



UNIVERSITÄT  
KOBLENZ · LANDAU

---

„Entwicklung eines naturschutzkonformen Konzeptes zur  
Stechmückenbekämpfung am Oberrhein“



**- Abschlussbericht -**

Gefördert durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt DBU Az 32608/01

**Projektbeginn:** 01.02.2015

**Laufzeit:** 51 Monate

**Verfasser:** Stefanie Allgeier  
Dr. Carsten Brühl  
Prof. Dr. Oliver Frör

Institution: iES Landau, Institut für Umweltwissenschaften, Universität Koblenz-Landau

**Projektkennblatt**  
der  
**Deutschen Bundesstiftung Umwelt**



Az	32608/01	Referat	Fördersumme	<b>124.579 Euro</b>
----	----------	---------	-------------	---------------------

**Antragstitel**                      **Entwicklung eines naturschutzkonformen Konzeptes zur Stechmückenbekämpfung am Oberrhein**

**Stichworte**

Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)
<b>51 Monate</b>	<b>01.02.2015</b>		

Zwischenberichte	02. Februar 2018
------------------	------------------

<b>Bewilligungsempfänger</b>	Institut für Umweltwissenschaften Universität Koblenz-Landau Fortstraße 7 D-76829 Landau	Tel	06341 28031310
		Projektleitung	Dr. Carsten Brühl
		Bearbeiter	Dr. Carsten Brühl, Stefanie Allgeier, Prof. Dr. Oliver Frör

**Kooperationspartner**                      -

### **Zielsetzung und Anlass des Vorhabens**

Seit mehr als 20 Jahren wird das Bakterium *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) regelmäßig zur biologischen Stechmückenbekämpfung am Oberrhein eingesetzt. Da der Oberrhein zu den artenreichsten Naturlandschaften Deutschlands gehört und zahlreiche Naturschutzgebiete beherbergt, sind potentielle Effekte auf Nicht-Zielarten und die aktuell hinterfragte Umweltverträglichkeit des Einsatzes von *Bti* als sehr bedenklich einzustufen. Daher ist ein wesentliches Ziel des Projektes die direkten und indirekten Auswirkungen der Stechmückenbekämpfung mit *Bti* auf die für die Nahrungskette essentiellen Zuckmücken und Amphibien als beispielhaften Mückenprädatoren zu untersuchen. Durch die Ermittlung der Betroffenheit der Bevölkerung und deren Akzeptanz einer naturschutzkonformen Bekämpfung (z.B. der Einsatz von Stechmückenfallen im häuslichen Umfeld), kann nachfolgend ein Konzept erarbeitet werden, in dem der Erhalt des nationalen Naturerbes gesichert wird.

### **Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden**

Das Projekt verfolgt einen interdisziplinären Ansatz und setzt sich im Wesentlichen aus drei ökotoxikologischen Studien (Laborstudien, Mesokosmenstudien, (Halb-)Freilandstudien), der Erprobung von alternativen Fallensystemen und sozioökonomischen Bevölkerungsumfragen zusammen. In den Laborstudien wurde die direkte Toxizität von *Bti* gegenüber Zuckmücken (*Chironomus riparius*) und subletale Effekte (Biomarker, Entwicklung) auf Grasfroschkaulquappen (*Rana temporaria*) untersucht. Die Mesokosmosexperimente (2015 und 2016) untersuchten den Einfluss von *Bti* auf die Nahrungsgrundlagen von Molch- und Libellenlarven. Dabei analysierten wir die Veränderung ihrer Nahrungszusammensetzung unter *Bti*-Behandlung mit Hilfe von stabilen Isotopen ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ) und untersuchten die damit verbundene Entwicklung, das Wachstum und die Überlebensrate von Molchlarven (*Lissotriton helveticus*). Der Fokus der drei (Halb-)Freilandstudien war die Untersuchung der Beeinträchtigung von Zuckmücken bei der Stechmückenbekämpfung unter natürlichen Bedingungen auf einer Druckwasserschlude und in einem temporär überfluteten Wald und einer Wiese. Parallel wurde der Einsatz von Stechmückenfallen (Biogents) zur Reduktion der Belästigung im häuslichen Umfeld in Berg (Pfalz) erprobt. Bei persönlichen Interviews innerhalb der betroffenen Bevölkerung am Oberrhein (2016: 300 Personen, 2017: 600 Personen) wurde unter Anwendung der kontingenten Bewertungsmethode der sozioökonomischen Nutzen der Stechmückenbekämpfung vor dem Hintergrund potenzieller Risiken für die Biodiversität ermittelt.

## **Ergebnisse und Diskussion**

Dieses Projekt lieferte den für die Biozid Zulassung wichtigen EC<sub>50</sub> Wert für Zuckmücken Erstlarven (7 ITU/L). Zudem werden Zuckmücken auch bei regulär angewandten Bti Mengen im Feld von der Stechmückenbekämpfung beeinträchtigt. Zuckmückendichten wurden unabhängig von der Komplexität des Studiendesigns durch den Bti-Einsatz um mindestens 50% reduziert. Damit reagieren Zuckmücken in diesen Systemen empfindlicher auf die Bti-Behandlung als bisher in der Literatur angenommen. Zusammen mit einer 90%igen Reduktion von Stechmückenlarven wird das Nahrungsangebot für aquatische sowie terrestrische Räuber in Feuchtgebieten erheblich beeinträchtigt und könnte indirekte Effekte entlang der Nahrungskette mit sich bringen. Zuckmücken stellen eine priorisierte Nahrung für aquatische Molchlarven dar, unabhängig ihrer Verfügbarkeit. Bti Behandlung führte zu einem geringeren Gewicht beim Landgang (7%) und einem höheren Risiko (27%) aufgrund von Nahrungslimitierung die Beute von Großlibellenlarven zu werden. Ein solcher Zusammenhang kann langfristige Folgen für die Populationsgröße von Amphibien haben. Obwohl der Kontakt von den in Deutschland verwendeten Bti-Ausbringungsformen nicht tödlich für Grasfroschkaulquappen war, zeigten sie nach Exposition subzelluläre Veränderungen, wie Entgiftungsaktivitäten und oxidativen Stress. Die Regulation dieser Prozesse, kann Nachteile auf andere wichtige Lebensfunktionen haben, die sich erst in der späteren Entwicklung zeigen können. Die Effektivität der Fallen gegenüber *Aedes vexans* konnte aufgrund der geringen Überflutungsereignisse nicht final bewertet werden, jedoch gibt es Hinweise, dass die Fallen die Überschwemmungsmücken verringern können. Die Bevölkerung befürwortet mehrheitlich eine Anpassung der Stechmückenbekämpfung bei der negative Effekte auf die Natur verringert werden, solange ein Schutz vor Stechmücken im häuslichen Bereich erhalten bleibt. Der Einsatz von Fallen innerhalb von Ortschaften könnte in Kombination mit einer reduzierten Bti-Ausbringung in Naturschutzkernzonen eine effektive und von der Bevölkerung akzeptierte naturschutzkonforme Methode der Bekämpfung sein.

## **Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation**

In mehreren (inter)nationalen Workshops, Tagungen und Informationsveranstaltungen wurde der intensive Austausch mit der lokal betroffenen Bevölkerung, Akteuren der Stechmückenbekämpfung, Naturschützern, Behördenvertretern und Wissenschaftlern gesucht. Bei allen Veranstaltungen kam es zu effektiven Gesprächen, die neue Aspekte zur Thematik geliefert und positiv zum Fortgang des Projektes beigetragen haben. Das mediale Interesse am Projekt war stets sehr groß, so dass etliche Zeitungsartikel aber auch Fernsehbeiträge entstanden sind. Insgesamt wurde dadurch das Bewusstsein der möglichen negativen Auswirkungen der Stechmückenbekämpfung in der Öffentlichkeit deutlich gesteigert. Bisher sind sechs wissenschaftliche Publikationen in internationalen Fachzeitschriften erschienen, zwei davon innerhalb assoziierter Projekte. Ein Review Artikel wird bald fertiggestellt. Die Vortragstätigkeit war mit sechs Vorträgen auf wissenschaftlichen Tagungen und weiteren lokalen Vorträgen sehr hoch.

## **Fazit**

Die viel zitierte „Umweltfreundlichkeit“ der Stechmückenbekämpfung mit Bit beruht auf einer mutmaßlich geringen Toxizität gegenüber Nicht-Zielorganismen, zu der am Oberrhein bisher keine belastbaren Feldstudien durchgeführt wurden. Unsere Studien zeigen allerdings ein unterschätztes Risiko für den Einsatz des Biozids Bti, da neben Stechmücken auch die Zuckmücken erheblich beeinträchtigt werden. Das Fehlen dieser Biomasse hat negative Konsequenzen für höhere Ebenen im Nahrungsnetz, wie z.B. auf schützenswerte Amphibien. Eine objektive Aufklärung über die Übertragung und Ausbreitung tropischer Krankheiten erscheint dringend nötig, vor allem in Bezug auf die Unterschiede der Bekämpfungsstrategie. Die Bevölkerung ist gegenüber einer umweltverträglicheren Strategie aufgeschlossen, auch wenn dies eine höhere finanzielle Beteiligung auch der betroffenen Haushalte mit sich bringen würde. Das Forschungsvorhaben gestaltete sich auf Grund seiner politischen Brisanz in seiner Durchführung zuweilen als sehr schwierig. Aus unserer Sicht müssen daher zukünftige Untersuchungen von der Politik unterstützt und von unabhängiger Seite durchgeführt werden. Für ein naturschutzkonformes Konzept zur Stechmückenbekämpfung am Oberrhein schlagen wir vor, den vermehrten Einsatz von lokalen Fallensystemen im häuslichen Bereich zu prüfen und die Stechmückenbekämpfung vor allem in Naturschutzgebieten zu reduzieren oder gar vollständig einzustellen.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Hintergrund .....	1
1.2	Stechmückenbekämpfung in Deutschland.....	3
1.3	Konfliktfeld Stechmückenbekämpfung und Naturschutz .....	5
1.4	Zielsetzung.....	7
2	Methoden .....	8
2.1	Untersuchungsgebiet .....	8
2.2	Ökotoxikologische Untersuchungen .....	9
2.2.1	Laborstudien .....	9
2.2.2	Mesokosmosstudien.....	11
2.2.3	Halbfreiland- und Freilandstudien.....	13
2.3	Konzept zur alternativen Stechmückenbekämpfung .....	17
2.4	Sozioökonomie.....	18
3	Ergebnisse und Diskussion .....	20
3.1	Einfluss auf Zuckmücken.....	20
3.1.1	Effekte auf Zuckmücken im Labor .....	20
3.1.2	Effekte auf Zuckmücken im Mesokosmos .....	22
3.1.3	Effekte auf Zuckmücken und deren Artzusammensetzung im (Halb-)Freiland.....	24
3.2	Einfluss auf Amphibien.....	27
3.2.1	Direkte Effekte.....	27
3.2.2	Indirekte Effekte .....	29
3.3	Effektivität der Mückenfallen am Oberrhein .....	31
3.4	Gesellschaftliche Sicht .....	34
3.5	Zusammenarbeit mit lokalen Akteuren .....	39
3.6	Medien- und Öffentlichkeitsarbeit .....	41
3.6.1	Workshops und Tagungen .....	41
3.6.2	Presseberichte .....	44
3.6.3	Wissenschaftliche Vorträge und Publikationen .....	46
4	Synthese und Fazit.....	47
5	Literatur.....	50
6	Appendix: Open access publications .....	58

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zeitungsartikel zur Stechmückenbekämpfung und Naturschutz von 1974 bis 2015.....	7
Abbildung 2: Helikopterausbringung von Bti am Oberrhein beispielhaft zwischen Leimersheim und Speyer innerhalb von Schutzgebieten (FFH, VSG, NSG) (rot) und außerhalb von Schutzgebieten (grau).....	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus des Laborexperimentes mit Grasfroschkaulquappen ( <i>R. temporaria</i> ). Dabei wurden die Kaulquappen mit drei Formulierungen (Eis, Flüssig, Sand) bei drei Feldraten (FR: 1x, 2x, 10x) insgesamt dreimal zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten (Applikation 1-3) behandelt. 48h nach jeder Applikation wurde jeweils eine Kaulquappe für Biomarkeranalysen entnommen (n=10) (nach Allgeier et al., 2018).....	11
Abbildung 4: a) Aufbau der Mesokosmosstudie und b) Inhalt der Mesokosmen exemplarisch für Experiment 2 (2016).....	12
Abbildung 5: Set-up der Enclosures der Halbfreilandstudie bei Hagenbach auf a) Überflutungsfläche und b) in einer Druckwasserschluhle am Rhein bei Hagenbach .....	14
Abbildung 6: Räumliche Darstellung der vier Studien zu Zuckmücken. Halbfreilandstudie mit Enclosures wurde in einem unbehandelten, temporär gefluteten Feuchtgebiet am Rhein durchgeführt ( $\Delta$ ). Eine Feldstudie fand in einem Feuchtgebiet im Wald ( $\circ$ ) (Bti (schwarz), n = 4; Kontrolle (weiß), n = 5) statt. Eine weitere auf einer überfluteten Wiese ( $\square$ ), die durch Split-Design in einen behandelten (schwarz) und einen unbehandelten (weiß) Teil unterteilt wurde (nach Allgeier et al. (2019). .....	15
Abbildung 7: Emergenzfalle auf einem tiefen Bereich der Untersuchungsfläche „Wiese“. ....	16
Abbildung 8: a) Biogents-Mosquitaire-CO2 Falle. b) Verteilung der Stechmückenfallen über Berg (Pfalz) aufgeteilt in verschiedene Schutzkonzepten: Einzelhäuser, Fallenring, Fallenwall.....	18
Abbildung 9: Durchführung der Betroffenheitsbefragung 2016 an 14 lokalen Supermärkten nah am Rhein (blau) und etwas weiter entfernt (rot). .....	19
Abbildung 10: EC50 Werte mit 95% Konfidenzintervall der täglich durchgeführten Akutttests über die gesamte Entwicklungsdauer (28 Tage) von <i>Chironomus riparius</i> Larven (nach Kästel et al. ,2017).....	20
Abbildung 11: Entwicklung der Dichten von (A) Stech- und (B) Zuckmückenlarven in Bti (schwarz) und Kontrolle (weiß) im Mesokosmosversuch 2016. Statistisch	

	signifikante Unterschiede werden durch Sterne angezeigt. Gestrichelte Linien stellen die Applikationszeitpunkte dar (nach Allgeier et al., 2019).....	23
Abbildung 12:	Mittlere Glutathion-S-Transferase (GST) Aktivität $\pm$ 95% Konfidenzintervall in Grasfroschkaulquappen nach dreimaliger Bti Applikation in verschiedenen Entwicklungsstufen, dargestellt in Kontrolle und Ausbringungsformen (Eis, Flüssig, Sand) bei steigenden Applikationsraten ( $\circ$ : 1x Feldrate, $\Delta$ : 2x Feldrate, $\square$ : 10x Feldrate). Statistisch signifikante Unterschiede werden durch Sterne angezeigt (nach Allgeier et al., 2018). .....	28
Abbildung 13:	Anteilige Beutetiere in der Nahrung von Molchlarven ( <i>L. helveticus</i> , <i>L. vulgaris</i> ). Linien=Median, Box=50% Konfidenzintervall, Fehlerbalken=95% Konfidenzintervall (nach Allgeier et al., 2019).....	29
Abbildung 14:	Mittlere ( $\pm$ SE) Größe und Entwicklung der <i>L. helveticus</i> Larven zum Zeitpunkt der Metamorphose (nach Allgeier et al., 2019).....	30
Abbildung 15:	Mittlere Überlebensrate von Molchlarven ( <i>L. helveticus</i> , <i>L. vulgaris</i> , n=11) unter Kontrollbedingungen und Bti-Behandlung bei Anwesenheit und Abwesenheit einer Großlibellenlarve ( <i>A. cyanea</i> ) (nach Allgeier et al., 2019).....	31
Abbildung 16:	Zeitverlauf der Stechmückenanflugraten von Juni bis August 2017. Gestrichelte Linie stellt die Aktivierung der Biogents-Fallen dar. ....	33
Abbildung 17:	Ergriffene Schutzmaßnahmen gegen Stechmücken (Mehrfachnennungen möglich). .....	34
Abbildung 18:	Ansichten zur Notwendigkeit der Weiterentwicklung der Stechmückenbekämpfung (N=600) .....	36
Abbildung 19:	Ansichten zur vorgeschlagenen Variante der Stechmückenbekämpfung (N=600).....	36
Abbildung 20:	Verteilung der Antworten auf die Frage nach der Zahlungsbereitschaft für die alternative Variante der Stechmückenbekämpfung (N=600).....	37
Abbildung 21:	Weitere Ansichten zur vorgeschlagenen Variante bei Zustimmung zur Umstellung .....	38
Abbildung 22:	Bereitschaft zur Anschaffung einer privaten Stechmückenfalle (N=600) .....	38
Abbildung 23:	Zahlungsbereitschaft für private Stechmückenfallen .....	39

## Abkürzungsverzeichnis

AChE	Acetylcholinesterase
Bti	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
CVM	Contingent Valuation Method
EC <sub>50</sub>	Effect Concentration 50%
FFH	Fauna-Flora-Habitat
GIS	Geoinformationssysteme
GR	Glutathion Reduktase
GST	Glutathion-S-Transferase
HLR	Human Landing Rate
ITU	International Toxic Units
KABS e.V.	Kommunale Aktionsgemeinschaft zur Bekämpfung der Schnakenplage e.V.
LC <sub>50</sub>	Lethal Concentration 50%
NSG	Naturschutzgebiet
RLP	Rheinland-Pfalz
SE	Standard error (Standardfehler)
SETAC	Society of Environmental Toxicology and Chemistry
SGD	Struktur- und Genehmigungsdirektion
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
VSG	Vogelschutzgebiet

# 1 Einleitung

## 1.1 Hintergrund

Stechmücken belästigen die menschliche Bevölkerung bereits seit Jahrhunderten. Gründe dafür sind einerseits die Gefahr von Krankheiten die durch Stechmücken übertragen werden können, aber auch die Belästigung die durch die reine Anwesenheit von Mücken und Mückenstiche entsteht (Becker et al., 2010). Besonders große Belästigung entsteht vor allem nach Überschwemmungsereignissen von temporären Feuchtgebieten. Nach Wasserkontakt erfahren die Eier von Überschwemmungsarten wie *Aedes vexans* und *Ae. sticticus* einen Schlupfreiz, der zu einem Massenschlupf der Stechmückenlarven führt. Das massenhafte Auftreten von Überschwemmungsmücken stellt oftmals eine starke Belastung für die lokale Bevölkerung dar und kann die Lebensqualität in solchen Gebieten verringern (Becker, 2006; Schäfer und Lundström, 2014). Die Bekämpfung von Überschwemmungsmücken erfordert eine umfassende flächendeckende Behandlung von regelmäßig überfluteten Feuchtgebieten z.B. entlang des Rheins.

Um Stechmücken zu bekämpfen wurden anfangs synthetische Insektizide wie Organophosphate und Pyrethroide eingesetzt, jedoch bemerkte man bald, dass deren Einsatz erhebliche Nachteile wie die Entwicklung von Resistenzen oder negative Auswirkungen auf die Umwelt und die menschliche Gesundheit hat (Hemingway und Ranson, 2000). Infolgedessen nahm der Einsatz von spezifischer wirkenden Bio-Pestiziden in den letzten Jahrzehnten stark zu. Vor allem kommerzielle Formulierungen mit dem Wirkstoff *Bacillus thuringiensis* serotyp *israelensis* stellen eines der wichtigsten bakteriellen Insektizide zur Bekämpfung von Stechmücken (Culicidae), Kriebelmücken (Simuliidae) und Zuckmücken (Chironomidae) dar (Becker, 2006; Lacey und Merritt, 2003).

*Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) ist ein bodenlebendes Bakterium, das seit der Entdeckung seiner toxischen Wirkung 1976 gegenüber Stechmückenlarven weltweit zu deren biologischen Bekämpfung eingesetzt wird. Mittlerweile ist der aktive Wirkstoff Bti das einzige Larvizid das zur Anwendung in der Stechmückenbekämpfung zugelassen ist und im Anhang I der EU-Biozid-Richtlinie aufgenommen wurde (European Commission, 2011). Bti entfaltet seine toxische Wirkung nach der oralen Aufnahme im Darm der Mückenlarven. Im alkalischen Darmmilieu der Larven wird ein  $\delta$ -Endotoxin, das im Zuge der Sporulation des Bakteriums gebildet wurde, in kleinere toxische Eiweißkomponenten (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, Cyt1Aa) zerlegt (Ben-Dov, 2014). Diese Toxine binden daraufhin an spezifische Rezeptorstellen am Mitteldarmepithel der Larve und führen dort zu einer Perforation des Darmes. Je nach aufgenommener Menge stirbt die Mückenlarven in wenigen Minuten bis Stunden (Boisvert und Boisvert, 2000; Bravo et al., 2007). Aufgrund dieser Spezifität in der Wirkung galt der Einsatz Bti bisher als umweltfreundlichste Methode, da bei empfohlener Dosis nicht mit



direkten Effekten auf andere Wasserlebewesen außer Mücken (Nematocera) zu rechnen ist (Boisvert und Boisvert, 2000). Die spezifischen Bedingungen treten jedoch auch im Darm von Zuckmücken auf, die bei der Stechmückenbekämpfung sogenannte Nicht-Ziel-Organismen darstellen und nicht negativ beeinträchtigt werden sollten. Da die nicht-stechenden Zuckmücken aufgrund ihres massenhaften Auftretens an Seen von der Bevölkerung ebenfalls als unangenehm empfunden werden, wird Bti auch zur Kontrolle von Zuckmückenpopulationen eingesetzt (Vaughan, Newberry, Hall, Liggett & Ormerod, 2008)

Zuckmücken sind nicht-stechende Mücken, die sowohl als Larven als auch Adulte ein wichtiger Bestandteil der Makroinvertebraten-Biomasse in den meisten aquatischen Ökosystemen sind. Neben ihrem allgegenwärtigem Vorkommen, sind Zuckmücken gekennzeichnet durch hohe Artenzahlen und Dichten, einem hohen Proteingehalt und guter Verdaulichkeit (Armitage, Pinder & Cranston, 1995; De La Noüe & Choubert, 1985). Stech- aber vor allem Zuckmücken stellen deshalb wichtige Nahrungsgrundlage für terrestrische, aber auch weniger mobile aquatische Prädatoren in den Ökosystemen der Auen- und Feuchtgebiete dar (DuRant und Hopkins, 2008; Quiroz-Martínez und Rodríguez-Castro, 2007). Der Einsatz von Bti kann daher, einhergehend mit Veränderungen der Grundlagen im Nahrungsnetz, zu weitreichenden indirekten Effekten auf Räuber wie Fledermäuse, Libellen, Vögel oder Amphibien führen.

Untersuchungen aus Frankreich zeigten Beeinträchtigungen von Mehlschwalben und Libellen im Naturschutzgebiet der Camargue nach drei Jahren regelmäßiger Bti Behandlung (Jakob & Poulin, 2016; Poulin, 2012; Poulin, Lefebvre & Paz, 2010). Diese Ergebnisse führten dazu, dass die Umweltverträglichkeit der Bti-basierten Stechmückenbekämpfung erneut hinterfragt wurde. Während *Bti* in mehr als 25 Ländern zur Bekämpfung von Überschwemmungsmücken eingesetzt wird, wurden die Feldstudien zu deren Umweltauswirkungen lediglich in Frankreich, Schweden und den USA durchgeführt (Land & Miljand, 2014). Trotz der langjährigen und umfangreichen Anwendung von *Bti* im deutschen Oberrheintal konzentrierte sich bisher nur eine Arbeit speziell auf Zuckmücken (Fillinger, 1998) während indirekte Effekte auf Basis von Verschiebungen in der Nahrungskette noch gar keine Beachtung fanden.

Saisonale, fischlose Kleinstgewässer und Überschwemmungsgebiete um Flüsse bieten optimale Brutplätze nicht nur für Mückenlarven sondern auch für Amphibien. Die Larvenentwicklung der meisten europäischen Amphibienarten fällt mit wiederkehrenden Stechmückenbekämpfungsmaßnahmen im Frühjahr und Sommer zusammen. Amphibien können daher sowohl direkt mit Bti in Kontakt kommen, jedoch auch indirekt betroffen sein, da Molche sich bereits im Larvenstadium räuberisch von aquatischen Invertebraten, u.a. Mückenlarven ernähren. Trotz des potenziellen Expositionsrisikos für Amphibien gibt es nicht viel (öko-

)toxikologische Forschung zu Bti und Amphibien, obwohl deren Populationen weltweit mit alarmierender Geschwindigkeit zurück gehen (Stuart et al., 2004). In Anbetracht der Tatsache, dass Amphibien Schlüsselkomponenten für den Energietransfer zwischen aquatischen und terrestrischen Lebensräumen sind (Gibbons et al., 2006), werden dringend ökotoxikologische Daten benötigt, um Amphibien zu schützen und das ökologische Gleichgewicht in den Ökosystemen von Feuchtgebieten zu wahren.

Für einen gesicherten Einsatz des Biozids Bit innerhalb von Feuchtgebieten sollte neben ungewollten Auswirkungen auf die Nicht-Ziel Biota sichergestellt sein, dass Bti nach Ausbringung nicht langfristig in der Umwelt verbleibt (geringe Persistenz) und Stechmücken daraufhin Resistenzen ausbilden können. Bti ist eine Suspension aus Sporen und vier verschiedene Eiweißkristallen, die in ihrer Mischung für die toxischen Effekte bei Stechmücken verantwortlich sind. Während die einzelnen Eiweißkristalle unterschiedliche lange in der Umwelt verbleiben können (Tetreau et al., 2012), können die langlebigen Bestandteile des Bakteriums, die Sporen, noch mehrere Monate nach dem Ausbringen nachgewiesen werden (Duchet et al., 2014; Respinis et al., 2006). Um einem möglichen, aber unwahrscheinlichem Recycling der Sporen (Tilquin et al., 2008) vorzubeugen, muss das ausgebrachte Bti in Deutschland vor der Anwendung durch Gammastrahlung sterilisiert werden, um lebensfähige Sporen oder Zellen zu entfernen (Becker et al., 2018). Die Ausbildung von Resistenzen gegenüber einzelnen Toxinen ist möglich (Stalinski, Tetreau, Gaude & Després, 2014), jedoch wurde auch nach 36 Jahren Behandlung bisher noch keine Resistenzbildung gegenüber der eingesetzten Toxinmischung im Freiland beobachtet (Becker et al., 2018; WHO, 2005).

## 1.2 Stechmückenbekämpfung in Deutschland

In Deutschland wird Bti seit Mitte der 1980er Jahren vor allem in Überschwemmungsgebieten entlang des Oberrheins mit dem Ziel eingesetzt, die Belästigung für die lokale Bevölkerung zu verringern (Becker, 2006). Um einen von der Bevölkerung spürbaren Effekt zu erzielen müssen die Stechmückenlarvenpopulation um >90% reduziert werden (Becker, 1997). Verantwortlich für die großflächige Bekämpfung mit Bti am Oberrhein ist der Verein „Aktionsgemeinschaft zur Bekämpfung der Schnakenplage e.V.“ (KABS e.V.) mit Sitz in Speyer, Rheinland-Pfalz. Der Verein finanziert sich über Beiträge der 100 Mitgliedsgemeinden sowie der Länder Baden-Württemberg und Rheinland-Pfalz. Der Etat der KABS e.V. beträgt in etwa 3,5 Mio. Euro/Jahr (KABS e.V., 2016), die vom Großteil der Bevölkerung auch gerne im Rahmen von Gemeindebeiträgen für den Zweck der Stechmückenbekämpfung bezahlt werden. Das Gebiet der KABS e.V. erstreckt sich entlang von ca. 300 Rhein-Kilometern zwischen dem Rheingau im Norden bis zum Kaiserstuhl im Süden und umfasst eine behandelte Fläche von 400.000 ha (jährlich 60.000 ha) (Becker et al., 2018). Von 1981 bis 2016 wurden in diesem Bereich insgesamt 4.988 Tonnen Bti-haltige Formulierungen ausgebracht. Die

jährliche Behandlungshäufigkeit der Feuchtgebiete beträgt im Mittel 5-mal, variiert je nach Rheinpegel aber zwischen 1 und 11-mal zwischen April und September (Becker et al., 2018). Rufe nach Stechmückenbekämpfung werden in weiteren Teilen Deutschlands laut, z.B. nach größeren Hochwassern an Elbe, Donau, dem Bodensee oder an bayrischen Seen wie dem Ammersee. Wie bei der Bekämpfung am Oberrhein ist auch hier die Belästigung durch das Auftreten von Stechmücken der ausschlaggebende Grund für die Forderung nach intensiven Bekämpfungsmaßnahmen.

Die Ausbringung von Bti erfolgt je nach Gebiet und Bekämpfungsstrategie entweder mit dem Hubschrauber oder zu Fuß. Dabei kommen verschiedene Formulierungen zum Einsatz deren Toxizität im Allgemeinen in International Toxic Units (ITU) angegeben wird (Skovmand und Becker, 2000). Zwei Drittel des Anwendungsgebietes werden mit dem Hubschrauber appliziert, der Bti-haltiges Eisgranulat (IcyPearls®) abwirft. Das Eisgranulat besteht aus der Formulierung VectoBac® WG (3000 ITU/mg) das mit Hilfe von Flüssigstickstoff in 4 mm große Kugeln umgewandelt und gefroren gelagert wird (Becker, 2003). Für die Bodenapplikation der restlichen Fläche werden entweder Rückenspritzen mit flüssigem VectoBac® WG oder VectoBac® 12AS (1200 ITU/mg) befüllt oder es wird ein Sandgranulat auf Basis von Grobsand und VectoBac® WG mit der Hand ausgeworfen.

Die in Deutschland eingesetzten Bti-Produkte müssen im Gegensatz zu andern europäischen Ländern sterilisiert werden, was zu einer Verringerung der Toxizität um 20-30% führt (Becker, 2002). Die Applikationsmenge wird grundsätzlich als ITU/ha-Gewässer angegeben und beträgt beim Hubschrauber 0,6 kg VectoBac® WG/ha ( $1,44 \times 10^9$  ITU/ha) und bei der Bodenapplikation 0,5 kg VectoBac® WG/ha ( $1,2 \times 10^9$  ITU/ha). Die Ausbringungsmenge ist abhängig vom Befallsgrad mit Mückenlarven und der Wasserqualität (BAuA, 2018), so wird die Ausbringungsmenge an Standorten mit tieferem Wasser (> 10 cm), einer hoher Mückendichte und älteren Stechmückenlarven routinemäßig verdoppelt, um einen ausreichenden Behandlungserfolg zu erzielen (BAuA, 2018; Becker, 2003). Eine verdoppelte Ausbringungsmenge wird häufig bei der Bekämpfung von univoltinen Schneeschmelzmücken (*Ochleratus communis*, *Oc. punctor*, *Ae. rusticus*, *Ae. cinereus*) angewandt (Becker, 2003; Schäfer et al., 1997).

Im Gegensatz zur erhöhten Belästigung durch Überschwemmungsmücken (*Ae. vexans*) steht die Angst vor der Verbreitung von durch Stechmücken übertragenen Krankheiten. Diese sogenannten Vektorarten lassen sich jedoch nicht mit einer Hubschrauberausbringung von Bti in Feuchtgebieten bekämpfen. Vektoren wie *Anopheles plumbeus* oder auch die asiatische Tigermücke (*Ae. albopictus*) zählen zu den Container-Brütern und entwickeln sich in menschnahen Kleingewässern wie Wasseransammlungen in Autoreifen, Blumenvasen oder Astlöchern. Die asiatische Tigermücke wurde im Stadtgebiet Heidelbergs, auf Friedhöfen und Gartenanlagen in Freiburg und auf Autobahnraststätten nachgewiesen. Zur Bekämp-

fung sind hierbei gezielte Maßnahmen wie die Ausbringung von Bti in Tablettenform und die Reduktion von Kleingewässern z.B. in Gartenanlagen zielführend (Becker et al., 2017). Ein Blick auf die in 2017 gemeldeten tropischen Erkrankungen zeigt, dass nur in sehr seltenen Fällen tropische Krankheiten innerhalb Deutschland übertragen werden (Falkenhorst, Enkelmann, Frank & Stark, 2018): Als einziger Fall wird eine Infektion mit Malaria genannt: Dabei handelt es sich um eine Krankenschwester, die sich durch einen Nadelstich bei einem Patienten mit Malaria tropica infizierte. Das im Zusammenhang mit Stechmücken oft erwähnte Chikungunya-Fieber wurde 33-mal festgestellt und dabei nie in Deutschland und nur einmal in Europa (Italien) übertragen. Auch Dengue-Fieber (635 Fälle) und Zika (69 Fälle) wurden nicht in Deutschland übertragen, die meisten Fälle wurden einer Infizierung in Thailand oder Mittelamerika zugeordnet. Bei der Bekämpfung von Stechmücken sollte daher klar unterschieden werden zu welchem Ziel und auf welche Weise bestimmte Arten bekämpft werden um zu zeigen, dass die Angst der Bevölkerung vor tropischen Krankheiten nicht mit einer großflächigen Ausbringung von Bti in Feuchtgebieten verringert werden kann.

### **1.3 Konfliktfeld Stechmückenbekämpfung und Naturschutz**

Schon in den 1970er Jahren wurden Stimmen aus dem Naturschutz laut, die eine Bekämpfung von Stechmücken kritisch sahen (siehe Zeitungsausschnitte Abb. 1). Die grundlegende Befürchtung bestand in einem Einbruch des Nahrungsnetzes in dem vor allem höhere trophische Ebenen, mit Arten, die sich von Stechmücken ernähren, betroffen sind. Da sowohl Stech- als auch Zuckmücken ab bestimmten Dosen von Bti betroffen sind, werden substantielle Anteile der aus Gewässern schlüpfenden Biomasse an Mücken abgetötet. In Gewässern ernähren sich andere Insekten wie z.B. Libellenlarven aber auch Amphibien und Fische von Stech- und Zuckmückenlarven. Für ein gutes Wachstum der Fischbrut ist das Vorhandensein beider Gruppen essentiell. Die adulten Stech- und Zuckmücken werden nach dem Schlupf von Libellen, Vögeln oder Fledermäusen gefressen und werden z.B. an die Vogelbrut verfüttert. Die frühsummerlichen Massenschlüpfe mit der großen, damit einhergehenden Biomasse, stellen einen Transfer aus den zu diesem Zeitpunkt hochproduktiven aquatischen Systemen in den terrestrischen Bereich dar (Schulz et al., 2015). Diese Biomasse deckt zu diesem Zeitpunkt die hohen energetischen Kosten, die für die Aufzucht von Jungen benötigt wird, z.B. bei der Fütterung der Vogelbrut oder zur Laktation der Jungen von Fledermäusen.

**Umweltschützer: Blutsauger sollen weiterleben**

Schnakenplage in vielen Bodenseeornten so schlimm wie nie zuvor – Widerstände gegen Vernichtungsaktionen

*Walden* **Waldschnaken 1982 so gut wie ausgerottet?** *Rhpf 26.11.*  
 Wissenschaftler mit Bekämpfungsaktion sehr zufrieden

Seite 10 Nummer 156

*M. 7. 83.*

Bei diesjähriger Schnakenbekämpfung neues Gift angewendet:

**Umwelt wurde geschont**

In 60 Flugstunden versprühten Hubschrauber das Mittel „Bti“

Seite 14 · Frankfurter Rundschau

*23.07.86*

**HES**

**Wenn Abend für Abend die Stechmücken sirren**

Schnakenplage quält Bewohner der Nidder-Aue / Doch Gifteinsatz im Naturschutzgebiet?

**ZEIT  ONLINE | LÄNDERSPIEGEL**

SCHNAKEN-KRIEG

1987

**Die Lage ist ernst!**

Wie aus der Mücke ein politischer Elefant wurde

*Altenstadt/Wetterau*

Wer es danach noch wagte, Bedenken gegen den Einsatz des biologischen Präparates, das die Darmwände der Mückenlarven zerstört, öffentlich zu äußern, dem erging es übel. Der Vogelschützer Karl Winther zum Beispiel, selbst in Altenstadt zuhause, wurde niedergebrüllt. Seine Warnung, mögliche langfristige Nebenwirkungen von BTI auf andere Tiere seien noch unerforscht, blieb bei den Betroffenen ohne Echo.

Für Vorsicht plädierten der gerade ins Amt gekommene Grüne und Umweltdezernent des Wetteraukreises, Rudolf Schwedes, und auch der Grüne Joschka Fischer, zu der Zeit hessischer Umweltminister.

**Badische Zeitung**

GEFÄHRLICH ODER NICHT?

## Schnakenbekämpfung am Bodensee: Sorge vor Kollateralschäden

**Surrende Mücken oder knatternde Hubschrauber – was nervt mehr? Diese Frage haben die meisten Kommunen am Bodensee für sich beantwortet und lassen den lästigen Blutsaugern den Vortritt.**

**2013****Süddeutsche Zeitung**

WISSEN

Montag, 23. März 2015, Nr. 68

**2015**

## Nach der Plage

Die Stechmücken am Rhein werden seit Langem mit dem angeblich umweltverträglichen Insektizid BTI bekämpft. Das Mittel wird sogar in Naturschutzgebieten eingesetzt. Dabei sind die Folgen für das Ökosystem unklar

**Abbildung 1: Zeitungsartikel zur Stechmückenbekämpfung und Naturschutz von 1974 bis 2015.**

In den letzten Jahren hat sich der Konflikt im Naturschutz nochmals zugespitzt. Die Bekämpfungsfläche am Oberrhein liegt in Rheinland-Pfalz in ca. 90% der Fälle in Schutzgebieten (NSG, VSG, FFH; siehe 2.1). Dazu kommen aktuell beobachtete Biomasserückgängen von Insekten in Schutzgebieten, die bei 75% in den letzten 27 Jahren liegen (Hallmann et al., 2017). Die Rückgänge von Insekten generell und im spezifischen der Bienen und Bestäuber, führten zu einem Volksbegehren in Bayern an dem sich über 18% der Bevölkerung beteiligten. Daraus ergingen Forderungen an eine Verschärfung des Naturschutzes. Auch im Bundestagswahlkampf der Grünen wird dieser Gedanke aufgegriffen und erwähnt „Findet die Schwalbe keine Mücke, sind auch ihre Tage gezählt“ (BÜNDNIS 90/DIE GRÜNEN, 2017). Das Bundesministerium für Umwelt (BMU) reagierte im Herbst 2018 mit einem Konzeptpapier zum Insektenschutz (BMU, 2018)

Aus diesen Entwicklungen ergibt sich ein Konflikt zwischen dem Ausbringen von Bti in Naturschutzgebieten zur flächendeckenden Bekämpfung lästiger Stechmücken und einer gleichzeitigen hohen Sensibilisierung für die Leistungen und den Erhalt der Natur in der Bevölkerung, wobei Insekten heutzutage besondere Beachtung finden.

