Honey Bee Colonies (*Apis Mellifera*) and Disease-Related Risk Factors for Colony Losses in Austria“. In: *Plos One* 14.7, e0219293. DOI: [10.1371/journal.pone.0219293](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219293) (siehe S. x, 8, 58, 68, 69, 124, 150).
- Morawetz, Linde et al. (2019b). „Prevalence of bee viruses in Austria in the year 2018“. In: *Austrian Citizen Science Conference*. Proceedings of Science, S. 007. DOI: <https://doi.org/10.22323/1.366.0007> (siehe S. 120).
- 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. 150).
- 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“. In: *The ISME Journal* 10.5, S. 1264–1273. ISSN: 1751-7362 1751-7370. DOI: [10.1038/ismej.2015.178](https://doi.org/10.1038/ismej.2015.178) (siehe S. 75, 122).
- 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“. In: *Agriculture, Ecosystems & Environment* 216, S. 44–50. ISSN: 01678809. DOI: [10.1016/j.agee.2015.09.027](https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.09.027) (siehe S. 7).
- Moritz, Robin F.A. et al. (2010). „Research Strategies to Improve Honeybee Health in Europe“. In: *Apidologie* 41.3, S. 227–242. ISSN: 0044-8435, 1297-9678. DOI: [10.1051/apido/2010010](https://doi.org/10.1051/apido/2010010) (siehe S. 7).
- Mouret, C et al. (2013). „Prevalence of 12 infectious agents in field colonies of 18 apiaries in western France“. In: *Revue de Medecine Veterinaire* 164.12, S. 577–582 (siehe S. 119).
- Murcia-Morales, María et al. (2020). „APIStrip, a New Tool for Environmental Contaminant Sampling through Honeybee Colonies“. In: *Science of The Total Environment* 729, S. 138948. ISSN: 00489697. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2020.138948](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138948) (siehe S. 63).
- 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. 9).
- Neumann, Peter und Tjeerd Blacquière (2017). „The Darwin Cure for Apiculture? Natural Selection and Managed Honeybee Health“. In: *Evolutionary Applications* 10.3, S. 226–230. ISSN: 1752-4571, 1752-4571. DOI: [10.1111/eva.12448](https://doi.org/10.1111/eva.12448) (siehe S. 60).
- Neumann, Peter und Norman L Carreck (2009). „Honey Bee Colony Losses“. In: *Journal of Apicultural Research* 49.1, S. 1–6. ISSN: 0021-8839. DOI: [10.3896/ibra.1.49.1.01](https://doi.org/10.3896/ibra.1.49.1.01) (siehe S. 6).

- 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?“ In: *Emerging Topics in Life Sciences* 4.1. Hrsg. von Alison Scott-Brown und Hauke Koch, S. 45–57. ISSN: 2397-8554, 2397-8562. DOI: [10.1042/ETLS20190125](https://doi.org/10.1042/ETLS20190125) (siehe S. 8, 9, 63, 65).
- Nolan, Maxcy P. und Keith S. Delaplane (2016). „Distance between honey bee *Apis mellifera* colonies regulates populations of *Varroa destructor* at a landscape scale“. In: *Apidologie*, S. 1–9. ISSN: 1297-9678. DOI: [10.1007/s13592-016-0443-9](https://doi.org/10.1007/s13592-016-0443-9) (siehe S. 121).
- Oberreiter, Hannes (2019). „Codebase: Austria Honey Bee Colony Overwinter Losses 2018/2019“. In: DOI: [10.5281/ZENODO.3402170](https://doi.org/10.5281/ZENODO.3402170) (siehe S. 13).
- Oberreiter, Hannes und Robert Brodschneider (2020). „Austrian COLOSS Survey of Honey Bee Colony Winter Losses 2018/19 and Analysis of Hive Management Practices“. In: *Diversity* 12.3, S. 99. ISSN: 1424-2818. DOI: [10.3390/d12030099](https://doi.org/10.3390/d12030099) (siehe S. x, 7, 56–69, 124, 150).
