

II. Gaschromatographische und massenspektrometrische Untersuchungen zur chemischen Zusammensetzung von Bienenwachsen

II.1. Einleitung

Die Wachse spielen im Leben der Honigbienen verschiedene wichtige Rollen. Wabenwachse dienen zur Aufzucht der Brut und als Speicher für Pollen und Honig. Kutikulawachse minimieren den Wasserverlust über die Kutikula und schützen die Bienen vor Mikroorganismen, Parasiten und Räufern (Buckner 1993). Bienenwachse spielen weiterhin eine wichtige Rolle bei der chemischen Kommunikation der Honigbienen: Kutikulawachse besitzen Erkennungsschlüssel in Bezug auf die Verwandtschaft und die Nestzugehörigkeit der Bienen. Wabenwachse vermitteln Erkennungsschlüssel für Nestgenossen, die auf die Bienen übertragen und unter den Bienen ausgetauscht werden (Breed et al. 1995a). Der Kontakt der Bienen zum Wabenwachs des Stockes ist auch bei der Etablierung von Schlüsseln zur Verwandtenerkennung von Bedeutung (Breed et al. 1998). Der Austausch von Wachsen oder Wachsbestandteilen zwischen der Waben- und der Kutikulaoberfläche deutet darauf hin, daß ein Wabenwachs-Kutikulawachs-Kontinuum im Stock existiert, welches als Vermittler bei der chemischen Kommunikation der Honigbienen im Stock dient. Dieses Wachskontinuum kann auch als Träger von lipophilen Pheromonen und Düften dienen. Pheromone würden, aufgenommen im Wachs oder auf gewisse Bereiche der Waben aufgetragen, in der Lage sein, viele verschiedene Vorgänge im Stock zu regeln (Free 1987, Kapitel I.5.).

Der Tanzboden stellt einen speziellen Bereich auf den Waben dar, der zur Kommunikation zwischen Tänzerinnen und Nachfolgerinnen und zur Rekrutierung von Nestgenossinnen dient (Tautz und Lindauer 1997). Damit es überhaupt zu einem Zusammentreffen von Tänzerinnen und Nachfolgerinnen kommt, muß dieser Tanzboden von den Bienen erkannt werden, also auf irgendeine Art und Weise markiert sein. Selbst wenn die Lage des Tanzbodens im Stock experimentell verändert wird, so finden die Bienen trotzdem den Tanzboden wieder (Tautz und Lindauer 1997). Als Markierung des Tanzbodens kämen einerseits vibratorische, also mechanische Eigenschaften in Betracht, aber auch chemische Markierungen, sei es durch die chemische Zusammensetzung des Tanzbodenwachses selbst, durch ein Pheromon oder rein passiv durch die eingetragenen Blütendüfte.

Eine wichtige Voraussetzung für Versuche zu den Interaktionen zwischen Pheromonen oder Düften und Waben- bzw. Kutikulawachsen ist, die chemische Zusammensetzung der Wachse, die in diesen Interaktionen eine Rolle spielen könnten, zu kennen und unterscheiden zu können. Dafür wurden Wabenwachse verschiedener Altersstufen, Tanzbodenwachs und

Kutikulawachse verschiedener Kasten, Geschlechter und Berufsgruppen der Honigbiene *Apis mellifera carnica* Pollm. auf ihre chemischen Bestandteile hin analysiert.

Es gibt einige Untersuchungen zu der chemischen Zusammensetzung von Waben- und Kutikulawachsen (Stransky und Streibl 1971, Stransky et al. 1971, Tulloch 1971, Tulloch 1980, Blomquist et al. 1980, Francis et al. 1989, Hepburn 1996), aber diese Studien wurden mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt, was keinen direkten quantitativen und qualitativen Vergleich der chemischen Zusammensetzung der Wachse zulässt. Es gibt keine Untersuchung, welche die verschiedenen Alterstufen des Wabenwachses oder verschiedene Bereiche der Waben im Stock berücksichtigt und keinen direkten Vergleich von Kutikulawachsen unterschiedlicher Kasten, Geschlechter und Berufsgruppen. Die meisten Untersuchungen, die sich mit Kutikulawachsen beschäftigen, konzentrieren sich auf die Kohlenwasserstoffe und ignorieren die polareren Bestandteile des Wachses. Und es gibt nur wenige Angaben über die chemische Zusammensetzung von Drohnen-Kutikulawachs. (McDaniel et al. 1984, Francis et al. 1985, Arnold et al. 1996)

Um ein Serie von miteinander vergleichbaren Daten über die chemische Zusammensetzung der oben genannten Wachse zu erhalten, wurden Waben- und Kutikulawachse von Bienen mit Hilfe einer Standard-Analysetechnik, die zunächst für die Analyse von Pflanzenkutikulawachsen entwickelt wurde (Riederer und Markstädter 1996), untersucht. Anschließend wurden diese Daten einer statistischen Analyse unterworfen, um ein Werkzeug für die Klassifikation der Wachse zu erhalten.

II.2. Material und Methoden

II.2.1. Wabenwachs unterschiedlicher Altersklassen. Wabenwachsproben wurden im Oktober 1996 aus einer Beute mit 20 Rahmen entnommen. Das Wachs wurde aus Rahmen bekannten Alters herausgeschnitten. Drei verschiedene Altersstufen wurden beprobt: Wabenwachs im Alter von einer Woche (junges Wachs), im Alter von 2-3 Jahren (mittelaltes Wachs) und im Alter von 8-10 Jahren (altes Wachs). Wachsschuppen wurden vom Boden derselben Beute gesammelt.

II.2.2. Tanzbodenwachs. Um Tanzbodenwachs zu gewinnen, wurden Sammlerinnen eines Beobachtungsstockes mit 2 Rahmen auf eine unbeduftete Futterquelle mit 2-molarer Glucoselösung dressiert. Die Futterquelle befand sich 110 m nach Süden vom Stock entfernt, insgesamt wurden 51 Sammlerinnen markiert. Die markierten Bienen tanzten in einem Bereich von 15 cm auf 10 cm direkt neben dem Stockeingang (Tanzboden)(Abb. II.1).