### 1.4 Zielsetzung

Die zentrale Frage des Projektes ist, ob und wie Stechmückenbekämpfung naturschutzkonform gestaltet werden kann, so dass sie von der Bevölkerung akzeptiert wird und gleichzeitig der Erhalt des nationalen Naturerbes gesichert wird. Um dieser Frage nachgehen zu können, muss zuerst untersucht werden, wie sich die derzeitige Stechmückenbekämpfung mit Bti auf

die Ökosysteme von Feuchtgebieten entlang des Oberrheins auswirkt. Das langfristige Ziel dieses Projektes könnte ein naturschutzkonformes, nachhaltiges Management der Stechmückenbekämpfung sein, das durch Bewusstseinskampagnen und gezieltere Stechmückenbekämpfung eine Balance zwischen sozialer Nachfrage und möglichst geringen Biodiversitätsverlusten im Bereich der Nicht-Zielarten innerhalb und außerhalb von Schutzgebieten schafft.

Dabei ist das Projektziel die Beantwortung folgender konkreter Fragen:

1. Welche direkten oder indirekten Effekte hat die Bti-basierte Stechmückenbekämpfung auf Nicht-Zielorganismen wie Zuckmücken und Amphibien? Wirkt sich das Fehlen von Mücken auf die Nahrungskette innerhalb von saisonalen Feuchtgebieten aus?
2. Wie effektiv ist der Einsatz von Stechmückenfallen bei massenhaftem Auftreten von Überschwemmungsmücken? Sind Stechmückenfallen eine Alternative für Bekämpfung im häuslichen Umfeld, indem sie die Belästigung deutlich reduzieren?
3. Wie ist die Wahrnehmung der lokalen Bevölkerung hinsichtlich der Belästigung durch Stechmücken und dem Eingriff in die Natur durch eine großflächige Bekämpfung? Würde die Bevölkerung ein naturschutzkonformeres Konzept akzeptieren, wenn damit eventuelle Einschränkungen verbunden wären?

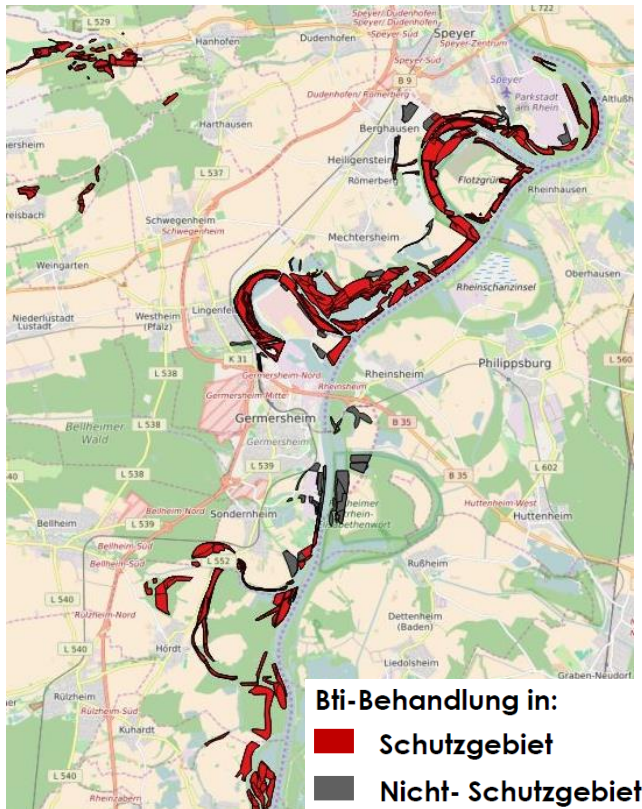
## **2 Methoden**

### **2.1 Untersuchungsgebiet**

Das Untersuchungsgebiet befindet sich entlang des Oberrheintals im Süden von Rheinland-Pfalz zwischen der französischen Grenze und Speyer. Der Oberrhein gehört zu den artenreichsten Naturlandschaften Deutschlands und ist einer von 30 in Deutschland vom Bundesamt für Naturschutz ausgewiesenen „Hotspots der biologischen Vielfalt“, die durch eine besonders hohe Dichte und Vielfalt charakteristischer Arten, Populationen und Lebensräume gekennzeichnet sind. Die Region am Oberrhein verfügt mit ihren Auenbereichen und Feuchtgebieten über äußerst sensible Lebensräume, die durch viele speziell ausgewiesene Schutzgebiete national sowie auch international geschützt werden. Darunter zählen Natur-, Landschafts- und Amphibienschutzgebiete aber auch Natura 2000 Schutzgebiete wie Vogelschutzgebiete und Gebiete, die nach der Fauna-Flora-Habitat-Richtlinie ausgewiesen sind. Der Oberrhein ist außerdem nach UNESCO-Konvention von 1971 als „Ramsar-Gebiet“ zertifiziert und somit ein einzigartiger Lebensraum für Wasser- und Watvögel mit internationaler Bedeutung und genießt damit den gleichen Stellenwert wie die Everglades in Florida oder die Camargue in Frankreich.

Trotz des Schutzstatus dieser Feuchtgebiete wird Bti seit mehr als 20 Jahren bis zu 11-mal jährlich ausgebracht, zum größten Teil mit dem Hubschrauber. GIS-Analysen der Helikopter-

behandlung der KABS e.V. im Jahr 2016 ergaben, dass der Großteil (86,5%) der Helikopter behandelten Flächen in Rheinland-Pfalz in Schutzgebieten (FFH, VSG, NSG) lagen (Abb. 2). Nur 13,5% der Flächen, die mit dem Helikopter behandelt wurden lagen außerhalb von Schutzgebieten und stellten siedlungsnahe Bereiche dar, wie z.B. Ludwigshafen Gartenstadt.



**Abbildung 2:** Helikopterausbringung von Bti am Oberrhein beispielhaft zwischen Leimersheim und Speyer innerhalb von Schutzgebieten (FFH, VSG, NSG) (rot) und außerhalb von Schutzgebieten (grau).

## 2.2 Ökotoxikologische Untersuchungen

### 2.2.1 Laborstudien

Obwohl Laborversuche kein Teil des Projektantrages waren, wurden zusätzlich zum beantragten Vorhaben zwei Laborversuche zu Zuckmücken und Amphibien durchgeführt. Die daraus resultierenden Ergebnisse sind ein grundlegender Beitrag in der Bewertung der Umwelt Risiken des Bti-Einsatzes und bilden die Grundlage für die nachfolgenden Versuche im Freiland.

#### *Zuckmücken*

Aufgrund ihrer physiologischen Ähnlichkeit zu Stechmücken, sind auch die nicht-stechenden Zuckmücken empfänglich für die von Bti produzierten Toxine und stellen in manchen Gebie-



ten der Erde sogar das Ziel der Bti Behandlung dar (Boisvert & Boisvert, 2000; Vaughan et al., 2008). Bisher wurde jedoch angenommen, dass Zuckmücken weniger empfindlich auf Bti reagieren und deren Larven erst bei einem Vielfachen der empfohlenen Dosis zur Stechmückenkontrolle beeinträchtigt werden (Becker & Lüthy, 2017). Diese Annahmen basierten größtenteils auf Laborstudien mit älteren Larvenstadien der Zuckmücken (Kondo, Ohba & Ishii, 1995; Stevens, Helliwell & Hughes, 2005), wobei generell angenommen wird, dass jüngere Entwicklungsstadien sehr viel empfindlicher sind als ältere Larven. Darüber hinaus sind die kleinsten Entwicklungsstadien, direkt nach dem Schlupf, oft freischwimmend (Armitage et al., 1995), so dass sie Bti ebenso ausgesetzt sind wie Stechmückenlarven. In der Literatur gab es bisher keinen  $EC_{50}$  Wert (Konzentration eines Stoffes bei dem 50% der Versuchspopulation Effekte zeigen) für Bti und Zuckmücken-Erstlarven obwohl dies ein Standardtest in der ökotoxikologischen Risikobewertung von Pestiziden ist. In einem standardisierten Laborversuch untersuchten wir die Empfindlichkeit von *Chironomus riparius* gegenüber VectoBac WG (2400 ITU/mg) in den verschiedenen Entwicklungsstadien. Die Tests folgten der OECD Richtlinie 235 und wurden an jedem Tag der fortschreitenden Larvalentwicklung durchgeführt.

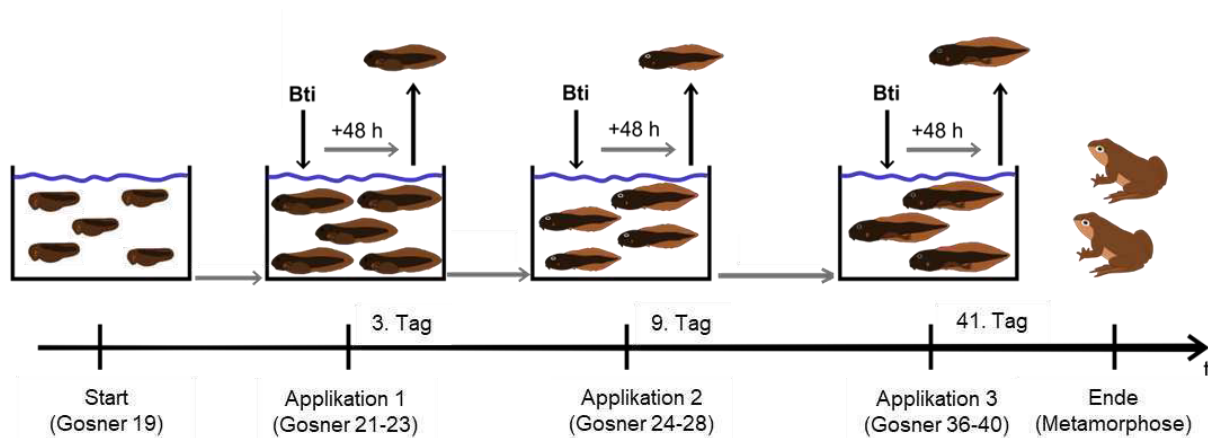
### *Amphibien*

Im Jahr 2015 erschien eine Studie von Lajmanovich und Kollegen, die aufzeigte, dass eine kommerziell erhältliche Bti-Flüssigformulierung (Introban®) negative Effekte bei einer tropischen Froschart auslöst, die bei hohen Konzentrationen sogar zum Tod führte. Tödliche Wirkungen auf Amphibien, die auf der gleichen spezifischen toxischen Wirkweise von Bti auf Insekten beruhen, sind eher unwahrscheinlich, da es im neutralen Darm von Amphibien keine geeigneten Rezeptorstellen gibt (Broderick et al., 2006; McDiarmid und Altig, 1999). Die angeführten Effekte könnten jedoch auch auf unbekannte Beistoffe in der Formulierung zurückzuführen sein (Lajmanovich et al., 2015). Ältere Studien aus den 80er und 90er Jahren arbeiteten mit Laborprodukten des Bakteriums anstatt aktuell verwendeter Bti-Formulierungen (Becker und Margalit, 1993; Morawcsik, 1983). Bisher wurden die in Deutschland angewendeten Bti-Produkte nicht wissenschaftlich auf deren Effekt gegenüber Amphibien und deren Larven untersucht.

Um zu klären, ob eine Exposition gegenüber der am Oberrhein verwendeten Bti-Formulierungen (Vectobac®WG, Vectobac®12AS) ähnliche Effekte hervorruft, führten wir im Frühjahr 2016 ein Laborexperiment mit den Larven des Grasfrosches (*Rana temporaria*) durch. Dabei simulierten wir die aktuelle Bekämpfungspraxis am Oberrhein unter Anwendung der üblichen Formulierungen (IcyPearls, Sandgranulat, Flüssig), umweltrelevanten Applikationsraten (niedrige Feldrate: 1x, hohe Feldrate: 2x, Überdosierung: 10x) und mittleren Bekämpfungshäufigkeiten (ein bis dreimal) in unterschiedlichen Entwicklungsstadien nach

Gosner (Gosner Stadium 23, 25, 39) (Abb. 3). Um zwischen der Empfindlichkeit der Entwicklungsstadien und dem Einfluss der anfänglichen doppelten Exposition innerhalb einer Woche unterscheiden zu können, führten wir noch ein weiteres Experiment durch, bei dem die Kaulquappen nur einmal bei GS 25 appliziert wurden. Die Experimente fanden in 1,7 L Kunststoffaquarien statt, wobei jede Behandlung und eine Bti-freie Kontrolle 10-mal wiederholt wurden (insgesamt 130 Aquarien).

Aufgenommene Endpunkte waren: Mortalität, die Entwicklungsdauer und physiologische Fitness (Gewicht, Länge, Kondition) am Ende einer erfolgreichen Metamorphose. Zusätzlich entnahmen wir 48h nach jeder Applikation Kaulquappen um subletale Effekte anhand von gut erforschten Biomarkern zu untersuchen: Glutathion-S-Transferase (GST), Glutathion Reduktase (GR) und Acetylcholin-Esterase (AChE). GST spielt eine zentrale Rolle bei der Entgiftung organischer Stoffe, während das Enzym GR ein Katalysator im Glutathion-Redoxzyklus (Steinberg, 2012). Beide können ein Hinweis auf oxidativen Stress sein und werden häufig zur Beurteilung der Auswirkungen von Pestiziden auf Amphibien eingesetzt (Venturino und D'Angelo, 2005). Darüber hinaus wurde AChE untersucht, da es eine wichtige Rolle in der Funktion der Nervenimpulsübertragung spielt und damit ein wichtiger und gut untersuchter Biomarker für den Nachweis neurotoxischer Eigenschaften in Wasserorganismen ist (Venturino und D'Angelo, 2005).

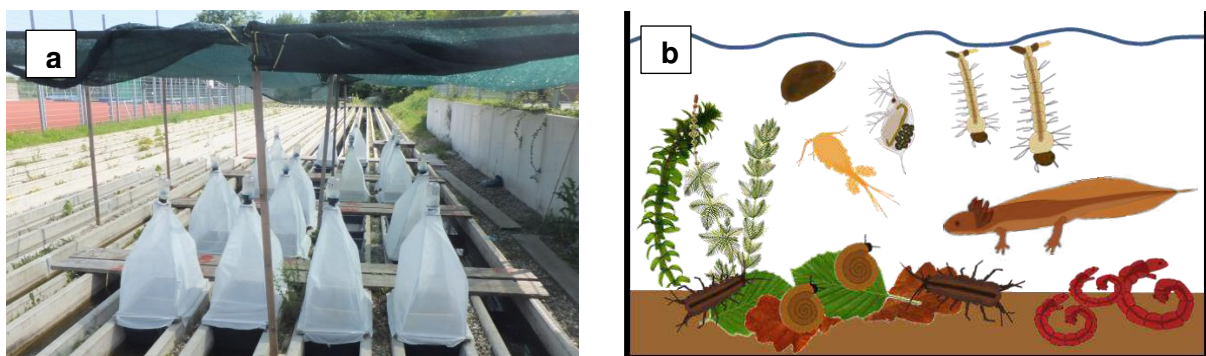


**Abbildung 3: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus des Laborexperimentes mit Grasfroschkaulquappen (*R. temporaria*). Dabei wurden die Kaulquappen mit drei Formulierungen (Eis, Flüssig, Sand) bei drei Feldraten (FR: 1x, 2x, 10x) insgesamt dreimal zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten (Applikation 1-3) behandelt. 48h nach jeder Applikation wurde jeweils eine Kaulquappe für Biomarkeranalysen entnommen (n=10) (nach Allgeier et al., 2018).**

### 2.2.2 Mesokosmosstudien

Im Vergleich zu einem Laborexperiment können biotische und abiotische Faktoren in natürlichen Gewässern (Wassertemperatur, Wassertiefe, Konkurrenz, Sonneneinstrahlung, Vorhandensein von Sediment oder Makrophyten) den toxischen Effekt von Bti auf Zuckmücken abschwächen (Cao et al., 2012; Charbonneau, Drobney & Rabeni, 1994). Darüber hinaus

kann durch ein Experiment in kontrollierten Kleingewässern auch nachvollzogen werden, wie sich Bti auf die Verfügbarkeit von Beutetieren für Molchlarven auswirkt und ob sich diese Veränderung in der Nahrungsaufnahme oder der Entwicklung der Molche widerspiegelt. Um diese Fragen zu adressieren, führten wir jeweils von Mai bis Juli 2015 und 2016 eine Mesokosmenstudie an der Gerinneanlage der Universität Koblenz-Landau, Campus Landau durch. Beide Experimente folgten grundsätzlich dem gleichen experimentellen Aufbau: Die Mesokosmen (90 L, Polyethylen-Mörteleimer) wurden in die Gerinne eingebracht und mit einem Schattierungsnetz (Reduzierung der Sonneneinstrahlung um 30%) abgedeckt (Abb. 4). Die Mesokosmen wurden mit Leitungswasser, gefiltertem Teichwasser, Quarzsand, einer Blättermischung (Schwarzerle/Eichenlaub) und Wasserpflanzen (*Elodea canadensis*, *Myriophyllum spicatum*) versetzt. Ab sechs Wochen vor dem Experiment setzen wir kontinuierlich in gleichen Mengen aquatische Invertebraten aus lokalen Feuchtgebieten (Teller- und Blasen-schnecken, Wasserasseln, Zooplankton, Zuckmücken, Stechmücken) und hauseigenen Zuchten (*Culex pipiens*, *Chironomus riparius*, *Daphnia magna*) zu. Jeder Mesokosmos wurde mit einer Emergenzfallle abgedeckt, um die Besiedlung durch externe Organismen zu verhindern und aufkommende Insekten in Sammelflaschen auf den Fallen zu fangen. Geschlüpfte Insekten wurden in 70%igem Ethanol konserviert und auf Familie oder Gattung bestimmt. Aquatische Wirbellose wurden 7-mal beprobt, einmal vor der Bti-Applikation und ansonsten einmal pro Woche. Gefangene Organismen wurden vor Ort gezählt, in Kategorien eingeteilt und danach wieder zurückgegeben. Wassertemperatur, pH und Sauerstoff wurden am Vormittag jedes Probenahmetages in randomisierter Form gemessen. Detaillierte Angaben zum Ansatz und Aufbau können in Allgeier et al. (2019) nachgelesen werden.



**Abbildung 4:** a) Aufbau der Mesokosmosstudie und b) Inhalt der Mesokosmen exemplarisch für Experiment 2 (2016).

#### *Experiment 1 (2015)*

Das erste Experiment untersuchte die Auswirkungen einer routinemäßigen Bti-Applikation auf aquatische Nicht-Zielorganismen (v.a. Zuckmücken) und auf die Nahrungsaufnahme und das Überleben von Molchlarven (Fadenmolch: *Lissotriton helveticus*), Teichmolch: *L. vulgaris*) bei Anwesenheit eines natürlichen Räubers, einer Großlibellenlarve (Blaugrüne Mosa-

ikjungfer: *Aeshna cyanea*). Der Versuch umfasste 48 Mesokosmen in drei unterschiedlichen Szenarien (ohne Räuber, 11 Molchlarven, 11 Molchlarven + 1 Libellenlarve) jeweils mit und ohne Bti-Behandlung in der hohen Applikationsrate. Alle Kombinationen hatten acht Replika-te. Wir untersuchten den Einfluss von Bti und den Räubern auf die aquatischen Wirbellosen-gemeinschaft und die Abundanzen von einzelnen Taxa. Die Endpunkte bei den Molchlarven waren die Analyse der Überlebensrate bis zur vollständigen Metamorphose und die Ernäh-rung der Molchlarven in den verschiedenen Szenarien. Um Rückschlüsse auf die prozentua-le Nahrungszusammensetzung der Molchlarven ziehen zu können, analysierten wir die Men-ge an stabilen Kohlenstoff- und Stickstoffisotopen ( $\delta^{13}\text{C}$  und  $\delta^{15}\text{N}$ ) in der Nahrung und im Muskelgewebe der Molch-Metamorphlinge. Ein hohes trophisches Niveau wird durch ange-reicherte  $\delta^{15}\text{N}$ -Werten relativ zur jeweiligen Beute angezeigt, während  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von der Quelle des gelösten Kohlenstoffs im Wasser abhängen und sich innerhalb der Nahrungsket-te nur wenig ändern (Peterson und Fry 1987).

#### *Experiment 2 (2016)*

Um die Auswirkung der Bti-Behandlung auch auf einzelne Molchlarvenindividuen nachvoll-ziehen zu können, wurde im Jahr 2016 ein weiterer Mesokosmenversuch durchgeführt. Dazu wurden acht Kontrollen und acht Bti-Mesokosmen angesetzt und mit jeweils einer *L. helveti-cus* Larve bestückt. Es erfolgten zwei Applikationen mit Bti IcyPearls in der hohen Applikati-onsrate. Als Endpunkte wurden die Zeit bis zur vollständigen Metamorphose der Fadenmol-che und deren Körpergröße bei Metamorphose aufgenommen.

#### 2.2.3 Halbfreiland- und Freilandstudien

Die Auswahl geeigneter Freilandflächen für die geplanten Untersuchungen zu den Auswir-kungen der Stechmückenbekämpfung auf Zuckmücken und Amphibienpopulationen im Frei-land gestaltete sich schwieriger als angenommen. Entlang des Oberrheins gibt es keine aus-reichende Anzahl von noch nie mit Bti behandelten Flächen, um eine valide Replikation der Kontrollflächen zu erreichen. Die Freilanduntersuchungen zu Zuckmücken stellen daher eine Kombination aus verschiedenen Versuchsansätzen dar, die den Einfluss von Bti auf Zuck-mücken bei unterschiedlicher Studienkomplexität und innerhalb verschiedener Habitats un-tersuchen. Die Auswirkung auf Amphibien konnten aufgrund der geringen Replikation von Kontrollflächen entlang des Oberrheins nur im Labor und Mesokosmos untersucht werden.

#### *Halbfreilandstudie*

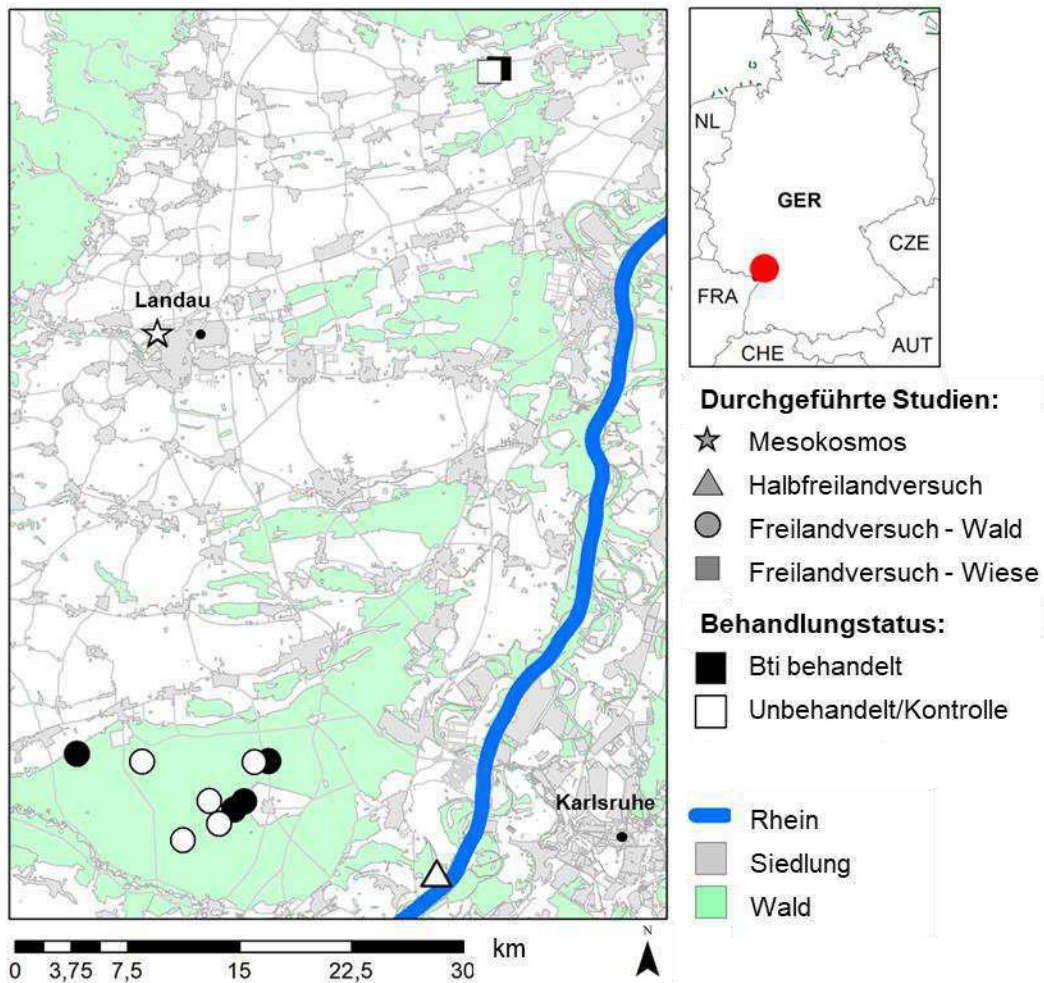
Der Halbfreilandversuch wurde auf zwei Flächen (Überflutungsfläche, Druckwasserschlu-te) in der Nähe des Rheins bei Hagenbach durchgeführt. Das Gebiet ist Teil einer Flussaue mit temporär überfluteten Bereichen im Naturschutzgebiet "Stixwörth" (Abb. 5). Die Überflu-tungsfläche liegt direkt am Rhein und wird bei Hochwasser regelmäßig überflutet, weswegen

dort eine Vielzahl an Überschwemmungsmücken auftritt. Die Druckwasserschlute ist eine, nach Angaben der Bekämpfungsorganisation KABS e.V. und der unteren Naturschutzbehörde SGD Süd, bisher noch nie behandelte Fläche, die als Zuckmückenbrutstätte gekennzeichnet ist und daher aus der Behandlung genommen wurde. Die Schlute fällt im Herbst fast ganz trocken bis auf tiefere Bereiche im Zentrum (~2,5 m) und die Vegetation ist dominiert von der Sumpfwasserschmalblättrigkeit (*Iris pseudocarus*).



**Abbildung 5: Set-up der Enclosures der Halbfreilandstudie bei Hagenbach auf a) Überflutungsfläche und b) in einer Druckwasserschlute am Rhein bei Hagenbach**

Die eingesetzten Enclosures waren Polyethylenfässer (72 x 57 x 84 cm; 300 L) ohne Boden, die in einem Abstand von 1 bis 2 m circa 15 cm in das Sediment getrieben wurden. Die durchschnittliche Wassertiefe betrug  $60 \pm 8$  cm. Die Enclosures bildeten eine abgeschlossene Einheit, die die natürlichen Grundvoraussetzungen des Gewässers enthalten (Abb. 5a). Für die Zeit des Experiments wurden die Enclosures vollständig mit einer Emergenzfalle verschlossen, um eine externe Besiedlung zu verhindern und die Beprobung des Insektenaufkommens zu ermöglichen (Abb. 5b). Die Hälfte der Enclosures wurde experimentell mit Bti IcyPearls® in der niedrigen Aufwandmenge behandelt. Die Emergenzdaten wurden aus 15 wöchentlichen Sammlungen vom Mai bis August 2016 abgeleitet. Aufgrund von extremen Witterungsverhältnissen im Jahr 2016 stand die Überflutungsfläche von Ende Mai bis Mitte Juli nahezu dauerhaft unter Wasser, so dass der Versuchsaufbau auf der Überschwemmungsfläche und Teile der Schlute nicht zu beproben war. Dazu kam eine Bti-Behandlung eines Teiles der Druckwasserschlute von seitens der KABS e.V. (siehe 3.5), so dass insgesamt nur 24 der 144 aufgestellten Enclosures in eine gesicherte Analyse einbezogen werden konnten.



**Abbildung 6:** Räumliche Darstellung der vier Studien zu Zuckmücken. Halbfreilandstudie mit Enclosures wurde in einem unbehandelten, temporär gefluteten Feuchtgebiet am Rhein durchgeführt (△). Eine Feldstudie fand in einem Feuchtgebiet im Wald (○) (Bti (schwarz), n = 4; Kontrolle (weiß), n = 5) statt. Eine weitere auf einer überfluteten Wiese (□), die durch Split-Design in einen behandelten (schwarz) und einen unbehandelten (weiß) Teil unterteilt wurde (nach Allgeier et al. (2019)).

### Freilandstudien

Wir führten zwei Feldstudien an Standorten durch, die Gegenstand regelmäßiger Stechmückenbekämpfung sind und auch während unserer Versuche von der KABS e.V. im Rahmen der regulären Stechmückenbekämpfung behandelt wurden. Die Untersuchungsgebiete unterschieden sich in Struktur und Vegetation und können als temporäre Wald- und Wiesenfeuchtgebiete kategorisiert werden, die sich in der Regel in unterschiedlichen Zuckmückengemeinschaften widerspiegeln (Brink, Den, Velde & Der, 1991).

Das Untersuchungsgebiet „Wald“ befindet sich im Bienwald (Abb. 6), einem Kiefern-, Eichen- und Erlenbruchwald, der sich auf dem Schwemmland der Lauter befindet. Feuchtgebiete um Siedlungen werden routinemäßig mit Bti handbehandelt, während die Bti-Behandlung in anderen Waldbereichen verboten ist, da sie Kernzonen für den Naturschutz darstellen und somit als Tabuzonen gelten. Für die Studie haben wir sechs Paare benachbarter Tümpel aus-

gewählt, die eine Hälfte befand sich im behandelten Bereich, die andere in den Tabuzonen. Auf jedem Tümpel befanden sich drei Emergenzfallen (wie Abb. 7), deren Inhalt über einen Zeitraum von fünf Wochen (April bis Mai 2015) wöchentlich geleert, gezählt und bestimmt wurde.

Das Untersuchungsgebiet „Wiese“ befindet sich in der Nähe von Neustadt/ Weinstraße (Abb. 5) und besteht aus überschwemmtem Grünland mit einigen kleinen Dauerwasserkörpern. Das Gebiet wird zwischen März und Juni ein bis zwei Mal mit dem Hubschrauber behandelt. Im Frühjahr 2013 wurde das Untersuchungsgebiet in zwei Teile geteilt, die durch einige Bäume und einen Weg natürlich getrennt sind. Während ein Teil weiterhin behandelt wurde, blieb der andere Teil zum ersten Mal seit über 20 Jahren unbehandelt (vier Jahre unbehandelt im Jahr 2016). Der behandelte und unbehandelte Teil der Wiese wurde jeweils mit zwölf Emergenzfallen desselben Typs wie im Wald ausgestattet (Abb. 6). Die Emergenz wurde während 13 Wochen (14. März bis 26. Juni 2016) wöchentlich gesammelt, beginnend zwei Wochen vor der Bti-Applikation.



**Abbildung 7: Emergenzfalle auf einem tiefen Bereich der Untersuchungsfläche „Wiese“.**

Da bekannt ist, dass einzelne Unterfamilien und Arten empfindlicher gegenüber Bti reagieren, haben wir neben den Häufigkeiten auch die Artzusammensetzung der Zuckmückengemeinschaft auf den Freilandflächen untersucht. Die taxonomische Unterscheidung von adulten Zuckmücken setzt eine hohe Expertise voraus und wird nur von wenigen Spezialisten in Deutschland beherrscht. Aus diesem Grund haben wir die gesammelten Zuckmücken aus den Freilandstudien anhand von state-of-the-art Metabarcoding genetisch untersucht, um eine Artzusammensetzung der Zuckmücken auf den einzelnen Flächen zu bekommen. Der einzige Nachteil der genetischen Analyse ist, dass nur das Vorhandensein/ Fehlen von Arten generiert werden kann und keine quantitativen Angaben. Die genetischen Analysen wurden in Rahmen des assoziierten Projektes AufLand der Forschungsinitiative Rheinland-Pfalz durchgeführt und stellen eine Weiterbearbeitung der gesammelten Daten dieses Projektes dar und werden deshalb mit in den Ergebnissen aufgeführt.

## 2.3 Konzept zur alternativen Stechmückenbekämpfung

Anstelle einer Flächenbekämpfung von Stechmücken unter der auch Zuckmücken erfasst werden suchten wir nach einer Bekämpfung der Stechmücken an dem Ort, wo die Belästigung empfunden wurde. Dies betraf nach einer Umfrage, die wir am Oberrhein durchführten, vor allem den häuslichen Bereich und das abendliche Sitzen auf der Terrasse (s.u. 2.4.). Zusammen mit der Firma Biogents AG (Regensburg) entwickelten wir ein Konzept für eine naturschutzkonformere Alternative zur derzeitigen Stechmückenbekämpfung mit Bti. Dieses Konzept wurde der Bevölkerung auch im Rahmen der sozioökonomischen Erhebungen vorgestellt, unter anderem, um mehr über deren Bereitschaft zur Adaption der bisherigen Praxis der Stechmückenbekämpfung zu erfahren.

Die Biogents AG stellt Stechmückenfallen her, die effektiv adulte Stechmücken mit Hilfe von CO<sub>2</sub> und einem patentierten Gegenstromprinzip anlocken, einfangen und somit reduzieren (Abb. 8a). Die Falle imitiert den Menschen u.a. durch eine von der Falle ausgehenden Konvektionsströmung und dem Einsatz eines Lockstoffes und CO<sub>2</sub>. Während tropische Mücken auch ohne CO<sub>2</sub> angelockt werden können ist CO<sub>2</sub> der wichtigste Lockstoff für heimische Stechmückenarten, da es mit dem menschlichen Atem abgegeben wird. Nach dem Anlocken, werden die Stechmücken ins Innere der Falle gelockt wo sie durch eine Einsaugrückströmung bis zur Vertrocknung festgehalten werden. Die Fallen werden üblicherweise im häuslichen Umfeld platziert (Garten, Grundstück) und können den Stechdruck innerhalb der umliegenden 20 m erheblich reduzieren.

Bisherige Studien mit der BG-Sentinel Falle zeigten bereits deren Effektivität beim Fang von tropischen Tigermücken (*Ae. albopictus*) in Cesena, Italien, wo man bis zu 85% weniger Mückenstiche in Gebieten mit Mückenfallen festgestellt hatte (Englbrecht, Gordon, Venturelli, Rose & Geier, 2015). Eine Voraussetzung für den Erfolg eines alternativen naturschutzkonformen Konzeptes zur Stechmückenbekämpfung mit Fallen ist jedoch, dass die Fallen ebenso effektiv im Fang der am Oberrhein belästigenden Überschwemmungsmücke *Aedes vexans* sind. Wir führten dazu von Juni bis September 2017 eine Studie in Berg (Pfalz) durch bei der die Fangeffizienz der Fallen und das Artenspektrum der gefangenen Stechmücken untersucht wurde. Berg grenzt im Norden an den Bienwald, liegt im Osten nahe am Rhein und wird im Süden durch die Lauter und deren Überschwemmungsflächen beeinflusst. Wir testeten verschiedene Schutzkonzepte und installierten Fallen an fünf Privathäusern verteilt auf Ortsränder und Ortsmitte (Einzelhäuser), einer Reihe von sechs linear benachbarten Häusern (Fallenwall) und einen Bereich um sieben Häuser (Fallenring) (Abb. 8b). Insgesamt wurden 38 Fallen aufgestellt, wobei die Anzahl der Fallen pro Haus stark von der Größe und Beschaffenheit des Grundstücks abhing. Die Fallen werden grundsätzlich in schattige Bereiche gestellt, die von den Stechmücken als Ruheorte aufgesucht werden. Zu jedem Einzel-



haus, dem Wall und dem Ring gab es eine in der Lage und Beschaffenheit ähnliche Kontrollfläche ohne Fallen. Der Fangbeutel der Fallen wurde wöchentlich geleert und die Stechmücken im Labor unter einem Binokular auf Gattung bestimmt. Um die Fangeffizienz der Fallen zu überprüfen wurde die Anflugrate innerhalb von 15 Minuten gemessen, allgemein benannt als Human Landing Rate (HLR). Dazu wurde einmal wöchentlich in der Dämmerung ein freier Arm exponiert, die Anzahl der Anflüge durch Stechmücken gezählt und versucht anfliegende Individuen für die anschließende Bestimmung mit einem Saugrohr zu fangen.

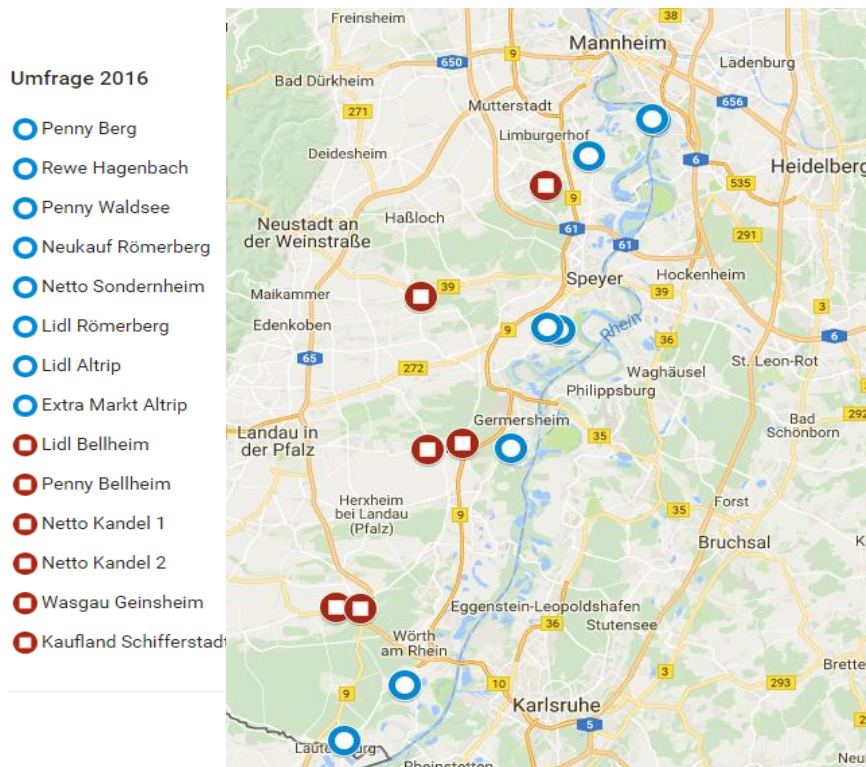


**Abbildung 8:** a) Biogents-Mosquitaire-CO2 Falle. b) Verteilung der Stechmückenfallen über Berg (Pfalz) aufgeteilt in verschiedene Schutzkonzepten: Einzelhäuser, Fallenring, Fallenwall.