- Palacios, G. et al. (2008). „Genetic Analysis of Israel Acute Paralysis Virus: Distinct Clusters Are Circulating in the United States“. In: *Journal of Virology* 82.13, S. 6209–6217. DOI: [10.1128/jvi.00251-08](https://doi.org/10.1128/jvi.00251-08) (siehe S. 89).
- 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“. In: *Insects* 10.1, S. 19. DOI: [10.3390/insects10010019](https://doi.org/10.3390/insects10010019) (siehe S. 59).
- Pechhacker, H., W. Praznik und J. Klaus (1990). „Untersuchungen über das Zuckerspektrum in Honigblaseninhalten und Honig“. In: *Apidologie* 21.5, S. 447–455. ISSN: 0044-8435. DOI: [10.1051/apido:19900506](https://doi.org/10.1051/apido:19900506) (siehe S. 63).
- Peck, David T., Michael L. Smith und Thomas D. Seeley (2016). „*Varroa destructor* mites can nimbly climb from flowers onto foraging honey bees“. In: *PLOS ONE* 11.12, e0167798. DOI: [10.1371/journal.pone.0167798](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167798) (siehe S. 121).
- Peng, Yan et al. (2015). „Consequences of *Nosema Apis* Infection for Male Honey Bees and Their Fertility“. In: *Scientific Reports* 5.1, S. 10565. ISSN: 2045-2322. DOI: [10.1038/srep10565](https://doi.org/10.1038/srep10565) (siehe S. 9).
- Pettis, Jeffery S. et al. (2012). „Pesticide Exposure in Honey Bees Results in Increased Levels of the Gut Pathogen *Nosema*“. In: *Naturwissenschaften* 99.2, S. 153–158. ISSN: 0028-1042, 1432-1904. DOI: [10.1007/s00114-011-0881-1](https://doi.org/10.1007/s00114-011-0881-1) (siehe S. 9).
- Potts, Simon G. et al. (2010). „Global Pollinator Declines: Trends, Impacts and Drivers“. In: *Trends in Ecology & Evolution* 25.6, S. 345–353. ISSN: 01695347. DOI: [10.1016/j.tree.2010.01.007](https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007) (siehe S. 7).
- R Core Team (2020). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria (siehe S. 12, 13, 80, 91, 92).
- Ramsey, Samuel D. et al. (2019). „*Varroa Destructor* Feeds Primarily on Honey Bee Fat Body Tissue and Not Hemolymph“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116.5, S. 1792–1801. ISSN: 0027-8424, 1091-6490. DOI: [10.1073/pnas.1818371116](https://doi.org/10.1073/pnas.1818371116) (siehe S. 8).
- Requier, Fabrice et al. (2017). „The carry-over effects of pollen shortage decrease the survival of honeybee colonies in farmlands“. In: *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. 62).
- Ribièrè, Magali, Violaine Olivier und Philippe Blanchard (2010). „Chronic bee paralysis: A disease and a virus like no other?“ In: *Journal of Invertebrate Pathology* 103, Supplement.0, S120–S131. ISSN: 0022-2011. DOI: [10.1016/j.jip.2009.06.013](https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.013) (siehe S. 75, 122).

- 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“. In: *Scientific Reports* 8.1, S. 1–11. ISSN: 20452322. DOI: [10.1038/s41598-018-28732-z](https://doi.org/10.1038/s41598-018-28732-z) (siehe S. 68).
- 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*)“. In: *Ecotoxicology* 25.9, S. 1648–1665. ISSN: 0963-9292, 1573-3017. DOI: [10.1007/s10646-016-1725-8](https://doi.org/10.1007/s10646-016-1725-8) (siehe S. 62).
- Rosenkranz, Peter, Pia Aumeier und Bettina Ziegelmann (2010). „Biology and Control of *Varroa Destructor*“. In: *Journal of Invertebrate Pathology* 103, S96–S119. ISSN: 0022-2011. DOI: [10.1016/J.JIP.2009.07.016](https://doi.org/10.1016/J.JIP.2009.07.016) (siehe S. 8, 9, 63, 65, 66).