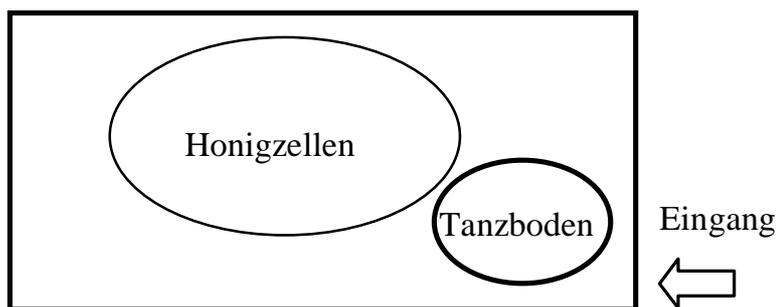


Abb. II.1: Tanzboden und Honigzellen auf einem Rahmen des Beobachtungsstockes.

Am Tag der Probenahme wurden von 9.30 Uhr bis 13.45 Uhr ca. 70 Tänze auf dem Tanzboden beobachtet. Direkt anschließend wurde Tanzbodenwachs aus der Mitte des betanzten Bereiches und Nicht-Tanzbodenwachs aus dem Bereich der Honigzellen desselben Beobachtungsstockes entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die unterschiedlichen Wabenwachs wurden in Chloroform (CHCl_3 , Reinheit $> 99,9\%$, Roth, Karlsruhe) mit einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst.

II.2.3. Kutikulawachs unterschiedlicher Kasten und Geschlechter. Für die Gewinnung der Kutikulawachs unterschiedlicher Kasten und Geschlechter wurden Innendienstbienen Ende September im Alter von 20 Tagen und Drohnen unterschiedlichen Alters im Sommer aus einer 20-Rahmen-Beute abgefangen. Nichtbegattete, 1-2 Tage alte Königinnen stammten aus der Königinnenzucht der Bienenstation der Universität Würzburg. Die Bienen wurden sofort

nach dem Abfangen in flüssigem Stickstoff (N₂) getötet und bis zur weiteren Verarbeitung bei – 18 °C aufbewahrt.

II.2.4. Kutikulawachse unterschiedlicher Berufsgruppen. Um ein Volk von gleich alten Bienen zu erhalten, wurden Jungbienen, die innerhalb einer Woche im Brutschrank bei 35 °C geschlüpft waren, in einen Beobachtungsstock mit 2 Rahmen eingesetzt. Nach 2 Wochen hatten sich in diesem Jungvolk Berufsgruppen gebildet. Daraufhin wurden Sammlerinnen, Innendienstbienen und Hofstaatbienen, die einen Altersunterschied von maximal einer Woche aufwiesen, aus diesem Beobachtungsstock abgefangen, in flüssigem Stickstoff getötet und bei – 18 °C aufbewahrt.

Die Kutikulawachse wurden durch Waschen einzelner Bienen in Chloroform bei Raumtemperatur für 30 Sekunden gewonnen. Unter einem leichten Stickstoffstrom wurden die Wachslösungen auf eine Konzentration von ungefähr 1 mg / ml eingeeengt.

Vorversuche zeigten, daß bei längerem Waschen zusätzlich Sterole in der Wachslösung waren. Dies bedeutete, daß zusätzlich Substanzen aus der Hämolymphe gewaschen worden waren. Damit wurde die tatsächliche Zusammensetzung der Kutikulawachse verfälscht, da in der Hämolymphe ebenfalls Kohlenwasserstoffe vorkommen (Francis et al. 1989).

II.2.5. Aufbereitung von Wabenwachsen unterschiedlicher Altersstufen und Kutikulawachsen unterschiedlicher Kasten und Geschlechter. Mit Hilfe einer Festphasenextraktion, die bei Naß et al. (1998) ausführlich beschrieben ist, wurden vier Fraktionen der Wachse durch Elution mit Hexan (Reinheit >99%, Roth, Karlsruhe), Isopropylchlorid (Reinheit >99,5%, Fluka, Deisenhofen), Diethylether (Reinheit >99,5%, Merck, Darmstadt) und einer Mischung aus CHCl₃, Methanol (Reinheit >99,9%, Roth, Karlsruhe) und destilliertem Wasser (13:5:1) gewonnen.

II.2.6. Aufbereitung von Tanzbodenwachs und Kutikulawachs unterschiedlicher Berufsgruppen. Vor der weiteren Bearbeitung wurden die Wachslösungen als Gesamtextrakte durch mit CHCl₃ extrahierte Baumwollwatte filtriert.

II.2.7. Analytik der Wachse. Die Wachslösungen (Fraktionen 1 bis 3 bei Wabenwachsen unterschiedlichen Alters und Kutikulawachsen unterschiedlicher Kasten und Geschlechter, Gesamtextrakte bei Tanzbodenwachs und Kutikulawachs unterschiedlicher Berufsgruppen) wurden qualitativ und quantitativ auf ihre Einzelbestandteile hin mittels Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID) und Gaschromatographie mit massenspektrometrischem Detektor (GC-MS) überprüft. Dazu wurden die Hydroxyl- und Carboxylgruppen, die im Gesamtextrakt und der 3. Fraktion vorhanden waren, mit N,O-bis-(trimethylsilyl)-

Darmstadt) in Lösung (30 min bei 70°C) zu den entsprechenden Trimethylsilylderivaten umgewandelt.

Die Analysen erfolgten mit Hilfe eines Gaschromatographen (5890 series II, Hewlett Packard, Avondale, Pennsylvania U.S.A.) mit einem druckprogrammierbaren on-column Injektor und Flammenionisationsdetektor (FID) oder massenspektrometrischem Detektor (MSD) (70 eV, m/z 50-650, Hewlett-Packard 5971). Die Wachsbestandteile wurden auf einer 30 m langen fused-silica Kapillarsäule (0.32 mm I.D., DB-1, $d_f = 0,1 \mu\text{m}$; J&W Scientific, Folsom, California U.S.A.) mit dem folgenden Temperaturprogramm getrennt: Injektion bei 50°C, 2 min bei 50°C, mit 40°C/min bis 200°C, 2 min bei 200°C, mit 3°C/min bis 320°C (FID) bzw. 300°C (MSD), 30 min bei 320°C (300°C). Auch der Einlaßdruck der Trägergase war zeitabhängig programmiert: 30 min bei 50 kPa, mit 10 kPa/min bis 150 kPa für den FID (Wasserstoff) und 30 min bei 10 kPa, mit 10 kPa/min bis 100 kPa für den MSD (Helium).