## 2.4 Sozioökonomie

Die sozioökonomischen Untersuchungen stützen sich auf die sogenannte Contingent Valuation Methode (CVM), die sich als ein standardisiertes Verfahren zur Ermittlung der gesellschaftlichen Wertschätzung von Umweltgütern etabliert hat (Whitehead, 2013). Im Rahmen des Projektes wird die Methode kombiniert mit einer Betroffenheitsanalyse der Bevölkerung durch Stechmücken. Um die Meinung der betroffenen Bevölkerung am Oberrhein abbilden zu können, wurde im August 2016 eine Bevölkerungsumfrage in zehn KABS e.V.-Mitgliedsgemeinden zwischen Berg (Pfalz) und Altrip durchgeführt. Insgesamt wurden in einer Zufallsstichprobe 300 Personen vor 14 lokalen Supermärkten in ausgewählten Ortschaften die nah am Rhein und etwas weiter entfernt lagen befragt (Abb. 9). Die Kernpunkte der Bevölkerungsbefragung waren:

- Erfassung der Betroffenheit der Bevölkerung durch Stechmücken
- Ergriffene Schutzmaßnahmen
- Einstellung gegenüber der Bekämpfung
- Sorge vor Krankheiten



**Abbildung 9: Durchführung der Betroffenheitsbefragung 2016 an 14 lokalen Supermärkten nah am Rhein (blau) und etwas weiter entfernt (rot).**

In der Hauptbefragung im September 2017 wurde die Einschätzung der Bevölkerung zur Stechmückenbekämpfung unter Berücksichtigung der Risiken für Natur und Umwelt erhoben. Die Grundidee der CVM ist es einen Markt für Umweltgüter, hier: eine naturschutzkonforme Stechmückenbekämpfung unter Berücksichtigung der Nichtzielarten, zu simulieren, auf dem die betroffenen Haushalte ihre Wertschätzung für das Gut in Form ihrer Zahlungsbereitschaft hierfür ausdrücken. Als naturschutzkonformes Konzept wurde eine Weiterentwicklung der bisherigen flächendeckenden Bekämpfung mit Bti vorgeschlagen und die Zahlungsbereitschaft der Haushalte für dieses alternative Konzept erfragt. Dieses Konzept sieht vor ökologisch besonders wichtige Flächen nicht mehr mit Bti zu behandeln, um die wertvollen natürlichen Lebensräume entlang des Oberrheins zu schützen. Da es daraufhin vermutlich mehr Stechmücken geben würde, werden in den Ortschaften zusätzlich etablierte Biogenz-Mückenfallen installiert, welche die Stechmücken nach Möglichkeit bereits an den Ortsrändern abfangen, bevor in den Wohngebieten eine Belästigung auftritt. Dadurch könnte es innerhalb der Ortschaften sogar zu einem besseren Schutz vor Stechmücken kommen. Die Bevölkerung müsste durch diese Variante jedoch hinnehmen, dass es außerhalb der Ortschaften vermutlich zu einer etwas höheren Belastung durch Stechmücken kommt als bisher. Um sicherzustellen, dass die Befragten den Anreiz haben, ihre wahre Zahlungsbereitschaft anzugeben, wurde das in der wissenschaftlichen Literatur empfohlene Dichotomous choice Format verwendet, bei dem den Befragten ein Preis für die Realisierung des darge-

stellten Szenarios genannt wird und sie diesen entweder annehmen oder ablehnen können. Das Szenario des Projekts wurde so dargestellt, dass es plausibel und glaubhaft in dem Sinne ist, dass die betroffene Gemeinde tatsächlich vor der Entscheidung steht, entweder das bisherige Bekämpfungssystem mittels Bti beizubehalten oder auf die naturschutzkonforme Alternative zu wechseln. Zur Analyse der Plausibilität und Validität der Antworten und zur Bestimmung der Einflussfaktoren der Zahlungsbereitschaft und somit des Nutzengewinns durch das Alternativszenario wurden in der Befragung eine Reihe sozio-ökonomischer und demografischer sowie Einstellungsfragen erfragt. Insgesamt wurden 600 zufällig ausgewählte Haushalte in 12 Orten entlang des Rheins (von Speyer bis Neuburg am Rhein) befragt. Die Befragung wurde von eigens hierfür geschulten studentischen Interviewern durchgeführt.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Einfluss auf Zuckmücken

##### 3.1.1 Effekte auf Zuckmücken im Labor

Die Ergebnisse der Laborstudie zeigten, dass Zuckmücken am Anfang ihrer Entwicklung empfindlicher gegenüber Bti sind als zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt. Zuckmückenlarven kurz nach dem Schlupf (1. Larvenstadium) sind sogar bis zu 100fach empfindlicher als Larven im 4. Larvenstadium (Abb. 10). Unsere Studie hat erstmalig den in der Ökotoxikologie wichtigen  $EC_{50}$  Wert von 7 ITU/L für Erstlarven des Standardtestorganismus *Chironomus riparius* und Bti geliefert. Diese Ergebnisse wurden 2017 im Nature assoziierten *Scientific Reports* unter Kästel et al. (2017) veröffentlicht.

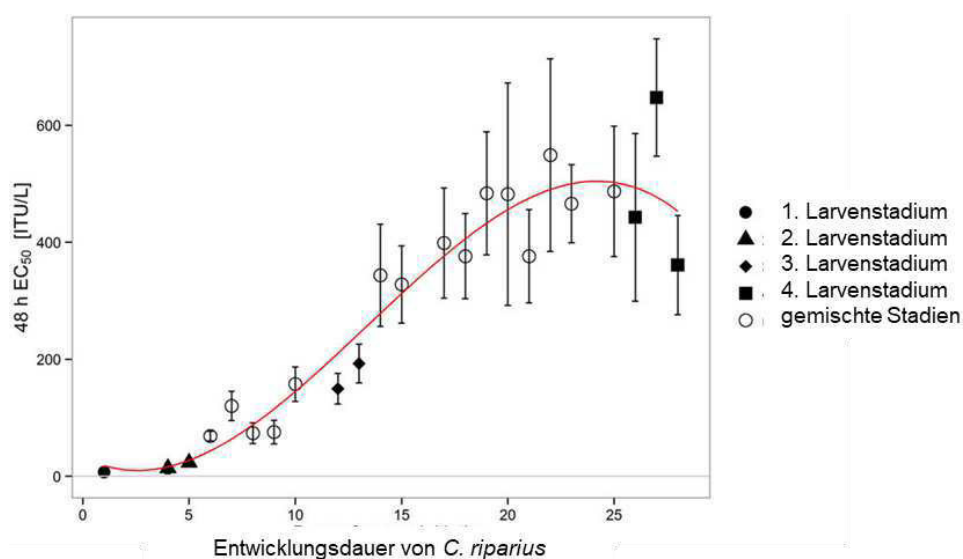


Abbildung 10:  $EC_{50}$  Werte mit 95% Konfidenzintervall der täglich durchgeführten Akutttests über die gesamte Entwicklungsdauer (28 Tage) von *Chironomus riparius* Larven (nach Kästel et al. ,2017).

Zuckmücken sind grundsätzlich anfällig für Bti, da sie in der Darmwand, ebenso wie Stechmücken, Rezeptorstellen besitzen an die sich Bti-Proteine binden können (Rey, Long, Pautou & Meyran, 1998). Die bisherigen Angaben für die Empfindlichkeit von Zuckmücken bezogen sich lediglich auf Larven in älteren Larvenstadien wie Dritt- oder Viertlarven (Ali, 1981; Cao et al., 2012; Charbonneau et al., 1994; Stevens et al., 2005, 2004). Ältere Larvenstadien zeigen nachweislich weniger ausgeprägte Effekte gegenüber anderen Pestiziden oder Metallen im Vergleich zu jungen Larven (Gauss, Woods, Winner & Skillings, 1985; Robinson & Scott, 1995; Williams, Green, Pascoe & Gower, 1986). Darüber hinaus sind die meisten Erstlarven der Zuckmücken freischwimmend und somit in der Wassersäule exponiert gegenüber Bti. Das unterscheidet sie von älteren Larvenstadien, die sich hauptsächlich im Sediment aufhalten.

Die Empfindlichkeit der Erstlarven liegt um einen Faktor 200 unter der niedrigsten Konzentration, die am Oberrhein zur Stechmückenbekämpfung ausgebracht wird. Bisher wurde davon ausgegangen dass Zuckmücken bei der Dosis die zur Stechmückenbekämpfung notwendig ist, nicht negativ betroffen sind, da viele Studien mit älteren Larven zeigten, dass Zuckmücken 10 bis 75mal weniger empfindlich sind als Stechmücken (Boisvert & Boisvert, 2000; Lundström, Schäfer, et al., 2010; Vaughan et al., 2008). Russell und Kollegen (2003) fanden bei der Untersuchung der Effektivität von VectoBac WG bei Drittlarven verschiedener Stechmücken (u.a. *Culex quinquefasciatus*, *Ae. aegypti*) 48h LC<sub>50</sub> Werte zwischen 12 und 57 ITU/L. Die Drittlarven von *C. riparius* in unserem Test waren in etwa nur dreimal weniger empfindlich. Die Erstlarven waren hingegen doppelt so empfindlich, so dass man davon ausgehen kann, dass Zuckmücken Erstlarven bei der Stechmückenbekämpfung in natürlichen Gewässern negativ beeinträchtigt werden. Dazu kommt, dass im Zweifelsfall davon auszugehen ist, dass die verwendete Dosierung eher höher statt zu niedrig angesetzt wird, um den gewünschten Effekt zu erzielen (Marina et al., 2014). Zudem wird in der deutschen Praxis der Bekämpfung beim Auftreten von Stechmücken Dritt- und Viertlarven gleich zu einer Verdopplung der Dosis gegriffen (Becker & Lüthy, 2017).

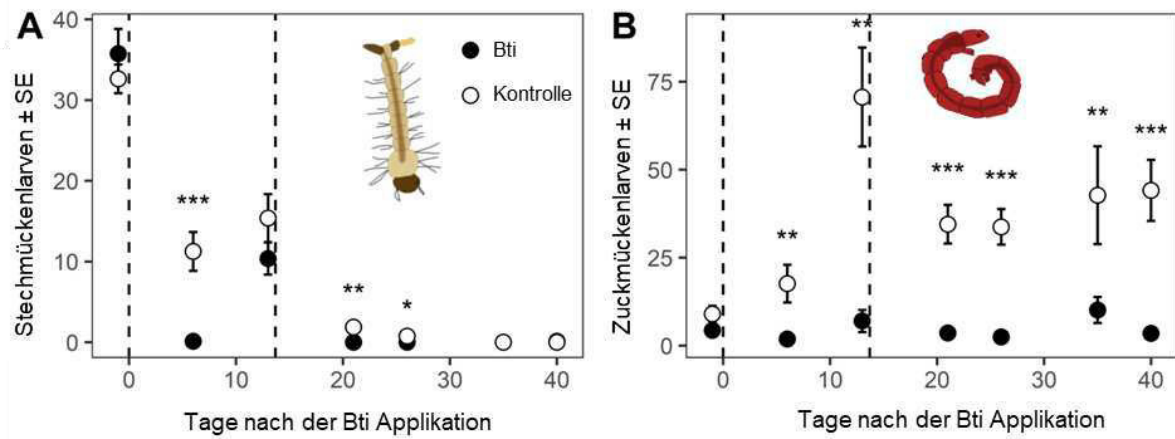
Werden die von uns gewonnenen Daten innerhalb einer Risikobewertung, wie sie für die Zulassung von Biozid-Produkten durchgeführt wird, verwendet, so wird der Schwellenwert für Erstlarven bezogen auf die Ausbringungsmenge am Rhein um den Faktor 2000 überschritten. Da dieser Wert bisher in der Risikobewertung gefehlt hat, basiert die derzeitige Zulassung der aktiven Substanz *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Serotype H14 AM65-52 auf der Bewertung des Risikos für aquatische Invertebraten in auf einem chronischen Labortest (21 Tage) des Wasserflohs *Daphnia magna* der dort als sensitivster getesteter Organismus galt (European Commission, 2011). Obwohl Daphnien und viele andere planktonische

Kleinkrebse ihre Nahrung, ebenso wie Stechmücken, filtrieren und so Bti aufnehmen können, zeigen allen bisherigen Studien keine Sensitivität gegenüber Bti (Boisvert & Boisvert, 2000; Duchet et al., 2008; Rey et al., 1998). Aus diesem Grund wurde auch in der Zulassung eine Neuevaluierung dieses Umstandes vorgeschlagen, um die zugrundeliegenden Ursachen dieses Effektes erklären zu können. Unsere Daten zu Zuckmücken können dann frühestens für eine Neubewertung des aktiven Wirkstoffes im Jahre 2023 evaluiert werden.

Die Empfindlichkeit der Zuckmücken ist jedoch nicht nur abhängig vom Larvenstadium sondern auch von Gattung und Art (Kondo et al., 1995) und anderen biotischen und abiotischen Einflüssen (Cao et al., 2012). Obwohl Effekte innerhalb von natürlichen Zuckmückengemeinschaften im Freiland durch die Wassertiefe, das Vorhandensein von Sediment oder Trübstoffen im Wasser abgeschwächt sein können, zeigten unsere weiteren Untersuchungen bei natürlicheren Bedingungen im Mesokosmos, Halbfreiland und Freiland ebenfalls negative Auswirkungen auf Zuckmücken.

### 3.1.2 Effekte auf Zuckmücken im Mesokosmos

In beiden von uns durchgeführten Mesokosmosversuchen veränderte sich die Struktur der Wirbellosengemeinschaft durch die Bti Applikation. Am meisten betroffen waren dabei die Dichten von Stechmücken aber auch von Zuckmücken, sowohl im Larvenstadium als auch als adulte Tiere nach dem Schlupf (Abb. 11; Tab. 1). Die ersten Effekte konnten bereits nach einer Woche beobachtet werden und spiegelten sich langfristig in einer 43 bis 82%igen Reduktion der geschlüpften Zuckmücken wieder (Tab. 1). Andere Invertebraten (Zooplankton, Wasserasseln, Wasserschnecken) wurden übereinstimmend mit Angaben aus der Literatur auch in unseren Experimenten nicht negativ von Bti beeinträchtigt (Boisvert & Boisvert, 2000). Andere Filtrierer wie Wasserflöhe waren allerdings auch nicht positiv beeinflusst, obwohl sie durch den Wegfall von Stechmücken durch geringeren Wettbewerb hätten profitieren können (Kroeger, Liess, Dziock & Duquesne, 2013).



**Abbildung 11:** Entwicklung der Dichten von (A) Stech- und (B) Zuckmückenlarven in Bti (schwarz) und Kontrolle (weiß) im Mesokosmosversuch 2016. Statistisch signifikante Unterschiede werden durch Sterne angezeigt. Gestrichelte Linien stellen die Applikationszeitpunkte dar (nach Allgeier et al., 2019).

Innerhalb der Zuckmücken reagierten Individuen der Unterfamilie Chironominae und Orthocladiinae empfindlicher als die räuberischen Tanypodinen. Diese Beobachtung deckt sich mit anderen Studien in denen Tanypodinen auch bei 10-facher Feldrate nicht beeinträchtigt waren (Boisvert & Boisvert, 2000; Liber, Schmude & Rau, 1998). Ein großer Anteil der Arten innerhalb der Chironominae und Orthocladiinae sind Detritusfresser oder Filtrierer und können Bti daher mit der Nahrung aus dem Wasser oder nach Deposition auf dem Sediment aufnehmen (Armitage et al., 1995). In einer Halbfreilandstudie aus Minnesota zeigten Zuckmücken nach der Anwendung von  $5,9 \times 10^9$  ITU/ha (VectoBac® G) ebenfalls eine ähnliche Reduktion von 50% (Liber et al., 1998), wobei die Dosis in etwa dem Doppelten der von uns applizierten Rate VectoBac® WG ( $2,88 \times 10^9$  ITU/ha) entspricht. Vergleicht man jedoch die Toxizität europäischer Bti-Anwendungen, so stimmt unsere Anwendung in etwa der Ausbringung von VectoBac® G in der schwedischen Mückenbekämpfung ( $3 \times 10^9$  ITU/ha) oder VectoBac® 12AS in der französischen Camargue ( $3,2 \times 10^9$  ITU/ha) überein (Jakob und Poulin, 2016; Lundström et al., 2010b).

Die beobachtete Reduktion der Zuckmücken konnte in all unseren Versuchen nachgewiesen werden, unabhängig vom Durchführungsjahr und dem Vorhandensein von anderen Stressoren wie Molch- oder Libellenlarven. Darüber hinaus war unsere Studie die erste Untersuchung des Bti-Einflusses auf Zuckmücken in kontrollierten Süßwassermesokosmen. Die Ergebnisse der Mesokosmen Studien waren ein Teil der Veröffentlichung Allgeier et al. (2019) bei *Ecotoxicology and Environmental Safety* und dem bei *Science of the Total Environment* eingereichten Manuskript Allgeier et al. 2019.

**Tabelle 1: Vergleich des Einflusses von Bti auf Stech- und Zuckmücken als Larven und Adulte (Emergenz) innerhalb von Mesokosmos, Halbfreiland und Freilandstudien. Statistisch signifikante Unterschiede sind in fett dargestellt (nach Allgeier et al., 2019).**

		Wochen	Stechmücken	Zuckmücken
			Reduktion [%]	Reduktion [%]
<b>Mesokosmos (Larven)</b>				
	Kontrolle	7		
	Bti	7	<b>85</b>	<b>53 - 87</b>
<b>Mesokosmos (Emergenz)</b>				
	Kontrolle	7		
	Bti	7	<b>45 - 91</b>	<b>43 - 82</b>
<b>Halbfreiland (Emergenz)</b>				
Schlute	Kontrolle	15		
	Bti	15	24	41
<b>Freiland (Emergenz)</b>				
Wald	Kontrolle	6		
	Bti	6	<b>99</b>	77
Wiese	Kontrolle	14		
	Bti	14	<b>92</b>	<b>68</b>

### 3.1.3 Effekte auf Zuckmücken und deren Artzusammensetzung im (Halb-)Freiland

Bisher wurde in der Literatur bemängelt, dass Effekte auf Zuckmücken nur in künstlichen Systemen nachgewiesen werden konnten (Duchet, Franquet, Lagadic & Lagneau, 2015) und nicht ohne weiteres von Meskosmosversuchen oder Halbfreilandversuchen auf das Freiland übertragen werden können. Unsere Studie konnte jedoch zeigen, dass Zuckmücken bei in der Stechmückenbekämpfung üblichen Bti-Applikationsraten um mindestens die Hälfte reduziert wurden und zwar unabhängig von der ökologischen Komplexität des Studiendesigns und den untersuchten Habitaten (Tab. 1). Die parallel von der KABS e.V. durchgeführte Stechmückenbekämpfung auf unseren Freilandflächen war sehr erfolgreich, da die Stechmücken um mehr als 90% reduziert wurden (Tab. 1). Die Stechmückenbekämpfung führte bei unseren Studienflächen nicht nur zu einer quantitativen Reduktion der Zuckmückendichten sondern auch zu einer qualitativen Veränderung ihrer Artzusammensetzung.

Aufgrund der verschiedenen Habitats waren die Diversität und die Zusammensetzung der Zuckmücken auf den Freilandflächen Schlute, Wald und Wiese sehr unterschiedlich. Während die meisten Arten auf der Wiese vorkommen, war im Wald hauptsächlich typische Arten von temporären Feuchtgebieten auftraten (Theissing et al. 2019). Die deutlichsten Effekte der Bti Applikation zeigten sich auf der temporär überschwemmten Wiese (Tab. 1). Auf der Bti behandelten Seite schlüpfen insgesamt zwei Drittel weniger Zuckmücken in einer Diver-

sität die ebenfalls um zwei Drittel reduziert war. Der Bti Effekt auf der Schlute war im Allgemeinen schwächer ausgeprägt, was sich durch die veränderte Artzusammensetzung innerhalb der Enclosures im Vergleich zum restlichen Gewässer erklären lässt.

Durch die Einführung des Split-Designs auf der Wiese konnten wir die Emergenz im ersten Jahr nach Aussetzen einer über 20 Jahre langen Bti-Behandlung (Theissinger et al., 2018) mit der Emergenz nach vier Jahren ohne Behandlung vergleichen. Zuckmücken waren in beiden Untersuchungsjahren gleichermaßen von Bti betroffen und zeigten konsequent eine Reduktion um zwei Drittel innerhalb von drei Monaten nach der Bti-Behandlung (Theissinger et al., 2018). Während Bti im ersten Jahr noch einen geringen Effekt auf Zuckmückendiversität hatte, wurde die unbehandelte Fläche innerhalb von vier Jahren von neuen Arten wiederbesiedelt, die nicht auf der Bti-behandelten Seite zu finden waren. Eine Reduktion der mit Bti bekämpften Gebiete am Oberrhein könnte sich daher positiv auf die Biodiversität in diesen temporären Feuchtgebieten auswirken.

Die ersten Einbrüche der Zuckmückendichten innerhalb der Emergenz konnten vier bis sechs Wochen nach der Applikation beobachtet werden. Dieser verzögerte Effekt resultiert daraus, dass sich zur Zeit der Bti-Bekämpfung verschiedene Zuckmückenspezies zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten im Gewässer befanden und deshalb unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber Bti zeigten. Mit drei bis vier Monaten besitzen die meisten Zuckmücken eine längere Entwicklungszeit als Stechmücken, die in den Sommermonaten in weniger als drei Wochen schlüpfen (Becker et al., 2010; Pillot, 2014a, 2014b). Um den Effekt auf die kleinen aber sehr empfindlichen Zuckmückenlarven abbilden zu können, empfiehlt sich die Aufnahme der Emergenz, da die Sicherbarkeit von kleinen Larven in Freilandproben aufgrund ihrer Größe deutlich erschwert ist.

Das Ausmaß der beobachteten Effekte vergleichbar mit einer fünfjährigen Studie in den Salzwiesen der Camargue, in der die Autoren 48% weniger adulte Zuckmücken auf Flächen mit Stechmückenbekämpfung fanden (Jakob und Poulin, 2016). In Feuchtegebieten in Minnesota sank die Zuckmückendichte zwei und drei Jahre nach Beginn der Bti-Applikation um 60 bis 80% (Hershey et al., 1998). Am Oberrhein gab es bisher nur eine Studie auf vergleichbaren Flächen, die sogar eine 94%ige Reduktion der aquatischen Zuckmücken zeigte, während terrestrische Arten weniger betroffen waren, da sie nicht exponiert gegenüber Bti in der Wasserphase sind (Fillinger, 1998).

Nichtsdestotrotz zeigen einige Freilandstudien keinen Effekt der Stechmückenbehandlung mit Bti auf Zuckmücken. Es ist dabei wichtig zu erwähnen, dass es einige Unsicherheiten in



der Bewertung dieser Studien gibt. Kurzzeitstudien mit einer Laufzeit von wenigen Tagen nach der Applikation (Wolfram, Wenzl & Jerrentrup, 2018) bis hin zu zwei bis acht Wochen (Charbonneau et al., 1994; Duchet et al., 2015; Pont, Franquet & Tourenq, 1999) zeigen häufig keine Beeinträchtigung von Zuckmücken. Unsere Untersuchungen verdeutlichen die Notwendigkeit, dass Studien mit dem Schwerpunkt Emergenz über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten durchgeführt werden sollten, um umfassende Effekte einer Bti-Behandlung auf Zuckmücken im Freiland abbilden zu können.

Darüber hinaus sollte die Bewertung von unerwünschten Effekten auf Nichtzielorganismen immer im Verhältnis zur erzielten Wirkung auf den Zielorganismus, hier Stechmücken, gesehen werden. In diesem Zusammenhang ist es problematisch, dass die Reduktion von Stechmücken bei einigen Studien nicht explizit dargestellt oder aufgenommen wurde (Caquet, Roucaute, Le Goff & Lagadic, 2011; Duchet et al., 2015; Lagadic et al., 2016; Lagadic, Roucaute & Caquet, 2014). Das Fehlen von negativen Auswirkungen auf Zuckmücken ist nur als verlässlich zu betrachten, wenn die Stechmücken zur gleichen Zeit statistisch signifikant reduziert wurden. Andernfalls könnte es möglich sein, dass die aufgebrauchten Konzentrationen aufgrund von Umweltbedingungen unwirksam gewesen sein konnten. Bei zu geringen Konzentrationen wäre ein Effekt auf Zuckmücken nur eingeschränkt zu beobachten. Während deutlich mehr Studien über die Auswirkungen der Stechmückenbekämpfung mit Bti in brackigen Küstenfeuchtgebieten oder Salzwiesen durchgeführt wurden (Caquet et al., 2011; Duchet et al., 2015; Jakob & Poulin, 2016; Lagadic et al., 2016; Pont et al., 1999) sind Felddaten aus Süßwasserökosystemen eher selten. Die jüngste Langzeituntersuchung zur Bekämpfung von *Ae. sticticus* in Feuchtgebieten entlang des Flusses Daläven in Schweden, ließ weder Effekte auf die Abundanzen noch auf Zuckmückendiversität erkennen (Lundström, Schäfer, et al., 2010; Lundström, Brodin, Schäfer, Vinnersten & Östman, 2010). Obwohl die schwedische Studie an überfluteten Flussgebieten stattfand, ist die Situation aufgrund der geringen Anzahl an jährlichen Bti-Applikationen nicht auf die Bekämpfung von *Ae. vexans* am Oberrhein übertragbar. Während Bti in den schwedischen Gebieten maximal fünfmal innerhalb des sechsjährigen Monitoring Zeitraums ausgebracht wurde, werden die Auen entlang des Rheins durchschnittlich fünfmal pro Jahr behandelt (Becker et al., 2018). Obwohl habitat- und standortbezogene Faktoren diese Ergebnisse stark beeinflussen können, hat man leider versäumt in den 1980er Jahren mit der Einführung der Bekämpfung ein ökologisches Monitoring durchzuführen, in dem man Nahrungsnetzeffekte adressiert. Die aktuelle Durchführung einer größeren Vergleichsstudie in den Rheinauen ist nur schwer möglich, da es nicht genug unbehandelte Kontrollgewässer mit hohen Stechmückendichten gibt. Dasselbe gilt für andere Gebiete in denen eine Ausdehnung der Stechmückenbekämpfung in Deutschland gefordert wird: auch entlang der Donau oder den deutschen Seen wur-

den bisher keine regionale Studien durchgeführt, anhand derer negative Effekte abgeschätzt werden können.

Die Studiengebiete Wald und Wiese werden zwischen März und Mai ein- bis zweimal mit *Bti* gegen univoltine Schneeschmelzmücken behandelt (Becker et al., 2010). Im frühen Frühjahr, wenn die Mehrheit der terrestrischen Insekten erst noch schlüpft, sind Zuckmücken jedoch eine besonders wichtige Nahrungsquelle. Entgegen der Annahme, dass Zuckmücken selten in temporär überfluteten sondern eher in permanenten Gewässern vorkommen (Becker & Ludwig, 1993), zeigten andere aber auch unsere Studie, dass Zuckmücken 42 bis 93% der gesamten Invertebratengemeinschaft darstellen (Hershey et al., 1998; Leeper & Taylor, 1998; Theissinger et al., 2018). Die Nahrung von Wasserfledermäusen, die hauptsächlich über solchen Feuchtgebiete jagen, bestand im Frühjahr bis zu 82% aus Zuckmücken (Arnold, Braun, Becker & Storch, 2000). In Anbetracht der Ausdehnung der Bti-Behandlungsfläche im Oberrheintal kann eine erhebliche Verringerung der gesamten Mückenbestände um mehr als 50% zu einer geringeren Nahrungsmittelverfügbarkeit für viele andere aquatische sowie terrestrische Räuber führen.

Die Ergebnisse zu den Freilandstudien waren Teil der Veröffentlichung Allgeier et al. (2019) im Journal *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Analysen der Artzusammensetzung der Zuckmücken auf den untersuchten Fläche entstanden im Rahmen des assoziierten Projektes AufLand und wurden unter Theissinger et al., 2018, 2019 bei *Metabarcoding und Metagenomics* veröffentlicht und bei *Molecular Ecology* eingereicht.

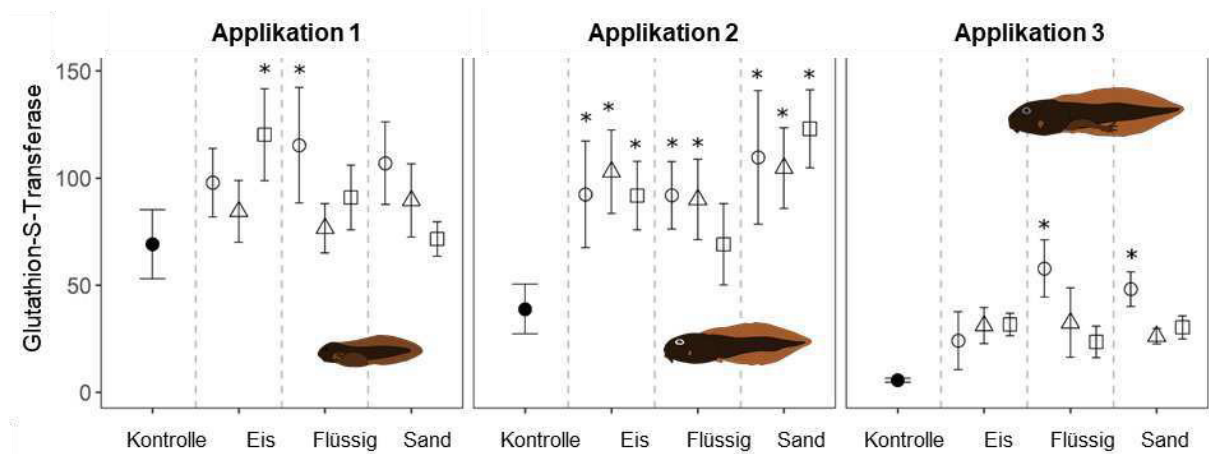
## 3.2 Einfluss auf Amphibien

### 3.2.1 Direkte Effekte

Im Gegensatz zu einer kürzlich in Argentinien durchgeführten Laborstudie mit der Bti-Formulierung Introban (Lajmanovich et al., 2015) führten die in Deutschland verwendeten Ausbringungsarten der Bti-Formulierungen auch bei 10-facher Überdosierung zu keiner Mortalität bei Grasfroschkaulquappen. In der Studie von Lajmanovich und Kollegen (2015) war die Toxizität bei der 100% der Kaulquappen starben (48.000 ITU/L) sogar niedriger als die von uns ausgebrachte Überdosierung der Flüssigformulierung VectoBac 12AS (64.940 ITU/L). Wie schon von Lajmanovich und Kollegen (2015) vermutet, könnten unbekannte Formulierungsbeistoffe für die erhöhte Mortalität verantwortlich sein. Da der Großteil der Beistoffe von VectoBac WG und 12AS ebenfalls nicht bekannt sind, sind unsere Ergebnisse für eine sichere Verwendung innerhalb der Stechmückenbekämpfung wesentlich.

Während eine Bti Exposition das Gewicht und die Länge der Grasfrösche bei der Metamorphose nicht veränderte, war die Entwicklungszeit der Kaulquappen in Bti-behandeltem Was-

ser leicht verkürzt. Darüber hinaus zeigten die Larven nach dem Kontakt mit Bti subzelluläre Veränderungen die sich in signifikanten Erhöhungen von GST (37 - 550%), GR (5 - 140%) und AChE (38 - 137%) widerspiegeln (Abb. 12 für GST). Es ist bekannt, dass Amphibienlarven ungünstigen Bedingungen in der Wasserphase entkommen, sobald sie eine ausreichende Masse erreicht haben (Morey & Reznick, 2000). Eine solche Reaktion wurde bereits unter dem Einfluss von Pestiziden nachgewiesen (Cauble & Wagner, 2005). Die Veränderungen in den biochemischen Markern weisen darauf hin, dass die Kaulquappen in Bti-behandeltem Wasser möglicherweise erhöhten Stressbedingungen ausgesetzt waren. Eine Veränderung in der neuronalen Aktivität (AChE), verstärkte Entgiftungsprozesse (GST) und antioxidative Abwehrreaktionen (GR) sind subletale Effekte, die langfristig zu oxidativem Stress in den exponierten Fröschen führen können. Da Investitionen in zelluläre Reaktionen auf Xenobiotika energieintensiver Prozesse sind (Steinberg, 2012), müssen die Kaulquappen Kompromisse eingehen, die sich im weiteren Lebensverlauf negativ auf ihre Fortpflanzung, Lebensdauer oder Fitness auswirken können (Lushchak, 2011; Monaghan et al., 2009).



**Abbildung 12: Mittlere Glutathion-S-Transferase (GST) Aktivität ± 95% Konfidenzintervall in Grasfroschkaulquappen nach dreimaliger Bti Applikation in verschiedenen Entwicklungsstufen, dargestellt in Kontrolle und Ausbringungsformen (Eis, Flüssig, Sand) bei steigenden Applikationsraten (○: 1x Feldrate, △: 2x Feldrate, □: 10x Feldrate). Statistisch signifikante Unterschiede werden durch Sterne angezeigt (nach Allgeier et al., 2018).**

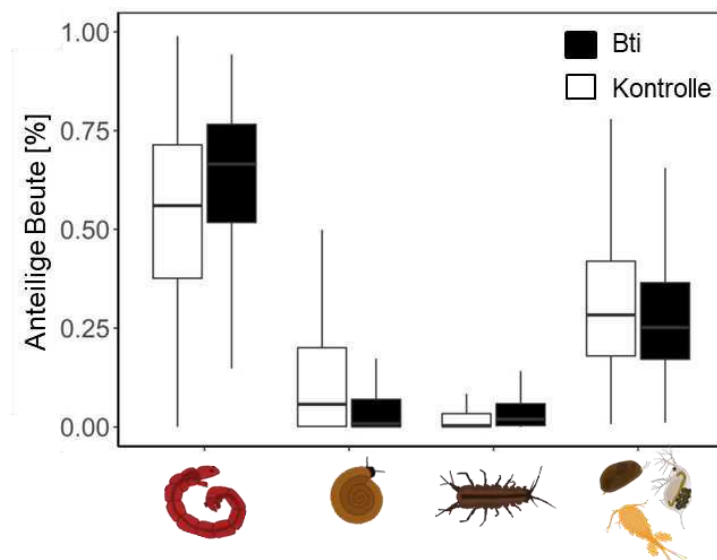
Die subzellulären Veränderungen waren unabhängig von der verwendeten Formulierung, Ausbringungsform und der applizierten Menge und wurden durch eine mehrmalige Behandlung innerhalb kurzer Zeit (6 Tage) verstärkt (vgl. Abb. 12). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die subletalen Veränderungen von einem in allen Formulierungen enthaltenen Stoff (z.B. Proteine, sporenassoziierte Faktoren, Beta-Exotoxine, Chitinasen, Formulierungsbeistoff) verursacht werden, was sich jedoch anhand unserer Studie nicht abschließend klären lässt. Um eine Verstärkung der Effekte zu vermeiden, sollte von behördlicher Seite über die Einführung einer maximalen Bekämpfungsanzahl bzw. einem minimal einzuhaltenden Ab-

stand zwischen den einzelnen Bekämpfungen nachgedacht werden. Im Zusammenhang mit dem weltweiten Amphibienrückgang (Stuart et al., 2004) können solche Maßnahmen dazu beitragen das Risiko von negativen Auswirkungen für Amphibien erheblich zu verringern.

Die Ergebnisse der Studie an Grasfroschkaulquappen wurden 2018 unter Allgeier et al. (2018) bei *Environmental Research* veröffentlicht.

### 3.2.2 Indirekte Effekte

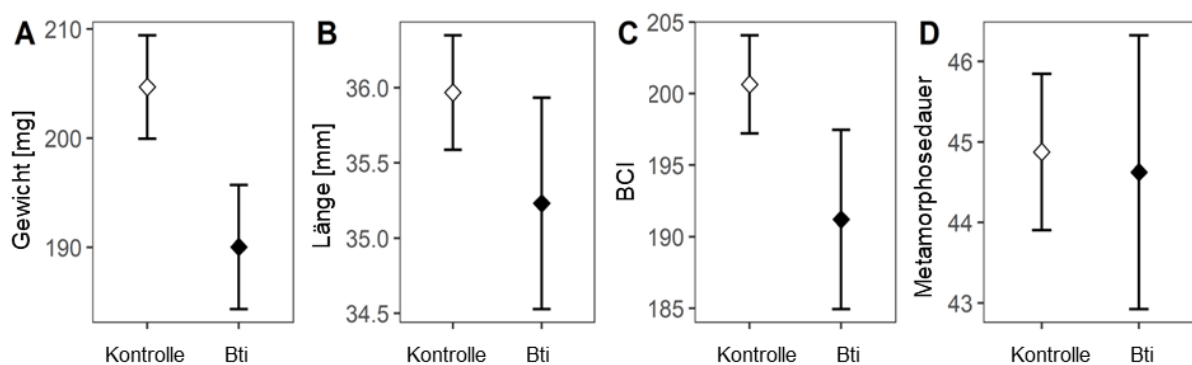
Grundlage für diese Untersuchung ist die Beobachtung, dass die Bti-Behandlung die Abundanz von Zuckmückenlarven in allen mit Bti-behandelten Mesokosmen erheblich verringerte (Tab. 1). Die Analyse der Nahrungsketten anhand der stabilen Isotope  $\delta^{15}\text{N}$  und  $\delta^{13}\text{C}$  ergab, dass die Nahrung von Molchlarven zum größten Teil aus Zuckmücken (> 56%) und Zooplankton (> 25%) bestand (Abb. 13). Darüber hinaus wurden Zuckmücken als Nahrung bevorzugt, auch wenn sie durch die Bti-Behandlung in wesentlich geringeren Mengen verfügbar waren (Abb. 12). Eine Ernährung, die hauptsächlich aus Zuckmücken und Zooplankton besteht, entspricht den Mageninhaltsanalysen von anderen Fadenmolchlarven und den synoptischen Arten *Ichthyosaura alpestris* und *Triturus cristatus* (Braz and Joly 1994). Im Vergleich zu Zuckmücken nehmen Stechmücken einen kleineren Teil in der Ernährung von Molchen ein (Bogdan et al., 2013), was wahrscheinlich an ihrem punktuellen Vorkommen und ihrer schnellen Entwicklungszeit liegt.