- Roth, Morgan A et al. (2020). „Biology and Management of *Varroa Destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in *Apis Mellifera* (Hymenoptera: Apidae) Colonies“. In: *Journal of Integrated Pest Management* 11.1. Hrsg. von Matthew Messenger, S. 1. ISSN: 2155-7470. DOI: [10.1093/jipm/pmz036](https://doi.org/10.1093/jipm/pmz036) (siehe S. 64).
- Rousseau, Andrée, Émile Houle und Pierre Giovenazzo (2020). „Effect of Shipping Boxes, Attendant Bees, and Temperature on Honey Bee Queen Sperm Quality (*Apis Mellifera*)“. In: *Apidologie*. ISSN: 0044-8435, 1297-9678. DOI: [10.1007/s13592-020-00756-3](https://doi.org/10.1007/s13592-020-00756-3) (siehe S. 68).
- Roy, C., N. Vidal-Naquet und B. Provost (2015). „A severe sacbrood virus outbreak in a honeybee (*Apis mellifera* L.) colony: a case report“. In: *Veterinarni Medicina* 60.6, S. 330–335. DOI: [10.17221/8248-VETMED](https://doi.org/10.17221/8248-VETMED) (siehe S. 75).
- Rundlöf, Maj et al. (2015). „Seed Coating with a Neonicotinoid Insecticide Negatively Affects Wild Bees“. In: *Nature* 521.7550, S. 77–80. ISSN: 0028-0836, 1476-4687. DOI: [10.1038/nature14420](https://doi.org/10.1038/nature14420) (siehe S. 62).
- Ruttner, F., H. Marx und G. Marx (1984). „Beobachtungen über eine mögliche Anpassung von *Varroa Jacobsoni* und *Apis Mellifera* L. in Uruguay.“ In: *Apidologie* 15.1, S. 43–62. ISSN: 0044-8435. DOI: [10.1051/apido:19840105](https://doi.org/10.1051/apido:19840105) (siehe S. 60).
- 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“. In: *Apidologie* 49.5, S. 637–646. ISSN: 12979678. DOI: [10.1007/s13592-018-0591-1](https://doi.org/10.1007/s13592-018-0591-1) (siehe S. 62).
- Schurr, Frank et al. (2019). „Validation of quantitative real-time RT-PCR assays for the detection of six honeybee viruses“. In: *Journal of Virological Methods* 270, S. 70–78. ISSN: 0166-0934. DOI: [10.1016/j.jviromet.2019.04.020](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.04.020) (siehe S. 87–89, 121, 122).
- Seeburger, Victoria Charlotte et al. (2020). „The Trisaccharide Melezitose Impacts Honey Bees and Their Intestinal Microbiota“. In: *PLOS ONE* 15.4. Hrsg. von Olav Rueppell, e0230871. ISSN: 1932-6203. DOI: [10.1371/journal.pone.0230871](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230871) (siehe S. 63).
- Seeley, Thomas D. (2007). „Honey Bees of the Arnot Forest: A Population of Feral Colonies Persisting with *Varroa Destructor* in the Northeastern United States“. In: *Apidologie* 38.1, S. 19–29. ISSN: 0044-8435, 1297-9678. DOI: [10.1051/apido:2006055](https://doi.org/10.1051/apido:2006055) (siehe S. 60).
- Seeley, Thomas D. und Michael L. Smith (2015). „Crowding Honeybee Colonies in Apiaries Can Increase Their Vulnerability to the Deadly Ectoparasite *Varroa Destructor*“. In: *Apidologie* 46.6, S. 716–727. ISSN: 0044-8435, 1297-9678. DOI: [10.1007/s13592-015-0361-2](https://doi.org/10.1007/s13592-015-0361-2) (siehe S. 9, 57, 60).

- Siede, Reinhold et al. (2005). „Prevalence of Kashmir bee virus in central Europe“. In: *Journal of Apicultural Research* 44.3, S. 129–129. ISSN: 0021-8839. DOI: [10.1080/00218839.2005.11101164](https://doi.org/10.1080/00218839.2005.11101164) (siehe S. 85, 90).