Die Quantifizierung der Einzelsubstanzen der Wachse erfolgte mittels geeigneten internen Standards, die zum Gesamtextrakt zugegeben wurden. Tetracosan (Reinheit >99%, Sigma, Deisenhofen) diente als Standard für Tanzbodenwachs und Kutikulawachs unterschiedlicher Berufsgruppen. Tetracosan, Methyltriacontanoat (Sigma, Deisenhofen) und Tricosansäure (Reinheit >99%, Fluka, Deisenhofen) wurden als Standards für Wabenwache unterschiedlichen Alters und Kutikulawachse unterschiedlicher Kasten und Geschlechter gewählt, da diese durch die entsprechenden Lösungsmittel der Festphase mit den jeweiligen Fraktionen co-eluiert wurden. Die Peakflächen der GC-FID-Läufe wurden elektronisch integriert (Hewlett Packard ChemStation Family 1990-1998, Palo Alto, U.S.A.), eventuelle Fehler konnten durch manuelle Integration korrigiert werden. Die Identifizierung der Wachskomponenten erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, durch den Vergleich der Massenspektren mit denen bekannter Substanzen mit Hilfe von elektronischen Datenbanken (Hewlett Packard ChemStation Software 1996, Palo Alto, U.S.A.) bzw. selbst synthetisierten Referenzsubstanzen.

II.2.8. Referenzsubstanzen für die ungesättigten Ester der Wachse. Für die Interpretation der Massenspektren ungesättigter Ester der Bienenwache erwiesen sich die zur Verfügung stehenden Datenbanken als nicht ausreichend. Deshalb wurde ein Ester aus einer einfach ungesättigten Säure und einem gesättigten Alkohol als Referenzsubstanz synthetisiert und dessen Massenspektrum als Vergleich herangezogen. Aufgrund der Vergleiche mit Massenspektren der Datenbanken wurden ungesättigte Ester mit dem Säurebruchstück einer Octadecensäure vermutet.

II.2.8.1. Synthese einfach ungesättigter Ester. Um eine geeignete Referenzsubstanz für die Massenspektren ungesättigter Ester des Bienenwachses zu erhalten, wurde ein Octadecensäure-Octadecylester synthetisiert. Dafür wurden 10 mg Octadecanol (Reinheit >99%, Sigma, Deisenhofen) und 5 mg Octadecensäure (Chrompack, Middleburg, Holland) in 5 ml Toluol (Reinheit >99,5%, Fluka, Deisenhofen) mit einem Tropfen konzentrierter Schwefelsäure (Reinheit 95-99%, Hartenstein, Würzburg) gelöst. Das Gemisch wurde bei 70 °C für 3-4 Stunden im Heizblock gerührt. Danach wurde die Lösung auf 1 ml eingeeengt und zweimal mit je 3 ml gesättigter Kochsalzlösung (Natriumchlorid, Reinheit >99,5%, Fluka, Deisenhofen) und 3 ml Chloroform gewaschen. Die so erhaltenen Chloroformfraktionen wurden vereinigt und nochmals mit derselben Menge Kochsalzlösung gewaschen. Um das restliche Wasser aus der Chloroformlösung zu entfernen, wurde über wasserfreiem Natriumsulfat (Reinheit >99%, Merck, Darmstadt) getrocknet und unter leichtem Stickstoffstrom trockengeblasen. Danach wurde das Produkt in 15 ml Chloroform aufgenommen. Eventuell vorhandene Hydroxyl- und Carboxylgruppen wurden mit N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid und Pyridin in Lösung (30 min bei 70°C) zu den entsprechenden Trimethylsilylderivaten umgewandelt. Die Analyse im Gaschromatograph mit massenspektrometrischem Detektor erfolgte gemäß der Analytik der Wabenwachse (Kapitel II.2.7.). Die eingesetzte Säure wurde komplett zum Ester umgesetzt. Im Gaschromatogramm konnten bis auf den eingesetzten Alkohol und den synthetisierten Ester keine weiteren Produkte nachgewiesen werden. Alkohol und Ester lagen im Verhältnis 1:1 vor. Dies entsprach dem Überschuß an Alkohol vor der Reaktion.

II.2.8.2. Vergleich mit Referenzspektrum. Durch die massenspektrometrische Analyse wurde ein Spektrum des synthetisierten Octadecensäure-Octadecylesters erhalten, bei dem der Molpeak M^+ mit einer Massenzahl von 534 und drei typische Fragmente mit den Massen 222, 264 und 283 gut zu erkennen waren. (Abb. II.2).

Das Fragment mit der Masse 283 entstand aus einer Spaltung der Alkyl-O-Bindung unter doppelter H-Umlagerung: $[RCO_2H_2]^+$ mit $R=237$. Anhand der gängigen Fragmentierungsreaktionen von Alkylestern ließen sich die Fragmente 264 und 222 nicht ohne weiteres erklären. Durch die Homologie dieser Fragmente bei ungesättigten Estern mit verschiedenen Alkoholanteilen konnten sie nur durch ein Spaltprodukt bedingt sein, welches den Säureanteil enthielt. Das Fragment mit der Masse 264 könnte durch eine Spaltung der Alkyl-O-Bindung unter einfacher H-Umlagerung mit zusätzlichem Verlust von H_2 ($[RCOH]^+ - H_2$) oder durch eine α -Spaltung der C-O-Bindung unter zusätzlichem Verlust eines Protons

könnte durch eine McLafferty-Umlagerung und Stabilisierung der Ladung durch die Doppelbindung in der Säure entstehen (Abb. II.3).