**Abbildung 13:** Anteilige Beutetiere in der Nahrung von Molchlarven (*L. helveticus*, *L. vulgaris*). Linien=Median, Box=50% Konfidenzintervall, Fehlerbalken=95% Konfidenzintervall (nach Allgeier et al., 2019).

Nach vorangegangener Bti-Behandlung wiesen die Molch-Metamorphlinge ein um 7% verringertes Gewicht beim Landgang auf. Der Unterschied im Gewicht war zwar nicht statistisch signifikant (bei Signifikanzlevel von 0.05), jedoch scheinen Bti-behandelte Molche etwas

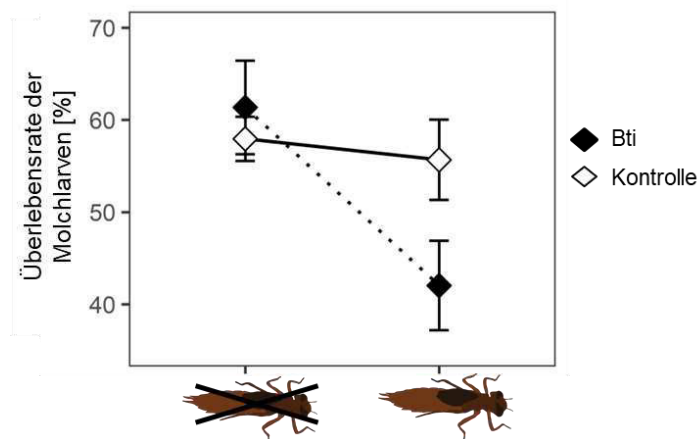
kleiner an Land zu gehen (Abb. 14). Aufgrund eines möglichen Überangebotes an Beutetieren innerhalb der Mesokosmen könnten diese Effekte unter natürlichen Bedingungen im Freiland bei geringerem Nahrungsangebot und mehr Konkurrenten noch größer ausfallen. Da die Körpergröße von Amphibien bei der Metamorphose hauptsächlich durch die Nahrungsaufnahme in den späteren Entwicklungsstadien bestimmt wird (Leips & Travis, 1994) und sich größere Molchlarven eher von benthischen Insekten ernähren (Kuzmin, 1991) könnten eine deutlich reduzierte Verfügbarkeit von Zuckmücken die Ursache für ein geringeres Gewicht am Ende der Metamorphose sein. Kleinere Molchlarven sind einem höheren Prädationsrisiko durch Fische, Käfer oder Libellen ausgesetzt und haben eine niedrigere Überlebenswahrscheinlichkeit als juvenile Tiere (Formanowicz, 1986; Smith, 1987).



**Abbildung 14: Mittlere ( $\pm$  SE) Größe und Entwicklung der *L. helveticus* Larven zum Zeitpunkt der Metamorphose (nach Allgeier et al., 2019).**

Obwohl Großlibellenlarven zu den tödlichsten Prädatoren innerhalb von Feuchtgebieten zählen (Van Buskirk & Schmidt, 2000), hat die Libellenlarve das Überleben der Molchlarven unter Kontrollbedingungen nicht beeinflusst (Abb. 15). In einem durch Bti veränderten Nahrungsnetz führte die Libelle allerdings dazu, dass 27% weniger Molchen bis zur Metamorphose überlebten (Abb. 15). Während beide Prädatoren in den Kontrollen genug Futter hatten um koexistieren zu können, hat die geringere Verfügbarkeit von alternativer Beute wie vor allem Zuckmücken in den Bti-Behandlungen zu einer verstärkten Prädation von Molchen geführt. Der Zusammenhang von höherer Verfügbarkeit alternativer Beute und geringeren Prädationsraten konnte bereits für Amphibien und Fische gezeigt werden (Preston et al., 2017). Bei einer Studie von Pauley und Kollagen (2015) führte die Kombination von Bti und Libellenlarven dazu, dass das Überleben von herbivoren Kaulquappen sogar um 80% reduziert wurde. In deren Experiment starben jedoch auch die Hälfte der Kaulquappen durch Libellen wenn sie keinem zusätzlichen Stress durch Insektizide ausgesetzt waren. Amphibien können ein Anti-Prädatoren-Verhalten ausbilden, um etwa durch verringerte Aktivität dem Risiko gefressen zu werden zu entgehen (Relyea, 2001; Van Buskirk & Schmidt, 2000). Subletale Effekte ausgehend von Pestiziden können die Ausbildung eines solchen Verhaltens jedoch verhindern und erhöhen so die Anfälligkeit gegenüber Prädation (Reeves, Perdue,

Blakemore, Rinella & Holyoak, 2011). Junges und Kollegen (2017) haben bereits zeigen können, dass die Exposition gegenüber der Bti-Formulierung Introban zu einer Verhaltensänderung in der Schwimmaktivität von Kaulquappen führte. Wenn weniger Amphibien nach der Metamorphose das Gewässer verlassen hat das nicht nur Auswirkungen auf die Populationsgröße, sondern auch auf ganze Ökosysteme, indem der Transfer von Biomasse und Energie von aquatischen in terrestrische Systeme reduziert wird (Gibbons et al., 2006).



**Abbildung 15: Mittlere Überlebensrate von Molchlarven (*L. helveticus*, *L. vulgaris*, n=11) unter Kontrollbedingungen und Bti-Behandlung bei Anwesenheit und Abwesenheit einer Großlibellenlarve (*A. cyanea*) (nach Allgeier et al., 2019).**

Die bisherigen Erkenntnisse zur Umweltbewertung von Bti, vor allem im Hinblick auf indirekte Effekte, sind bisher nur auf Studien aus den USA (Minnesota), Schweden (Daläven) und Frankreich (Camargue) begründet (Hershey et al., 1998; Jakob & Poulin, 2016; Östman, Lundström & Vinnersten, 2008; Poulin, 2012; Vinnersten, Lundström, Petersson & Landin, 2009). Die nachgewiesenen indirekten Effekte von Bti in der Nahrungskette begründen sich bisher nur auf Mehlschwalben und adulte Libellen in der Camargue. Dabei ist grundsätzlich anzunehmen, dass weniger mobile, aquatische Räuber wie Amphibien, Libellen oder Fische eher von einer Reduktion der Mückendichten in Gewässern beeinflusst werden.

Die Ergebnisse zu indirekten Effekten auf Molchlarven und Libellen wurden im März 2019 bereits beim Journal *Science of the Total Environment* unter Allgeier et al. 2019 eingereicht.

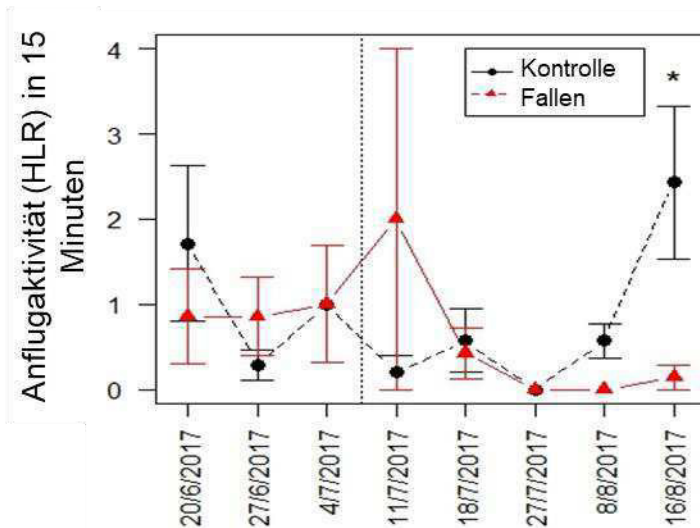
### 3.3 Effektivität der Mückenfallen am Oberrhein

Im Vergleich zum hochwasserreichen Sommer 2016, blieben die Überschwemmungen und das massenhafte Auftreten von Stechmücken während des Sommers 2017 weitgehend aus. Insgesamt wurden daher nur 1575 Stechmücken in den Fallen gefangen. Die absolute Mehrheit (94%) gehörten zur Gattung *Culex*, wovon *Culex pipiens* den Hauptanteil ausmachte. *Culex pipiens*, auch Hausmücke genannt, brütet in kleinsten Wasseransammlungen wie Pfützen, Eimer oder Regentonnen und ist im Gegensatz zu *Ae. vexans* nicht auf Hochwasser-

ereignisse angewiesen. Die Hausmücke ist an ein Leben in urbanen Gebieten angepasst, ist nachts und in der Dämmerung aktiv und sucht dann Gebäude zur Nahrungsaufnahme und zur Überwinterung auf. Um *C. pipiens* effektiv zu bekämpfen, eignen sich lokale Methoden, wie das Abdecken der Regentonne und der Beseitigung kleiner Wasserflächen, um den Weibchen keine Möglichkeit zur Eiablage zu bieten. Bti kann dabei zur Anwendung in Regentonnen oder Teichen herangezogen werden. Eine weitläufige Bti-Behandlung der Feuchtgebiete innerhalb von Naturschutzgebieten bietet keinen Schutz gegen die Belästigung durch die Hausmücke, die in der Regel selbst oder durch die Unachtsamkeit der Nachbarschaft gezüchtet wird. Durch lokale Aufklärungskampagnen könnte die Bevölkerung erheblich zu ihrem eigenen Schutz vor Stechmücken beitragen.

Insgesamt wurden nur 40 Individuen der Gattung *Aedes/Ochlerotatus* (2,5% aller Stechmücken) in den Fallen gefangen. Darunter waren aufgrund der ausbleibenden Hochwasserspitzen nur einige wenige *Ae. vexans*, auf deren Untersuchung sich diese Studie ursprünglich richtete. Die meisten der tagaktiven *Aedes* Arten sind überwiegend in den Tropen und Subtropen verbreitet, in Europa gibt es lediglich zehn Arten, darunter auch tropische Arten die sich erst in den letzten Jahren gehäuft nach Europa verschleppt wurden. Auch in Berg konnten Individuen der eingewanderten Asiatischen Buschmücke (*Ae. japonicus*) nachgewiesen werden. Die Asiatische Buschmücke ist in Ostasien beheimatet und wurde in Europa erstmals in Frankreich im Jahr 2000 nachgewiesen (Schaffner, Chouin & Guilloteau, 2003). Die Buschmücke ist mittlerweile in großen Teilen von Baden-Württembergs und Rheinland-Pfalz verbreitet und hat sich bereits von Westdeutschland bis in die Schweiz verbreitet (Koban et al., 2019). Obwohl *Ae. japonicus* zu den potenziellen Vektoren für Krankheiten wie Dengue Fieber, West-Nil oder Zika-Virus zählt, gab es noch keine Übertragung der Erreger innerhalb von Europa (Koban et al., 2019). Die restlichen Stechmückenindividuen (4%) gehörten hauptsächlich zu den Gattungen *Anopheles* und nur einige wenige Individuen der Gattungen *Culiseta* und *Coquillettidia* konnten in den Fallen nachgewiesen werden.

Aussagen über die Effektivität der Fallen können nur anhand eines Vergleiches des Stechdrucks bzw. der Anflugraten von Stechmücken getroffen werden. Bei den wöchentlichen Messungen wurden 74 Anflüge gezählt, deren zeitliche Verteilung im Untersuchungszeitraum in Abb. 16 zu sehen ist.



**Abbildung 16:** Zeitverlauf der Stechmückenanflugraten von Juni bis August 2017. Gestrichelte Linie stellt die Aktivierung der Biogents-Fallen dar.

Insgesamt ist festzuhalten, dass es 9-mal weniger Stechmücken in den Gebieten gab, die mit Stechmückenfallen ausgestattet waren. Der Effekt der Fallen auf die Reduktion des Stechdrucks stellte sich erst nach einer Zeit von drei Wochen ein. Gründe dafür sind, dass sich neue Fallen erstmal einige Zeit laufen müssen, um den neuartigen Geruch zu verlieren. Viel wichtiger ist jedoch, dass die Fallen kontinuierlich Stechmücken fangen und der kumulative Effekt erst etwas verzögert zum Vorschein treten kann. Der erst signifikante Unterschied war fünf Wochen nach Aktivierung der Fallen zu erkennen. Es ist zu vermuten, dass sich der Effekt bei einem Fortgang der Studie weiterhin deutlich gezeigt hätte. Trotz dieser Indizien konnte diese Daten jedoch wegen des ungewöhnlich stechmückenarmen Sommers und der niedrigen Zahl an geschlüpften Überschwemmungsmücken nicht dafür herangezogen werden, eine finale Aussage über die Fängigkeit der Fallen am Oberrhein zu treffen. Die Studie wurde im Sommer 2018 wiederholt, jedoch war das Jahr durch noch größere Hitze und Trockenheit geprägt, so dass die vorläufigen Ergebnisse ein geringeres Vorkommen von *Ae. vexans* aufzeigen und auch keine abschließende Betrachtung zu lassen. Die Auswertung der Ergebnisse 2018 erfolgt gerade im Rahmen zweier Abschlussarbeiten.

Neben Studien, die den Einsatz solcher Fallen zu Monitoring-Zwecken untersuchten (Lühken et al., 2014) gibt es Versuche tropische Mücken (*Ae. albopictus*) in Frankreich und Italien mit Fallen zu bekämpfen (Akhoundi, Jourdain, Chandre, Delaunay & Roiz, 2018; Englbrecht et al., 2015). Akhoundi und Kollegen (2018) zeigten, dass der Stechdruck durch Tigermücken ab sechs Wochen nach Aktivierung ihrer Fallen um fast 100% reduziert werden konnte. Ein Testlauf von ähnlichen Fallen in einem Dorf in der Camargue hatte die Reduktion von *Oc. caspius* und *Oc. detritus* zum Ziel (Poulin, Lefebvre, Muranyi-Kovacs & Hilaire, 2017). Beide Arten sind an Salzwasser angepasste Spezies und sind hauptsächlich für die Belästigung in



der Camargue verantwortlich, weswegen sie dort großflächig mit Bti bekämpft werden. Poulin und Kollegen (2017) erreichten durch den Einsatz von Fallen eine mittlere Reduktion des Stechdrucks von 70%, wobei die Fangleistung auch abhängig von der Stechmückenspezies war. *Aedes vexans* war in den Fängen nicht sehr häufig, jedoch wurde ihr Stechdruck sogar um 94% reduziert.

Alle Studien betonen, dass der Einsatz von solchen Fallensystemen den klaren Vorteil hat, dass sie durch ihre Pestizidfreiheit, dem geringen Effekt auf die Nicht-Ziel-Fauna und ihre lokale Anwendung umweltfreundlich sind. Darüber hinaus bleiben Mückenlarven aber auch adulte Tiere bis zum Fang als Nahrungsgrundlage erhalten. In Kombination mit anderen Methoden stellt der Einsatz von Fallen somit eine weniger invasive Form der Stechmückenbekämpfung dar.

### 3.4 Gesellschaftliche Sicht

Eine Kontroverse bei der Diskussionsrunde im regionalen Workshop 2015 war, dass die Stechmückenbekämpfung von der Bevölkerung gewünscht ist und daher nicht abgeändert werden könne. Es stellte sich jedoch heraus, dass subjektive Erfahrung oder Erfahrungsberichte oder die ökologische Gesinnung die Grundlage solcher Einschätzungen sind. Als zentrale Ergebnisse der ersten Umfrage im Jahr 2016 sind aufzuführen, dass sich ca. 50% der Befragten von Stechmücken stark bis sehr stark belästigt fühlen und ca. 90% der Befragten verschiedenste Schutzmaßnahmen gegen Stechmücken ergreifen. Am Häufigsten werden Sprays oder Salben für die Haut verwendet (61%), gefolgt von Fliegengittern (57%), Vermeiden in der Dämmerung draußen zu sein (41%) und lange Bekleidung (40%) (Abb. 17).

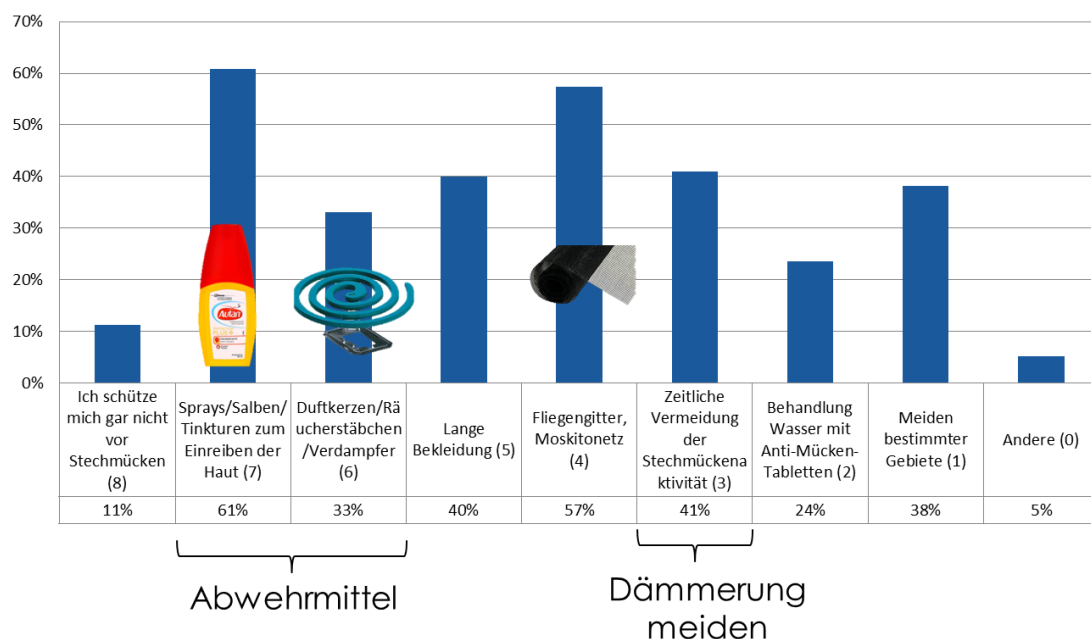


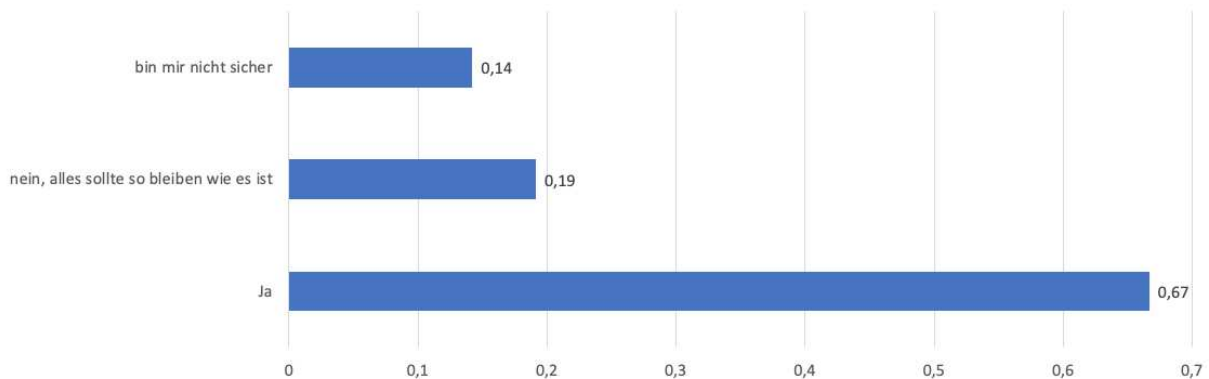
Abbildung 17: Ergriffene Schutzmaßnahmen gegen Stechmücken (Mehrfachnennungen möglich).

Die Befragten fühlen sich vor allem im Außenbereich ihres Hauses / ihrer Wohnung aber auch beim Wandern, Spaziergehen und Baden belästigt. An Sportstätten, Gaststätten und im Innenbereich wird die Belästigung als gering eingestuft. 25% der Befragten fühlten sich an über 50 Tagen im Jahr so eingeschränkt, dass sie Unternehmungen draußen abbrechen mussten, wobei gut 60% gar nicht bis wenig empfindlich auf Stechmückenstiche reagieren. Die Stechmückenbekämpfung wird überwiegend positiv gesehen, eine Mehrheit (71%) befürwortet sogar deren Ausweitung. Bezüglich der Finanzierung und der Bekämpfung in Naturschutzgebieten sind die Befragten gespalten. 55% sind gerne bereit die Stechmückenbekämpfung über Beiträge der Gemeinden zu finanzieren, während 35% gegen ein solches Konzept sind, obwohl es bereits seit Einführung der großflächigen Bekämpfung so praktiziert wird. Etwa die Hälfte der Befragten (47%) befürwortet eine Bekämpfung der Stechmücken in Naturschutzgebieten, wobei 36% dafür sind Naturschutzgebiete am besten ganz aus der Behandlung zu nehmen. In der Bevölkerung herrscht eine große Verunsicherung bezüglich des Risikos einer Verbreitung tropischer Krankheiten durch Stechmücken. Es besteht eine deutliche Sorge, dass Stechmücken in der Zukunft tropische Krankheiten übertragen können (69%). Abschließend hat diese Umfrage gezeigt, dass die Belästigung für die Bevölkerung am höchsten im Garten oder auf der Terrasse ist und die Akzeptanz für eine Anpassung der bisherigen Praxis nur erreicht werden kann, wenn gesichert wird, dass die Belästigung innerhalb von Ortschaften nicht zunimmt.

Die oben genannten Ergebnisse der Betroffenheitsstudie aus 2016 konnten im Wesentlichen in der größer angelegten Contingent Valuation Studie von September 2017 repliziert werden. Jedoch zeigte sich, dass 43% der befragten Haushalte nicht wussten, dass ihre Gemeinde die Aktivitäten der KABS e.V. anteilig mitfinanziert. Die überwiegende Mehrheit unterstützt den aktuellen Umfang der Bekämpfung und somit auch der Finanzierung, lediglich 12% würden unter diesen Bedingungen einer Ausweitung der Bekämpfung und somit höheren Ausgaben der Gemeinde zustimmen.

Konkret nach den Aktivitäten der KABS e.V. gefragt, zeigte sich jedoch, dass obwohl die Aktivitäten der KABS e.V. den meisten Menschen bekannt waren, die Hälfte der befragten Personen nicht wusste, dass in Naturschutzgebieten überhaupt eine Bti-Behandlung stattfindet. Insgesamt finden diesen Fakt allerdings nur 22% besorgniserregend. Die Menschen waren größtenteils dafür, die derzeitige Praxis des Bti-Einsatzes aufgrund der möglichen Auswirkungen auf die Umwelt dringend zu überdenken und anzupassen (67%, 14% waren unentschieden, Abb. 18) und waren dem Einsatz von Stechmückenfallen grundsätzlich nicht abgeneigt. 19% der Befragten vertraten aber auch die Meinung, dass die derzeitige Praxis keinesfalls abgeändert werden dürfte.

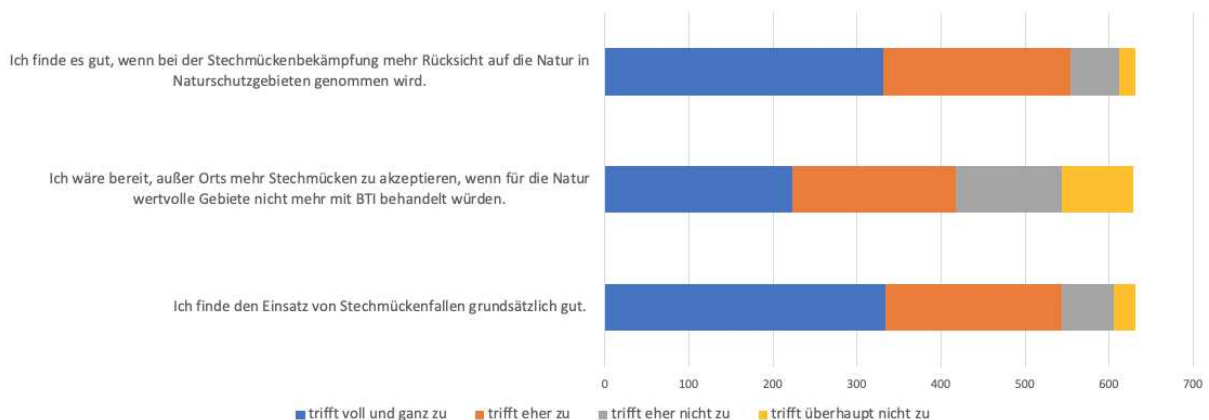
Halten Sie es in Anbetracht der möglichen negativen Auswirkungen für die Natur für nötig, die bisherige Praxis des BTI-Einsatzes zu überdenken und weiter zu entwickeln?



**Abbildung 18: Ansichten zur Notwendigkeit der Weiterentwicklung der Stechmückenbekämpfung (N=600)**

Der Schutz der Natur in Naturschutzgebieten ist der Mehrheit der Befragten durchaus wichtig. Um dieses Ziel zu erreichen, würden zwei Drittel der Befragten sogar akzeptieren, dass es mehr Stechmücken außerhalb der Ortschaften gibt (Abb. 19). Dem Einsatz der alternativen Bekämpfungstechnik mittels Stechmückenfallen standen die Befragten mehrheitlich positiv gegenüber (Abb. 19).

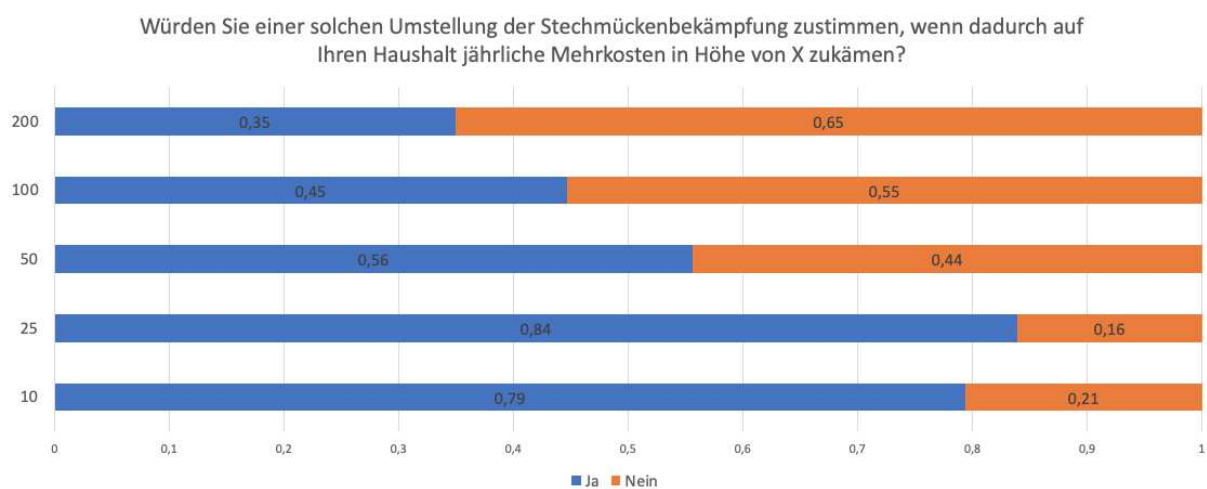
Wir sind sehr an Ihrer Meinung zu dieser neuen Variante der Stechmückenbekämpfung interessiert. Wie sehr treffen folgende Aussagen auf Sie zu? Antworten Sie bitte mit den Möglichkeiten auf Liste 6.



**Abbildung 19: Ansichten zur vorgeschlagenen Variante der Stechmückenbekämpfung (N=600)**

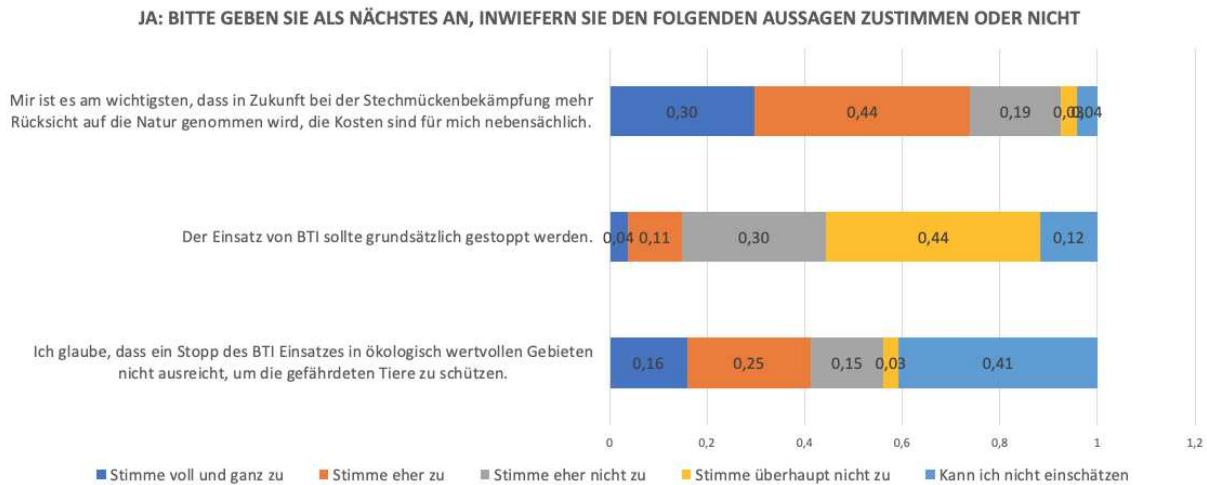
Wie in Abbildung 20 dargestellt wurde verschiedenen Untergruppen der Befragten unterschiedliche Beträge zwischen 10 Euro und 200 Euro pro Monat vorgeschlagen, um eine Umstellung auf die alternative Bekämpfungsmethode zu finanzieren. Dieser Vorschlag konnte entweder angenommen oder abgelehnt werden. Abbildung 20 zeigt die jeweiligen Zustimmungs- und Ablehnungsraten zu diesen Vorschlägen. Aus diesen Antworten ergibt sich eine mittlere (durchschnittliche) Zahlungsbereitschaft von ca. 118 Euro pro Jahr und Haushalt.

Der Median liegt mit ca. 75 Euro etwas niedriger. Diese Werte verdeutlichen die hohe Bereitschaft der Bevölkerung in den betroffenen Gebieten, für eine naturschutzkonforme Stechmückenkontrolle, d.h. für eine Kontrolle, die ein Abtöten der Mückenlarven in den zahlreichen ökologisch wertvollen Feuchtgebieten vermeidet und die Belästigung durch Mücken durch Fallen lediglich dort einschränkt, wo sich die Menschen am meisten belästigt fühlen, deutliche Mehrkosten auf sich zu nehmen. Dieses Antwortverhalten deckt sich mit den Antworten, die in Abb. 19 dargestellt sind, ebenso mit der Antwort auf die Frage nach der Zustimmung zur ersten Aussage in Abbildung 21. Fast drei Viertel der Befragten äußert Zustimmung dazu, dass Rücksicht auf die Natur in Zukunft an oberster Stelle stehen sollte und dies nicht durch gegebenenfalls höhere Kosten in Frage gestellt werden darf.



**Abbildung 20: Verteilung der Antworten auf die Frage nach der Zahlungsbereitschaft für die alternative Variante der Stechmückenbekämpfung (N=600)**

Jedoch ist in Abbildung 21 auch zu erkennen, dass ein grundsätzlicher Stopp des Bti-Einsatzes nur von wenigen Menschen befürwortet wird. Zudem äußern 41% der Befragten Zustimmung zu der Einschätzung, dass möglicherweise die vorgeschlagene Aussparung des Bti-Einsatzes in ökologisch wertvollen Gebieten allein nicht ausreichend ist, um die gewünschten Naturschutzziele zu erreichen. Diese Paarung von Aussagen deutet auf den Konflikt hin, in dem sich die Befragten befinden. Sie erkennen wohl selbst, dass zur Erreichung der Naturschutzziele eine deutliche Einschränkung des Bti-Einsatzes nötig ist, jedoch schrecken sie vermutlich aus Angst vor Stechmückenplagen vor einem völligen Stopp des Einsatzes dieses Mittels zurück. Daraus lässt sich schließen, dass die Erarbeitung neuer alternative und wirkungsvoller Verfahren zum Schutz vor Stechmücken in diesen Gebieten dringend benötigt wird.



**Abbildung 21: Weitere Ansichten zur vorgeschlagenen Variante bei Zustimmung zur Umstellung**

Im Rahmen der Befragung wurde zusätzlich ermittelt, ob die Haushalte bereit wären, sich für ihr eigenes Grundstück eine Stechmückenfalle zuzulegen, z.B. wenn es nicht zu der vorgestellten gemeinschaftlichen Aktion kommunal aufgestellter Fallen kommen sollte. Wie in Abbildung 22 dargestellt zeigt sich jedoch, dass nur ca. ein Viertel der Befragten hierzu bereit wären, wobei die Kosten bei der Ablehnung dieser individuellen Lösung nicht den Hauptgrund darzustellen scheinen. Vermutlich fehlt für eine positivere Einschätzung bislang noch die Erfahrung mit dieser neuen Technik, die selbstverständlich für den einzelnen Haushalt einen deutlich höheren Aufwand im Betrieb erfordern würde als eine kommunal organisierte Bekämpfung wie bisher oder mit Fallen.

Wären Sie bereit, sich unter diesen Bedingungen eine solche Falle anzuschaffen, um sich aktiv auf Ihrem Grundstück gegen Stechmücken zu schützen



**Abbildung 22: Bereitschaft zur Anschaffung einer privaten Stechmückenfalle (N=600)**

Bei den Haushalten, die sich eine solche Falle auch privat anschaffen würden, scheint jedoch die Zahlungsbereitschaft hierfür recht hoch zu sein, wobei die derzeitigen Anschaffungs- und Betriebskosten noch über dieser Zahlungsbereitschaft liegen (Abb. 23).



**Abbildung 23: Zahlungsbereitschaft für private Stechmückenfallen**

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die befragten Haushalte in den betroffenen Gebieten alternativen Methoden der Stechmückenkontrolle und -bekämpfung, die einen Schutz der wertvollen Naturgebiete gewährleisten würde, aufgeschlossen gegenüber stehen und sogar in einem sehr hohen Maße dazu bereit sind, entsprechende Mehrkosten zu tragen. Der Bti-Einsatz soll zwar nach wie vor ein Grundbestandteil einer als naturschutzkonform empfundenen Methode sein, jedoch muss sichergestellt werden, dass ökologisch wertvolle Gebiete (dies gilt es dann bei der Umsetzung zu definieren), von einem solchen Einsatz ausgespart werden. Die Lösung, die Stechmücken teilweise weniger an ihrem Entstehungsort direkt, sondern eher dort zu bekämpfen, wo sie lästig werden, erfährt eine große Zustimmung. Hierzu würden die Menschen auch in Kauf nehmen, dass abseits der Orte der hauptsächlichsten Belästigung eine Zunahme an Stechmücken erfolgt.

### 3.5 Zusammenarbeit mit lokalen Akteuren

Die Zusammenarbeit mit lokalen Akteuren zum Thema Stechmückenbekämpfung und die Überprüfung von ökologischen Auswirkungen gestaltete sich äußerst schwierig. Die Stechmückenbekämpfung mit Bti ist ein politisch stark aufgeladenes Thema und jegliche Zweifel an deren Umweltverträglichkeit werden als Angriff auf das Konzept gesehen. Da dieses Projekt die „Umweltfreundlichkeit“ der aktuellen Bekämpfungsstrategie mit Bti untersuchte, wurde bereits im ersten Projektjahr eine Anfrage im Landtag RLP gestellt, ob die Regierung „die Arbeit der KABS e.V. als uneingeschränkt naturschutzkonform“ bewertet (Landtag RLP, 2015). Auch Bundestagsabgeordnete schalteten sich in die Diskussion ein und verlangten

von uns direkt Aufklärung warum eine solche Untersuchung überhaupt notwendig sei. Diese Bedenken beruhen darauf, dass man seit Jahrzehnten behauptet, dass die etablierte Bekämpfungstrategie mit Bti umweltfreundlich sei, ohne dies allerdings je im Freiland untersucht zu haben. Im Verlauf dieses Projektes wurde ersichtlich, dass viele der im Vorfeld angeführten Studien der KABS e.V. nur als interne Berichte oder vor mehr als 20 Jahren durchgeführte Diplomarbeiten vorlagen. Diese Unterlagen sind nicht öffentlich verfügbar, unterlagen keinem peer-review und waren nur auf mehrfaches Nachfragen hin zu bekommen. Auch die Behandlungssituation war nicht einfach zu erfassen. Daten zur aktuellen Behandlung lagen anfangs nur in Form von Karten vor, neuere GIS Aufzeichnungen zeigten auf Nachfrage Fehler auf. Es ist darauf hinzuweisen, dass eine Kontrolle der Ausbringung von Seiten der Behörden nicht erfolgt: die KABS e.V. kontrolliert die Einhaltung der Tabubereiche selbst.

Leider hat sich das grün geführte Umweltministerium in RLP bisher sehr zurückhaltend mit einer Interessensbekundung zur Forschung an einer Umweltverträglichkeit der Schnakenbekämpfung gezeigt und das Projekt nicht unterstützt. Auf der anderen Seite wurden die von uns erarbeiteten wissenschaftlichen Ergebnisse in den lokalen aber auch nationalen Medien aufgegriffen, was ein öffentliches Interesse an der Thematik zeigt.

Im Verlauf des Projektes erhielten wir mehrfache Einladungen zu Diskussionen über die derzeitige Praxis zur Stechmückenbekämpfung in denen es zu heißen Wortgefechten der Befürworter und Gegner kam. Am Ammersee wurde auf Grund einer Bürgerinitiative diskutiert, ob eine Stechmückenbekämpfung eingeführt werden sollte. Der Gemeinderat in Herrsching (Ammersee) hat sich allerdings auf Grund der aktuellen Befunde zum Insektenrückgang gegen eine solche Maßnahme entschlossen, u.a. auch um die Natur und das Ökosystem am Ammersee zu erhalten.

Während der praktischen Feldarbeiten dieses Forschungsprojektes kam es leider trotz vorhergehender Absprache mit allen Akteuren (KABS e.V. und Genehmigungsbehörde SGD Süd) zu einem Zwischenfall. Die Enclosures in der Druckwasserschlute wurden am 22.06.2016 bei Stechmückenbekämpfung durch die KABS e.V. mit dem Hubschrauber zum Teil mit Bti behandelt, obwohl die von uns genutzte Fläche eine ausgewiesene Tabufläche darstellte. Ab diesem Zeitpunkt konnte leider nicht mehr mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass die Kontrolle nicht mit Bti behandelt worden war. Daher war eine Weiterführung des Versuchs nicht mehr möglich. Die KABS e.V. hat die Behandlung der Kontrollflächen, die vorher eindeutig bei gemeinsamen Begehungen mit Herrn Dr. Norbert Becker festgelegt wurden, nach einigem Schriftwechsel eingeräumt und als ein Versehen bezeichnet. Es bleibt offen wie viele solcher Versehen in anderen Tabubereichen in der jahrzehntelangen Behandlungsgeschichte vorgekommen sind.