- Siefert, Paul et al. (2020). „Chronic Within-Hive Video Recordings Detect Altered Nursing Behaviour and Retarded Larval Development of Neonicotinoid Treated Honey Bees“. In: *Scientific Reports* 10.1, S. 8727. ISSN: 2045-2322. DOI: [10.1038/s41598-020-65425-y](https://doi.org/10.1038/s41598-020-65425-y) (siehe S. 7).
- Wu-Smart, Judy und Marla Spivak (2016). „Sub-Lethal Effects of Dietary Neonicotinoid Insecticide Exposure on Honey Bee Queen Fecundity and Colony Development“. In: *Scientific Reports* 6.1, S. 32108. ISSN: 2045-2322. DOI: [10.1038/srep32108](https://doi.org/10.1038/srep32108) (siehe S. 7).
- Smolyakov, Vadim (2017). *Ensemble Learning to Improve Machine Learning Results*. URL: <https://blog.statsbot.co/ensemble-learning-d1dcd548e936/> (siehe S. 94).
- Staveley, Jane P. et al. (2014). „A Causal Analysis of Observed Declines in Managed Honey Bees (*Apis Mellifera*)“. In: *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 20.2, S. 566–591. ISSN: 1080-7039, 1549-7860. DOI: [10.1080/10807039.2013.831263](https://doi.org/10.1080/10807039.2013.831263) (siehe S. 7).
- 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“. In: *Journal of Apicultural Research* 53.1, S. 1–18. ISSN: 0021-8839, 2078-6913. DOI: [10.3896/IBRA.1.53.1.01](https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.1.01) (siehe S. 6, 7, 9, 57).
- Steinhauer, Nathalie et al. (2018). „Drivers of Colony Losses“. In: *Current Opinion in Insect Science* 26, S. 142–148. ISSN: 22145745. DOI: [10.1016/j.cois.2018.02.004](https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.004) (siehe S. 6).
- Stoltz, Don et al. (1995). „Molecular diagnosis of Kashmir bee virus infection“. In: *Journal of Apicultural Research* 34.3, S. 153–160. ISSN: 0021-8839. DOI: [10.1080/00218839.1995.11100900](https://doi.org/10.1080/00218839.1995.11100900) (siehe S. 89, 90).
- Straub, Lars et al. (2019). „Neonicotinoids and Ectoparasitic Mites Synergistically Impact Honeybees“. In: *Scientific Reports* 9.1, S. 8159. ISSN: 2045-2322. DOI: [10.1038/s41598-019-44207-1](https://doi.org/10.1038/s41598-019-44207-1) (siehe S. 9).
- Sumpter, D. J. T. und S. J. Martin (2004). „The dynamics of virus epidemics in Varroa-infested honey bee colonies“. In: *Journal of Animal Ecology* 73.1, S. 51–63. ISSN: 1365-2656. DOI: [10.1111/j.1365-2656.2004.00776.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2004.00776.x) (siehe S. 121).
- Switanek, Matthew et al. (2017). „Modelling Seasonal Effects of Temperature and Precipitation on Honey Bee Winter Mortality in a Temperate Climate“. In: *Science of The Total Environment* 579, S. 1581–1587. ISSN: 0048-9697. DOI: [10.1016/J.SCITOTENV.2016.11.178](https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2016.11.178) (siehe S. 10, 56, 57, 69, 124).
- Tentcheva, Diana et al. (2004). „Prevalence and Seasonal Variations of Six Bee Viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* Mite Populations in France“. In: *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. 75, 119).
- Therneau, Terry und Beth Atkinson (2019). *rpart: Recursive Partitioning and Regression Trees*. R package version 4.1-15. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=rpart> (siehe S. 93).
- Thoms, Christopher A. et al. (2019). „Beekeeper Stewardship, Colony Loss, and *Varroa Destructor* Management“. In: *Ambio* 48.10, S. 1209–1218. ISSN: 0044-7447, 1654-7209. DOI: [10.1007/s13280-018-1130-z](https://doi.org/10.1007/s13280-018-1130-z) (siehe S. 58).