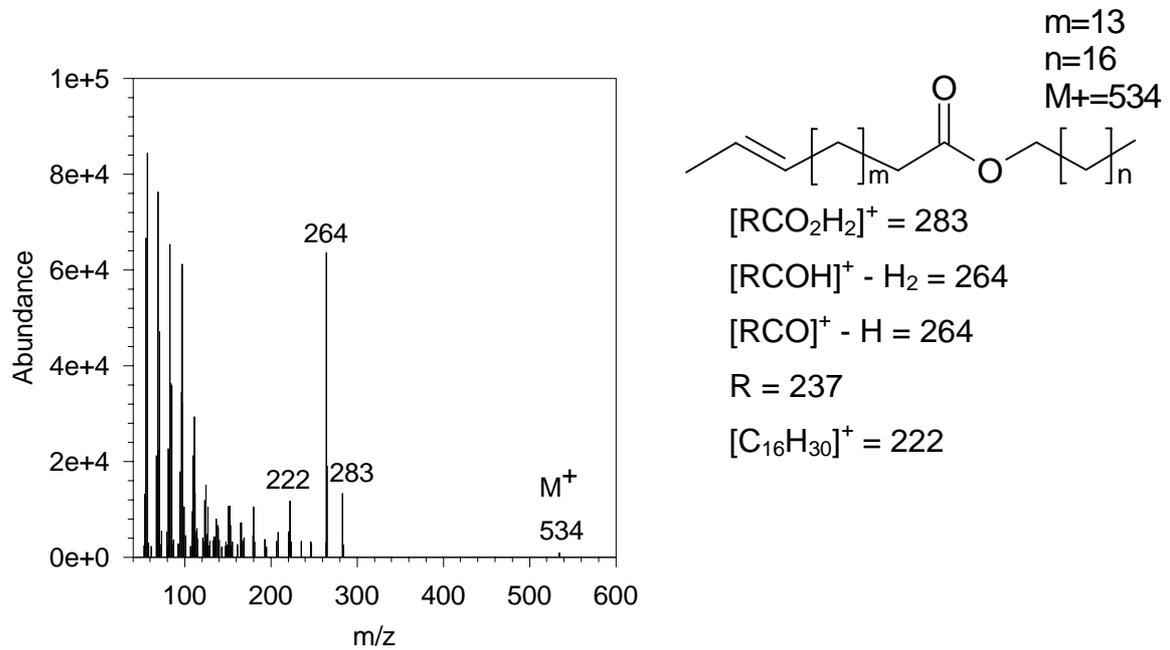


Abbildung II.2: Octadecensäure-Octadecylester (synthetisiert) : Massenspektrum und Strukturformel mit den charakteristischen Bruchstücken, (m/z = Ionenmasse).

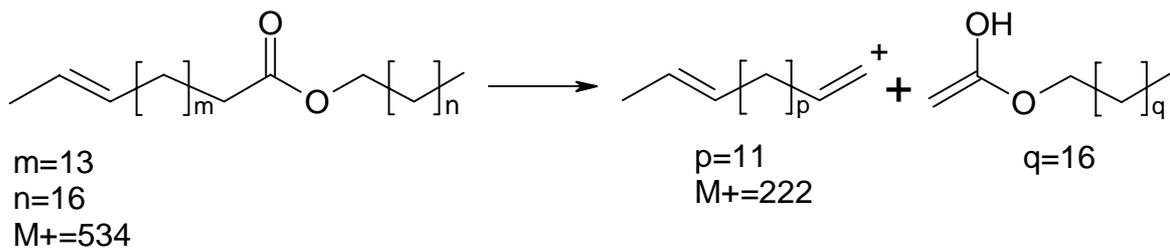


Abbildung II.3: Mögliche Entstehung des Fragments mit der Masse 222 bei der Massenspektrometrie eines Octadecensäure-Octadecylesters.

Die ungesättigten Ester des Bienenwachses wiesen Fragmente mit exakt denselben Massen wie die des synthetisierten Octadecensäure-Octadecylesters auf (Abb. II.4). Aufgrund dieser Übereinstimmung wurden die ungesättigten Ester des Bienenwachses als Ester der Octadecensäure mit einem je nach Kettenlänge entsprechenden gesättigten Alkohol

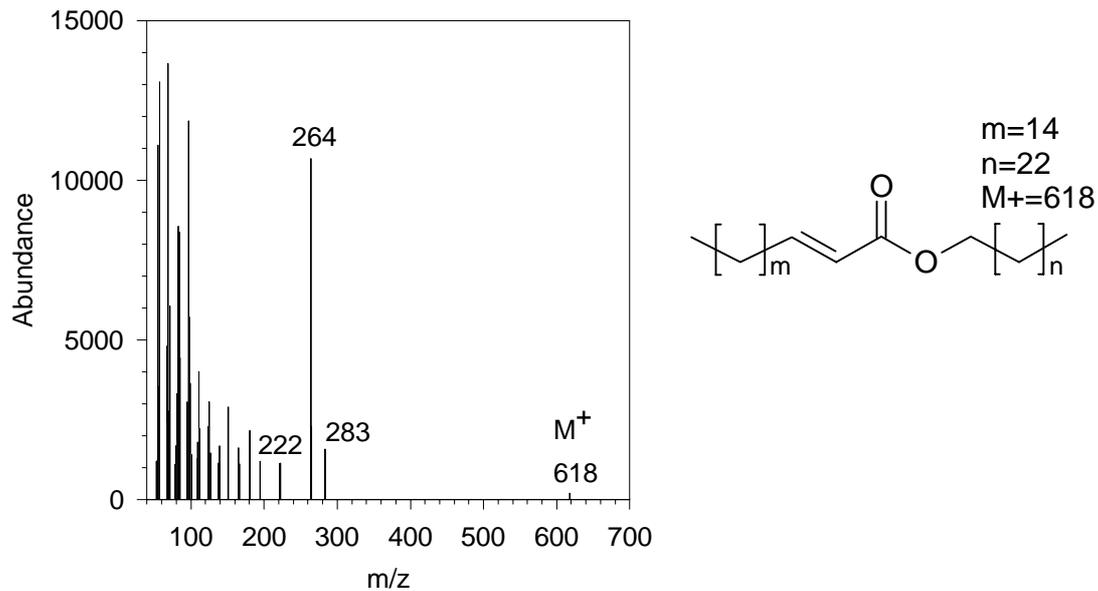


Abbildung II.4: Octadecensäure-Tetracosylester aus Bienenwachs: Massenspektrum und Strukturformel, (m/z = Ionenmasse).

II.2.9. Statistik. Es wurden insgesamt je 6 Wiederholungen für jede Wachsprobe analysiert. Die Reproduzierbarkeit der gaschromatographischen Quantifizierung der Substanzen war besser als 5 %. Die Rohdaten wurden mit Hilfe von kategorisierten Normalverteilungs-Plots auf Normalverteilung überprüft. Mit Hilfe der Diskriminantenfunktionsanalyse wurde untersucht, in welchen Substanzen bzw. Substanzklassen die Unterschiede zwischen den verschiedenen Wabenwachsen und den verschiedenen Kutikulawachsen liegen (Diskrimination der Wachse). Außerdem bestand mit der Diskriminantenfunktionsanalyse die Möglichkeit, die Wachse zu klassifizieren.

Die Diskriminantenfunktionsanalyse ist einer multivariaten Varianzanalyse (MANOVA) sehr ähnlich. Mit dieser Analyse lassen sich Diskriminantenfunktionen (DF) angeben, welche die entsprechenden Variablen (Substanzklassen) identifizieren, mit deren Hilfe zwischen den Gruppen (Wachsklassen) unterschieden werden kann. Die Diskriminantenfunktion 1 bietet dabei die beste Unterscheidung, die Diskriminantenfunktion 2 die zweitbeste usw. Die Diskriminierung kann durch Auftragung der individuellen Werte der Diskriminantenfunktionen für jede Gruppe graphisch dargestellt werden.