Im Spannungsfeld der Stechmückenbehandlung erscheint es uns nur dann möglich eine Feldstudie zur Umweltverträglichkeit der seit Jahrzehnten durchgeführten Stechmückenbehandlung mit Bti durchzuführen wenn die politische Ebene eine solche Untersuchung mitträgt und die zuständigen Genehmigungsbehörden eine solche Maßnahme vollumfänglich unterstützen.

### 3.6 Medien- und Öffentlichkeitsarbeit

#### 3.6.1 Workshops und Tagungen

##### *Regionaler Workshop 2015*

Der erste Workshop mit dem Titel „Stechmückenbekämpfung am Oberrhein – Welcher Forschungs- und Handlungsbedarf besteht?“ fand am 13.11.2015 statt und wurde auf regionaler Ebene abgehalten. Am Workshop nahmen 18 Experten aus allen betroffenen Bereichen teil: Wissenschaft, Behörden, Umweltverbände, KABS e.V. und Bürgermeister der betroffenen Gemeinden. Ein Workshop, in dem jede Interessensgruppe ihren Standpunkt und Befürchtungen zu der Thematik Stechmückenbekämpfung unter Ausschluss der Presse vorbringen kann, wurde als besonders zielführend erachtet. Die eingeladenen Stakeholder mussten sich in 3-minütigen Kurzvorträgen positionieren. Im Anschluss an die Vorträge von Dr. Norbert Becker (KABS e.V.) und Dr. Carsten Brühl (Uni Landau) wurden die Teilnehmer in zwei Kleingruppen á 9 bzw. 10 Personen aufgeteilt um folgende Fragestellungen zu diskutieren:

- Sehen Sie eine Gefährdung der Umwelt durch die Stechmückenbekämpfung? Geben Sie bitte eine kurze Begründung.
- Welche Forschungsfragen sollten Ihrer Meinung nach angegangen werden, um eine Risikobeurteilung sinnvoll weiterentwickeln zu können?
- Welche Maßnahmen können umgesetzt werden, um eine Gefährdung der Umwelt zu vermeiden?
- Denken Sie, dass die Bekämpfung in Schutzgebieten von der Bevölkerung gewünscht ist?

Etwas über die Hälfte der Teilnehmer (53%) sehen eine Gefährdung der Umwelt durch die Stechmückenbekämpfung. 16% können sich durchaus vorstellen, dass die Umwelt negativ beeinflusst werden könnte. Weitere 10% sehen geringe Auswirkungen, die aber wenig erheblich sind bei fachgerechter Durchführung der Bekämpfung und im Vergleich zu anderen Einflüssen (z.B. anthropogen, saisonale Schwankungen im Ökosystem) vernachlässigbar sind. 21% gehen dagegen davon aus, dass es keine nachhaltigen Schäden an der Umwelt gibt. Eine Gefährdung wird gesehen, da es in der Literatur bereits einige Hinweise auf negative Auswirkungen auf die Umwelt gibt. Als weitere Begründungen wurden die direkt toxischen Effekte auf Zuckmücken und die möglicherweise resultierenden indirekten Effekte in-



nerhalb des Nahrungsnetzes angeführt. Bei den Effekten auf Zuckmücken war auch in der Diskussion weitgehend unbestritten, dass Bti auf Zuckmücken wirken kann. Umstritten war, wie gut die bisher zum Nahrungsnetz vorhandenen Studien die Situation am Oberrhein abbilden. Am Oberrhein konnte bisher noch keine direkte Verbindung zwischen Veränderungen der Vögel-, Fledermaus- oder Amphibienpopulationen und Bti festgestellt werden.

Als Forschungsfragen wurden Langzeitstudien bzw. ein behandlungsbegleitendes Monitoring gefordert. Dabei wurde von einigen Teilnehmern explizit gefordert, dass dieses Monitoring unabhängig von der KABS e.V. durchgeführt werden soll. In diesem Zusammenhang wurden die fehlende Transparenz der Bti-Behandlung und das bestehende Informationsdefizit angesprochen. Darüber hinaus sollte eine verbindliche Dokumentation über die Behandlungen stattfinden, die am besten extern von Naturschützern oder der Genehmigungsbehörde regelmäßig kontrolliert und überwacht wird. Während der Diskussion der Maßnahmen kam heraus, dass der Genehmigungsbescheid dringend optimiert und hinterfragt werden sollte. Ein aktualisierter Genehmigungsbescheid soll eine adaptierte Neubewertung der Flächen, deren Schutzstatus, die Notwendigkeit einer Bekämpfung und aktualisierte Tabuflächen beinhalten. Für die Gestaltung einer Neugenehmigung gab es verschiedene Vorschläge, wie zum Beispiel, dass Schutzziele für bestimmte Gebiete definiert werden, z.B. der Erhaltungszustand der Arten oder dass die Bewirtschaftungs- und Managementpläne der Flächen bei der Erstellung berücksichtigt werden. Parallel dazu soll ein Monitoring der Flächen durchgeführt werden. Die Neubewertung sollte am besten in regelmäßigen Abständen, wie z.B. alle 5 Jahre aktualisiert und gegebenenfalls angepasst werden. Die Mehrheit von 70% der Workshop Teilnehmer war sich sicher, dass die Bekämpfung von Schutzgebieten am Oberrhein grundsätzlich von der Bevölkerung gewünscht wird. Als Gründe dafür wurden das mangelnde ökologische Verständnis und die generelle Unkenntnis über eventuelle Auswirkungen vorgebracht. Darüber hinaus wurde eine Zusammenarbeit und Unterstützung der Wissenschaftler der Universität Koblenz-Landau von den Wissenschaftlern der KABS e.V. zugesichert. Eine solche Zusammenarbeit sollte die Basis einer richtungweisenden Behandlung dieser Thematik sein, für die mit dem Workshop ein Grundstein gelegt wurde.

#### *Nationaler Workshop 2016*

Aufgrund der Schwierigkeiten im Gespräch mit der KABS e.V. wurde zum deutschlandweiten Workshop am 25.11.2016 ein neutraler Moderator hinzugezogen, der durch die Veranstaltung mit dem Titel „Stechmückenbekämpfung in Deutschland - Bewilligungsverfahren, Bewertungsgrundlagen, Handlungsbedarf?“ führte. Teilgenommen haben insgesamt 38 Personen aus verschiedenen Behörden (Bayern, Hessen, Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz), Naturschutzverbänden (BUND RLP, NABU RLP, Vogelschutz Bayern e.V.), Wissenschaft (Universität Landau, Heidelberg, Konstanz), Vertreter der KABS e.V. und des Umweltbundesamtes, Spezialisten für Zuckmücken, Amphibien und Mückenfallen und eine Bürgerinitia-

tive aus Bayern, die Stechmückenbekämpfung einführen wollen. Am Workshop waren auch Herr Dr. Wachendörfer von der DBU und Vertreter der lokalen Presse anwesend. Auf vier Fachvorträge zu dem aktuellen Forschungsstand der Uni Landau und einer Erklärung des Bti Genehmigungsverfahrens im Rahmen der Biozidverordnung hatten die Stakeholder in einem Kurzvortrag die Möglichkeit ihre Position zu der Thematik zu erläutern. Die Teilnehmer wurden am Nachmittag zu drei Gruppendiskussionen eingeteilt (Naturschutz, Bevölkerung, Behörde).

Die Naturschützer waren sich einig, dass NSG, Naturparks und FFH Gebiete nur dem Schutz der Natur zur Verfügung stehen sollen und daher komplett aus der Bti Behandlung rausgenommen werden müssten. Laut KABS e.V. führt ein großflächiger Verzicht der Bti Behandlung in Naturschutzgebieten (in RLP 2014 mehr als 86% der Flächen in Naturschutzgebieten) zu einer Beeinträchtigung des Behandlungserfolges. Die Bevölkerung müsste aufgeklärt werden (auch im Hinblick auf tropische Mücken), um mehr Toleranz für Mücken zu erreichen. Die Wissenschaft sollte dazu beitragen, dass über mögliche ökologische Folgen nicht mehr nur spekuliert wird, sondern Studien dazu vorliegen. Die Bevölkerung ist bisher zu wenig über mögliche ökologische Folgen informiert und Stechmücken im Allgemeinen informiert. Dabei gibt es ein Informationsgefälle zwischen Land- und Stadtbevölkerung. Es wird angenommen, dass die Bevölkerung ein ausgewogenes Konzept, das Stechmückenbekämpfung und Naturschutz sinnvoll ausbalanciert, verstehen und mittragen würde, solange eine Belästigung durch Stechmücken (weiterhin) geringgehalten wird. Das Vollzugskonzept der Stechmückenbekämpfung ist in der Praxis in den Bundesländern unterschiedlich. Eine Kontrolle der Bekämpfung sollte stichprobenhaft erfolgen, jedoch sind die Behörden dabei auf den ehrenamtlichen Naturschutz angewiesen. Das aktuelle Monitoring umfasst die Störung durch den Hubschraubereinsatz, jedoch nicht die ökologische Situation der Gebiete. Für die Entscheidung der Behörden hinsichtlich der Umweltauswirkungen wäre ein abgestimmtes Forschungskonzept durch unabhängige Institutionen und politische Vertreter aus den Ministerien wünschenswert, welches auch die Überprüfung von Alternativen mit einbezieht.

Die Diskussion der Veranstaltung wurde trotz professioneller Moderation deutlich von den Teilnehmern von Seiten der KABS e.V. gestört und mit unqualifizierten Meinungsäußerungen unterbrochen. Da dies nicht konstruktiv und zielführend ist, wurde im Anschluss beschlossen bei der internationalen Abschlussveranstaltung keine Hauptverantwortliche bzw. aktiven Mitglieder der KABS e.V. oder einer anderen Stechmückenbekämpfungsorganisation einzuladen (s.u.).

#### *Informationsveranstaltung „Stechmückenreduktion im häuslichen Umfeld“*

Zu Beginn der Studie zur Erprobung der alternativen Methode der Stechmückenbekämpfung wurde am 01.06.2017 ein öffentlicher Vortrag für alle Teilnehmer an der Studie und die inte-

ressierte Bevölkerung in Berg(Pfalz) abgehalten. Im Vortrag wurden die Hintergründe zum Projekt, die Biogents-Fallen und die Studie näher vorgestellt.

#### *Herrsching, Ammersee*

Herr Dr. Brühl wurde am 13.11.2017 zu einer Gemeinderatsitzung nach Herrsching (Bayern) eingeladen, um die Gemeinderäte wissenschaftlich fundiert über mögliche Auswirkungen der Bti-Behandlung zu informieren, damit diese eine Entscheidung über einen Bti-Einsatz am Ammersee treffen können.

#### *Internationale wissenschaftliche Abschlussveranstaltung 2018*

Unsere wissenschaftlichen Abschlussworkshop führten wir vom 2. bis 2. März im Tagungshotel „Annweiler Kurhaus“ in Annweiler durch. Der Workshop richtete sich an europäische Wissenschaftler, die selbst mit Bti forschen, geforscht haben oder Reviews dazu verfasst haben. Insgesamt umfasste die Veranstaltung acht Teilnehmer aus Deutschland, Frankreich, Schweden und der Schweiz. Um eine fruchtbare Diskussion zu ermöglichen, wurde bei den eingeladenen Wissenschaftlern darauf geachtet, dass sie in keinem europäischen Land aktiv an der dortigen Stechmückenbekämpfung beteiligt sind. Ziel dieser Veranstaltung war, den aktuellen Stand der Forschung zum Bti Einsatz und dessen Auswirkungen auf die Umwelt zu evaluieren und in einem Review-Artikel zusammenfassend festzuhalten. Wir haben durch diese Veranstaltung ein Netzwerk an unabhängigen Wissenschaftlern geschaffen und Ideen für neue Forschungsprojekte entwickelt. Der gemeinsame Review-Artikel liegt als Entwurf vor und soll in einer internationalen peer-review Zeitschrift erscheinen.

#### *Assoziierte Tagung im Rahmen des Projektes AufLand 2018*

Im Rahmen von AufLand, einem Forschungsprojekt der Forschungsinitiative des Ministeriums für Wissenschaft, Weiterbildung und Kultur Rheinland-Pfalz wurde am 13.08.2018 ein Experten-Workshop abgehalten, um die Zukunft der Forschung und Praxis in Rheinland-Pfalz zu diskutieren. Im Teilworkshop zur Stechmückenbekämpfung wurden 20 Teilnehmer aus Forschung, Administration, Praxis und Naturschutz geladen und eine Zukunftsagenda bzw. Handlungsempfehlung erstellt.

### 3.6.2 Presseberichte

- WDR Beitrag vom 30.06.2015 im Rahmen der Wissenschaftssendung „Quarks & Co“ über die umstrittene Mückenjagd und ihre Umweltverträglichkeit.  
(<https://www1.wdr.de/mediathek/video/sendungen/quarks-und-co/video-umstrittene-mueckenjagd-100.html>)
- Rheinpfalz vom 3.12.2016 (von Andreas Lapos): „Faktische Schnakenstiche und postfaktische Wissenslücken“: Artikel über den Workshop zum Thema „Schnakenbekämpfung“ an der Universität Landau.

- Rheinpfalz vom 05.10.2017 (von Katja Edelmann): „Alle in den Eimer vor dem Fenster“ über die sozioökonomische Umfrage in 600 Haushalten von Speyer bis Neuburg am Rhein.
- Rheinpfalz vom 13.10.2017 (von Christine Kraus): „Schnaken: Kritik „unwissenschaftlich““ ist eine Reaktion der KABS e.V. auf die Veröffentlichung und Pressemitteilung über die kürzlich veröffentlichte Studie zu Bti und Zuckmücken.
- Südwestdeutsche Zeitung vom 20.10.2017 (von Jürgen Müller): „Nicht nur Blutsauger getötet?“ bezieht sich auf die Veröffentlichung „Decreasing *Bacillus thuringiensis israelensis* sensitivity of *Chironomus riparius* larvae with age indicates potential environmental risk for mosquito control“ und beleuchtet mögliche Folgen für Nahrungsnetze und die Umwelt.
- Rheinpfalz/ Südwestdeutsche Zeitung vom 28.10.2017 (von Jürgen Müller): „Bei Neumond auf Mückenpirsch“ behandelt die Landauer Studie und eine Studie von der KABS e.V., die dazu dienen soll die Bedenken aus Landau zu entkräften.
- Mannheimer Morgen vom 08.11.2017 (von Simone Jakob): „Mücken surren in Lichtfallen“ stellt eine Erhebung der KABS e.V. vor, die den Bedenken der Wissenschaftler aus Landau entgegenstehen soll.
- SWR Beitrag 27.10.2017 nach dem Erscheinen der Veröffentlichung “Decreasing *Bacillus thuringiensis israelensis* sensitivity of *Chironomus riparius* larvae with age indicates potential environmental risk for mosquito control.”  
(<https://swrmediathek.de/player.htm?show=1641f200-bb39-11e7-a5ff-005056a12b4c>)
- Starnberger Kurier vom 15.11.2017 „Herrsching lässt die Mücke sein“ beleuchtet die Diskussion um den Bti Einsatz am Starnberger See mit einem Beitrag von Dr. Carsten Brühl und die Entscheidung des Gemeinderats aus ökologischen Gründen wie dem aktuellen Insektensterben keine Stechmückenbekämpfung einzuführen.
- Badische Neueste Nachrichten vom 19.12.2017 (von Konrad Stammschröder): “KABS verteidigt ihre Mückenbekämpfung” stellt den Laborversuch der Uni Landau und die Reaktion der KABS e.V. dar.
- Rheinpfalz vom 12.03.2018 (von Jürgen Müller): „Studie: Bti setzt Kaulquappen unter Stress“ berichtet über die erste Veröffentlichung zu Amphibien aus dem Projekt.
- SWR Beitrag vom 28.11.2018: „Der Klimacheck – Wie verändert sich die Natur?“ mit Axel Wagner enthält einen Beitrag zur Stechmückenbekämpfung mit Herrn Dr. Brühl und Frau Allgeier.  
(<https://swrmediathek.de/player.htm?show=f05b4930-f22b-11e8-8ed2-005056a10824>)

- Rheinpfalz am Sonntag vom 10.03.2019 (von Christian Gruber): „Risiken und Nebenwirkungen“ berichtet über neuste Ergebnisse zur Vernichtung von Zuckmücken und möglicher Resistenzbildung in Stechmücken.

### 3.6.3 Wissenschaftliche Vorträge und Publikationen

Die erste Vorstellung des Projektes wurde am 27.11.2015 im Zuge der Young Academics Conference gefördert von der Forschungsinitiative des Ministeriums für Wissenschaft, Weiterbildung und Kultur Rheinland-Pfalz, Projekt AufLand. Auf der Tagung der Deutschen Gesellschaft für Limnologie (DGL) am 28.09.2016 in Wien hielt Stefanie Allgeier einen Vortrag mit dem Titel „Stechmückenbekämpfung mit *Bacillus thuringiensis israelensis* – mögliche direkte und indirekte Auswirkungen“. Im Rahmen des Young Scientist Meeting (18.02.2017) der Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) in Stockholm wurden die ersten Ergebnisse zu den Auswirkungen auf Amphibien vorgestellt. Darüber hinaus hat Frau Allgeier am 27.9.2017 einen Vortrag über das gesamte Themengebiet „Bti und Umweltauswirkungen“ zum *Pollichia* Themenabend in Speyer abgehalten. Auf der Jahrestagung der Setac GLB (13.11.2017) in Neustadt/Weinstraße hat Frau Allgeier ebenfalls Ergebnisse zu Zuckmücken und Amphibien vorgestellt. Auf der SETAC Europe in Rom (15.05.2018) präsentierte Frau Allgeier ein Poster zu den direkten Effekten von Bti auf Amphibien. Des Weiteren hielt Frau Allgeier einen Vortrag über die gesamten Ergebnisse des Projektes auf der Jahrestagung der Gesellschaft für Ökologie (GfÖ) in Wien (12.09.2018).

Wissenschaftliche Publikationen aus dem Projekt:

- **Allgeier, S., Kästel, A., Brühl, C.A.** (*submitted*). Mosquito control based on *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) interrupts artificial wetland food chains. *Submitted to Science of the Total Environment*.
- **Allgeier, S., Kästel, A., Brühl, C.A. (2019)**. Adverse effects of mosquito control using *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*: Reduced chironomid abundances in mesocosm, semi-field and field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 169:786–796.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651318311862>

- **Allgeier, S., Frombold, B., Mingo, V., Brühl, C. A.** (2018). European common frog *Rana temporaria* (Anura: Ranidae) larvae show subcellular responses under field-relevant *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) exposure levels. *Environmental Research*, 162, 271–279.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935118300112?via%3Dihub>

- Kästel, A., **Allgeier, S., Brühl, C.A.** (2017). Decreasing *Bacillus thuringiensis israelensis* sensitivity of *Chironomus riparius* larvae with age indicates potential environmental risk for mosquito control. *Scientific Reports* 7, 1.

<https://www.nature.com/articles/s41598-017-14019-2>

Projekt assoziierte Publikationen:

- Theissinger, K., Kästel, A., Elbrecht, V., Makkonen, J., Michiels, S., Schmidt, S., **Allgeier, S., Brühl, C.A.** (2018). Using DNA metabarcoding for assessing chironomid diversity and community change in mosquito controlled temporary wetlands. *Metabarcoding and Metagenomics*, 2.

<https://mbmq.pensoft.net/articles.php?id=21060>

- Theissinger, K., Röder, N., **Allgeier, S.**, Beermann, A., **Brühl, C.A.**, Friedrich, A., Michiels, S., Schwenk, K., (*submitted*). Mosquito control actions affect chironomid diversity in temporary wetlands of the Upper Rhine Valley. *Submitted to Molecular Ecology*.

#### 4 Synthese und Fazit

Die flächendeckende Bekämpfung mit Bti hat die Erhöhung der Lebensqualität am Oberrhein zum Ziel, welches durch die 95-98%ige Reduktion von plageerregenden Wald- und Überschwemmungsmücken erreicht wird. Die Diskussion über die Vereinbarkeit von Stechmückenbekämpfung zu Gunsten der Bevölkerung und Auswirkungen auf das Nahrungsnetz wird bereits seit den 1970er Jahren geführt. Trotz der immer wieder aufflammenden Diskussion lagen keine validen und aussagekräftigen Felduntersuchungen zu Effekten der Bti Stechmückenbekämpfung auf das Nahrungsnetz vor. Am Oberrhein hat man es versäumt ein langjähriges Monitoring zu Umwelteffekten einzurichten. Vielmehr hat man auf Grund der wenigen betroffenen Organismen in höheren Trophieebenen des Nahrungsnetzes und deren geringen Anteil an Stechmücken in der Nahrung geschlossen, dass Bti umweltfreundlich sei. Direkte Mortalitäten, die bei der Ausbringung chemischer Insektizide im Gewässer bei Fischen und Vögeln vor Bti beobachtet wurden, treten nicht mehr auf. Der Großteil der bisherigen Untersuchungen zu den Auswirkungen von Bti wurde vor allem von den Bekämpfungsorganisationen selbst, am Oberrhein der KABS e.V., durchgeführt. Dabei stand der Vorwurf im Raum, dass die Untersuchungsergebnisse, die von den Ausbringern und Patentinhabern erarbeitet wurden, möglicherweise ein Risiko für die Umwelt nur ungenügend adressieren. Im Laufe dieses DBU-Projektes wurde daher sehr schnell deutlich, dass ein neutral gesteu-

ertes Projekt zur Stechmückenbekämpfung sowohl seitens der Naturschützer als auch von behördlicher Seite längstens erwünscht war.

In diesem Forschungsprojekt konnten wir zeigen, dass das erste Larvenstadium von Zuckmücken im Laborversuch sehr empfindlich gegenüber Bti ist. Werden diese Daten innerhalb einer Risikobewertung für das Biozid Bti verwendet, so wird der Schwellenwert für Erstlarven bezogen auf die Ausbringungsmenge am Rhein um den Faktor 2000 überschritten. Dies zeigt ein hohes Risiko der Zuckmücken gegenüber einer Stechmückenbekämpfung mit Bti an. Die Risikobewertung des Biozids Bti, die bisher ohne Betrachtung der Zuckmücken durchgeführt wurde, ist unvollständig und unterschätzt das tatsächlich bestehende Umweltrisiko. Auch die verschiedenen, in ihrer Komplexität aufsteigenden, Mesokosmos- und Freilanduntersuchungen zeigten eine Verringerung von Larven und Adulten der Zuckmücken um 50% und mehr. Dabei trat diese Reduktion auch in Flächen auf, die von der KABS e.V. seit Jahrzehnten behandelt wurden. Zur Reduktion der Zuckmücken stellten wir auch Effekte auf die Diversität der Gemeinschaft fest.

Bti-Formulierungen zeigten hoch toxische Wirkung bei Amphibien und die bisher am Oberrhein verwendeten Produkte waren bisher noch nie untersucht worden. Diese Lücke wurde in unserem Forschungsprojekt geschlossen. In Laborversuchen konnten wir keine Mortalität bei Kaulquappen des Grasfrosches feststellen, allerdings eine enzymatische Stressreaktion beobachten. Indirekte Effekte der Stechmückenbekämpfung mit Bti auf das Nahrungsnetz konnten wir exemplarisch an Molchen aufzeigen. Molchlarven, die sich von Stech- aber auch Zuckmücken ernähren, waren vor allem in Anwesenheit von anderen Räubern (Libellenlarven) von den indirekten Wirkungen auf die Nahrungsressource betroffen und zeigten Veränderungen in der Körpermasse bei der Metamorphose und ihrer Überlebensrate durch verstärkte Prädation. Im Zeitalter des Klimawandels sind wir gut beraten jeglichen zusätzlichen Stress für bedrohte Tierarten, wie sie Amphibien darstellen, gering zu halten. Dies wäre vor allem in Naturschutzgebieten, die dem Erhalt dieser Arten dienen, wünschenswert. Dieses Projekt hat in seiner Durchführung wichtigen Input zu einer teilweise festgefahrenen Situation geliefert. Um Fragen bezüglich indirekter Nahrungsnetzeffekte schlussendlich beantworten zu können bedarf es einer Weiterführung dieses Ansatzes und eines längerfristigen Monitorings, das die Bereitstellung von Kontrollflächen ohne Bti- Behandlung und die Kooperation der Stakeholder voraussetzt.

Die Ergebnisse unserer ersten Bevölkerungsumfrage zeigten deutlich, dass die Belästigung für die Bevölkerung am höchsten im Garten oder auf der Terrasse ist und die Akzeptanz für eine Anpassung der bisherigen Bekämpfungspraxis nur erreicht werden kann, wenn gesichert wird, dass die Belästigung innerhalb von Ortschaften nicht zunimmt. In unseren Augen stellt eine Kombination aus dem Einsatz von Stechmückenfallen innerhalb von Ortschaften und einer stark bis vollständig reduzierten Bti-Bekämpfung ein vielversprechendes Konzept

für eine naturschutzkonformere Bekämpfung dar. Naturschutzgebiete jeglicher Art sollten in Anlehnung an Forderungen des BMU zum Insektenschutz vollständig von der Bekämpfung ausgenommen werden (BMU, 2018).

Unsere Befragungen entlang des Oberrheins zeigten, dass die Bevölkerung bezüglich der negativen Auswirkungen des Bti-Einsatzes auf die Natur wenig informiert ist. Dahingehend sensibilisiert befürwortet sie jedoch mehrheitlich eine Anpassung der Stechmückenbekämpfung, die negative Auswirkungen auf die Umwelt vermeidet, solange weiterhin das bisher erreichte Schutzniveau vor Stechmücken im häuslichen und innerörtlichen Bereich erhalten bleibt. Eine Mehrheit akzeptiert angepasste Methoden der Stechmückenbekämpfung, die jedoch weiterhin den Bti-Einsatz als ein Grundelement enthalten, und sie äußern eine unerwartet hohe Bereitschaft zu den Mehrkosten einer solchen Methode beizutragen. Die Bevölkerung war gegenüber einer Bekämpfung am Ort der Belästigung anstelle der Brutstätten, die weitaus weniger Umwelteingriffe beinhaltet, sehr aufgeschlossen. Somit erscheint es uns sinnvoll, entsprechende Verfahren in größer angelegten Feldversuchen zu testen und die Bevölkerung in Form von Gemeindebeiträgen an den Kosten dieser Tests zu beteiligen.

Ein Teil des gemeindlichen Etats für Stechmückenbekämpfung sollte aus unserer Sicht dafür herangezogen werden mehr Aufklärung zum Thema Stechmücken in der Bevölkerung am Oberrhein zu betreiben. In Jahren mit wenig Hochwasserereignissen und dem assoziierten Massenschlupf von Überschwemmungsmücken kann eine Vielzahl an Hausmücken schlüpfen und zu einer Belästigung in der häuslichen Umgebung führen. Mit besseren Informationen könnte zum einen sichergestellt werden, dass die Bevölkerung selbst dazu beiträgt Stechmückenbrutstätten im häuslichen Bereich zu verringern, anstatt sich auf die Bekämpfung der KABS e.V. zu verlassen. Eine Aufklärung bezüglich des Risikos einer Infektion mit exotischen Krankheiten durch einen Vektor sollte dabei besonders adressiert werden. Zu dieser Thematik sollten sich in keinem Fall alleinig die Durchführenden der aktuellen Bekämpfung (KABS e.V.) von belästigenden Stechmücken aus Feuchtgebieten äußern. Die tropische Art, welche im Moment in aller Munde ist, *Ae. albopictus* (Asiatische Tigermücke), brütet in künstlichen Kleinstgewässern (Container-Brüter) und wird durch die Bti-Behandlung von Überflutungsflächen nicht bekämpft. Diese Tatsache wird allerdings oft falsch dargestellt und führt zu einer Verunsicherung der Bevölkerung.

In der Camargue wurden alternative Fallensysteme im häuslichen Bereich eingesetzt, was die Belästigung der Bevölkerung verringerte (Poulin et al. 2017). In Zukunft soll in diesem wichtigen Feuchtgebiet die Behandlung mit Bti wieder reduziert werden, um das Ökosystem nicht zu gefährden. Aus diesem gut untersuchten Beispiel lassen sich auch für Deutschland mögliche Änderungen im Umgang mit der Belästigung durch Stechmücken ableiten. Die Stechmückenbekämpfung könnte dort erfolgen, wo die Belästigung auftritt, im häuslichen Bereich, und nicht in den für den Naturschutz ausgewiesenen Gebieten. Bisher gilt die



Stechmückenbekämpfung unter Verwendung von Bti als der Königsweg und eine umweltverträgliche Methode. Als einer der ersten Umsetzungsgebiete weltweit, wird die am Oberrhein etablierte Methode global exportiert. Es ist allerdings darauf hinzuweisen, dass eine wissenschaftlich abgesicherte Überprüfung der Umweltauswirkungen bisher noch nicht in ausreichendem Maße stattgefunden hat.

## 5 Literatur

- Akhoundi, M., Jourdain, F., Chandre, F., Delaunay, P. & Roiz, D. (2018). Effectiveness of a field trap barrier system for controlling *Aedes albopictus*: a “removal trapping” strategy. *Parasites & Vectors*, 11(1), 101. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2691-1>
- Ali, A. (1981). *Bacillus thuringiensis* serovar. israelensis (ABG-6108) against chironomids and some nontarget aquatic invertebrates. *Journal of Invertebrate Pathology*, 38(2), 264–272. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(81\)90132-4](https://doi.org/10.1016/0022-2011(81)90132-4)
- Allgeier, S., Frombold, B., Mingo, V. & Brühl, C. A. (2018). European common frog *Rana temporaria* (Anura: Ranidae) larvae show subcellular responses under field-relevant *Bacillus thuringiensis* var. israelensis (Bti) exposure levels. *Environmental Research*, 162, 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.01.010>
- Allgeier, S., Kästel, A. & Brühl, C. A. (2019). Adverse effects of mosquito control using *Bacillus thuringiensis* var. israelensis: Reduced chironomid abundances in mesocosm, semi-field and field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169, 786–796. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.050>
- Armitage, P. D., Pinder, L. C. & Cranston, P. (Hrsg.). (1995). *The Chironomidae: Biology and ecology of non-biting midges*. Springer Netherlands. Zugriff am 9.4.2018. Verfügbar unter: [//www.springer.com/de/book/9780412452604](http://www.springer.com/de/book/9780412452604)
- Arnold, A., Braun, M., Becker, N. & Storch, V. (2000). Zur Nahrungsökologie von Wasser- und Flughautfledermaus in den nordbadischen Rheinauen. *Carolinea*, 58, 257–263.
- BAuA. (2018). Zusammenfassung der Eigenschaften des Biozidproduktes VectoBac WG. Zulassungsnummer DE-0011520-18. Dortmund: Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin.
- Becker, N. (1997). Microbial control of mosquitoes: Management of the upper rhine mosquito population as a model programme. *Parasitology Today*, 13(12), 485–487. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(97\)01154-X](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(97)01154-X)
- Becker, N. (2002). Sterilization of *Bacillus thuringiensis* israelensis products by gamma radiation. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 18(1), 57–62.
- Becker, N. (2003). Ice granules containing endotoxins of microbial agents for the control of mosquito larvae - a new application technique. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 19(1), 63–66.
- Becker, N. (2006). Biological control of mosquitoes: Management of the upper rhine mosquito population as a model programme (Progress in Biological Control). In J. Eilenberg & H.M.T. Hokkanen (Hrsg.), *An Ecological and Societal Approach to Biological Control* (S. 227–245). Springer Netherlands.
- Becker, N. & Ludwig, M. (1993). Investigations on possible resistance in *Aedes vexans* field populations after a 10-year application of *Bacillus thuringiensis* israelensis. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 9(2), 221–224.

- Becker, N., Ludwig, M. & Su, T. (2018). Lack of resistance in *Aedes vexans* field populations after 36 years of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* applications in the Upper Rhine Valley, Germany. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 34(2), 154–157.
- Becker, N. & Lüthy, P. (2017). Chapter 26 - Mosquito control with entomopathogenic bacteria in Europe. In L.A. Lacey (Hrsg.), *Microbial control of insect and mite pests* (S. 379–392). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803527-6.00026-3>
- Becker, N. & Margalit, J. (1993). Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes and black flies. In P.F. Entwistle, J.S. Corry, M.J. Balley & S. Higgs (Hrsg.), *Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice*. (S. 147–170). Chichester, UK: John Wiley.
- Becker, N., Schön, S., Klein, A.-M., Ferstl, I., Kizgin, A., Tannich, E. et al. (2017). First mass development of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)—its surveillance and control in Germany. *Parasitology Research*, 116(3), 847–858. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5356-z>
- Becker, N., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C. & Kaiser, A. (2010). *Mosquitoes and their control. 2nd edition*. Heidelberg: Springer.
- Ben-Dov, E. (2014). *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its Dipteran-Specific Toxins. *Toxins*, 6(4), 1222–1243. <https://doi.org/10.3390/toxins6041222>
- BMU. (2018). Eckpunktepapier zum Aktionsprogramm Insektenschutz der Bundesregierung. Verfügbar unter: [https://www.bmu.de/fileadmin/Daten\\_BMU/Download\\_PDF/Artenschutz/eckpunkte\\_insektenschutz\\_bf.pdf](https://www.bmu.de/fileadmin/Daten_BMU/Download_PDF/Artenschutz/eckpunkte_insektenschutz_bf.pdf)
- Bogdan, H. V., Covaciu-Marcov, S.-D., Gaceu, O., Cicort-Lucaciu, A.-S., Ferenti, S. & Sas-Kovács, I. (2013). How do we share food? Feeding of four amphibian species from an aquatic habitat in south-western Romania. *Animal Biodiversity and Conservation*, 36(1), 89–99.
- Boisvert, M. & Boisvert, J. (2000). Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on target and nontarget organisms: A review of laboratory and field experiments. *Biocontrol Science and Technology*, 10(5), 517–561. <https://doi.org/10.1080/095831500750016361>
- Bravo, A., Gill, S. S. & Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), 423–435. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>
- Braz, E. & Joly, P. (1994). Micro-habitat use, resource partitioning and ecological succession in a size-structured guild of newt larvae (g. *Triturus*, Caudata, Amphibia). *Archiv für Hydrobiologie*, 131(2), 129–139.
- Brink, V., Den, F. W. B., Velde, V. & Der, G. (1991). Macrozoobenthos of floodplain waters of the rivers rhine and meuse in the Netherlands: A structural and functional analysis in relation to hydrology. *River Research and Applications*, 6(4), 265–277. <https://doi.org/10.1002/rrr.3450060405>
- Broderick, N. A., Raffa, K. F. & Handelsman, J. (2006). Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(41), 15196–15199. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604865103>
- BÜNDNIS 90/DIE GRÜNEN. (2017). Zukunft wird aus Mut gemacht. Bundestagswahlkampfprogramm 2017. Verfügbar unter: [https://cms.gruene.de/uploads/documents/BUENDNIS\\_90\\_DIE\\_GRUENEN\\_Bundestagswahlprogramm\\_2017\\_barrierefrei.pdf](https://cms.gruene.de/uploads/documents/BUENDNIS_90_DIE_GRUENEN_Bundestagswahlprogramm_2017_barrierefrei.pdf)

- Cao, C.-W., Sun, L.-L., Wen, R.-R., Li, X.-P., Wu, H.-Q., Wang, Z.-Y. et al. (2012). Toxicity and affecting factors of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on *Chironomus kiiensis* larvae. *Journal of Insect Science*, 12(1). <https://doi.org/10.1673/031.012.12601>
- Caquet, T., Roucaute, M., Le Goff, P. & Lagadic, L. (2011). Effects of repeated field applications of two formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on non-target salt-marsh invertebrates in Atlantic coastal wetlands. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(5), 1122–1130. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.04.028>
- Cauble, K. & Wagner, R. S. (2005). Sublethal Effects of the Herbicide Glyphosate on Amphibian Metamorphosis and Development. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75(3), 429–435. <https://doi.org/10.1007/s00128-005-0771-3>
- Charbonneau, C. S., Drobney, R. D. & Rabeni, C. F. (1994). Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on nontarget benthic organisms in a lentic habitat and factors affecting the efficacy of the larvicide. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13(2), 267–279. <https://doi.org/10.1002/etc.5620130211>
- De La Noüe, J. & Choubert, G. (1985). Apparent digestibility of invertebrate biomasses by rainbow trout. *Aquaculture*, 50(1), 103–112. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(85\)90156-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(85)90156-5)
- Duchet, C., Franquet, E., Lagadic, L. & Lagneau, C. (2015). Effects of *Bacillus thuringiensis israelensis* and spinosad on adult emergence of the non-biting midges *Polypedilum nubifer* (Skuse) and *Tanytarsus curticornis* Kieffer (Diptera: Chironomidae) in coastal wetlands. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 115, 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.029>
- Duchet, C., Larroque, M., Caquet, Th., Franquet, E., Lagneau, C. & Lagadic, L. (2008). Effects of spinosad and *Bacillus thuringiensis israelensis* on a natural population of *Daphnia pulex* in field microcosms. *Chemosphere*, 74(1), 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.024>
- Duchet, C., Tetreau, G., Marie, A., Rey, D., Besnard, G., Perrin, Y. et al. (2014). Persistence and Recycling of Bioinsecticidal *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Spores in Contrasting Environments: Evidence from Field Monitoring and Laboratory Experiments. *Microbial Ecology*, 67(3), 576–586. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0360-7>
- DuRant, S. E. & Hopkins, W. A. (2008). Amphibian predation on larval mosquitoes. *Canadian Journal of Zoology*, 86(10), 1159–1164. <https://doi.org/10.1139/Z08-097>
- Englbrecht, C., Gordon, S., Venturelli, C., Rose, A. & Geier, M. (2015). Evaluation of BG-Sentinel Trap as a Management Tool to Reduce *Aedes albopictus* Nuisance in an Urban Environment in Italy. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 31(1), 16–25. <https://doi.org/10.2987/14-6444.1>
- European Commission. (2011). *Annex I Assessment report: Bacillus thuringiensis subsp. israelensis Serotype H-14 Strain AM65-52. Product-type 18: Insecticide*. Italy.
- Falkenhorst, G., Enkelmann, J., Frank, C. & Stark, K. (2018). Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten Reiseassoziierte Krankheiten 2017. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.25646/5755>
- Fillinger, U. (1998). *Faunistische und ökotoxikologische Untersuchungen mit B.t.i. an Dipteren der nördlichen Oberrheinauen unter besonderer Berücksichtigung der Verteilung und Phänologie einheimischer Zuckmückenarten (Chironomidae)*. PhD Thesis. Heidelberg: Rupprecht-Karls-University Heidelberg.
- Formanowicz, D. R. (1986). Anuran tadpole/aquatic insect predator-prey interactions: tadpole size and predator capture success. *Herpetologica*, 42(3), 367–373.

