



ProtectAlps: Alpen, persistente Schadstoffe und Insekten

Veronika Hierlmeier^{1,2} (Veronika.Hierlmeier@lfu.bayern.de); Wolfgang Moche³ (wolfgang.moche@umweltbundesamt.at); Elke Ludewig⁴ (elke.ludewig@zamg.ac.at); Till Rehm⁵ (t.rehm@schneefernerhaus.de), Timotheus Kopf⁶ (timo.kopf@chello.at); Florian M. Steiner^{2&} (Florian.M.Steiner@uibk.ac.at); Birgit C. Schlick-Steiner^{2&} (Birgit.Schlick-Steiner@uibk.ac.at), Korbinian P. Freier^{7&} (Korbinian.Freier@lfu.bayern.de)

¹ Bayerisches Landesamt für Umwelt, Referat für Stoff- und Chemikalienbewertung Garmisch-Partenkirchen, Deutschland

² Leopold-Franzens-Universität Innsbruck, Institut für Ökologie, Innsbruck, Österreich

³ Umweltbundesamt GmbH Wien, Österreich

⁴ Zentralanstalt für Meteorologie und Geodynamik, Salzburg, Österreich

⁵ Umweltforschungsstation Schneefernerhaus, Zugspitze, Deutschland

⁶ Herzog-Sigmund-Straße 4a, Völs, Österreich

⁷ Bayerisches Landesamt für Umwelt, Referat für Stoff- und Chemikalienbewertung Augsburg, Deutschland

& Diese AutorInnen haben gleichermaßen als Senior-AutorInnen beigetragen

Zusammenfassung

Das Projekt „ProtectAlps“ untersucht das Vorkommen von schwer abbaubaren organischen Schadstoffen (POP), Quecksilber und Pestiziden in wildlebenden Insekten an der Zugspitze (Deutschland) und dem Hohen Sonnblick (Österreich). Mittels Ultraspurenanalysen werden die Konzentrationen in den Insektenkörpern bestimmt. Vermessungen von Körperstrukturen der Insekten geben Aufschluss über etwaige morphologische Veränderungen. Durch genetische Charakterisierungen können potentielle Inzuchteffekte als Ursache von Asymmetrie diskutiert werden. In ersten Analysen lässt sich eine breite Palette von persistenten Schadstoffen in Insekten detektieren. Die Schadstoffkonzentrationen in den Insekten sollen mit Depositionsraten in Bezug gesetzt werden, die seit 2005 in den Untersuchungsgebieten bestimmt werden.

Hintergrund/Einleitung

Die Häufigkeit von Insekten ist in den letzten Jahren auch in Naturschutzgebieten stark zurückgegangen (Hallmann et al. 2017). Für den Rückgang gibt es verschiedene Gründe: Landnutzungsänderungen, Einträge eutrophierender Stoffe und die Intensivierung der Landwirtschaft führen zu Verlusten und zur Fragmentierung geeigneter Habitats (Hendrickx et al. 2007). Neben diesen Faktoren können auch Umweltchemikalien wie aktuell eingesetzte Pestizide Insektenpopulationen beeinflussen (Fernandes et al. 2016). Welche Rolle persistente organische Schadstoffe (POP) beim Insektenrückgang spielen, ist weniger untersucht. Diese Chemikalien sind schwer abbaubar in der Umwelt und verbleiben dort über Jahre. Zu den POP gehört eine Vielzahl an Stoffen, unter anderem international geregelte Pestizide wie DDT und Lindan, aber auch Industriechemikalien wie polychlorierte Biphenyle (PCB) und Nebenprodukte aus Verbrennungsprozessen. Diese Substanzen können sich im Fettgewebe von Organismen anreichern (Jones & de Voogt 1999). Studien zeigen, dass POP Insekten unterschiedlich schädigen. Bei Schaben konnte man die Schädigung von Gewebe und Zellen nachweisen (Lambiase et al. 2005). Bei Honigbienen wiederum konnte eine Veränderung des Verhaltens beobachtet werden (Drummond et al. 2017). Stressoren stehen außerdem im Verdacht auf die Morphologie von Insekten einzuwirken und eine Asymmetrie von grund-

sätzlich symmetrischen Körperstrukturen auszulösen (Parson 1990).