Die Diskriminantenfunktionsanalyse ermöglicht auch die Klassifizierung der Wachse mit

Diskriminantenfunktionen verwechselt werden. Für jede Gruppe wird eine Klassifikationsfunktion ermittelt. Durch einen Vergleich der Klassifikationsfunktionen kann eine beliebige unbekanntes Wachsprobe einer entsprechenden Wachsklasse zugeordnet werden. D.h. die Wachsprobe gehört derjenigen Klasse an, deren Klassifikationswert (score, S) (berechnet aus den zugehörigen Klassifikationsfunktionen) am größten wird.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit p bei der Diskriminantenfunktionsanalyse wurde folgendermaßen definiert: $p \geq 0,01$, nicht signifikant; $0,01 > p \geq 0,001$, signifikant; $p < 0,001$, hochsignifikant. Für alle statistischen Analysen wurde das Programm Statistica for Windows (StatSoft Inc., 1994) herangezogen. Es wurden nur Substanzen bzw. Substanzklassen in die Statistik mit einbezogen, die mit der Gaschromatographie-Massenspektrometrie eindeutig zu identifizieren waren. Schwer zu bestimmende und schwer zu quantifizierende Substanzklassen wurden in der statistischen Analyse von vornherein nicht berücksichtigt.

II.3. Ergebnisse

II.3.1. *Wabenwachse unterschiedlicher Altersklassen.* Alle hier untersuchten Altersklassen der Wabenwachse waren dominiert von langkettigen aliphatischen Komponenten in einem Kettenlängenbereich von C_{21} bis C_{54} (Abb. II.5).

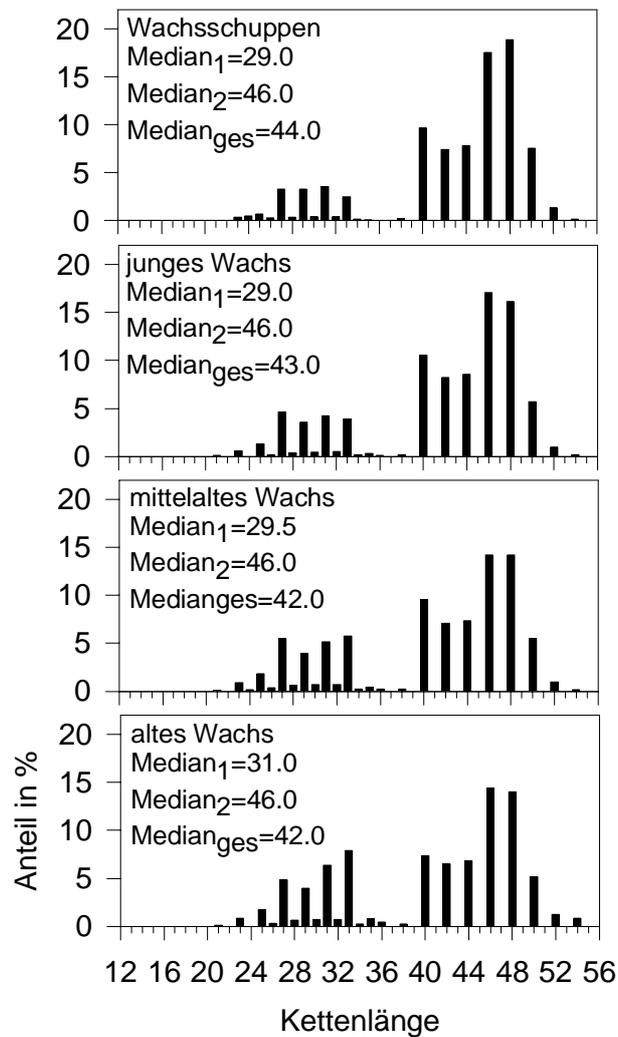


Abbildung II.5: Kettenlängenverteilungen von verschiedenen Altersstufen von Wabenwachsen, Anteile in %. Median₁ bezieht sich auf den Kettenlängenbereich C_{19} bis C_{36} , Median₂ auf Ketten von C_{37} bis C_{54} . Median_{ges} charakterisiert den gesamten Kettenlängenbereich.

Die Verteilungen der Kettenlängen waren zweigipflig und unterschieden sich in ihrer äußeren Form kaum zwischen Wachsschuppen, neuem, mittelaltem und altem Wachs. Die jeweiligen Mediane (Median_1 und Median_2) für die Verteilungen der kürzeren (C_{21} bis C_{36}) bzw. längeren (C_{37} bis C_{54}) Ketten stimmten mehr oder weniger überein. Der Median über das gesamte Spektrum der Ketten ($\text{Median}_{\text{ges}}$, C_{21} bis C_{54}) betrug bei den Wachsschuppen 44 C-Atome und verringerte sich bis zum alten Wachs um 2 C-Atome auf eine Kettenlänge von C_{42} .

Nachdem die Wabenwachse in 4 Fraktionen getrennt wurden, konnten mit den Fraktionen 1 bis 3 gaschromatographische Analysen durchgeführt werden. Fraktion 4 war für die Analyse aufgrund ihrer hohen Polarität nicht geeignet und ihr Anteil an der Gesamtmenge des Wachses wurde nur gravimetrisch bestimmt.

Tabelle II.1: Mengenausbeuten bei der Analyse von Wabenwachsen.

Wabenwachse	Relative Mengenanteile (%) ^a		
	Mittelwerte \pm 95 % Vertrauensbereiche		
Probe	identifiziert im GC	nicht identifiziert im GC	polare Fraktion
Wachsschuppen	71 \pm 2,2	4,2 \pm 2,24	25 \pm 1,8
Junges Wachs	68 \pm 2,1	3,0 \pm 2,13	29 \pm 6,6
Mittelaltes Wachs	70 \pm 1,9	4,6 \pm 1,93	26 \pm 2,6
Altes Wachs	69 \pm 1,5	5,4 \pm 1,51	26 \pm 4,0

^a Mit der Fraktion 1 bis 3 wurden gaschromatographische (GC) Analysen durchgeführt. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die Gesamtmenge der Fraktionen 1 bis 4; das Detektionslimit lag bei 0,01%, Kommastellen wurden entsprechend gesetzt.