- Thrasylvoulou, Andreas et al. (2015). „Improvements To The Regulations On Organic Farming To Facilitate The Practice Of Organic Beekeeping“. In: *Bee World* 91.3, S. 58–61. ISSN: 0005-772X. DOI: [10.1080/0005772x.2014.11417604](https://doi.org/10.1080/0005772x.2014.11417604) (siehe S. 61).
- Traynor, Kirsten S. et al. (2016). „Multiyear Survey Targeting Disease Incidence in US Honey Bees“. In: *Apidologie* 47.3, S. 325–347. ISSN: 0044-8435, 1297-9678. DOI: [10.1007/s13592-016-0431-0](https://doi.org/10.1007/s13592-016-0431-0) (siehe S. 8, 75).
- Tsvetkov, N. et al. (2017). „Chronic Exposure to Neonicotinoids Reduces Honey Bee Health near Corn Crops“. In: *Science* 356.6345, S. 1395–1397. ISSN: 0036-8075, 1095-9203. DOI: [10.1126/science.aam7470](https://doi.org/10.1126/science.aam7470) (siehe S. 7).
- Turlach, Berwin A. und Andreas Weingessel (2019). *quadprog: Functions to Solve Quadratic Programming Problems*. R package version 1.5-8. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=quadprog> (siehe S. 94).
- 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“. In: *Insects* 10.1, S. 10. ISSN: 2075-4450. DOI: [10.3390/insects10010010](https://doi.org/10.3390/insects10010010) (siehe S. 58).
- Urbanowicz, Christine et al. (2019). „Low maize pollen collection and low pesticide risk to honey bees in heterogeneous agricultural landscapes“. In: *Apidologie* 2011. ISSN: 12979678. DOI: [10.1007/s13592-019-00655-2](https://doi.org/10.1007/s13592-019-00655-2) (siehe S. 62).
- 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“. In: *Journal of Virological Methods* 80, S. 97–112 (siehe S. 140).
- Van der Zee, Romée et al. (2012). „Managed Honey Bee Colony Losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the Winters of 2008–9 and 2009–10“. In: *Journal of Apicultural Research* 51.1, S. 100–114. ISSN: 0021-8839, 2078-6913. DOI: [10.3896/IBRA.1.51.1.12](https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.1.12) (siehe S. 7, 9).
- Van der Zee, Romée et al. (2013). „Standard Survey Methods for Estimating Colony Losses and Explanatory Risk Factors in *Apis Mellifera*“. In: *Journal of Apicultural Research* 52.4, S. 1–36. ISSN: 0021-8839. DOI: [10.3896/ibra.1.52.4.18](https://doi.org/10.3896/ibra.1.52.4.18) (siehe S. 11–13, 54, 78, 92).
- Van der Zee, Romée 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“. In: *Journal of Apicultural Research* 53.1, S. 19–34. ISSN: 0021-8839. DOI: [10.3896/ibra.1.53.1.02](https://doi.org/10.3896/ibra.1.53.1.02) (siehe S. 6, 7, 9, 58, 59, 62, 68, 124).
- Van der Zee, Romée et al. (2015). „An Observational Study of Honey Bee Colony Winter Losses and Their Association with *Varroa Destructor*, Neonicotinoids and Other Risk Factors“. In: *PLOS ONE* 10.7. Hrsg. von James C. Nieh, e0131611. ISSN: 1932-6203. DOI: [10.1371/journal.pone.0131611](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131611) (siehe S. 10, 54).
- 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“. In: *American Bee Journal* 147, S. 599–603 (siehe S. 7).
- vanEngelsdorp, Dennis et al. (2008). „A Survey of Honey Bee Colony Losses in the U.S., Fall 2007 to Spring 2008“. In: *PLoS ONE* 3.12, S. 8–13. ISSN: 19326203. DOI: [10.1371/journal.pone.0004071](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004071) (siehe S. 7, 56, 57).