POP werden weitläufig über die Atmosphäre verbreitet (Jones & de Voogt 1999). Dies führt auch zu einer Belastung von Regionen, die weit entfernt von Quellen sind. Hohe Niederschlagsraten und kühle Temperaturen, die in Gebirgsregionen vorherrschen, begünstigen die Deposition zusätzlich (Wania & Westgate 2008).

Im Rahmen des INTERREG-A-Projekts „ProtectAlps“ werden das Vorkommen und mögliche Auswirkungen von schwer abbaubaren Schadstoffen auf Insekten in Gebirgsregionen untersucht. Ausgangspunkt dafür liefern weltweit einzigartige Messreihen der Messstationen an der Zugspitze und am Hohen Sonnblick. Dort werden seit 2005 Lufteinträge von POP gemessen, temporale Veränderungen detektiert und mit weltweiten Konzentrationen verglichen (Kirchner et al. 2016). Diese Messwerte sollen im vorliegenden Projekt mit Konzentrationen von POP und Quecksilber in Insekten verknüpft werden, um die Akkumulation von Schadstoffen in Insekten der Alpen zu bewerten. Potentielle Auswirkungen der Schadstoffe auf die Vitalität der Insekten sollen über Asymmetrien in Körperstrukturen erfasst werden. Zusätzlich werden die Insekten genetisch charakterisiert, um etwaige Inzuchteffekte bei auftretender Asymmetrie bewerten zu können.

Material und Methoden

Die Untersuchungsgebiete liegen im Umfeld der Umweltforschungsstation Schneefernerhaus (UFS) an der Zugspitze, Deutschland und des Sonnblick-Observatoriums (SBO) am Hohen Sonnblick in den Hohen Tauern, Österreich. Die Insekten wurden in beiden Gebieten auf Höhe der Latschen-Vegetation zwischen 1600 m und 1900 m Seehöhe im Juli und August 2018 entnommen. Zum Vergleich der Standorte wurden Organismen ausgewählt, die in beiden Gebieten häufig sind. Folgende Arten bzw. Gattungen wurden untersucht:

1. Große Kerbameise (*Formica exsecta*)
2. Schwachbeborstete Gebirgsameise (*Formica aquilonia*)
3. Hummeln (*Bombus spp.*)

Ungeflügelte Ameisen wurden direkt am Ameisennest entnommen. Hummeln wurden von Blüten abgesammelt. Zur Probenahme wurde ausschließlich im Labor gereinigtes Glas und Metall verwendet. Somit konnte eine Kontamination der Proben durch Stoffe, die sich etwa aus kunststoffhaltigen Sammelmaterial lösen, vermieden werden. Nach dem Fang der Insekten werden diese bis zur Bearbeitung bei -20°C gelagert. Insgesamt wurden für die weitergehenden Analysen pro Gebiet und Art/Gattung bis zu 40 Gramm Frischgewicht an Insekten gewonnen. In Abstimmung mit Experten war die Entnahme dieser Mengen für die Populationen in den Untersuchungsgebieten unerheblich.

In den Insektenkörpern wurden die Konzentrationen der POP aus folgenden Gruppen in gepoolten Proben, getrennt nach Organismus und Gebiet, untersucht:

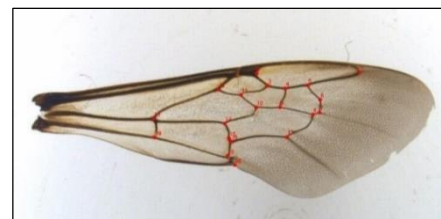
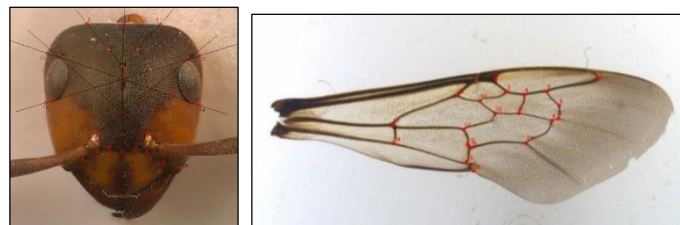
- 33 halogenierte Flammschutzmittel (FSM)
- 32 Organochlorpestizide (OCP)
- 6 Polychlorierte Biphenyle (Indikator-PCB)
- 11 Per- und Polyfluorierte Chemikalien (PFC)