Bei der Analyse von Fraktion 1 bis 3 konnten 69 % bis 71 % der Gesamtmenge des Wachses identifiziert werden. Weitere 3 % bis 5 % des Wachses konnten zwar über den Gaschromatograph quantifiziert werden, aber waren aus verschiedenen Gründen nicht eindeutig zu identifizieren. Die Fraktion 4, welche die polarsten Bestandteile der Wachse enthielt, machte einen mengenmäßigen Anteil von 25 % bis 29 % der Wabenwachse aus. (Tab. II.1)

Die chemische Zusammensetzung wird hier aufgrund der Übersichtlichkeit nicht anhand der Einzelsubstanzen, sondern anhand der Substanzklassen verglichen. Die verschiedenen Altersklassen von Wabenwachsen waren dominiert von langkettigen Alkylestern mit einem

Fraktionen 1 bis 3 (Tab II.2). Wurden alle vorkommenden Ester zusammengenommen, dann bestand das analysierte Wabenwachs zu 64 % bis 78 % aus Estern.

Tabelle II.2: Relative chemische Zusammensetzung der Fraktionen 1 bis 3 von Wabenwachsen unterschiedlichen Alters.

Substanz- klassen	Relative Mengenanteile (%) ^a			
	Mittelwerte \pm 95 % Vertrauensbereiche			
	Wachsschuppen (n=6)	Junges Wachs (n=6)	Mittelaltes Wachs (n=6)	Altes Wachs (n=6)
Alkane	11 \pm 4,9	13 \pm 1,7	15 \pm 1,7	14 \pm 1,1
Alkene	3,4 \pm 1,43	6,0 \pm 1,04	8,8 \pm 0,98	12 \pm 1,3
Alkadiene	0,06 \pm 0,044	0,24 \pm 0,041	0,72 \pm 0,077	2,0 \pm 0,21
2-Methyl- alkane	0,00 \pm 0,008	0,19 \pm 0,117	0,46 \pm 0,053	0,95 \pm 0,129
Ester	57 \pm 6,9	57 \pm 3,6	47 \pm 4,0	48 \pm 4,3
Ungesättigte Ester	13 \pm 3,3	11 \pm 0,7	12 \pm 1,4	9,5 \pm 1,54
Hydroxy- Ester	8,0 \pm 3,08	7,9 \pm 5,72	8,1 \pm 1,57	6,4 \pm 0,98
Säuren	1,3 \pm 2,00	0,14 \pm 0,158	0,51 \pm 0,338	0,08 \pm 0,105
Alkohole	0,41 \pm 0,239	0,53 \pm 0,317	0,74 \pm 0,128	0,48 \pm 0,202
Nicht identifiziert	5,6 \pm 2,97	4,2 \pm 2,99	6,2 \pm 2,59	7,3 \pm 2,03

^a Die angegebenen Werte beziehen sich auf die Gesamtmenge der Fraktionen 1 bis 3; das Detektionslimit lag bei 0,01%, Kommastellen wurden entsprechend gesetzt.

Säuren und Alkohole trugen nach diesen Ergebnissen nur einen kleinen Teil zum Wachs bei. Vorausgegangene Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß mit der Methode der Festphasenextraktion die Anteile der Säuren und Alkohole unterschätzt werden, da diese zum Teil erst mit dem Lösungsmittelgemisch der Fraktion 4 eluiert werden. Die Fraktion 4 des Wabenwachses kann auch Dirole, Hydroxysäuren und sogar Mono- und Diacylglyceride enthalten (Davidson and Hepburn 1986). Zwischen 4,2 % \pm 2,99 und 7,3 % \pm 2,03 der Fraktionen 1 bis 3 konnten nicht eindeutig identifiziert werden. Mit zunehmendem Alter sank

Alkadiene und 2-Methylalkane stiegen von jeweils $3,4 \% \pm 1,43$ (Alkene), $0,06 \% \pm 0,044$ (Alkadiene) und $0,00 \% \pm 0,008$ (2-Methylalkane) in den Wachsschuppen auf jeweils $12 \% \pm 1,3$, $2,0 \% \pm 0,21$ und $0,95 \% \pm 0,129$ beim alten Wachs. Diese systematische Zunahme wurde deutlicher bei der Betrachtung der Anteile dieser Substanzklassen an der Fraktion 1 der Altersklassen. In diesem Fall stiegen die Alkane, Alkene und Alkadiene von $24 \% \pm 1,1$, $0,38 \% \pm 0,071$ und $0,05 \% \pm 0,048$ in den Wachsschuppen auf jeweils $40 \% \pm 0,5$, $7,0 \% \pm 0,09$ und $3,3 \% \pm 0,08$ im altem Wachs (Tab II.3).

Tabelle II.3: Relative chemische Zusammensetzung der Fraktion 1 von Wabenwachsen unterschiedlichen Alters.

Substanz- Klassen	Relative Mengenanteile (%) ^a			
	Mittelwerte \pm 95 % Vertrauensbereiche			
	Wachsschuppen (n=6)	Junges Wachs (n=6)	Mittelaltes Wachs (n=6)	Altes Wachs (n=6)
Alkane	75 \pm 1,2	67 \pm 0,9	60 \pm 0,3	50 \pm 0,6
Alkene	24 \pm 1,1	31 \pm 0,7	35 \pm 0,2	40 \pm 0,5
Alkadiene	0,38 \pm 0,071	1,2 \pm 0,03	2,9 \pm 0,05	7,0 \pm 0,09
2-Methyl- alkane	0,05 \pm 0,048	1,0 \pm 0,31	1,8 \pm 0,05	3,3 \pm 0,08

^a Die angegebenen Werte beziehen sich auf die Gesamtmenge der Fraktion 1; das Detektionslimit lag bei 0,01%, Kommastellen wurden dementsprechend gesetzt.

Statistik. Mit Hilfe der Diskriminantenfunktionsanalyse konnten die Fraktionen 1 bis 3 der unterschiedlich alten Wabenwachse hochsignifikant aufgrund der Substanzklassen der Alkadiene, Alkene, Alkane, der ungesättigten Ester und der Ester unterschieden werden. Die Anteile der Säuren, Alkohole und unidentifizierten Substanzen wurden von vornherein aus der Analyse ausgeschlossen (Kapitel II.2.9.). Die ersten beiden Diskriminantenfunktionen (DF) waren jeweils signifikant ($p < 0,001$) und erklärten zusammen 99,3 % der Unterschiede zwischen den verschiedenen Altersklassen. Die erste Diskriminantenfunktion allein erreichte schon 94 % Unterscheidung basierend auf den Fraktionen 1 bis 3. Die dritte Diskriminantenfunktion war nicht signifikant ($p = 0,07$). Die ersten beiden Diskriminantenfunktionen reichten aus, um mit einer Signifikanz von $p < 0,005$ zwischen den vier Altersklassen der Wabenwachse zu unterscheiden (Abb. II.6).