- Gauss, J. D., Woods, P. E., Winner, R. W. & Skillings, J. H. (1985). Acute toxicity of copper to three life stages of *Chironomus tentans* as affected by water hardness-alkalinity. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, 37(2), 149–157. [https://doi.org/10.1016/0143-1471\(85\)90005-4](https://doi.org/10.1016/0143-1471(85)90005-4)
- Gibbons, J. W., Winne, C. T., Scott, D. E., Willson, J. D., Glaudas, X., Andrews, K. M. et al. (2006). Remarkable amphibian biomass and abundance in an isolated wetland: implications for wetland conservation. *Conservation Biology*, 20(5), 1457–1465. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2006.00443.x>
- Hallmann, C. A., Sorg, M., Jongejans, E., Siepel, H., Hofland, N., Schwan, H. et al. (2017). More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PLOS ONE*, 12(10), e0185809. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185809>
- Hemingway, J. & Ranson, H. (2000). Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annual Review of Entomology*, 45(1), 371–391. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.371>
- Hershey, A. E., Lima, A. R., Niemi, G. J. & Regal, R. R. (1998). Effects of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) and methoprene on nontarget macroinvertebrates in Minnesota wetlands. *Ecological Applications*, 8(1), 41–60. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(1998\)008\[0041:EOBTIB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(1998)008[0041:EOBTIB]2.0.CO;2)
- Jakob, C. & Poulin, B. (2016). Indirect effects of mosquito control using Bti on dragonflies and damselflies (Odonata) in the Camargue. *Insect Conservation and Diversity*, 161–169. <https://doi.org/10.1111/icad.12155>
- Junges, C. M., Maglianese, M. I., Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M. & Attademo, A. M. (2017). Acute Toxicity and Etho-toxicity of Three Insecticides Used for Mosquito Control on Amphibian Tadpoles. *Water, Air, & Soil Pollution*, 228(4). <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3324-6>
- KABS e.V. (2016, April 21). Was ist die KABS e.V? Zugriff am 24.1.2018. Verfügbar unter: [http://www.kabsev.de/1/1\\_2/1\\_2\\_1/](http://www.kabsev.de/1/1_2/1_2_1/)
- Kästel, A., Allgeier, S. & Brühl, C. A. (2017). Decreasing *Bacillus thuringiensis israelensis* sensitivity of *Chironomus riparius* larvae with age indicates potential environmental risk for mosquito control. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14019-2>
- Koban, M. B., Kampen, H., Scheuch, D. E., Frueh, L., Kuhlisch, C., Janssen, N. et al. (2019). The Asian bush mosquito *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) in Europe, 17 years after its first detection, with a focus on monitoring methods. *Parasites & Vectors*, 12(1), 109. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3349-3>
- Kondo, S., Ohba, M. & Ishii, T. (1995). Comparative susceptibility of chironomid larvae (Dipt., Chironomidae) to *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* with special reference to altered susceptibility due to food difference. *Journal of Applied Entomology*, 119(1–5), 123–125. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1995.tb01256.x>
- Kroeger, I., Liess, M., Dziock, F. & Duquesne, S. (2013). Sustainable control of mosquito larvae in the field by the combined actions of the biological insecticide Bti and natural competitors. *Journal of Vector Ecology*, 38(1), 82–89. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2013.12012.x>
- Kuzmin, S. L. (1991). Food resource allocation in larval newt guilds (genus *Triturus*). *Amphibia-Reptilia*, 12, 293–304.
- Lacey, L. A. & Merritt, R. W. (2003). The safety of bacterial microbial agents used for black fly and mosquito control in aquatic environments (Progress in Biological Control). *Environmental impacts of microbial insecticides* (S. 151–168). Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-1441-9\\_8](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1441-9_8)

- Lagadic, L., Roucaute, M. & Caquet, T. (2014). Bti sprays do not adversely affect non-target aquatic invertebrates in French Atlantic coastal wetlands. *Journal of Applied Ecology*, 51(1), 102–113. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12165>
- Lagadic, L., Schäfer, R. B., Roucaute, M., Szöcs, E., Chouin, S., de Maupeou, J. et al. (2016). No association between the use of Bti for mosquito control and the dynamics of non-target aquatic invertebrates in French coastal and continental wetlands. *Science of The Total Environment*, 553, 486–494. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.096>
- Lajmanovich, R. C., Junges, C. M., Cabagna-Zenklusen, M. C., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Maglianese, M. et al. (2015). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in aqueous suspension on the South American common frog *Leptodactylus latrans* (Anura: Leptodactylidae) tadpoles. *Environmental Research*, 136, 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.10.022>
- Land, M. & Miljand, M. (2014). Biological control of mosquitoes using *Bacillus thuringiensis israelensis*: a pilot study of effects on target organisms, non-target organisms and humans., *Mistra EviEM, Stockholm, Sweden*.
- Landtag RLP. (2015, Dezember). Kleine Anfrage des Abgeordneten Martin Brandl (CDU). Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft, Ernährung, Weinbau und Forsten Rheinland-Pfalz. Verfügbar unter: <https://www.landtag.rlp.de/landtag/drucksachen/5924-16.pdf>
- Leeper, D. A. & Taylor, B. E. (1998). Insect emergence from a South Carolina (USA) temporary wetland pond, with emphasis on the Chironomidae (Diptera). *Journal of the North American Benthological Society*, 17(1), 54–72. <https://doi.org/10.2307/1468051>
- Leips, J. & Travis, J. (1994). Metamorphic responses to changing food levels in two species of hylid frogs. *Ecology*, 75(5), 1345–1356. <https://doi.org/10.2307/1937459>
- Liber, K., Schmude, K. L. & Rau, D. M. (1998). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to chironomids in pond mesocosms. *Ecotoxicology*, 7(6), 343–354. <https://doi.org/10.1023/A:1008867815244>
- Lühken, R., Pfitzner, W. P., Börstler, J., Garms, R., Huber, K., Schork, N. et al. (2014). Field evaluation of four widely used mosquito traps in Central Europe. *Parasites & Vectors*, 7, 268. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-268>
- Lundström, J. O., Brodin, Y., Schäfer, M. I., Vinnersten, T. Z. P. & Östman, Ö. (2010). High species richness of Chironomidae (Diptera) in temporary flooded wetlands associated with high species turn-over rates. *Bulletin of Entomological Research*, 100(04), 433–444. <https://doi.org/10.1017/S0007485309990472>
- Lundström, J. O., Schäfer, M. I., Petersson, E., Persson Vinnersten, T. Z., Landin, J. & Brodin, Y. (2010). Production of wetland Chironomidae (Diptera) and the effects of using *Bacillus thuringiensis israelensis* for mosquito control. *Bulletin of Entomological Research*, 100(01), 117–125. <https://doi.org/10.1017/S0007485309990137>
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
- Marina, C. F., Bond, J. G., Muñoz, J., Valle, J., Novelo-Gutiérrez, R. & Williams, T. (2014). Efficacy and non-target impact of spinosad, Bti and temephos larvicides for control of *Anopheles* spp. in an endemic malaria region of southern Mexico. *Parasites & Vectors*, 7, 55. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-55>
- McDiarmid, R. W. & Altig, R. (1999). *Tadpoles: the biology of anuran larvae*. Chicago: University of Chicago Press. Zugriff am 24.10.2017. Verfügbar unter: <http://www.press.uchicago.edu/ucp/books/book/chicago/T/bo3643050.html>

- Monaghan, P., Metcalfe, N. B. & Torres, R. (2009). Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters*, 12(1), 75–92. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01258.x>
- Morawcsik, J. (1983). *Untersuchungen zur Wirkung von Bacillus thuringiensis var. israelensis auf aquatische nontarget-Organismen*. Dissertation. Heidelberg: University of Heidelberg.
- Morey, S. & Reznick, D. (2000). A comparative analysis of plasticity in larval development in three species of spadefoot toads. *Ecology*, 81(6), 1736–1749. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2000\)081\[1736:ACAOPI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2000)081[1736:ACAOPI]2.0.CO;2)
- Östman, Ö., Lundström, J. O. & Vinnersten, T. Z. P. (2008). Effects of mosquito larvae removal with *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) on natural protozoan communities. *Hydrobiologia*, 607(1), 231–235. <https://doi.org/10.1007/s10750-008-9387-z>
- Pauley, L. R., Earl, J. E. & Semlitsch, R. D. (2015). Ecological effects and human use of commercial mosquito insecticides in aquatic communities. *Journal of Herpetology*, 49(1), 28–35. <https://doi.org/10.1670/13-036>
- Peterson, B. J. & Fry, B. (1987). Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18(1), 293–320. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.001453>
- Pillot, H. K. M. M. (2014a). *Chironomidae Larvae, Vol. 2: Chironomini: Biology and Ecology of the Chironomini*. KNNV Publishing. Zugriff am 24.4.2018. Verfügbar unter: <https://brill.com/view/title/25574>
- Pillot, H. K. M. M. (2014b). *Chironomidae Larvae, Vol. 3: Orthoclaadiinae: Biology and Ecology of the Aquatic Orthoclaadiinae*. KNNV Publishing. Zugriff am 23.5.2018. Verfügbar unter: <https://brill.com/view/title/25582>
- Pont, D., Franquet, E. & Tourenq, J. N. (1999). Impact of different *Bacillus thuringiensis* variety israelensis treatments on a chironomid (Diptera Chironomidae) community in a temporary marsh. *Journal of Economic Entomology*, 92(2), 266–272. <https://doi.org/10.1093/jee/92.2.266>
- Poulin, B. (2012). Indirect effects of bioinsecticides on the nontarget fauna: The Camargue experiment calls for future research. *Acta Oecologica*, 44, 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2011.11.005>
- Poulin, B., Lefebvre, G., Muranyi-Kovacs, C. & Hilaire, S. (2017). Mosquito Traps: An Innovative, Environmentally Friendly Technique to Control Mosquitoes. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(3), 313. <https://doi.org/10.3390/ijerph14030313>
- Poulin, B., Lefebvre, G. & Paz, L. (2010). Red flag for green spray: adverse trophic effects of Bti on breeding birds. *Journal of Applied Ecology*, 47(4), 884–889. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2010.01821.x>
- Preston, D. L., Hedman, H. D., Esfahani, E. R., Pena, E. M., Boland, C. E., Lunde, K. B. et al. (2017). Responses of a wetland ecosystem to the controlled introduction of invasive fish. *Freshwater Biology*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/fwb.12900>
- Quiroz-Martínez, H. & Rodríguez-Castro, A. (2007). Aquatic insects as predators of mosquito larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(sp2), 110–117. [https://doi.org/10.2987/8756-971X\(2007\)23\[110:AIAPOM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2987/8756-971X(2007)23[110:AIAPOM]2.0.CO;2)
- Reeves, M. K., Perdue, M., Blakemore, G. D., Rinella, D. J. & Holyoak, M. (2011). Twice as easy to catch? A toxicant and a predator cue cause additive reductions in larval amphibian activity. *Ecosphere*, 2(6), art72. <https://doi.org/10.1890/ES11-00046.1>

- Relyea, R. A. (2001). The relationship between predation risk and antipredator responses in larval anurans. *Ecology*, *82*(2), 541–554. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2001\)082\[0541:TRBPRA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2001)082[0541:TRBPRA]2.0.CO;2)
- Respinis, S. D., Demarta, A., Patocchi, N., Lüthy, P., Peduzzi, R. & Tonolla, M. (2006). Molecular identification of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to trace its fate after application as a biological insecticide in wetland ecosystems. *Letters in Applied Microbiology*, *43*(5), 495–501. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01999.x>
- Rey, D., Long, A., Pautou, M. P. & Meyran, J. C. (1998). Comparative histopathology of some Diptera and Crustacea of aquatic alpine ecosystems, after treatment with *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *88*(3), 255–263. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1998.00370.x>
- Robinson, P. W. & Scott, R. R. (1995). The toxicity of cyromazine to *Chironomus zealandicus* (chironomidae) and *Deleatidium* sp. (leptophlebiidae). *Pesticide Science*, *44*(3), 283–292. <https://doi.org/10.1002/ps.2780440312>
- Russell, T. L., Brown, M. D., Purdie, D. M., Ryan, P. A. & Kay, B. H. (2003). Efficacy of VectoBac (*Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*) Formulations for Mosquito Control in Australia. *Journal of Economic Entomology*, *96*(6), 1786–1791. <https://doi.org/10.1093/jee/96.6.1786>
- Schäfer, M. L. & Lundström, J. O. (2014). Efficiency of Bti-based floodwater mosquito control in Sweden – four examples. *Journal of the European Mosquito Control Association*, *32*, 8.
- Schäfer, M., Storch, V., Kaiser, A., Beck, M. & Becker, N. (1997). Dispersal behavior of adult snow melt mosquitoes in the Upper Rhine Valley, Germany. *Journal of vector ecology*, *22*(1), 1–5.
- Schaffner, F., Chouin, S. & Guilloteau, J. (2003). First record of *Ochlerotatus* (Finlays) *jaoponicus japonicus* (Theobald, 1901) in metropolitan France. *Journal of the American Mosquito Control Association*, *19*(1), 1–5.
- Schulz, R., Bundschuh, M., Gergs, R., Brühl, C. A., Diehl, D., Entling, M. H. et al. (2015). Review on environmental alterations propagating from aquatic to terrestrial ecosystems. *Science of The Total Environment*, *538*, 246–261. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.038>
- Skovmand, O. & Becker, N. (2000). Bioassays of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Navon, A. Ascher KRS, editors. *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*. (S. 41–47). Wallingford: CAB International.
- Smith, D. C. (1987). Adult Recruitment in Chorus Frogs: Effects of Size and Date at Metamorphosis. *Ecology*, *68*(2), 344–350. <https://doi.org/10.2307/1939265>
- Stalinski, R., Tetreau, G., Gaude, T. & Després, L. (2014). Pre-selecting resistance against individual Bti Cry toxins facilitates the development of resistance to the Bti toxins cocktail. *Journal of Invertebrate Pathology*, *119*, 50–53. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.04.002>
- Steinberg, C. E. W. (2012). *Stress ecology - Environmental stress as ecological driving force and key player in evolution*. Berlin: Springer Science & Business Media. Zugriff am 25.10.2017. Verfügbar unter: [//www.springer.com/de/book/9789400720718](http://www.springer.com/de/book/9789400720718)
- Stevens, M. M., Akhurst, R. J., Clifton, M. A. & Hughes, P. A. (2004). Factors affecting the toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* to fourth instar larvae of *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, *86*(3), 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.04.002>
- Stevens, M. M., Helliwell, S. & Hughes, P. A. (2005). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* formulations, spinosad, and selected synthetic insecticides to *Chironomus*

- tepperi larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21(4), 446–450. [https://doi.org/10.2987/8756-971X\(2006\)21\[446:TOBTVI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2987/8756-971X(2006)21[446:TOBTVI]2.0.CO;2)
- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S. L., Fischman, D. L. et al. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306(5702), 1783–1786. <https://doi.org/10.1126/science.1103538>
- Tetreau, G., Alessi, M., Veyrenc, S., Pérignon, S., David, J.-P., Reynaud, S. et al. (2012). Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the Field: Evidence for Spore Recycling and Differential Persistence of Toxins in Leaf Litter. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(23), 8362–8367. <https://doi.org/10.1128/AEM.02088-12>
- Theissinger, K., Kästel, A., Elbrecht, V., Makkonen, J., Michiels, S., Schmidt, S. et al. (2018). Using DNA metabarcoding for assessing chironomid diversity and community change in mosquito controlled temporary wetlands. *Metabarcoding and Metagenomics*, 2, e21060. <https://doi.org/10.3897/mbmg.2.21060>
- Tilquin, M., Paris, M., Reynaud, S., Despres, L., Ravanel, P., Geremia, R. A. et al. (2008). Long Lasting Persistence of *Bacillus thuringiensis* Subsp. *israelensis* (Bti) in Mosquito Natural Habitats. *PLoS ONE*, 3(10), e3432. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003432>
- Van Buskirk, J. & Schmidt, B. R. (2000). Predator-induced phenotypic plasticity in larval newts: Trade-offs, selection, and variation in nature. *Ecology*, 81(11), 3009–3028. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2000\)081\[3009:PIPPIL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2000)081[3009:PIPPIL]2.0.CO;2)
- Vaughan, I. P., Newberry, C., Hall, D. J., Liggett, J. S. & Ormerod, S. J. (2008). Evaluating large-scale effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on non-biting midges (Chironomidae) in a eutrophic urban lake. *Freshwater Biology*, 53(10), 2117–2128. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.02043.x>
- Venturino, A. & D'Angelo, A. M. P. de. (2005). Biochemical targets of xenobiotics: Biomarkers in amphibian ecotoxicology. *Applied Herpetology*, 2(3), 335–353. <https://doi.org/10.1163/1570754054507433>
- Vinnersten, T. Z. P., Lundström, J. O., Petersson, E. & Landin, J. (2009). Diving beetle assemblages of flooded wetlands in relation to time, wetland type and Bti-based mosquito control. *Hydrobiologia*, 635(1), 189–203. <https://doi.org/10.1007/s10750-009-9911-9>
- Whitehead, J. C. (2013). Contingent Valuation: A Comprehensive Bibliography and History. By Richard T. Carson. *Marine Resource Economics*, 28(1), 107–109. <https://doi.org/10.5950/0738-1360-28.1.107>
- WHO. (2005). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Geneva: World Health Organization. Zugriff am 9.4.2019. Verfügbar unter: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69101>
- Williams, K. A., Green, D. W. J., Pascoe, D. & Gower, D. E. (1986). The acute toxicity of cadmium to different larval stages of *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) and its ecological significance for pollution regulation. *Oecologia*, 70(3), 362–366. <https://doi.org/10.1007/BF00379498>
- Wolfram, G., Wenzl, P. & Jerrentrup, H. (2018). A multi-year study following BACI design reveals no short-term impact of Bti on chironomids (Diptera) in a floodplain in Eastern Austria. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(12), 709. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-7084-6>



## **6 Appendix: Open access publications**

(siehe PDF)

# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Decreasing *Bacillus thuringiensis israelensis* sensitivity of *Chironomus riparius* larvae with age indicates potential environmental risk for mosquito control

Anna Kästel , Stefanie Allgeier & Carsten A. Brühl

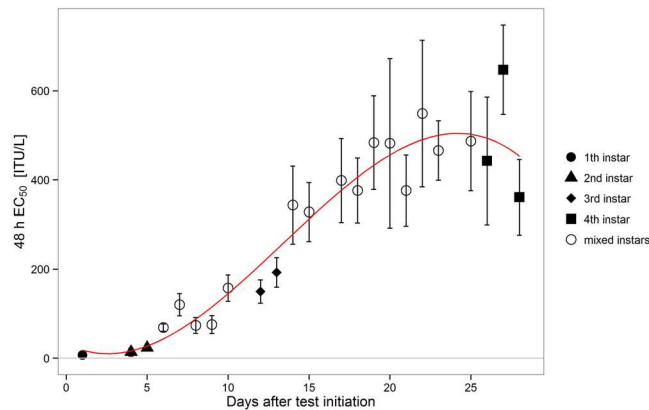
Mosquito control based on the use of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) is regarded as an environmental friendly method. However, Bti also affects non-target chironomid midges that are recognized as a central resource in wetland food webs. To evaluate the risk for different larval stages of *Chironomus riparius* we performed a test series of daily acute toxicity laboratory tests following OECD guideline 235 over the entire aquatic life cycle of 28 days. Our study is the first approach that performs an OECD approved test design with Bti and *C. riparius* as a standard organism in ecotoxicological testing. First-instar larvae of *Chironomus riparius* show an increased sensitivity towards Bti which is two orders of magnitude higher than for fourth instar larvae. Most EC50 values described in the literature are based on acute toxicity tests using third and fourth instar larvae. The risk for chironomids is underestimated when applying the criteria of the biocide regulation EU 528/2012 to our data and therefore the existing assessment approval is not protective. Possible impacts of Bti induced changes in chironomid abundances and community composition may additionally affect organisms at higher trophic levels, especially in spring when chironomid midges represent a key food source for reproducing vertebrates.

*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) formulations are commonly used agents for mosquito and black fly control worldwide<sup>1,2</sup>. More than 200 tons of Bti were applied annually in global mosquito control programs in the 1990s<sup>3</sup>. Bti is considered as the most environmental friendly alternative to chemical pesticides due to a high specificity to mosquito larvae and minimal effects to non-target organisms in closely related dipterans<sup>4</sup>. Within the group of Diptera the non-biting midges (Chironomidae) are the most Bti sensitive family<sup>2</sup>. In temperate regions chironomids are regarded as non-target organisms in mosquito control while in tropical countries they are also recognized as pests (and therefore target organisms) in rice culture<sup>5</sup>. In this case Bti is used as control agent for chironomids with maximum density reductions between 65% and 88% in experimental ponds<sup>6,7</sup>.

In most European mosquito control programs Bti products are usually applied over large areas by helicopter using a sling-bucket system while small wetlands are treated by hand<sup>8</sup>. In the Upper Rhine Valley (Germany) two different Bti formulations are used for mosquito control along 350 km of river: Vectobac® WG and Vectobac® 12 AS applied up to 12 times/season<sup>9</sup>. The nominal field rate depends on the occurring larval instars of the mosquito larvae, their density and flood water levels and is fixed at 1440 or doubled at 2880 ITU (International Toxic Units)/L<sup>3,8,10</sup>. Bti kills mosquito larvae by crystal and cytotoxic-proteins that are built-up during sporulation of the bacteria<sup>11</sup>. Mosquito larvae consume these proteins which are activated in the alkaline milieu of the midgut subsequently. After activation they form pores in the epithelium leading to disruption of the midgut cells and finally to death of the larvae within a few hours<sup>11,12</sup>. The same mode of action takes place in the midgut of chironomids<sup>13</sup>.

Chironomids are the most abundant group among aquatic macroinvertebrates in aquatic habitats<sup>14–16</sup>. The life cycle of chironomids comprises four larval instars, a pupal life stage and the flying midge as imago<sup>14,15</sup>. Their ubiquity, species richness, high abundances and high ecological diversity in all kinds of lentic and lotic habitats

Institute for Environmental Sciences, University of Koblenz-Landau, Landau, Germany, Fortstrasse 7, 76829, Landau, Germany. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.A.B. (email: [bruehl@uni-landau.de](mailto:bruehl@uni-landau.de))



**Figure 1.** EC50 values with 95% Confidence Intervals (CI) on each test day during the 28 day test period. Days with more than 90% of the individuals attributed to a specific larval stage were assigned to first until fourth instars (filled symbols). The EC50 values where this criterion was not met are marked as mixed instars (unfilled symbol). Red line: curve fit of the EC50 values  $f(x) = 37.2 - 20.1x + 4.1x^2 - 0.1x^3$ , adjusted  $R^2 = 0.92$ ,  $p = 1.165e-10$ . For each day 150 larvae were used.

make them a central food resource in wetland food webs<sup>14</sup>. Adult chironomids form huge swarms and can dominate insect emergence in wetlands with over 90% of the emerging individuals<sup>17</sup>. Additional to their availability and high biomass ranging between 1.0 and 100 g dry weight per year and square meter<sup>14</sup> chironomid larvae have a high protein content and digestibility<sup>18</sup>. All in all, chironomids are not only a frequent but also a valuable food resource for various insects and crustaceans as well as amphibians, birds, fish and mammals at higher trophic levels<sup>14</sup>.

Chironomid larvae are routinely tested as standard organism representing aquatic insects in the environmental risk assessment for pesticides<sup>19,20</sup>. Acute toxicity is measured with first instar larvae as value for the effective concentration where 50% of the individuals are immobile (EC50)<sup>19</sup>. Since mortality is difficult to assess in first-instar larvae immobility is used as alternative to mortality. Therefore EC50 and LC50 values (lethal concentration where 50% of the individuals are dead) are equivalent. Acute laboratory tests are conducted without sediment to represent a worst case scenario. The first larval instar of chironomids is free-swimming and hence not affected by the absence of sediment<sup>20</sup>. Furthermore, first instar chironomids showed a higher sensitivity to certain stressors such as heavy metals and chemicals<sup>21,22</sup>. The sensitivity regarding the EC50 values between first and fourth larval stages of *C. riparius* could differ by e.g. a factor up to 950 for Cadmium<sup>23</sup>. Although Bti products are applied directly to water bodies no EC50 values for first instar chironomids could be found in the literature and documents for Bti product registrations<sup>24</sup>.

In Europe Bti (Serotype H-14, strain AM65-52) is regulated as biocide under the guideline 528/2012. The guideline pursues the protection of non-target organisms, the environment, biodiversity and ecosystems<sup>25</sup>. The crucial instrument for granting authorization is the PEC (Predicted environmental concentration)/PNEC (Predicted no effect concentration) ratio which should not exceed 1 to assure previously mentioned protection goals. Since 2011, Bti is approved under the former biocide directive 98/8/EC. For the latest assessment report<sup>26</sup> no ecotoxicological values for Chironomidae were available and could be included in the risk assessment.

Several toxicity studies produced EC50 values to pestiferous chironomid larvae using effective concentrations for different products and study designs. However, data are only available for third and fourth larval instars<sup>22,23,27</sup>. In contrast to these efficiency studies we tested larvae of *C. riparius* as a non-target organism. We followed the standardized study design according to OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) Guideline 235 to obtain comparable 48 h EC50 values for different larval stages<sup>19</sup>. These tests were conducted daily over the entire aquatic life cycle of 28 days in order to test how sensitivity changes during larval development. Mean EC50 values for every larval stage were calculated and compared to reviewed literature values and field application rates for mosquito control. Furthermore we compared and evaluated the different EC50 values of previous studies that addressed Bti sensitivity of chironomids. PEC/PNEC ratios for the different species and larval instars were calculated to simulate a risk assessment under the guideline EU 528/2012<sup>25</sup>.

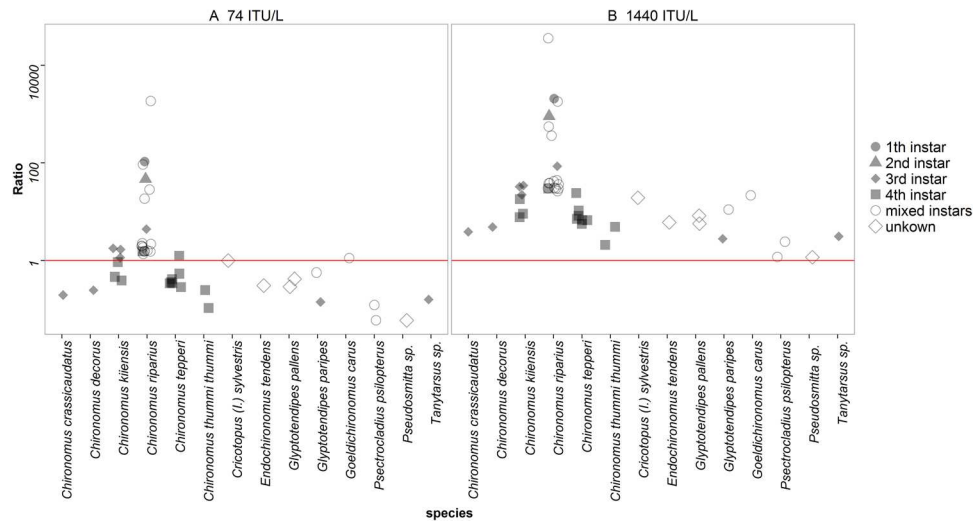
## Results

During its larval development *Chironomus riparius* showed a broad spectrum of sensitivity to Bti with EC50 values ranging from 6.9 ITU/L up to 607.8 ITU/L (Fig. 1). The first and most sensitive larval instar was 100-fold more sensitive than the fourth larval instar. Within this range the decrease in sensitivity of developing larval stages could be described with a sigmoid curve fit ( $f(x) = 37.2 - 20.1x + 4.1x^2 - 0.1x^3$ , adjusted  $R^2 = 0.92$ ) suggesting an overall decrease in sensitivity for older larvae (except for the last days, when pupation occurred, and individuals stop feeding and are therefore also not exposed to Bti).

In four of 28 tests the control immobilisation exceeded 15% or did not achieve 100% immobilization in the highest concentration which is why these studies were excluded from the analysis and do not appear in Fig. 1 (see Supplemental Information, Table S1). Days with less than 90% individuals of the same larval instar stage in the corresponding test are declared as 'mixed instars' (further details can be found in Table S1, Supplemental

Larval instar	Mean EC50 (ITU/L)	95% Confidence Interval (ITU/L)	Included test days
First	6.9	3.8–10.0	2
Second	16	13.6–18.4	4, 5
Third	168.7	147.9–189.4	12, 13
Fourth	485	416.6–553.3	26, 27, 28

**Table 1.** Mean EC50 values and 95% confidence intervals. All mean EC50 are statistically significant different from each other. Included test days (see main text) are provided.



**Figure 2.** The calculated ratio of PEC/PNEC is shown. The ratio was calculated with a PEC of 74 ITU/L (A) respectively 1440 ITU/L which is the field rate (B). The red line marks the trigger value of the biocide guideline (PEC/PNEC = 1).

Information). Out of 28 tests 8 were identified as mixed instars even though all larvae were from one age cohort (within 24 h).

For each of the four larval stages mean EC50 values were calculated and compared to each other. Mean EC50 values increase with successive larval stage (Table 1). All mean EC50 values are statistically significantly different from each other with p-values below 0.003 (Supplemental Information, Table S10) and separated by factors between 2.3 and 10.5. The highest increase is between second and third larval instar. First and second instar larvae show a high sensitivity to Bti compared to older larval stages.

The PEC/PNEC ratio for the biocide risk assessment was calculated using two different PEC values. One was obtained from the risk assessment report of Bti Serotype H-14, strain AM65-52 (74 ITU/L)<sup>26</sup>; the other (1440 ITU/L) is the actual exposure concentration in surface water in mosquito control areas in the Upper Rhine Valley<sup>10</sup>. PNEC values are based on EC50 values of the different species obtained from literature (Supplemental Information, Table S3). For the lower exposure value four species exceed the trigger value 1 of the exposure/effect ratio (Fig. 2A). However at actual mosquito control rates all chironomid species are at risk since the PEC/PNEC ratio exceeds 1 in all cases (Fig. 2B). The most relevant value for the risk assessment is the EC50 of first instar larvae of *C. riparius*. Here the exposure/effect ratio is 105 (PEC = 74 ITU/L) or 2057 respectively (PEC = 1440 ITU/L). Both exceed the trigger value of 1 by several orders of magnitudes indicating an underestimated risk (Fig. 2).

## Discussion

Our study reveals a high sensitivity of first and second instar larvae of *C. riparius*, with EC50 values 209 times (in case of first instar larvae) and 90 times (in case of second instar larvae) below the lowest field application concentration used in mosquito control in the Upper Rhine Valley, Germany. The results of the consecutive test design of this study showed a decrease in sensitivity for a cohort of chironomid larval instars towards Bti exposure during their development. Bti sensitivity was significantly different for all larval instars of *C. riparius* in this study.

Earlier larval instars of chironomids are more susceptible to Bti than older instars. The factors separating the larval instars are not consistent within the different tested species. Reported factors of decrease differ for different instars and species from 4-fold<sup>21</sup> to 174-fold<sup>28</sup> but the trend, older larvae react less sensitive, is consistent<sup>29</sup>. The differences could be caused by the variance in test design regarding species and size of the larvae or larval densities. The size of the larvae matters, because - even in the same larval instar - EC50 values of Bti were reported statistically significant different<sup>6</sup>. Also the different Bti formulations could affect chironomid sensitivity<sup>5</sup>. Inert ingredients comprise a major part of the formulations and are suspected to change the settling rate of the Bti product or the feeding behavior of the larvae<sup>5</sup>.

The actual assessment report on Bti for its registration in the EU did not include the most sensitive non-target organism – Chironomidae – but referred to the crustacean *Daphnia magna* instead<sup>26</sup>. Chironomids would be more suitable due to their close relationship to the target organism mosquito. They live in the targeted environment and the uptake and the mode of action of Bti is similar. Additionally midges are also recognized as central food resource in wetlands<sup>30–33</sup>. Following the Guideline 528/2012 the PEC/PNEC ratios exceed the trigger value for all reviewed chironomid species<sup>25</sup>. Most studies tested less sensitive instars, so the presumed safety of Bti for non-target Chironomidae is not given. In case of the first instar larvae of *C. riparius* the PEC/PNEC ratio is 2057 which is more than 2000 times higher than acceptable. Based on the violation of the PEC/PNEC ratio Bti and its formulated products need a reevaluation of the existing approval. Potential environmental harm is indicated by including our sensible and sensitive endpoint in the risk assessment.

The acute toxicity test is a worst case scenario for chironomid larvae. In the field the sensitivity of chironomids to Bti could be lower due to the presence of sediment, sunlight and other abiotic and biotic factors<sup>34–36</sup>. However, the exposure rates of 74 ITU/L and 1440 ITU/L used in our risk calculation are situated at the lower end of the existing range; field rates in Europe generally vary between 1,440 ITU/L and 3,198 ITU/L<sup>10,31,37–39</sup>. Field studies monitoring mosquito control in wetlands sometimes detected reductions of chironomid populations<sup>37,40–42</sup>, others did not find any effects<sup>38,43–45</sup>. Community composition of chironomid species and larval instars in mosquito breeding sites with Bti application is often unknown. Field populations consist of a mixture of different larval instars<sup>46</sup> which lead to different sensitivity levels. Another possible explanation for the varying results in the field studies is the different species composition of the aquatic insect community which arises from different habitats like salt marshes, river floodplains and seasonal wetlands.

Chironomids represent non-target organisms in mosquito control scenarios<sup>2,40</sup>. Due to their ubiquitous occurrence and high numbers they are one of the most valuable food resources in temporary wetlands<sup>14,47</sup>. A decline of chironomids alongside with the removal of mosquito larvae leads to a reduction of available biomass for organisms at higher trophic levels and thus has implications for the entire food web<sup>31,33,37,41</sup>. Various predators feed directly and indirectly on chironomid larvae and imagines like dragonflies, spiders, amphibians and their larvae, fish, birds and bats<sup>14,31,37,48–51</sup>. Some studies exist on direct and indirect effects on higher trophic levels after Bti application<sup>37,52</sup> and only a thorough evaluation of their study designs and data analysis together with further coordinated research can help to come to a valid conclusion regarding potential food web deterioration due to Bti mosquito control. In Germany, in contrast to other countries as Sweden, USA or France no long-term environmental monitoring with control sites was established to allow a solid analysis<sup>31,38,41,43</sup>.

The results from this laboratory study indicate that the risk for chironomids in the course of Bti-based mosquito control is underestimated. This could lead to disruptions on higher trophic levels within the wetland food web. As an environmental friendly alternative to other insecticides<sup>3</sup>, in Germany Bti is also applied multiple times per season in nature conservation areas of European value with specific protected target species<sup>10,31,40</sup>. Currently the magnitude of Bti effects on wetland food webs is unknown and nature protection goals might be violated.

## Material and Methods

**Test organism.** The test organism *Chironomus riparius* Meigen 1804 (obtained from BayerCropScience AG, Monheim 2013) was kept in permanent culture within a climate controlled chamber (Weiss Environmental Technology Inc., Germany) at  $20 \pm 1$  °C with a 16:8 light/dark regime with 800–1000 lux light intensity. Animals were cultured in M4 Medium<sup>19</sup> which was renewed once a week. The culture vessels with larvae were gently aerated and a layer of quartz sand (0.5 mm) was provided. Larvae were fed with ground fish food (TetraMin, Germany).

**Rearing the tested larvae.** 20 fertile egg ropes not older than 24 h were collected three days before test initiation and reared in separate culture vessel without any sediment but aeration. Ground fish food was added every two days. To reduce stress resulting from high density larvae were randomly separated into different vessels after five days. Medium was renewed whenever necessary but latest after three days. The larvae were reared in the climatic chamber mentioned above.

**Acute toxicity tests.** The acute toxicity tests were conducted according to OECD guideline 235. Five larvae were exposed to five different test concentrations in 100 mL plastic beakers (Duny, Bramsche, Germany) filled with 50 mL test solution, prepared with M4 medium and Vectobac WDG. Each of the five treatment concentrations (Supplemental Information, Table S1) and the M4 medium control consisted of five replicates. Individuals that did not move after a gentle stream produced with a pipette were considered as moribund. The number of immobile individuals was recorded after 24 h and 48 h. Individuals of the 4<sup>th</sup> instar larvae that started pupation during the test were excluded from the test<sup>47</sup>. Consequently the number of larvae per beaker deviated from five in the highest larval instar tests after 26 days. During the tests no food and aeration was provided. All tests ran in the climatic chamber as described previously. Oxygen content and pH was measured at the end of each test (after 48 h) and was always found in agreement with OECD Guideline 235.

**Test substance and concentrations.** The test substance Vectobac WDG (Valent BioSciences Corporation, USA) has the toxic potency of 3000 International Toxic Units (ITU) per mg. The active ingredient is *Bacillus thuringiensis israelensis* (strain AM 65–52). VectoBac WDG was sterilized by gamma radiation according to the standard procedure of the German Mosquito Control Association (KABS e. V.). Thereafter the potency of Vectobac WDG is reduced to approximately 2400 ITU/mg<sup>53</sup>.

Due to larval development and decreasing sensitivity the test concentrations were adjusted during the test period of 28 days (further details in Supplemental Information, Tables S1 and S2). A solution with a certain amount of VectoBac WDG was prepared in M4 medium. The amount of Bti was weighed and a stock solution

was prepared. The stock solution was diluted further using M4 medium until the desired test concentrations were achieved (details for preparation in Supplemental Information Table S2). To allow comparison with other studies the concentration is not given in mg VectoBac WDG/L but in ITU/L.

**Determination of larval stages.** Head capsule measurements were conducted to determine the larval stage of *C. riparius* since the age in days or body length is not a sufficient method to determine the larval instar<sup>54</sup>. Each day 10 to 20 randomly selected larvae were taken out of the rearing vessel, preserved in 70% Ethanol and head capsule width (HCW) and head capsule length (HCL) were determined using a binocular microscope (Leica CME, Leica Microsystems, Germany) fitted with a calibrated eyepiece micrometer.