Obwohl der Fokus der Studie auf POP liegt, wurden zudem Quecksilber und 34 aktuell eingesetzte Pestizide mitanalysiert. Die Analyse der kompletten Körper der Insekten erfolgte im akkreditierten Labor des Umweltbundesamts in Wien, Österreich. Die Insekten wurden vor Analyse der POP gefriergetrocknet und homogenisiert.

Zur Feststellung der links-rechts Asymmetrie wurden die Körperstrukturen der Insekten unter einem Makroskop fotografiert. Bei den Ameisen wurden dafür die Köpfe der Individuen mit einem Skalpell vom Körper getrennt und auf speziellen Papierstücken fixiert. Pro Individuum wurden ca. 30-40 Fotos einzelner Schichten erstellt, die im Computer zu einem scharfen Bild zusammengesetzt wurden (Abb. 1). Bei *Bombus spp.* wurden Vorder- und Hinterflügel am Gelenk herauspräpariert und auf Objektträgern fixiert. Die Flügel wurden dabei von beiden Seiten fotografiert (Abb. 2). Am Computer wurden markante Punkte auf den Bildern markiert („Landmarks“) und die Daten analysiert und statistisch ausgewertet.

Die genetische Analyse der Populationsstruktur erfolgte anhand von Mikrosatelliten. Dabei handelt es sich um repetitive Sequenzen mit hoher Mutationsrate an bestimmten Stellen (Loci) im Genom (Ellegreen 2004). Hierfür wurde DNA aus Beinen oder Hinterleib der Insekten mit Extraktionskits gewonnen. Für die diversen Insekten wurden zunächst verschiedene Primerpaare von Mikrosatelliten-Loci getestet, um herauszufinden, welche sich für eine Analyse eignen. Für beide Ameisenarten wurden 14 Loci getestet. Für *Bombus spp.* erfolgt eine genetische Charakterisierung für den *Bombus-lucorum*- Artkomplex. Dieser Artkomplex besteht aus vier morphologisch schwer unterscheidbaren Arten und dominiert in den gesammelten Proben von 2018. Hierfür wurden 8 Loci getestet. Die DNA wurde mittels PCR vervielfältigt und die Amplifikation mittels Gelelektrophorese kontrolliert. Die Frag-

mentanalyse erfolgte am Comprehensive Cancer Center Sequencing Facility, Chicago, USA. So konnten Genotypen am Computer analysiert werden. Die statistische Auswertung der Daten lieferte Kenntnisse zu genetischen Distanzen, zur molekularen Varianz und zum Verwandtschaftsgrad.



Abbildungen 1 und 2: Kopf von *Formica aquilonia* und Vorderflügel von *Bombus sp.* mit gesetzten Landmarks zur Feststellung der Asymmetrie. Bild *F. aquilonia*: Philipp Stromberger, Bild *Bombus sp.*: Nils Struck

Bisherige Ergebnisse

Erste chemische Analysen zeigten, dass in allen Proben der Insekten POP in einem Bereich von wenigen Nanogramm bis mehreren Mikrogramm pro Kilogramm Frischgewicht (FG) detektiert werden konnten ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ FG). Die Mehrheit der 33 untersuchten FSM war in den Insektenproben von 2018 in einem Bereich von 0,001 bis über $0,1 \mu\text{g}/\text{Kg}$ FG nachweisbar. Dabei waren Hexabrombenzol (HBB) und Pentabromtoluol (PBT) mit Konzentrationen von 0,015 beziehungsweise $0,091 \mu\text{g}/\text{Kg}$ FG messbar (Median, 6 Poolproben). In der gleichen Größenordnung waren die Flammschutzmittel Dechlorane-Plus (Anti), BDE-47 und BDE-209 in den Proben nachzuweisen. Die Konzentrationen der 32 untersuchten OCP und aller aktuell eingesetzten Pestizide lagen unter den Nachweisgrenzen von 0,5 beziehungsweise $5 \mu\text{g}/\text{Kg}$ FG. Im Gegensatz dazu wurden in allen Insektenproben die sechs Indikator-PCB mit einer Summen-Konzentration von $0,9 \mu\text{g}/\text{Kg}$ FG nachgewiesen.