Nachdem bei der Unterscheidung der Wachse Alkane, Alkene und Alkadiene von entscheidender Bedeutung waren und diese ausschließlich in der Fraktion 1 vorkommen, wurde die Diskriminantenfunktionsanalyse nur für die Fraktion 1 durchgeführt. Diese Fraktion ist aufgrund ihrer Zusammensetzung leicht zu gewinnen und exakt und sehr gut reproduzierbar zu analysieren. Dies ist für eine schnelle Analyse von Wachsen von Vorteil. Allein aufgrund der Kohlenwasserstoffe konnten die vier Altersklassen der Wabenwache hochsignifikant ($p < 0,001$) unterschieden werden, wobei mit zwei hochsignifikanten Diskriminantenfunktionen (DF) ($p < 0,001$) eine vollständige Unterscheidung ($DF1 = 99,3 \%$, $DF1 + DF2 = 100 \%$) möglich war. Die Unterscheidung basierte auf den Substanzklassen der Alkadiene und der Alkene.

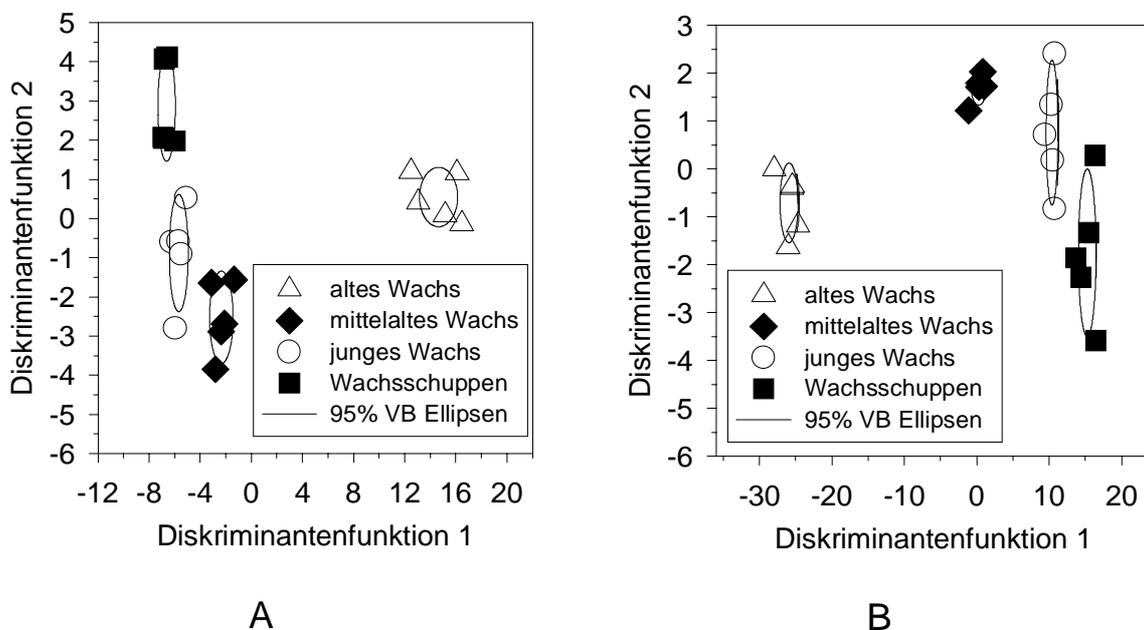


Abbildung II.6: Diskriminantenfunktionsanalysen von Wabenwachsen: Unterscheidung der Wachse aufgrund der Fraktionen 1 bis 3 (A) und der Fraktion 1(B) (VB = Vertrauensbereich).

II.3.2. Tanzbodenwachs. Im Unterschied zu den vorangegangenen Untersuchungen der Wabenwache wurden beim Tanzbodenwachs die Gesamtextrakte ohne Fraktionierung mittels GC-MS analysiert. Dadurch könnten durch Überlagerung von Peaks kleinere Anteile von Einzelsubstanzen verloren gehen, aber es besteht die Möglichkeit, auch leichter flüchtige Substanzen in die Analyse mit einzubeziehen. Tanzbodenwachs bestand ebenso wie normales Wabenwachs zu $47 \% \pm 2,3$ bis $48 \% \pm 2,0$ aus Alkylestern, rechnete man alle Arten von Estern zusammen, so machten diese Substanzen 60% bis 61% aus. Zweitwichtigste

bei Tanzbodenwachs. Danach folgten die Säuren mit einem Anteil von $12 \% \pm 2,9$ bei normalem Wabenwachs und $11 \% \pm 3,0$ bei Tanzbodenwachs. Insgesamt war das Tanzbodenwachs in seiner chemischen Zusammensetzung dem normalen Wabenwachs sehr ähnlich (Tab II.4). Statistisch konnte mit der Diskriminantenfunktionsanalyse sowohl auf der Ebene der Substanzklassen als auch auf der Ebene der Einzelsubstanzen kein Unterschied festgestellt werden.

Tabelle II.4: Chemische Zusammensetzung von Tanzbodenwachs und Nichttanzbodenwachs.

Substanzklassen	Relative Mengenanteile (%) ^a	
	Mittelwerte \pm 95 % Vertrauensbereiche	
	normales Wabenwachs (n=6)	Tanzbodenwachs (n=6)
Alkane	15 \pm 0,4	15 \pm 0,7
Alkene	7,4 \pm 0,38	7,3 \pm 0,35
2-Methylalkane	0,02 \pm 0,051	n.d. ^b
Ester	48 \pm 2,0	47 \pm 2,3
Ungesättigte Ester	9,6 \pm 1,01	9,8 \pm 0,24
Hydroxyester	3,6 \pm 1,15	3,1 \pm 0,50
Säuren	12 \pm 2,9	11 \pm 3,0
Alkohole	1,1 \pm 0,10	0,95 \pm 0,130
Nicht identifiziert	3,6 \pm 0,68	4,6 \pm 2,16

^a Die angegebenen Werte beziehen sich auf den Gesamtextrakt; das Detektionslimit lag bei 0,01%, Kommastellen wurden entsprechend gesetzt.