HCW and HCL of the selected individuals were analyzed with k-mean clustering (vegan package, R) and assigned to one of the four clusters corresponding to four larval instars. Percentages of the different larval instars were calculated daily (further details in Supplemental Information, Tables S1, S6 and Figure S7).

**Risk assessment for Biocides.** The PEC/PNEC ratio was calculated following the Guideline EU 528/2012. PNEC is extrapolated from the EC50 value of the most sensitive organism, in this case first larvae of *C. riparius* and the assessment factor of 10. This leads to a PNEC of 0.69 (6.9 ITU/L;  $10 = 0.69$  ITU/L). The PNEC was calculated for all reported EC50 values. Differing test parameters of the nine evaluated studies were summarized (Supplemental Information, Table S3, Figure S6, Table S7). The PEC was derived from the assessment report of Italy and stated as 74 ITU/L, which is the lowest possible PEC in the report<sup>26</sup>. The resulting concentration after application to surface water in Germany is 1,440 ITU/L, and this was included as a realistic value in the analysis.

**Statistical analyses.** All statistical analyses were carried out using the statistical software R (version 3.1.0)<sup>55</sup>. The significance level to detect differences was set to  $\alpha = 0.05$  for all tests. Dose-response models in the drc package<sup>56</sup> were fitted to the data and the daily 48 h EC50 with 95% Confidence Interval was calculated with the best model. Model fit was assessed using Akaike's information criterion.

Tests were considered valid if the control mortality did not exceed 15% as recommended in the OECD Guideline 235 for acute toxicity tests<sup>19</sup>. As mentioned above larvae for headcapsule measurements were randomly selected every day. The headcapsule measurements of these larvae allowed conclusions about the instar stage. The percentage of larvae in respective larval instar was calculated for every test day (Supplemental Information, Table S1). When more than 90% of the larvae were found to be in the same larval stage, the test on this day was assigned to this larval instar (Supplemental Information, Table S1). Test days which fulfilled the criterion of 90% larvae within the same instar, less than 15% control mortality and 100% mortality in the highest concentration were used for mean EC50 calculations. Data of every larval stage were fitted to a dose-response model (Supplemental Information Figure S5, Table S3). Mean EC50 values were analysed for statistically significant differences among the four larval instars using confidence interval overlap testing (Supplemental Information, Table S10)<sup>57</sup>. To extract the most influential parameters of the EC50 values obtained from the literature review a linear model was calculated with the "car" package<sup>58</sup>. Different linear models were tested with ANOVA for significant difference to get the most parsimonious model (Supplemental Information Figure S6, Table S7).

## References

- Lacey, L. A. & Merritt, R. W. The safety of bacterial microbial agents used for black fly and mosquito control in aquatic environments. 151–168. In Hokkanen, H. M. T. & Hajek, A. Environmental impacts of microbial insecticides: Need and methods for risk assessment. (Springer, Netherlands, 2003).
- Boisvert, M. & Boisvert, J. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on target and nontarget organisms: a review of laboratory and field experiments. *Biocontrol Sci. Technol.* **10**, 517–561 (2000).
- Becker, N. The use of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) against mosquitoes, with special emphasis on the ecological impact. *Isr. J. Entomol.* **32**, 63–69 (1998).
- Boisvert, M. Utilization of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti)-based formulations for the biological control of mosquitoes in Canada. 87–93. In Proceedings of the 6th Pacific Rim Conference on the biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its environmental impact. (National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), 2007).
- Stevens, M. M., Helliwell, S. & Hughes, P. A. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* formulations, spinosad, and selected synthetic insecticides to *Chironomus tepperi* larvae. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **21**, 446–450 (2005).
- Stevens, M. M., Akhurst, R. J., Clifton, M. A. & Hughes, P. A. Factors affecting the toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* to fourth instar larvae of *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae). *J. Invertebr. Pathol.* **86**, 104–110 (2004).
- Ali, A. *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* (ABG-6108) against chironomids and some nontarget aquatic invertebrates. *J. Invertebr. Pathol.* **38**, 264–272 (1981).
- Becker, N. Ice granules containing endotoxins of microbial agents for the control of mosquito larvae - a new application technique. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **19**, 63–66 (2003).
- Becker, N. Microbial control of mosquitoes: Management of the upper rhine mosquito population as a model programme. *Parasitol. Today* **13**, 485–487 (1997).
- Becker, N. Antwortschreiben SGD Süd, AZ 42/553-61 (2016).
- Bravo, A., Gill, S. S. & Soberon, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicol.* **49**, 423–435 (2007).
- Bravo, A., Likitvivanavong, S., Gill, S. S. & Soberon, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **41**, 423–431 (2011).
- Yiallourous, M., Storch, V. & Becker, N. Impact of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on larvae of *Chironomus thummi thummi* and *Psectrocladius psilopterus* (Diptera: Chironomidae). *J. Invertebr. Pathol.* **74**, 39–47 (1999).
- Armitage, P., Cranston, P. & Pinder, L. C. *The chironomidae: Biology and ecology of non-biting midges*. (Chapman and Hall, 1995).
- Pinder, L. C. V. Biology of Freshwater Chironomidae. *Annu. Rev. Entomol.* **31**, 1–23 (1986).
- Benke, A. C. Production Dynamics of Riverine Chironomids: Extremely High Biomass Turnover Rates of Primary Consumers. *Ecology* **79**, 899–910 (1998).
- Leeper, D. A. & Taylor, B. E. Insect Emergence from a South Carolina (USA) Temporary Wetland Pond, with Emphasis on the Chironomidae (Diptera). *J. North Am. Benthol. Soc.* **17**, 54–72 (1998).
- D L Nouë, J. & Choubert, G. Apparent digestibility of invertebrate biomasses by rainbow trout. *Aquaculture* **50**, 103–112 (1985).

19. OECD/OCDE. Chironomus sp., acute immobilisation test: OECD Guideline for the testing of chemicals 235 (2011).
20. Weltje, L. *et al.* The chironomid acute toxicity test: development of a new test system. *Integr. Environ. Assess. Manag.* **6**, 301–7 (2010).
21. Treverrow, N. Susceptibility of *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae) to *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*. *J. Aust. Entomol. Soc.* **24**, 303–304 (1985).
22. Gauss, J. D., Woods, P. E., Winner, R. W. & Skillings, J. H. Acute toxicity of copper to three life stages of *Chironomus tentans* as affected by water hardness-alkalinity. *Environ. Pollut. Ser. Ecol. Biol.* **37**, 149–157 (1985).
23. Williams, K. A., Grenn, D. W. J., Pascoe, D. & Gower, D. E. The acute toxicity of cadmium to different larval stages of *Chironomus riparius* (Diptera:Chironomidae) and its ecological significance for pollution regulation. *Oecologia* **70**, 362–366 (1986).
24. EU. Commission Directive 2011/78/EU of 20 September 2011 amending Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council to include *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Serotype H14, Strain AM65-52 as an active substance in Annex I thereto (Text with EEA relevance) (1998).
25. EU. Regulation (EU) No 528/2012 of the European parliament and the council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products. 258/2012 (2012).
26. EU. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* – Strain AM65-52 (PT 18) assessment report. 87 (EU, 2010).
27. Robinson, P. W. & Scott, R. R. The toxicity of Cyromazine to *Chironomus zealandicus* (Chironomidae) and Deleatidium sp. (Leptophlebiidae). *Pestic. Sci.* **44**, 283–292 (1995).
28. Ali, A., Baggs, R. D. & Stewart, J. P. Susceptibility of some florida chironomids and mosquitoes to various formulations of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis*. *J. Econ. Entomol.* **74**, 672–677 (1981).
29. Ping, L., Wen-Ming, Z., Shui-Yun, Y., Jin-Song, Z. & Li-Jun, L. Impact of environmental factors on the toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* ips82 to *Chironomus kiiensis*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **21**, 59–63 (2005).
30. Armitage, P. D. Chironomidae as food. 423–435. In Armitage, P. D., Cranston, P. S. & Pinder, L. C. V. *The chironomidae* (Springer, Netherlands, 1995).
31. Poulin, B., Lefebvre, G. & Paz, L. Red flag for green spray: adverse trophic effects of Bti on breeding birds. *J. Appl. Ecol.* **47**, 884–889 (2010).
32. Batzer, D. P. & Wissinger, S. A. Ecology of insect communities in nontidal wetlands. *Annu. Rev. Entomol.* **41**, 75–100 (1996).
33. Niemi, G. J. *et al.* Ecological effects of mosquito control on zooplankton, insects, and birds. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**, 549–559 (1999).
34. Becker, M., Zgomba, M., Ludwig, M., Petric, D. & Rettich, F. Factors influencing the activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* treatments. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **8**, 285–289 (1992).
35. Charbonneau, C. S., Drobney, R. D. & Rabeni, C. F. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on nontarget benthic organisms in a lentic habitat and factors affecting the efficacy of the larvicide. *Environ. Toxicol. Chem.* **13**, 267–279 (1994).
36. Cao, C. W. *et al.* Toxicity and affecting factors of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on *Chironomus kiiensis* larvae. *J. Insect Sci.* **12**, (2012).
37. Jakob, C. & Poulin, B. Indirect effects of mosquito control using Bti on dragonflies and damselflies (Odonata) in the Camargue. *Insect Conserv. Divers.* **9**, 161–169 (2016).
38. Lagadic, L. *et al.* No association between the use of Bti for mosquito control and the dynamics of non-target aquatic invertebrates in French coastal and continental wetlands. *Sci. Total Environ.* **553**, 486–494 (2016).
39. Östman, Ö., Lundström, J. O. & Vinnersten, T. Z. P. Effects of mosquito larvae removal with *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) on natural protozoan communities. *Hydrobiologia* **607**, 231–235 (2008).
40. Fillinger, U. Faunistische und ökotoxikologische Untersuchungen mit B.t.i. an Dipteren der nördlichen Oberrheinauen unter besonderer Berücksichtigung der Verbreitung und Phänologie einheimischer Zuckmückenarten (Chironomidae). Dissertation. University of Heidelberg (1998).
41. Hershey, A. E., Shannon, L., Axler, R., Ernst, C. & Mickelson, P. Effects of Methoprene and Bti (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) on nontarget insects. *Hydrobiologia* **308**, 219–227 (1995).
42. Balcer, M. D., Schmude, K., Snitgen, J. & Lima, A. Long-term effects of the mosquito control agents Bti (*Bacillus thuringiensis israelensis*) and methoprene on nontarget macro-invertebrates in wetlands in Wright County, Minnesota (1997–1998). *Report to Metropolitan Mosquito Control District, St. Paul, Minnesota* (1999).
43. Lundström, Jo *et al.* Production of wetland Chironomidae (Diptera) and the effects of using *Bacillus thuringiensis israelensis* for mosquito control. *Bull. Entomol. Res.* **100**, 117–125 (2010).
44. Lagadic, L., Roucaute, M. & Caquet, T. Bti sprays do not adversely affect non-target aquatic invertebrates in French Atlantic coastal wetlands. *J. Appl. Ecol.* **51**, 102–113 (2014).
45. Caquet, T., Roucaute, M., Le Goff, P. & Lagadic, L. Effects of repeated field applications of two formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on non-target saltmarsh invertebrates in Atlantic coastal wetlands. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **74**, 1122–1130 (2011).
46. Tokeshi, M. Population dynamics, life histories and species richness in an epiphytic chironomid community. *Freshw. Biol.* **16**, 431–441 (1986).
47. Thienemann, A. Chironomus, Leben, Verbreitung und wirtschaftliche Bedeutung der Chironomiden. *Die Binnengewässer, Band 20*, Schweizerbarthsche Verlagsbuchhandlung (1954).
48. Arnold, A., Braun, M., Becker, N. & Storch, V. Contribution to the trophic ecology of bats in the upper rhine valley, southwest Germany. *Proc. VIIIth EBRS* 17–22 (2001).
49. Stav, G., Blaustein, L. & Margalit, Y. Individual and interactive effects of a predator and controphic species on mosquito populations. *Ecol. Appl.* **15**, 587–598 (2005).
50. Klecka, J. & Boukal, D. S. Who eats whom in a pool? A comparative study of prey selectivity by predatory aquatic insects. *PLOS ONE* **7**, e37741 (2012).
51. Poulin, B. Indirect effects of bioinsecticides on the nontarget fauna: The Camargue experiment calls for future research. *Acta Oecologica* **44**, 28–32 (2012).
52. Land, M. & Miljand, M. Biological control of mosquitoes using *Bacillus thuringiensis israelensis*: a pilot study of effects on target organisms, non-target organisms and humans. *Mistra EviEM, Pilot Study PS4, Stockholm, Sweden* (2014).
53. Becker, N. Sterilization of *Bacillus thuringiensis israelensis* products by gamma radiation. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **18**, 57–62 (2002).
54. Watts, M. M. & Pascoe, D. A Comparative Study of *Chironomus riparius* Meigen and *Chironomus tentans* Fabricius (Diptera:Chironomidae) in Aquatic Toxicity Tests. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **39**, 299–306 (2000).
55. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. (R Foundation for Statistical Computing, 2013).
56. Ritz, C. & Streibig, J. C. Bioassay Analysis using R. *Software* (2005).
57. Wheeler, M. W., Park, R. M. & Bailer, A. J. Comparing median lethal concentration values using confidence interval overlap or ratio tests. *Environ. Toxicol. Chem.* **25**, 1441–1444 (2006).
58. Fox, J. *et al.* *Car: Companion to Applied Regression* (2014).

## Acknowledgements

This work has been supported by the Ministerium für Wissenschaft, Weiterbildung und Kultur Rheinland-Pfalz, Germany, in the frame of the programme “Research initiative”, project “AufLand”. S.A. was funded by the German Federal Environmental Foundation (Deutsche Bundesstiftung Umwelt, DBU) project 32608/01 (“Development of a concept for the mosquito treatments in the Upper Rhine Valley that is in conformity with nature protection”). We thank Philipp Uhl for his assistance in R and suggestions on the manuscript.

## Author Contributions

Study concept: C.A.B., A.K. Experimental work: A.K., S.A. Data analysis: A.K. Manuscript preparation: A.K., S.A., C.A.B. All authors approved the final article.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14019-2>.

**Competing Interests:** The authors declare that they have no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017



# Using DNA metabarcoding for assessing chironomid diversity and community change in mosquito controlled temporary wetlands

Kathrin Theissinger<sup>1</sup>, Anna Kästel<sup>1</sup>, Vasco Elbrecht<sup>2</sup>, Jenny Makkonen<sup>1,3</sup>, Susanne Michiels<sup>4</sup>, Susanne I. Schmidt<sup>1</sup>, Stefanie Allgeier<sup>1</sup>, Florian Leese<sup>2</sup>, Carsten A. Brühl<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University of Koblenz-Landau, Institute for Environmental Sciences, Landau, Germany.

<sup>2</sup> University of Duisburg-Essen, Aquatic Ecosystem Research, Essen, Germany.

<sup>3</sup> University of Eastern Finland, Department of Environmental and Biological Sciences, Kuopio, Finland.

<sup>4</sup> AquaDiptera, Emmendingen, Germany.

Corresponding author: Kathrin Theissinger (theissinger@uni-landau.de)

Academic editor: Kristy Deiner | Received 18 September 2017 | Accepted 21 December 2017 | Published 15 January 2018

## Abstract

The biocide *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) is widely applied for mosquito control in temporary wetlands of the German Upper Rhine Valley. Even though Bti is considered environmentally friendly, several studies have shown non-target effects on chironomids, a key food resource in wetland ecosystems. Chironomids have been proposed as important indicators for monitoring freshwater ecosystems, however, morphological determination is very challenging. In this study, we investigated the effectiveness of metabarcoding for chironomid diversity assessment and tested the retrieved chironomid operational taxonomic units (OTUs) for possible changes in relative abundance and species diversity in relation to mosquito control actions in four temporary wetlands. Three of these wetlands were, for the first year after 20 years of Bti treatment, partly left Bti-untreated in a split field design, and one wetland has never been treated with Bti. Our metabarcoding approach detected 54 chironomid OTUs across all study sites, of which almost 70% could be identified to species level comparisons against the BOLD database. We showed that metabarcoding increased chironomid species determination by 70%. However, we found only minor significant effects of Bti on the chironomid community composition, even though Bti reduced chironomid emergence by 65%. This could be due to a time lag of chironomid recolonization, since the study year was the first year of Bti intermittence after about 20 years of Bti application in the study area. Subsequent studies will have to address if and how the chironomid community composition will recover further in the now Bti-untreated temporary wetlands to assess effects of Bti.

## Key Words

*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti), Barcode of Life Database (BOLD), chironomid saprobic index, cytochrome oxidase subunit I (COI), ecotoxicology, macrozoobenthos emergence, operational taxonomic units (OTU)

## Introduction

Since 1981, the biocide *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) is widely applied for mosquito (Culicidae, Diptera) control in temporary wetlands of the German Upper Rhine valley to minimize nuisance of local residents (Becker 1998). Bti is considered as the most environmentally friendly alternative to chemical pesticides for mosquito control due to a supposedly high specificity to mosquito larvae and negligible non-target effects even on closely related dipterans (Boisvert and Boisvert 2000).

This is important as large areas of both aquatic and terrestrial habitats of the Upper Rhine valley are protected (bird sanctuaries, nature reserves and Natura 2000 sites) and comprise of biodiversity hotspots (Biggs et al. 2005, Lukács et al. 2013).

However, several studies have shown that Bti non-target effects are possible (reviewed in Boisvert and Boisvert (2000)). Non-biting midges (Chironomidae, Diptera) are the most Bti-sensitive non-target family (Boisvert and Boisvert 2000). Controlled experiments revealed varying mortality rates on chironomid larvae with older larvae

being typically less sensitive to Bti (Ali et al. 1981, Trevorrow 1985, Ping et al. 2005). They also reported different sensitivities among species (Yiallourous et al. 1999) and subfamilies (Liber et al. 1998). A recent study found that first instar larvae of *Chironomus riparius* are highly susceptible to Bti treatment even at commonly used mosquito control application rates (Kästel et al. 2017). Consequently, Bti application might overproportionately affect chironomid species in early larval stages at the time of application. So far, field studies have yielded ambiguous data on possible side effects of Bti on chironomid abundances. These range from positive effects on chironomid larvae richness possibly due to reduced mosquito competition (Lundström et al. 2010), over no effect on chironomid abundance (Lagadic et al. 2016), to a 35–80% reduction of chironomids abundances (Rodcharoen et al. 1991, Hershey et al. 1995, Vaughan et al. 2008, Poulin et al. 2010, Jakob and Poulin 2016).

Chironomids are a taxonomically and ecologically highly diverse group and often dominate all kinds of lotic and lentic ecosystems in terms of species abundances and biomass (Ferrington 2008). With sometimes over 50% of the total macroinvertebrate fauna in aquatic ecosystems (Milošević et al. 2013, Puntí et al. 2009) chironomids are thus a key food resource in wetland ecosystems. They also constitute a central link between aquatic and terrestrial food webs as adult midges are prey for birds, bats, spiders and adult dragonflies (Niemi et al. 1999, Stav et al. 2005, Poulin et al. 2010, Pfitzner et al. 2015). Furthermore, temporal and spatial variability in chironomid community composition has been observed (Lindegaard and Brodersen 1995, Rossaro et al. 2006, Milošević et al. 2013) together with a high adaptability of the community to changing environmental conditions (Raunio et al. 2011). Given these particular ecological characteristics, chironomids have been proposed as important indicators for monitoring freshwater ecosystems (Moog 2002, Sæther 1979). However, their morphological determination is very challenging and the taxonomic expertise needed for species identification of chironomids is often lacking (Batzler and Boix 2016). This makes it difficult to study changes in chironomid composition and utilize this as a monitoring tool. DNA-based determination approaches such as DNA barcoding seem therefore promising to support and complement the taxonomic assessment of chironomid community composition.

During recent years, DNA metabarcoding of whole communities has become a new powerful tool for environmental monitoring of aquatic ecosystems (Hajibabaei et al. 2011, Carew et al. 2013, Elbrecht and Leese 2015, Gibson et al. 2015). The DNA-based assays to monitor species biodiversity proved to be a rapid and efficient tool that allows the recovery of a substantial amount of taxa (Sweeney et al. 2011, Taberlet et al. 2012, Yu et al. 2012, Carew et al. 2013, Elbrecht et al. 2017). For metabarcoding in animals, typically the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) is used (Hebert et al. 2003). The COI barcoding region has usually a good tax-

onomic resolution and comparatively well-curated databases as reference for many taxa (Sweeney et al. 2011, Elbrecht et al. 2017). The species present in the sample are identified based on a comparison of retrieved COI sequences (summarized as operational taxonomic units; OTUs) with reference databases (e.g. NCBI or BOLD; Ratnasingham and Hebert 2007). Good species coverage in the database is necessary for taxonomic assignment from sequences, but the identification rate for the different taxa vary widely (Ekrem et al. 2007, Kwong et al. 2012). For Chironomidae only about 30% of the estimated 700 different species in Germany (Samietz 1996) have an entry in the public databases BOLD with formal barcodes (accessed on 3. October 2017, search terms: chironomid & Germany). However, common taxa might be well represented.

## Objectives, concept and approach

In this study, DNA metabarcoding was applied to assess the distribution and species richness of chironomids in Bti-treated vs. first year Bti-untreated temporary wetlands in the Upper Rhine Valley. The study sites were part of a mosquito control area that has received regular Bti treatments for approximately 20 years ([http://www.kabsev.de/1/1\\_2/1\\_2\\_1/index.php](http://www.kabsev.de/1/1_2/1_2_1/index.php), accessed on 11. August 2017). Our first aim was to study the effectiveness of metabarcoding for chironomid diversity assessment as important and often overlooked freshwater bioindicator. We expected to obtain more species-level identifications based on molecular methods as compared to traditional taxonomic determination and used these data to calculate the saprobic index for the respective sites. Our second aim was to test for possible changes in the chironomid community composition of the temporary wetlands in response to mosquito control actions. Based on the above-mentioned studies we expected:

- an overall reduction in chironomid abundance at Bti-treated sites,
- a reduction in species richness of chironomids at Bti-treated sites, and therefore:
- an overall effect of Bti-treatment on chironomid community composition.

## Methodology

### Study sites

The study was conducted in Rhineland-Palatinate in southwest Germany close to Neustadt-Geinsheim (Fig. 1). The study sites are regularly flooded in spring and dry out in summer. Thus, the area can be classified as seasonal (= temporary) wetland, which is moreover partly protected as a key amphibian breeding area in the region (Williams 2006). The area has been subject to regular mosquito control management actions for over 20

years, with usually one to two helicopter-applications of Bti between March and June, depending on temperature and precipitation. The study sites Fig. 1 were: “Stiftungsfläche” (S): mainly flooded grassland with some small permanent water bodies, “Großwald” (G): alder carr with larger permanent water bodies, “Mitteltrumm” (M): alder/oak carr with some deeper trenches and ditches and flat sinks. Additionally, the site “Lachen-Speyerdorf” (CL; see Fig. 1) served as control site and was located approximately 7 km away from the sites S, G and M. The site CL was dominated by open alder and pine forest with an abandoned river course.

For the first time after 20 years of regular Bti treatment, parts of the study area were left Bti-untreated in spring 2013 allowing for a split field design. Accordingly, S, G and M were divided into Bti-treated (T; 20 years treated) and untreated (U; first season untreated) site pairs, and CL served as control site never been treated with Bti. The helicopter application took place on April 10, 2013 using IcyPearls (Vectobac WG, ValentBiosciences) at a concentration of  $1.44 \times 10^9$  ITU/ha.

### Emergence data

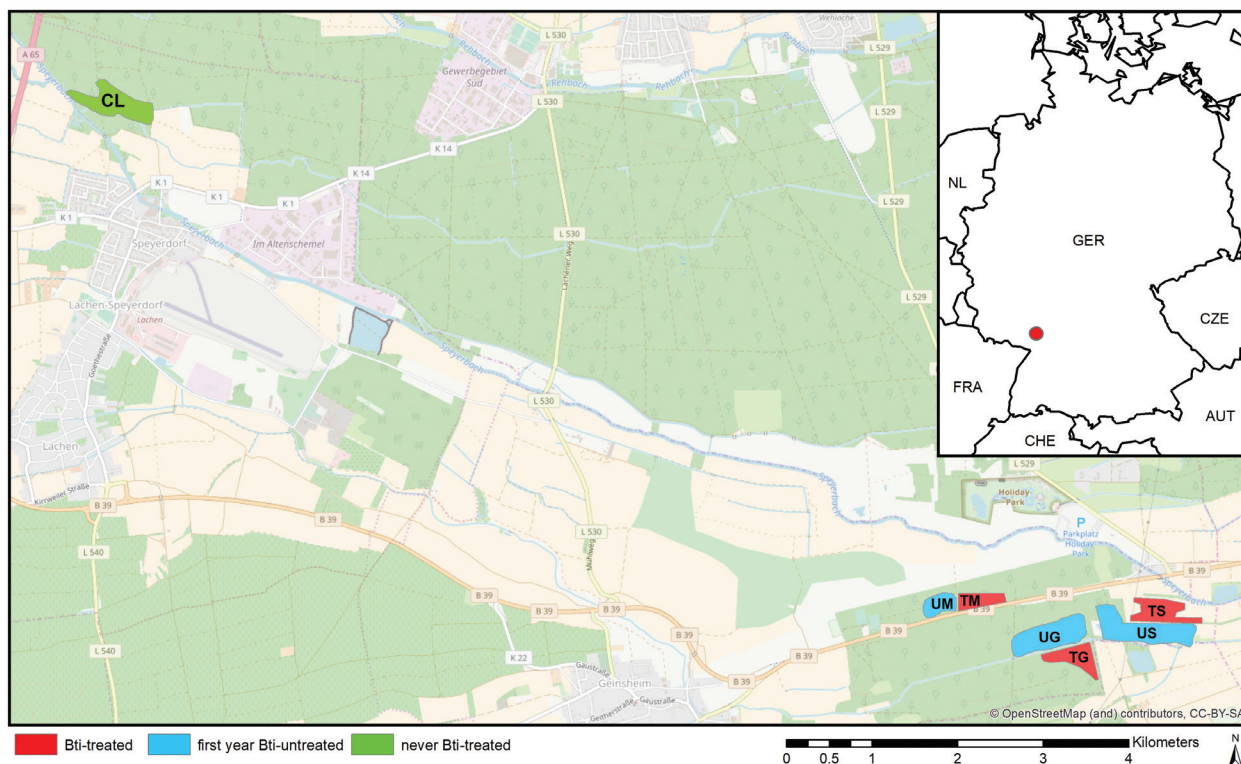
Insect imagines were collected weekly with emergence traps (N = 5 per site and treatment, in total 35 traps, 0.25 m<sup>2</sup> area each) over a period of four months (April – July 2013) for 13 weeks after application (WAA; WAA 1 – WAA 13) of Bti. The preserved emergence was deter-

mined to order level and the order Diptera to family level using a Leica M80 microscope and a 10x magnification and counted per trap and sampling week. All chironomid specimens were selected for further analyses. All specimens were conserved in 70% ethanol and stored at room temperature for up to two years until DNA extraction.

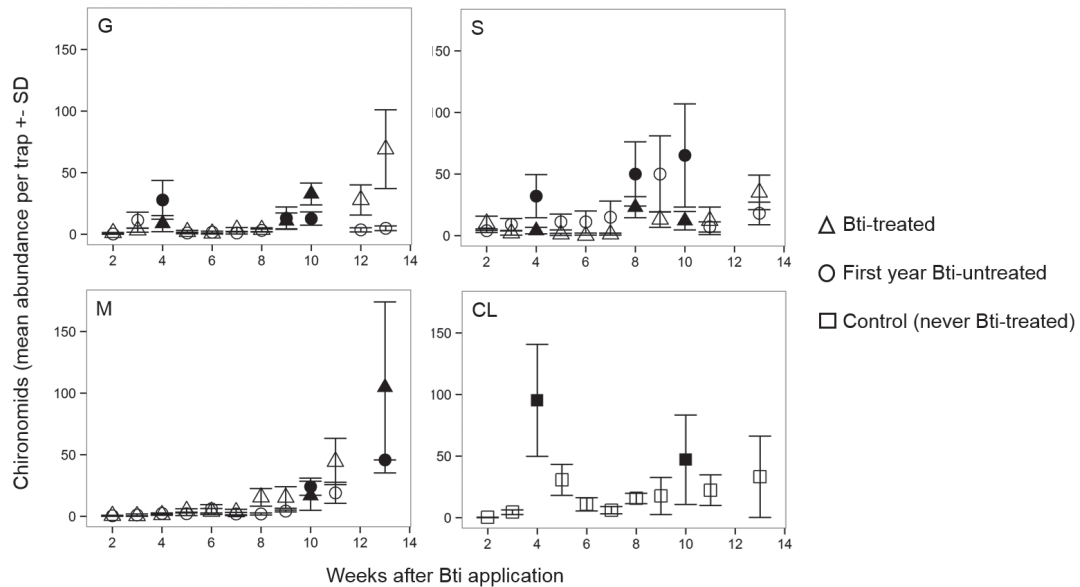
Chironomid samples of all emergence traps per WAA were pooled for Bti-treated and Bti-untreated sites. For specific emergence peaks (N = 18, see Fig. 2 and text in results) these pooled samples were selected for metabarcoding to determine whether abundance differences can be attributed to a shift in species community composition.

### Laboratory methods

Chironomids of emergence peaks (N = 18) were selected based on taxonomy and dried overnight at 60 °C. The specimens of each sample were grinded using a Tissue Lyser II (Qiagen, Hilden, Germany) at 30 Hz for 3 × 1 min with two sterile metal beads (3 mm, Hobbyfix, Opotec, Giebelstadt) with a brief centrifugation in between. DNA was extracted following a high salt DNA extraction protocol after (Aljanabi and Martinez 1997). Extraction success was verified using a Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer, Wilmington, USA). 50 µL of DNA from each sample were treated with 1.1 µL RNase (10 mg/mL, Roth, Karlsruhe, Germany) at 37 °C for 30 min, followed by purification using a MinElute Reaction Clean up Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The DNA con-



**Figure 1.** Study sites in southwest Germany close to Neustadt-Geinsheim. “Stiftungsfläche” (S), “Großwald” (G), “Mitteltrumm” (M) “Lachen-Speyerdorf” (CL). S, G and M were divided into Bti-treated (T; 20 years treated) and Bti-untreated (U; first season untreated) site pairs, and CL served as control site never been treated with Bti.



**Figure 2.** Chironomid mean abundances across all traps per site (M, G, S, and CL) for the whole sampling period. Different symbols refer to the varying Bti-treatments. Filled symbols indicate pooled emergence peak samples ( $N = 18$ ) used for metabarcoding.

centration after clean-up was again measured using the Nanodrop and DNA concentrations of all samples were adjusted to 25 ng/ $\mu$ L.

A 322-bp fragment of the mitochondrial COI gene was amplified using the BF2 + BR1 primer set (Elbrecht et al. 2017). The used primer set was developed and evaluated with mock and *in silico* methods and does incorporate the needed degeneracy to amplify macroinvertebrates (including chironomids) reliably (Elbrecht and Leese 2017). The used fusion primers included Illumina adapter tails for sequencing (P5 or P7) and inline barcodes of different lengths for sample multiplexing (Elbrecht and Leese 2015). For each of the 18 samples two PCRs were conducted using the same primer pair but switching P5 and P7 Illumina adapters (Elbrecht and Leese 2015, Suppl. material 1). Sample 04CL was run with PCR replicates to test the PCR variability. PCR reactions consisted of 1  $\times$  PCR buffer (including 2.5 mM  $Mg^{2+}$ ), 0.2 mM dNTPs, 0.5  $\mu$ M of each primer, 0.025 U/ $\mu$ L of HotMaster Taq (5Prime, Gaithersburg, MD, USA), 25 ng DNA, and HPLC  $H_2O$  to a total volume of 50  $\mu$ L. The PCR program included the following steps: 94  $^{\circ}C$  for 3 minutes, 35 cycles of 94  $^{\circ}C$  for 30 seconds, 50  $^{\circ}C$  for 30 seconds, 65  $^{\circ}C$  for 120 seconds and ended with 65  $^{\circ}C$  for 5 minutes. PCR success was checked on a 1% agarose gel. Since some samples exhibited low DNA quantity (Qubit 2.0, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA; measured concentration below 1 ng/ $\mu$ L), PCR for the respective samples was repeated with cycle number increased to 40 (Suppl. material 1). Amplicons were purified and size selected (retaining fragments of >300 bp) with a left-sided size selection using magnetic beads (SpriSelect, Beckman Coulter, Brea, CA, USA, ratio: 0.76 $\times$ ). The DNA concentration was quantified using the Qubit and a high sensitivity (HS)

Assay Kit. Purified PCR products were pooled proportionately according to the number of specimens used in the extraction into a library to ensure all specimens are sequenced with the same sequencing depth. After pooling, the library was sent to an external laboratory (Macrogen, Seoul, Korea) for 300 bp paired-end sequencing on a MiSeq Illumina system (v3) run.

### Bioinformatic analysis

Following the bioinformatic pipeline as previously described in Elbrecht and Leese (2017), the sequence data were processed as follows. In brief, after demultiplexing using a custom R script paired-end reads were merged to one sequence (Usearch version 8.8.1756). Primer sequences were removed via cutadapt (version 1.9.1). Singletons in each sample removed before clustering OTUs with the cluster\_otus command at 97% identity Edgar 2013. All samples (including singletons) were matched against the OTUs (Usearch). To enhance data reliability, sequences matched to the respective OTU had to occur in both replicates and exceed the 0.003% threshold sequence abundance to being considered in downstream analysis (Elbrecht and Leese 2015). Finally, the obtained OTU sequences were matched against the BOLD database to retrieve taxon identification. All used metabarcoding pipeline and R scripts are available in Suppl. material 2.

### Using metabarcoding data for chironomid diversity assessment

The retrieved chironomid species list was checked for biogeographic and ecologically plausibility, i.e., if the species names were listed for Germany and are repre-

sentative for temporary wetlands. If more than one species name per OTU was retrieved from BOLD with over 98% identity, we carefully examined the resulting hit table. For most hits, we then selected the biogeographically plausible species for our study region, based on the known biogeographical distribution and chironomid expert knowledge, for further ecological interpretations. If no clear decision could be made together with expert taxonomists, we followed the conservative approach to select the species name already represented in our data by another OTU. The species names retrieved in that way were categorized based on larval morphology in the context of standard water quality assessments into morphological determination “possible” (i.e., determination under 80× magnification without preparation), “difficult” (i.e., some characteristics need to be prepared and checked under greater magnification) and “impossible” (i.e., for species where the larva is not described, or do

not show morphological differences within one genus, or would demand highly elaborative preparation for species determination). Using this approach, we aimed to elucidate which proportion of the chironomid species pool is neglected in standard water quality assessments, where only the easily and quickly determinable chironomid larvae are considered. We then calculated the percentage of species retrieved via metabarcoding (here emergence data) in relation to species, which would have also been possible to determine morphologically in standard water quality assessments (usually larval data). Based on available saprobic indices of the chironomid species (Moog 1995, Moog 2002) retrieved via metabarcoding we also calculated the chironomid saprobic index (SI; Table 2) exemplarily for the four study sites across all WAA. When the same species name was retrieved from more than one OTU the respective abundances were summed up.

**Table 1.** Retrieved chironomid species names out of 54 obtained chironomid OTUs based on BOLD database searches. Given are OTU number(s), species names and the classification of the species determination based on larval morphology as routinely possible, difficult and impossible. Species names indicated with \* are questionable.

OTU	species names	morphological identification of larvae		
		possible	difficult	impossible
OTU_15	<i>Ablabesmyia monilis</i> (Linnaeus)		×	
OTU_73	<i>Acricotopus lucens</i> (Zetterstedt)	×		
OTU_11	<i>Chironomus annularius</i> (Meigen)			×
OTU_29	<i>Chironomus curabilis</i> * (Bel et al.)			×
OTU_24	<i>Chironomus melanescens</i> (Keyl)			×
OTU_5	<i>Chironomus dorsalis</i> (Meigen)			×
OTU_13 + OTU_25 + OTU_12	<i>Chironomus riparius</i> (Meigen)	×		
OTU_42	<i>Corynoneura scutellata</i> (Winnertz)			×
OTU_68	<i>Corynoneura coronata</i> (Edwards)			×
OTU_35	<i>Cricotopus sylvestris</i> (Fabricius)			×
OTU_40	<i>Dicrotendipes lobiger</i> (Kieffer)	×		
OTU_75	<i>Limnophyes minimus</i> (Meigen)			×
OTU_18 + OTU_64	<i>Limnophyes pentaplastus</i> (Kieffer)			×
OTU_34	<i>Monopelopia tenuicalcar</i> (Kieffer)	×		
OTU_47	<i>Parachironomus parilis</i> (Walker)			×
OTU_4	<i>Paralimnophyes longiseta</i> (Thienemann)			×
OTU_33	<i>Paratanytarsus grimmii</i> (Schneider)			×
OTU_51	<i>Paratanytarsus tenellulus</i> (Goetghebuer)			×
OTU_77	<i>Paratendipes albimanus</i> (Meigen)	×		
OTU_1	<i>Polypedilum uncinatum</i> (Goetghebuer)			×
OTU_45	<i>Procladius fuscus</i> * (Brundin)			×
OTU_19 + OTU_28 + OTU_97	<i>Psectrocladius limbatellus</i> (Holmgren)			×
OTU_32	<i>Psectrotanytus varius</i> (Fabricius)	×		
OTU_66	<i>Rheocricotopus fuscipes</i> (Kieffer)		×	
OTU_60 + OTU_264	<i>Tanytarsus heusdensis</i> (Goetghebuer)		×	
OTU_48	<i>Tanytarsus pallidicornis</i> (Walker)		×	
OTU_14 + OTU_137	<i>Tanytarsus usmaensis</i> (Pagast)		×	
OTU_7	<i>Telmatopelopia nemorum</i> (Goetghebuer)	×		
OTU_26	<i>Xenopelopia nigricans</i> (Fittkau)			×
OTU_41 + OTU_79	<i>Zavrelimyia barbatipes</i> (Kieffer)			×
N = 38	N = 30	N = 7	N = 5	N = 18

**Table 2.** Saprobic Index (SI) calculations per site (N = 4) across the whole sampling period based on 14 species retrieved from our data set for which the SI is available. Given are the species saprobic values (s), weights (w) as well as the species sequence frequencies (h) summed over all traps and sampling time points.