Von den PFC waren in mindestens je zwei Pool-Proben Perfluorhexansäure (PFHxA), Perfluorheptansäure (PFHpA) und Perfluorononansäure (PFNA) mit Konzentrationen von etwa $1 \mu\text{g}/\text{Kg}$ FG beziehungsweise weniger als $0,5 \mu\text{g}/\text{Kg}$ FG nachweisbar. Allerdings fehlte für einen Teil der Poolproben Biomasse, so dass für die PFC genauere Aussagen erst im weiteren Verlauf des Projekts möglich sein werden.

Quecksilber konnte in allen Insektenproben nachgewiesen werden, mit einem Median von $1,2 \mu\text{g}/\text{Kg}$ FG in Hummeln und $7,4 \mu\text{g}/\text{Kg}$ FG in Ameisen. Die höhere Konzentration in Ameisen könnte deren höherer Stellung im Nahrungsnetz entsprechen sowie einem durchschnittlich höheren Alter der Individuen.

Die genetische Analyse der *F. exsecta*- Proben aus dem Jahr 2018 wurde abgeschlossen. Nach Testen der Loci wurden 12 Primer-Paare zur Analyse verwendet. Dabei zeigte sich überwiegend eine klare genetische Trennung der Nester nach

Untersuchungsgebiet. Der Verwandtschaftsgrad bei drei von fünf Nestern der Zugspitze war sehr hoch und zwei von fünf Nestern am Hohen Sonnblick wiesen ebenfalls nur geringe genetische Distanz auf. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass ein Großteil der molekularen Varianz durch die Individuen selbst erklärt wurde und der Anteil, der durch die Regionen und die Nester erklärt wurde, geringer war. Innerhalb der einzelnen Nester hingegen herrschte ein hoher Verwandtschaftsgrad.

Ausblick

Nach Auswertung der geometrischen Morphometrie und der genetischen Charakterisierung der *Bombus spp.* und der *F. aquilonia*- Proben aus den Jahren 2018 und 2019 werden diese Daten mit den Depositionsdaten der Umweltforschungsstationen und den Messwerten der chemischen Analyse statistisch in Verbindung gesetzt. So werden sich gebietsweise und intraspezifische Unterschiede der Arten analysieren lassen. Zusätzlich soll als weitere Zielgattung der Totengräberkäfer *Nicrophorus sp.* aufgenommen werden. Dadurch wird die Bioakkumulation von Insekten mit den Ernährungsweisen herbivor (*Bombus spp.*), omnivor (*F. exsecta*, *F. aquilonia*) und carnivor (*Nicrophorus spp.*) untersucht werden können.

Neben POP wirkt der Eintrag von Stickstoff als langlebiger Stoff indirekt auf Insekten, indem er die Zusammensetzung der Pflanzengesellschaften verändert (Haddad et al. 2000). Der Stickstoff wird als Nitrat und Ammoniak aus Landwirtschaft und Verkehr auch in entlegene Ökosysteme eingetragen (Bayerisches Landesamt für Umwelt 2018). Dieser Zusammenhang soll ebenfalls im Rahmen von ProtectAlps untersucht werden. Hierzu finden Vegetationskartierungen und Abfragen von Datenbanken statt. Diese Daten sollen wiederum mit Luftkonzentrationen von Ammoniak und Nitrat an den Messstationen an Zugspitze und Sonnblick verknüpft werden.