- vanEngelsdorp, Dennis et al. (2009). „Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study“. In: *PLoS ONE* 4.8. Hrsg. von Justin Brown, e6481. ISSN: 1932-6203. DOI: [10.1371/journal.pone.0006481](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481) (siehe S. 7, 57).

- vanEngelsdorp, Dennis et al. (2010). „A Survey of Honey Bee Colony Losses in the United States, Fall 2008 to Spring 2009“. In: *Journal of Apicultural Research* 49.1, S. 7–14. ISSN: 0021-8839, 2078-6913. DOI: [10.3896/IBRA.1.49.1.03](https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.03) (siehe S. 7, 56).
- vanEngelsdorp, Dennis et al. (2011). „A Survey of Managed Honey Bee Colony Losses in the USA, Fall 2009 to Winter 2010“. In: *Journal of Apicultural Research* 50.1, S. 1–10. ISSN: 0021-8839, 2078-6913. DOI: [10.3896/IBRA.1.50.1.01](https://doi.org/10.3896/IBRA.1.50.1.01) (siehe S. 6, 7).
- 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“. In: *Preventive Veterinary Medicine* 108.2-3, S. 225–233. ISSN: 01675877. DOI: [10.1016/j.prevetmed.2012.08.004](https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.08.004) (siehe S. 68).
- 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. 91).
- Wickham, Hadley et al. (2019). „Welcome to the tidyverse“. In: *Journal of Open Source Software* 4.43, S. 1686. DOI: [10.21105/joss.01686](https://doi.org/10.21105/joss.01686) (siehe S. 12).
- Williams, Geoffrey R. et al. (2010). „Colony Collapse Disorder in Context“. In: *BioEssays* 32.10, S. 845–846. ISSN: 02659247. DOI: [10.1002/bies.201000075](https://doi.org/10.1002/bies.201000075) (siehe S. 7, 57).
- Williams, Geoffrey R. et al. (2015). „Neonicotinoid Pesticides Severely Affect Honey Bee Queens“. In: *Scientific Reports* 5.1, S. 14621. ISSN: 2045-2322. DOI: [10.1038/srep14621](https://doi.org/10.1038/srep14621) (siehe S. 7, 68).
- 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)“. In: *Journal of economic entomology* 112.3, S. 1043–1049. ISSN: 1938291X. DOI: [10.1093/jee/toz003](https://doi.org/10.1093/jee/toz003) (siehe S. 68).
- Woodcock, Ben et al. (2016). „Impacts of Neonicotinoid Use on Long-Term Population Changes in Wild Bees in England“. In: *Nature Communications* 7.1, S. 12459. ISSN: 2041-1723. DOI: [10.1038/ncomms12459](https://doi.org/10.1038/ncomms12459) (siehe S. 6).
- Woodcock, Ben et al. (2017). „Country-Specific Effects of Neonicotinoid Pesticides on Honey Bees and Wild Bees“. In: *Science* 356.6345, S. 1393–1395. ISSN: 0036-8075, 1095-9203. DOI: [10.1126/science.aaa1190](https://doi.org/10.1126/science.aaa1190) (siehe S. 7, 63).
- Wright, Marvin N. und Andreas Ziegler (2017). „ranger: A Fast Implementation of Random Forests for High Dimensional Data in C++ and R“. In: *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. 94).
- Yue, C. et al. (2007). „Vertical-Transmission Routes for Deformed Wing Virus of Honeybees (*Apis mellifera*)“. In: *Journal of General Virology* 88.8, S. 2329–2336. ISSN: 0022-1317, 1465-2099. DOI: [10.1099/vir.0.83101-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.83101-0) (siehe S. 9, 121).
- Zioni, Naama, Victoria Soroker und Nor Chejanovsky (2011). „Replication of Varroa destructor virus 1 (VDV-1) and a Varroa destructor virus 1–deformed wing virus recombinant (VDV-1–DWV) in the head of the honey bee“. In: *Virology* 417.1, S. 106–112. ISSN: 0042-6822. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.05.009> (siehe S. 121).