Species names	s	w	h [G]	h [S]	h [M]	h [CL]
<i>Ablabesmyia monilis</i> (Linnaeus)	2.3	2	13	100,034	269	6
<i>Chironomus riparius</i> (Meigen)	3.5	3	21,341	63,995	47,395	75
<i>Corynoneura scutellata</i> (Winnertz)	1.7	2	80	17	2,622	237
<i>Cricotopus sylvestris</i> (Fabricius)	2.6	2	6	13,553	7	11
<i>Limnophyes pentaplastus</i> (Kieffer)	1.3	2	17	800	3	54,508
<i>Monopelopia tenuicalcar</i> (Kieffer)	0.8	4	8	6,828	0	0
<i>Paratendipes albimanus</i> (Meigen)	2.3	2	0	136	0	0
<i>Psectrocladius limbatellus</i> (Holmgren)	1.8	3	2,588	65,009	18	1,331
<i>Psectrotanypus varius</i> (Fabricius)	2.8	1	2,767	2,156	4,273	0
<i>Rheocricotopus fuscipes</i> (Kieffer)	2.2	3	0	0	0	120
<i>Tanytarsus heusdensis</i> (Goetghebuer)	1.4	1	4	857	0	0
<i>Tanytarsus pallidicornis</i> (Walker)	1.8	1	2	1,426	0	0
<i>Xenopelopia nigricans</i> (Fittkau)	0.8	2	403	114	16,913	0
<i>Zavrelimyia barbatipes</i> (Kieffer)	1.0	3	1	157	3,266	0
SI			3.3	2.5	2.8	1.3

### Bti effects on chironomid community composition

To test whether the abundance data of emerged chironomids differed among Bti-treated and Bti-untreated sites (including the control site) for pooled samples of WAA 1 – WAA 4 (first emergence peak) and WAA 1 – WAA 13 (whole sampling period) a generalized linear mixed effect model (GLMM) (packages “nlme” v. 3.1-117, Pinheiro et al. 2016, and “MASS” v. 7.3-31, Venables and Ripley 2002) was implemented. As error structure the quasi Poisson family was chosen, where “study site” was implemented as random factor.

To test for differences in chironomid species richness between Bti-treated and Bti-untreated sites (including the control site), a Welch test was applied to the total number of OTUs and based on retrieved species names.

To test the hypothesis that the chironomid community composition differed between treatments, an adonis analysis (nonmetrical permutational MANOVA equivalent, Anderson 2001) was performed. For this, the Bray-Curtis distances of the Hellinger-transformed (see below) OTU read abundance assemblages per sites were calculated between pairs of sites, and these pairwise distances between sites were combined to a distance matrix of all sites, using the command ‘vegdist’ in the package “vegan” v. 2.4-1 (Oksanen et al. 2016). Within this distance matrix the nonmetrical permutational MANOVA equivalent was calculated using “Bti-treatment” as the distinguishing factor, with the command ‘adonis’ from the vegan package. We then assumed that time (WAA) would have a dominant effect on chironomid communities, but that Bti-treatment would alter the community as well. Therefore, also the interaction time \* Bti-treatment was tested. Due to low number of replicates, the samples from the sites M and CL of WAA 8 and 9 were combined to the same time

period. For the sites S and G only WAA 8 and WAA 9, respectively, were available.

All analyses were conducted in R (<https://www.R-project.org>). For all multivariate analyses, the Hellinger transformation was chosen to give less weight to the few high abundant OTUs, since the abundance data were highly left-skewed with few taxa reaching abundances several orders of magnitude higher than those of the less abundant species (Legendre and Legendre 2012).

## Results

### Emergence data

In total, 11,589 emerged insects were collected, comprising of 17 taxa groups (Chironomidae: 78%; Culicidae: 14%; Trichoptera: 4%; Chaoboridae: 2%; Brachycera: 1%, other: 1%). On the Bti-treated sites 27 mosquito individuals were collected in the emergence traps, while on the Bti-untreated sites 1,006 mosquitoes emerged. Based on morphological identification 9,033 adult chironomids were collected. The number of chironomid specimens per emergence trap across all sites varied from 1 (Bti-treated site) to 1,239 (first year Bti-untreated site).

Emergence of chironomids fluctuated over time with varying emergence peaks at the Bti-untreated sites (Fig. 2). In particular, we detected one spring emergence peak (WAA 4) and two summer emergence peaks (WAA 9 + 10) at site G. At site S one spring peak (WAA 4) and two summer peaks (WAA 8 + 10) were detected. At site M, two summer peaks (WAA 10 + 13) were identified. A spring peak (WAA 4) and a summer peak (WAA 10) were identified at the never Bti-treated site CL. Specifically pooled emergence peak samples (N = 18, Figure

2) were selected for metabarcoding to investigate, if the abundance difference between Bti treated and untreated site pairs can be attributed to a shift in the chironomid community composition. The amount of individuals per pooled emergence peak sample varied from 22 to 541 (Suppl. material 1).

### Bioinformatic analyses

In total 20,805,626 raw reads were generated by the MiSeq run with good read quality ( $Q30 \geq 76.7\%$  of reads). Raw data are available at NCBI SRA archive (accession number SRR4244505; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=SRR4244505>). After demultiplexing, merging and trimming of PCR primers 8,869,048 sequences were used for further analysis. The number of sequences in each sample was significantly correlated ( $p < 0.001$ , adj.  $R^2=0.942$ ) with the abundance of specimens per sample (Suppl. material 3).

OTU clustering analysis resulted in 442 OTUs. After application of the previously defined quality standards (0.003% minimum abundance) 89 OTUs were retained and used for subsequent analyses. The BOLD database searches identified 54 of the 89 OTUs (60.7%) as chironomids (Suppl. material 4). Of those, 38 OTUs (68.5%) could be assigned a species identification with 98 – 100% similarity, leaving 17 OTUs (31.5%) without species level identification (Suppl. material 4).

### Using metabarcoding data for chironomid diversity assessment

In total 30 chironomid species were detected in the metabarcoding data set, with six species being assigned to 2–3 OTUs respectively (Table 1). For 11 OTUs we retrieved more than one species name with a sequence similarity of 97.82–100% (Suppl. material 4). For those OTUs, we were able to select the only biogeographically plausible species for our study region, based on biogeography and chironomid expert knowledge, for further ecological interpretations (underlined species names in Suppl. material 4). Only for OTU\_12 two species names were biogeographically plausible, namely *Chironimus luridus* and *C. riparius*. Here, we selected the latter species as

*C. riparius* was also characterized by other OTUs in our data, whereas *C. luridus* was not represented otherwise.

Of the 30 retrieved species, seven species can be routinely determined (cost and time efficient) based on larval morphology in ecological water assessments, whereas the remaining species are difficult ( $N = 5$ ) or impossible ( $N = 18$ ) to determine based on larval morphology (Table 1). This resulted in a 73% increase of retrieved chironomid species names based on metabarcoding (using emergence data) in relation to morphological larvae determination.

The chironomid SI was calculated based on the available saprobic value for 14 chironomid species (45.2%) of our data set Table 2. The saprobic value per detected species ranged from 0.8 (*Monopelopia tenuicalcar*, *Xenopelopia nigricans*) up to 3.5 (*C. riparius*). For our study sites the chironomid SI ranged from 1.3 at the control site to 3.3 at the Bti treated sites (Table 2).

### Bti effects on chironomid community composition

The abundance of emergent chironomids until WAA 4 at the Bti-treated sites was reduced by 64.99% compared to the abundance in the Bti-untreated sites (GLMM  $t = 11.29$ ,  $p = 0.008$ ,  $df = 2$ ). After WAA 13, slightly more chironomids hatched at the Bti-treated vs. Bti-untreated sites (2,132 vs 1,800 individuals, respectively). However, this difference was not statistically significant (GLMM  $t = -0.239884$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.833$ ).

Neither the number of OTU per sample (Welch two sample t-test,  $t = 1.33$ ,  $p = 0.20$ ) nor the number of species assigned from the OTU based on the data base (Welch two sample t-test,  $t = 1.45$ ,  $p = 0.17$ ) were significantly different between Bti-treated and Bti-untreated site pairs.

The adonis model of crossed Bti-treatment \* site effects (with the variation from time implemented as groups (strata) within which permutations are constrained ) explained 51% of the variation of the multivariate chironomid community composition, 34% of which were due to the differences within sites (Table 3). The effect from Bti treatment suggests a statistically significant, but only minor component explaining 12% of the variation ( $p = 0.02$ ; Table 3).

**Table 3.** Results from the adonis analysis on the effect of treatment over time. The variation due to differences between sampling events was taken into account by the "strata = time" argument in the model. Df = degrees of freedom; F model = F statistic of the respective sub model.

	Df	Sums of Squares	F Model	R <sup>2</sup>	Pr(>F)	
Site (time)	3	0.82	1.89	0.34	0.003	***
Bti Treatment	1	0.30	2.05	0.12	0.02	*
Site (time) : Bti-Treatment	2	0.13	0.90	0.05	0.45	
Residuals	8	1.15		0.48		
Total	13	2.40		1.00		

## Discussion

### Using metabarcoding data for chironomid diversity assessment

With our metabarcoding approach we detected 54 chironomid OTUs across all study sites, of which almost 70% could be identified to species level using the BOLD database. Even though we did not have a specific reference database for our study system (e.g. Carew et al. 2013), we have mainly extracted biogeographically and ecologically meaningful species names as many of these species are frequently found in periodically desiccative ponds as euryoecious ubiquitous (e.g., *Ablabesmyia monilis*, *Acricotopus lucens*, *Chironomus riparius*, *Corynoneura scutellata*, *Cricotopus sylvestris*, *Limnophyes pentaplastus*, *Paratendipes albimanus*, *Polypedilum uncinatum*, *Psectrotanypus varius* and *Tanytarsus pallidicornis*). Despite selecting only chironomid specimens for metabarcoding, also non-chironomid OTUs (N = 35; 39.3%) were detected in low abundancies (Suppl. material 4). These records included other Dipterans (N = 14; 15.7%), Trichopterans (N = 2; 2.2%), Lepidopterans (N = 2; 2.2%), Arachnids (Pionidae: N = 6; 6.7%), Fungi (Sporidiobolales, N = 2, Eurotiales, N = 1, Tremellales, N = 1 and Microstromatares, N = 1; 5.6% in total) and Bacteria (Rickettsia: N = 1; 1.1%). In addition, OTUs without hit in the BOLD-database (N = 6; 6.7%) were detected. However, the presence of other taxa in the data is most likely related to the universality of the primer pair used, which could have amplified traces of other taxa previously stored in the same collection tubes, thus causing the large number of low level OTUs detected. Previous experiences show that low abundance OTUs are often derived from PCR or sequencing errors as well as chimeras and non-target DNA of small organisms (Elbrecht and Leese 2015, 2017, Elbrecht et al. 2017). As DNA was extracted from tissue bulk samples, eDNA and small non-target specimens are not of interest for this study. Thus, the data was not further analyzed. It should also be noted that the lower the OTU abundance is the more there are stochastic effects between samples, making it difficult to analyze OTUs with very low abundance.

For 11 OTUs we retrieved more than one species name with a sequence similarity of 97.82–100 % (Suppl. material 4). This could indicate 1) limited taxonomic resolution of the short fragment amplified by the used primer set, producing only 322 bp COI fragments opposed to the 658 bp COI fragments using the classical Folmer primers (Folmer 1994); 2) different taxonomic keys used thus having different synonyms included; or 3) potential taxonomic misidentification which are also discussed in (Elbrecht et al. 2017) who recommend better data curation in taxonomic databases. In contrast, six chironomid species names were retrieved from two or three different OTUs, respectively, and two OTUs (45, 29) were assigned to questionable species names due to their biogeography (*Procladius cf. fuscus* and *C. curabilis*, Table 1). This could suggest

cryptic intraspecific diversity, as we used a species divergence rate of 3% which might be too low for some species (Ekrem et al. 2007, Carew et al. 2013). As little is known about the genetic lineage of Chironomidae, cryptic species or variable phenotypes could be possible and hinder the correct identification by taxonomist (Anderson et al. 2013, Carew et al. 2007, Stur and Ekrem 2011).

The information benefit of metabarcoding by obtaining species names strongly depends on the quality of the database. For 17 chironomid OTUs (31.5%) no species identification could be obtained (Suppl. material 4). BOLD holds 270,292 published records of Chironomidae forming 5,540 BINs (clusters) with specimens from 49 countries. Of these records (accessed on 14.07.2017), 100,231 have species names, and represent 1,233 species for an estimated species diversity of 15,000 worldwide (Armitage et al. 1995). For Germany, with an estimated species richness of approx. 700 different Chironomidae (Samietz 1996), BOLD has 3,706 published records forming 217 BINs (clusters). Of these records (accessed on 14.07.2017), 3,683 have species names, representing only 208 species (around 30%). Metabarcoding can only be as good as the database on which it relies for OTU matching to species identifications. We thus encourage experienced chironomid taxonomists to increase the number chironomid species in the BOLD database to even improve the effectiveness of metabarcoding for chironomid diversity assessments.

By applying metabarcoding we obtained 70% more chironomid species identifications than would have been possible based on traditional taxonomic determination of larval samples (Table 1), thus proving the usefulness of metabarcoding for chironomid diversity assessment. Some of our retrieved species are indicators for high water quality and were previously detected in spring biotopes, such as *Acricotopus lucens*, *Chironomus luridus*, *Dicrotendipes lobiger*, *Limnophyes minimus*, *Limnophyes pentaplastus*, *Psectrocladius limbatellus*, *Psectrotanypus varius* and *Tanytarsus usmaensis* (Reiff et al. 2015), suggesting a general good water quality of our study sites. Only seven of those species can be determined based on larval morphology (Table 1). Even though various determination keys for larval and adult chironomids exist, not all taxa can be determined to species level even by experts (Kranzfelder et al. 2016). Especially larvae and female midges are almost impossible to determine morphologically, since often male genitals are necessary to distinguish species. Some chironomid species have a parthenogenetic life cycle (e.g. *Paratanytarsus grimmi*, Langton 1988), so only females occur especially in temporary wetlands (Dettinger-Klemm 2003). Without determination of all occurring chironomids, including females, around 27% of the species diversity could be lost (Ekrem et al. 2010). Even if morphology enables the determination down to genus level, an ecological interpretation is difficult since chironomid species of the same genus might have very dissimilar ecological preferences Milošević et al. (2013).



The saprobic index per site based on 14 chironomid species and their sequence abundancies ranged from 1.3 (control site) to 3.3 in one of the Bti treated sites (Table 2). Due to the demanding morphological chironomid species determination, it is common practise to exclude chironomids from bioassessment programs (Milošević et al. 2013). However, in standard water quality assessments in Germany sometimes only all red chironomid larvae are counted, summarized as *Chironomus spec.* and included in the saprobic index with a value around 3.5. Considering the high chironomid diversity and the range of saprobic values for chironomids between 0.8 (very good water quality) and 3.5 (bad water quality), the standard water quality assessment would have resulted in a severe underestimation of the studied water bodies due to the presence of *C. riparius*. In addition to the difficult morphological determination, small chironomid larvae (< 1 mm) from freshly hatched species can be easily overlooked by larvae picking. Thus, a metabarcoding approach based on water and homogenized sediment samples could be highly useful for future application in water quality assessments by increasing the chironomid diversity in a sample without specialised taxonomic expertise needed (Bista et al. 2017).

The advantages of metabarcoding over traditional monitoring for water quality assessments is gaining increasing attention. Since Haase et al. 2010) postulated the overlooking of many taxa in traditional stream monitoring programs, many studies proved that metabarcoding can provide higher numbers and more accurate taxonomic identifications than morphology-based methods for many freshwater macroinvertebrates (Hajibabaei et al. 2011, Carew et al. 2013, Elbrecht and Leese 2015, Elbrecht et al. 2017). Moreover, barcoding has increased for rapid biodiversity assessment and biomonitoring for many terrestrial taxa (Yu et al. 2012, Taberlet et al. 2012, Brehm et al. 2013). Ji et al. (2013) compared metabarcoded samples of arthropods and birds with standard biodiversity data sets, and found that the genetic data sets were taxonomically more comprehensive, quicker to produce and less reliant on taxonomic expertise. Cristescu (2014) raised the urge for a coordinated progression of species barcoding that integrates taxonomic expertise and genetic data. For the family Chironomidae an extended and reliably curated barcode database (analogous to the Trichoptera Barcode of Life Database, Zhou et al. 2016) would be highly useful for integrating chironomids in standard freshwater biomonitoring which enhance water quality assessments and might lead to better management of aquatic ecosystems.

### Bti effects on chironomid community composition

In our study sites we could show that a considerable number of chironomids live in these wetlands subjected to mosquito control. The uptake and the mode of action of Bti is similar for mosquitos and chironomids (Ali et al. 1981). Regarding potential effects of mosquito control

actions using the biocide Bti we expected an overall reduction in chironomid abundance in the Bti-treated sites as well as a reduction in species richness and resulting community composition changes.

The chironomid abundance until WAA 4 was significantly reduced by almost 65% in the Bti-treated sites compared to the Bti-untreated sites, including the never Bti-treated control site. At the control site this spring peak was especially pronounced, indicating that WAA 4 (here: begin of May) is a key time period for the overall chironomid emergence in this area. The observed abundance reduction can be explained by the recent Bti treatment, which killed not only the mosquito larvae but also the chironomid larvae, predominantly affecting freshly hatched larvae. Especially first instar larvae of *C. riparius* were shown to be highly affected by Bti in laboratory experiments while older larvae were less sensitive (Kästel et al. 2017). Until WAA 13 there was a non-significant trend towards more chironomids in the Bti-treated sites, which could be due to a reduced mosquito competition (Lundström et al. 2010) and subsequently chironomids with a second reproductive cycle in the same year had better conditions (more food resources available) to reproduce. Moreover, species have different egg laying and hatching times, and Bti does not affect eggs but only hatched individuals (Boisvert and Boisvert 2000). The species richness, however, was not significantly different between Bti-treated and untreated sites, neither on OTU-level, accounting for potential cryptic species diversity, nor on species level. The Bti-treatment thus seems to have a mainly quantitative effect on the abundance of the species present in the communities, which is stronger shortly after application during the main chironomid emergence peak in spring.

The adonis analysis corroborated the assumption that site and time (seasonality) had a dominant effect on chironomid communities (Table 3). The predominant effect of site can be explained by the study sites different vegetation (grassland, alder carr, oak carr and pine forest) which influences species composition by varying substrate availability, water chemistry, and the availability of nutritional resources (Van Den Brink and Van Der Velde 1991). Thus, it is not feasible to directly compare the chironomid species composition on the never Bti-treated control site (CL) and the Bti-treated sites (S, G and M) among each other since the vegetational surroundings are quite different and so is the species composition (see Table 2). Note, however, that it is hardly possible to find a “true” control site in the Upper Rhine Valley, i.e., a wetland which has never been treated with Bti next to wetlands subject to mosquito control. In this study we have therefore compared four different study sites, three of which have been subject to mosquito control with Bti.

Even though site and time influenced species composition the most, the first year of Bti intermittence significantly altered the chironomid community as well. This Bti effect was rather low (12%, Table 3). However, considering the more than 20 years of continued Bti application in

the study area each spring (in some years even several applications per season) and the proven toxic effect of Bti on chironomid first instar larvae (Kästel et al. 2017), we can assume a more or less depleted community in terms of chironomid diversity. As dispersal for adult chironomids from the next Bti-untreated areas might take too long given the reduced flight capacities (Armitage et al. 1995), a recolonization of univoltine species would probably need longer than one season intermitting Bti treatment. Therefore, resilience in terms of significantly increased species richness may even only be expected after several seasons intermitting of the Bti treatment. This highlights the importance for follow-up studies at the sites.

## Conclusions

We showed the effectiveness of metabarcoding for chironomid diversity assessments, which led to a 70% increase in species determination compared to determination based on larval morphology. Thus, metabarcoding improves data quality by generating taxonomic resolution. Regarding the question of non-target effects of Bti on the chironomid community, our study found only minor significant effects even though Bti reduced the chironomid emergence by 65%. This could be due to a time lag of chironomid recolonization, since the study year was the first year of Bti intermittence after around 20 years of Bti application in the study area. A follow-up study after a few years of Bti intermittence could result in a more obvious recovery of the chironomid community composition in the Bti-untreated temporary wetlands.

## Acknowledgements

This work has been financed by the Ministerium für Wissenschaft, Weiterbildung und Kultur Rheinland-Pfalz, Germany, in the frame of the programme “Research initiative”, project AufLand. We are grateful to the representatives of the town Neustadt an der Weinstrasse and to the Stiftung Natur und Umwelt Rheinland-Pfalz for supporting this project ideally and financially. FL and VE are supported by the EU COST (European Cooperation in Science and Technology) Action DNAqua-Net (CA15219). We thank Martin Spies, Zoologische Staatssammlung München, for advices with questionable species and Christoph Leeb for generating the map of the study sites. Furthermore, we would like to thank Torbjørn Ekrem, Iliana Bista and Kristy Deiner for valuable comments substantially improving this manuscript.

**Authors' contributions:** Sampling: AK, SA; Laboratory work: AK, VE; Bioinformatic data analyses: VE; Biological data analyses: KT, AK, JM, SM; Multivariate statistics: SIS; Study design and supervision: KT; CB; FL; Manuscript writing: KT; AK; equal contribution.

All authors edited and commented on the manuscript draft.

## References

- Ali A, Baggs RD, Stewart JP (1981) Susceptibility of some Florida chironomids and mosquitoes to various formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Journal of Economic Entomology* 74: 672–677. <https://doi.org/10.1093/jee/74.6.672>
- Aljanabi S, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25 (22): 4692–4693. <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
- Anderson AM, Stur E, Ekrem T (2013) Molecular and morphological methods reveal cryptic diversity and three new species of Nearctic Micropsectra (Diptera: Chironomidae). *Freshwater Science* 32 (3): 892–921. <https://doi.org/10.1899/12-026.1>
- Anderson M (2001) Permutation tests for univariate or multivariate analysis of variance and regression. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*. <https://doi.org/10.1139/cjfas-58-3-626>
- Armitage PD, Cranston PS, Pinder LC (1995) *The Chironomidae: Biology and Ecology of Non-Biting Midges*. Chapman and Hall, London. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-0715-0>
- Batzer D, Boix D (Eds) (2016) *Invertebrates in Freshwater Wetlands: An International Perspective on Their Ecology*. Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24978-0>
- Becker N (1998) The use of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) against mosquitoes, with special emphasis on the ecological impact. *Israel Journal of Entomology* 63–69.
- Biggs J, Williams P, Whitfield M, Nicolet P, Weatherby A (2005) 15 years of pond assessment in Britain: results and lessons learned from the work of Pond Conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 15: 693–714. <https://doi.org/10.1002/aqc.745>
- Bista I, Carvalho G, Walsh K, Seymour M, Hajibabaei M, Lallias D, Christmas M, Creer S (2017) Annual time-series analysis of aqueous eDNA reveals ecologically relevant dynamics of lake ecosystem biodiversity. *Nature Communications* 8: 14087. <https://doi.org/10.1038/ncomms14087>
- Boisvert M, Boisvert J (2000) Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on target and nontarget organisms: a review of laboratory and field experiments. *Biocontrol Science and Technology* 10 (5): 517–561. <https://doi.org/10.1080/095831500750016361>
- Brehm G, Strutzenberger P, Fielder K (2013) Phylogenetic diversity of geometrid moths decreases with elevation in the tropical Andes. *Ecography* 36: 1247–1253. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2013.00030.x>
- Carew M, Pettigrove V, Cox R, Hoffmann A (2007) The response of Chironomidae to sediment pollution and other environmental characteristics in urban wetlands. *Freshwater Biology* 52 (12): 2444–2462. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01840.x>
- Carew M, Pettigrove V, Metzeling L, Hoffmann A (2013) Environmental monitoring using next generation sequencing: rapid identification of macroinvertebrate bioindicator species. *Frontiers in Zoology* 10: 45. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-45>
- Cristescu M (2014) From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: Towards an integrative approach to the study of global biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution* 29 (10): 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.08.001>
- Dettinger-Klemm P-A (2003) *Chironomids (Diptera, Nematocera) of temporary pools - an ecological case study*. PhD Thesis, University Heidelberg, Heidelberg.

- Edgar RC (2013) UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods* 10: 996–998. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>
- Ekrem T, Stur E, Hebert P (2010) Females do count: documenting Chironomidae (Diptera) species diversity using DNA barcoding. *Organisms Diversity and Evolution* 10: 397–408. <https://doi.org/10.1007/s13127-010-0034-y>
- Ekrem T, Willassen E, Stur E (2007) A comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 530–542. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.11.021>
- Elbrecht V, Leese F (2015) Can DNA-based ecosystem assessments quantify species abundance? Testing primer bias and biomass - sequence relationships with an innovative metabarcoding protocol. *PLoS One* 10 (7): e0130324. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130324>
- Elbrecht V, Leese F (2017) Validation and development of COI metabarcoding primers for freshwater macroinvertebrate bioassessment. *Frontiers in Environmental Sciences* 5: 1–16. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2017.00011>
- Elbrecht V, Vamos EE, Meissner K, Aroviita J, Leese F (2017) Assessing strengths and weaknesses of DNA metabarcoding-based macroinvertebrate identification for routine stream monitoring. *Methods in Ecology and Evolution* 8 (10): 1265–1275. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12789>
- Ferrington L (2008) Global diversity of non-biting midges (Chironomidae; Insecta-Diptera) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 447–455. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8259-7\\_45](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8259-7_45)
- Folmer O (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294–299.
- Gibson J, Shokralla S, Curry C, Baird D, Monk W, King I, Hajibabaei M (2015) Large-scale biomonitoring of remote and threatened ecosystems via high-throughput sequencing. *PLoS One* 10 (10): e0138432. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138432>
- Haase P, Pauls S, Schindehütte K, Sundermann A (2010) First audit of macroinvertebrate samples from an EU Water Framework Directive monitoring program: human error greatly lowers precision of assessment results. *Journal of the North American Benthological Society* 29 (4): 1279–1291. <https://doi.org/10.1899/09-183.1>
- Hajibabaei M, Shokralla S, Zhou X, Singer GG, Baird D (2011) Environmental Barcoding: A Next-Generation Sequencing Approach for Biomonitoring Applications Using River Benthos. *PLoS One* 6 (4): e17497. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017497>
- Hebert PN, Ratnasingham S, de Waard J (2003) Barcoding Animal Life: Cytochrome c Oxidase Subunit I Divergences among Closely Related Species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 270: 96–99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Hershey A, Shannon L, Axler R, Ernst C, Mickelson P (1995) Effects of methoprene and *Bti* (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) on non-target insects. *Hydrobiologia* 308: 219–227. <https://doi.org/10.1007/BF00006873>
- Jakob C, Poulin B (2016) Indirect effects of mosquito control using Bti on dragonflies and damselflies (Odonata) in the Camargue. *Insect Conservation and Diversity* 9: 161–169. <https://doi.org/10.1111/icad.12155>
- Ji Y, Ashton L, Pedley S, Edwards D, Tang Y, Nakamura A, Kitching R, Dolman P, Woodcock P, Edwards F, Larsen T, Hsu W, Benedick S, Hamer K, Wilcove D, Bruce C, Wang X, Levi T, Lott M, Emerson B, Yu D (2013) Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecology Letters* 16: 1245–1257. <https://doi.org/10.1111/ele.12162>
- Kästel A, Allgeier S, Brühl C (2017) Decreasing *Bacillus thuringiensis israelensis* sensitivity of *Chironomus riparius* larvae with age indicates potential environmental risk for mosquito control. *Scientific Reports* 7: 13565. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14019-2>
- Kranzfelder P, Ekrem T, Stur E (2016) Trace DNA from insect skins: a comparison of five extraction protocols and direct PCR on chironomid pupal exuviae. *Molecular Ecology Resources* 16 (1): 353–363. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12446>
- Kwong S, Srivathsan A, Meier R (2012) An update on DNA barcoding: low species coverage and numerous unidentified sequence. *Cladistics* 28: 639–644. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2012.00408.x>
- Lagadic L, Schäfer RB, Roucaute M, Szöcs E, Chouin S, de Maupeou J, Duchet C, Franquet E, Hunsec B, Bertrand C, Fayolle S, Francés B, Rozier Y, Foussadier R, Santoni J, Lagneau C (2016) No association between the use of Bti for mosquito control and the dynamics of non-target aquatic invertebrates in French coastal and continental wetlands. *Science of The Total Environment* 553: 486–494. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.096>
- Langton PH (1988) The parthenogenetic midge of water supply systems, *Paratanytarsus grimmii* (Schneider) (Diptera: Chironomidae). *Bulletin of Entomological Research* 78: 317–328. <https://doi.org/10.1017/S0007485300013080>
- Legendre P, Legendre L (2012) Numerical ecology. Elsevier, Amsterdam.
- Liber K, Schmude K, Rau D (1998) Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to chironomids in pond mesocosms. *Ecotoxicology* 7: 343–354. <https://doi.org/10.1023/A:1008867815244>
- Lindgaard C, Brodersen K (1995) Distribution of Chironomidae (Diptera) in the river continuum. In: Cranston P (Ed.) Chironomids: from genes to ecosystems. CSIRO, Melbourne, 257–271 pp.
- Lukács B, Sramkó G, Molnár A (2013) Plant diversity and conservation value of continental temporary pools. *Biological Conservation* 158: 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.08.024>
- Lundström J, Schäfer M, Petersson E, Persson-Vinnersten T, Landin J, Brodin Y (2010) Production of wetland Chironomidae (Diptera) and the effects of using *Bacillus thuringiensis israelensis* for mosquito control. *Bulletin of Entomological Research* 100 (01): 117–125. <https://doi.org/10.1017/S0007485309990137>
- Milošević D, Simić V, Stojković M, Čerba D, Mančev D, Petrović A, Paunović M (2013) Spatio-temporal pattern of the Chironomidae community: Toward the use of non-biting midges in bioassessment programs. *Aquatic Ecology* 47 (1): 37–55. <https://doi.org/10.1007/s10452-012-9423-y>
- Moog O (1995) Fauna Aquatica Austriaca. Wasserwirtschaftskataster, Bundesministerium f. Land- und Forstwirtschaft, Wien.
- Moog O (2002) Fauna Aquatica Austriaca, Katalog zur autökologischen Einstufung aquatischer Organismen Österreichs. Wasserwirtschaftskataster, Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft, Wien.
- Niemi G, Hershey A, Shannon L, Hanowski J, Lima A, Axler R, Regal R (1999) Ecological effects of mosquito control on zooplankton, insects, and birds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18 (3): 549–559. <https://doi.org/10.1002/etc.5620180325>
- Oksanen FGB, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlenn D, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solyomos P, Stevens MHH, Szöcs E,

- Wagner H (2016) vegan: Community Ecology Package. R package. 2.4-1. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Pfützner W, Beck M, Weitzel T, Becker N (2015) The role of mosquitoes in the diet of adult dragon and damselflies (Odonata). *Journal of American Mosquito Control Association* 31 (2): 187–189. <https://doi.org/10.2987/14-6476R>
- Ping L, Wen-Ming Z, Shui-Yun Y, Jin-Song Z, Li-Jun L (2005) Impact of environmental factors on the toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* ips82 to *Chironomus kiiensis*. *Journal of American Mosquito Control Association* 21: 59–63. [https://doi.org/10.2987/8756-971X\(2005\)21\[59:IOEFOT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2987/8756-971X(2005)21[59:IOEFOT]2.0.CO;2)
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, Team RC (2016) nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package. 3.1-128. <http://CRAN.R-project.org/package=nlme>
- Poulin B, Levebre G, Paz L (2010) Red flag for green spray: adverse trophic effects of *Bti* on breeding birds. *Journal of Applied Ecology* 47 (4): 884–889. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2010.01821.x>
- Puntí T, Rieradevall M, Prat N (2009) Environmental factors, spatial variation, and specific requirements of Chironomidae in Mediterranean reference streams. *Journal of the North American Benthological Society* 28: 247–265. <https://doi.org/10.1899/07-172.1>
- Ratnasingham S, Hebert P (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Molecular Ecology Notes* 7: 355–364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x>
- Raunio J, Heino J, Paasivirta L (2011) Non-biting midges in biodiversity conservation and environmental assessment: findings from boreal freshwater ecosystems. *Ecological Indications* 11: 1057–1064. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2010.12.002>
- Reiff N, Michiels S, Reusch H, Wagner R, Gerecke R (2015) Die Dipteren-Fauna der Kleingewässer im Bergrutschgebiet Hirschkopf bei Mössingen (Landkreis Tübingen, Baden-Württemberg), unter besonderer Berücksichtigung der Chironomidae. *Lauterbornia* 80: 1057–1064.
- Rodcharoen J, Mulla M, Chaney J (1991) Microbial larvicides for the control of nuisance aquatic midges (Diptera: Chironomidae) inhabiting mesocosms and man-made lakes in California. *Journal of the American Mosquito Control Association* 7 (1): 56–62.
- Rossaro B, Lencioni V, Boggero A, Marziali L (2006) Chironomids from Southern Alpine running waters: ecology, biogeography. *Hydrobiologia* 562: 231–246. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-1813-x>
- Samietz R (1996) Kommentiertes Verzeichnis der auf dem Gebiet der Bundesrepublik Deutschland nachgewiesenen Chironomiden-Arten (Insecta; Diptera). *Abhandlungen und Berichte des Museums der Natur Gotha* 19: 36–70.
- Stav G, Blaustein L, Margalit Y (2005) Individual and interactive effects of a predator and con-trophic species on mosquito populations. *Ecological Applications* 15 (2): 587–598. <https://doi.org/10.1890/03-5191>
- Sæther OA (1979) Chironomid communities as water quality indicators. *Ecography* 2 (2): 65–74. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.1979.tb00683.x>
- Stur E, Ekrem T (2011) Exploring unknown life stages of Arctic Tanytarsini (Diptera: Chironomidae) with DNA barcoding. *Zootaxa* 2743: 27–39.
- Sweeney B, Battle J, Jackson J, Dapkey T (2011) Can DNA barcodes of stream macroinvertebrates improve descriptions of community structure and water quality? *Journal of the North American Benthological Society* 30: 195–216. <https://doi.org/10.1899/10-016.1>
- Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Brochmann C, Willerslev E (2012) Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 21 (8): 2045–2050. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x>
- Treverrow N (1985) Susceptibility of *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae) to *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*. *Journal of the Australian Entomological Society* 303–304. <https://doi.org/10.1111/j.1440-6055.1985.tb00248.x>
- Van Den Brink FWB, Van Der Velde B (1991) Macrozoobenthos of floodplain waters of the rivers rhine and meuse in the Netherlands: A structural and functional analysis in relation to hydrology. *River Research and Applications* 6 (4): 265–277. <https://doi.org/10.1002/rrr.3450060405>
- Vaughan IP, Newberry C, Hall DJ, Liggett JS, Ormerod SJ (2008) Evaluating large-scale effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on non-biting midges (Chironomidae) in a eutrophic urban lake. *Freshwater Biology* 53 (10): 2117–2128. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.02043.x>
- Venables WN, Ripley BD (2002) *Modern Applied Statistics with R*. 4. Springer, NY. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-21706-2>
- Williams D (2006) *The biology of temporary waters*. Oxford University Press, Oxford.
- Yiallourou M, Storch V, Becker N (1999) Impact of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on larvae of *Chironomus thummi thummi* and *Psectrocladius psilopterus* (Diptera: Chironomidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 74: 39–47. <https://doi.org/10.1006/jjipa.1999.4852>
- Yu D, Ji Y, Emerson B, Wang X, Ye C, Yang C, Ding Z (2012) Biodiversity soup: Metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods in Ecology and Evolution* 3 (4): 613–623. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00198.x>
- Zhou X, Frandsen P, Holzenthal R, Beet C, Bennett K, Blahnik R, Bonada N, Cartwright D, Chuluunbat S, Cocks G, et al. (2016) The Trichoptera barcode initiative: a strategy for generating a species-level Tree of Life. *Philosophical Transactions B* 371: 20160025. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0025>

### Supplementary material 1

#### Sample ID, specimen number, DNA and amplicon concentrations, primer combination, number of PCR cycles and final volumn for library preparation

Authors: Kathrin Theissinger, Anna Kästel, Vasco Elbrecht, Jenny Makkonen, Susanne Michiels, Susanne I. Schmidt, Stefanie Allgeier, Florian Leese and Carsten Brühl

Data type: excel table

Copyright notice: This dataset is made available under the Open Database License (<http://opendatacommons.org/licenses/odbl/1.0/>). The Open Database License (ODBL) is a license agreement intended to allow users to freely share, modify, and use this Dataset while maintaining this same freedom for others, provided that the original source and author(s) are credited.

Link: <https://doi.org/10.3897/mbmg.2.21060.suppl1>

**Supplementary material 2****Bioinformatic pipeline**

Authors: Vasco Elbrecht

Data type: R scripts

Copyright notice: This dataset is made available under the Open Database License (<http://opendatacommons.org/licenses/odbl/1.0/>). The Open Database License (ODbL) is a license agreement intended to allow users to freely share, modify, and use this Dataset while maintaining this same freedom for others, provided that the original source and author(s) are credited.

Link: <https://doi.org/10.3897/mbmg.2.21060.suppl2>

**Supplementary material 3****Number of specimens per sample as a function of the number of sequences per sample**

Authors: Kathrin Theissinger, Anna Kästel, Vasco Elbrecht, Jenny Makkonen, Susanne Michiels, Susanne I. Schmidt, Stefanie Allgeier, Florian Leese and Carsten Brühl

Data type: Text and Figure

Copyright notice: This dataset is made available under the Open Database License (<http://opendatacommons.org/licenses/odbl/1.0/>). The Open Database License (ODbL) is a license agreement intended to allow users to freely share, modify, and use this Dataset while maintaining this same freedom for others, provided that the original source and author(s) are credited.

Link: <https://doi.org/10.3897/mbmg.2.21060.suppl3>

**Supplementary material 4****OTU table**

Authors: Kathrin Theissinger, Anna Kästel, Vasco Elbrecht, Jenny Makkonen, Susanne Michiels, Susanne I. Schmidt, Stefanie Allgeier, Florian Leese and Carsten Brühl

Data type: excel spread sheet

Copyright notice: This dataset is made available under the Open Database License (<http://opendatacommons.org/licenses/odbl/1.0/>). The Open Database License (ODbL) is a license agreement intended to allow users to freely share, modify, and use this Dataset while maintaining this same freedom for others, provided that the original source and author(s) are credited.

Link: <https://doi.org/10.3897/mbmg.2.21060.suppl4>