Ziel des Projekts ist nicht nur die momentane Erfassung des Vorkommens von POP als Stressoren auf Insekten in alpinen Regionen, sondern auch die Schaffung von Standards und Rahmenbedingungen für eine langfristige Umweltbeobachtung. Auf dieser Basis wird es möglich sein, die Untersuchungen zu wiederholen und den Verlauf der Belastung von Insekten mit POP kontinuierlich zu erfassen.

Danksagung:

Wir bedanken uns bei allen Unterstützern des Projekts ProtectAlps, insbesondere bei unseren Kollegen aus dem Artenschutzbereich am Bayerischen Landesamt für Umwelt, der Bayerischen Zoologischen Staatssammlung, dem Nationalpark Hohe Tauern für die Sammelgenehmigung, sowie Nils Struck, Sabrina Gurten, Anna Hofinger, Philipp Stromberger und Viktoria Leitner. ProtectAlps ist ein Projekt aus dem EU-INTERREG-A Programm Bayern Österreich (AB 173), mit Kofinanzierung durch die Zentralanstalt für Meteorologie und Geodynamik (ZAMG) und durch das Bayerische Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz.

Literatur

- Bayerisches Landesamt für Umwelt, UmweltWissen-Schadstoffe, Ammoniak und Ammonium. Helmbrechts 2018, Broschüre.
- Drummond, J., Williamson, S.M., Fitchett, A.E., Wright, G.A., Judge, S.J. (2017) Spontaneous honeybee behaviour is altered by persistent organic pollutants. *Ecotoxicology* 26: 151-150.
- Ellegreen, H., (2004) Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nature Rev. Genetics* 5: 435-445.
- Fernandes, M.E., Alves, F.M., Pereira, R.C., Aquino, L.A., Fernandes, F.L., Zanuncio, J.C. (2016) Lethal and sublethal effects of seven insecticides on three beneficial insects in laboratory assays and field trials. *Chemosphere* 156: 45-55.
- Haddad, N.M., Haarstad, J., Tilman, D. (2000) The effects of long-term nitrogen loading on grassland insect communities. *Oecologia* 124: 73-84.
- Hendrickx, F., Maelfait, J.P., Van Wingerden, W., Schweiger, O., Speelmans, M., Aviron, S. et al. (2007) How landscape structure, land-use intensity and habitat diversity affect components of total arthropod diversity in agricultural landscapes. *J Appl Ecol* 44: 340-351.
- Jones, K.C., de Voogt, P. (1999) Persistent organic pollutants (POPs): state of science. *Environ Pollut* 100: 209-221.
- Kirchner, M., Jakobi, G., Körner, W., Levy, W., Moche, W., Niedermoser, B., Schaub M., Ries, L., Weiss, P., Anritter, F., Fischer, N., Henkelmann, B., Schramm, K. W. (2016) Ambient air levels of organochlorine pesticides at three high alpine monitoring stations: trends and dependencies on geographical origin. *Aerosol Air Qual Res* 16, 738-751.
- Lambiase, S., Zhang, Y., Morbini, P., Fasola, M., Bernocchi, G., Roda, E., Griogolo, A. (2005) Tissue damage after acute intoxication by polychlorinated biphenyls in cockroaches. *Eur. J. Histochem* 49: 189-197.
- Parson, P.A. (1990) Fluctuating asymmetry: an epigenetic measure of stress. *Biol Rev Camb Philos Soc* 65: 131-145.
- Wania, F., Westgate, J.N. (2008) On the mechanism of mountain cold-trapping of organic chemicals. *Environ Sci Technol* 42: 9092-9098.

Korrespondenzadresse:

Veronika Hierlmeier
 Bayerisches Landesamt für Umwelt- Referat 76
 Staatliche Vogelschutzwarte
 Gsteigstraße 43
 D- 82467 Garmisch-Partenkirchen
 08821/9430120
 E-Mail: Veronika.Hierlmeier@lfu.bayern.de

Internet:

https://www.lfu.bayern.de/analytik_stoffe/protectalps/
<https://www.schneefernerhaus.de/startseite.html>
<https://www.sonnblick.net/de/>