^b n.d. = nicht detektiert

II.3.3. Kutikulawachs unterschiedlicher Kasten und Geschlechter. Die chemische Zusammensetzung von Kutikulawachsen verschiedener Kasten und Geschlechter der Honigbiene ähnelte teilweise dem der Wabenwachse. Ebenso wie bei den Wabenwachsen konnte ein breites Spektrum von Kettenlängen nachgewiesen werden (C₁₉ bis C₅₄), die untere Grenze der Ketten lag jedoch etwas niedriger als bei den Wabenwachsen.

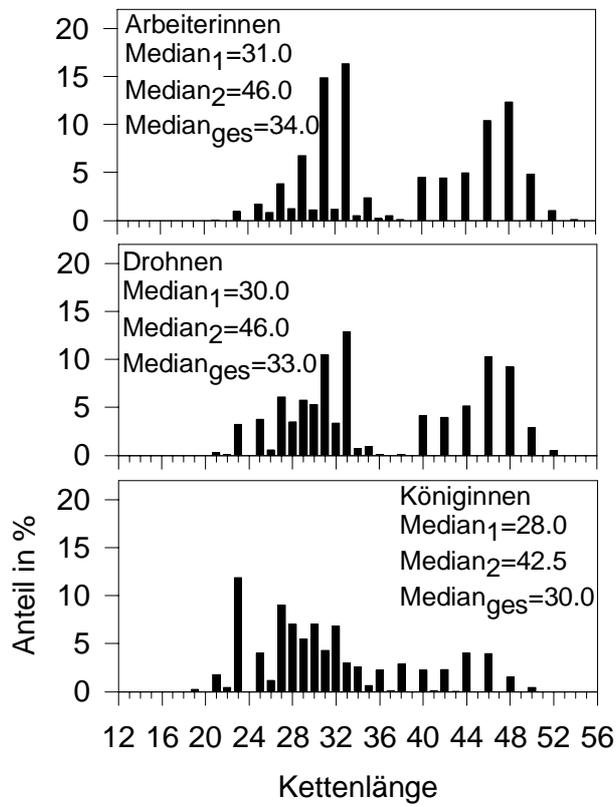


Abbildung II.7: Kettenlängenverteilungen von Kutikulawachsen unterschiedlicher Kasten und Geschlechter, Anteile in %. Median₁ bezieht sich auf den Kettenlängenbereich C₁₉ bis C₃₆, Median₂ auf Ketten von C₃₇ bis C₅₄. Median_{ges} charakterisiert den gesamten Kettenlängenbereich.

Die Verteilung der Ketten war ebenfalls zweigipflig, wobei diesmal die Verteilung mit den kürzeren Ketten (C₁₈ bis C₃₇) einen erheblich größeren Anteil ausmachte. Dies spiegelte sich auch in den Medianen über den gesamten Kettenlängenbereich (Median_{ges}) im Bereich von C₃₀ bis C₃₄ wider (Abb. II.7).

Die Kettenlängenverteilung von Königinnen-Kutikulawachs war klar von Arbeiterinnen- bzw. Drohnen-Kutikulawachs zu unterscheiden. Bei den Königinnen machten die kürzerkettigen aliphatischen Kohlenwasserstoffe einen größeren Anteil aus und die Zweigipfligkeit der Verteilung war nicht so stark ausgeprägt.

Die Gesamtmenge Kutikulawachs pro Individuum betrug $166 \pm 21,0 \mu\text{g}$ bei Arbeiterinnen (n=12), $114 \pm 19,0 \mu\text{g}$ bei Drohnen (n=9) und $93 \pm 12,5 \mu\text{g}$ bei 1-2 Tage alten Königinnen

identifizierten Substanzen lag bei den Kutikulawachsen zwischen 54 % und 67 % (Tab. II.5). Den größten nicht identifizierten Anteil der Fraktionen 1 bis 3 wiesen die Wachse der Königinnen mit 7% auf, wohingegen bei den Arbeiterinnen nur 1,6 % unbekannt blieben.

Tabelle II.5: Mengenausbeuten bei der Analyse von Kutikulawachsen.

Kutikulawachse	Mittelwerte \pm 95 % Vertrauensbereiche			
	Menge in μg pro Individuum	Relative Mengenanteile (%) ^a		
		identifiziert im GC	nicht identifiziert im GC	Polare Fraktion
Arbeiterinnen	166 \pm 21,0	67 \pm 0,7	1,6 \pm 0,76	31 \pm 5,1
Drohnen	114 \pm 19,0	54 \pm 0,7	2,2 \pm 0,72	43 \pm 6,2
Königinnen	93 \pm 12,5	57 \pm 2,8	7,7 \pm 2,79	36 \pm 9,7

^a Mit der Fraktion 1 bis 3 wurden gaschromatographische (GC) Analysen durchgeführt. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die Gesamtmenge der Fraktionen 1 bis 4; das Detektionslimit lag bei 0,01%, Kommastellen wurden entsprechend gesetzt.

Die polarere Fraktion 4 war bei den Drohnen mit 43 % am höchsten, d.h. vom Kutikulawachs der Drohnen konnten nur 57 % über die gaschromatographische Analyse erfaßt werden. Bei Betrachtung der chemischen Zusammensetzung der Fraktionen 1 bis 3 der jeweiligen Wachse zeigte sich, daß die Kutikulawachse von Kohlenwasserstoffen dominiert wurden mit einem Gesamtanteil der Alkane, Alkene, Alkadiene und der 2-Methylalkane von 50 % bis 62 % (Tab. II.6). Allerdings gab es in den einzelnen Wachsen der verschiedenen Kasten und Geschlechter erhebliche Unterschiede in Bezug auf die relativen Anteile der einzelnen Substanzklassen. Bei den Arbeiterinnen bestand der größte Teil des Kutikulawachses aus langkettigen Alkylestern (31 % \pm 6,1), gefolgt von Alkenen (23 % \pm 5,7 und Alkanen (19 % \pm 5,0). Im Gegensatz dazu hatte das Königinnen-Kutikulawachs einen sehr kleinen Anteil an Alkenen (4,6 % \pm 2,89) und langkettigen Alkylestern (15 % \pm 12,4). Dagegen stammte ein großer Anteil von 39 % \pm 10,6 von den Alkanen. Die chemische Zusammensetzung des Kutikulawachses von Drohnen war der Zusammensetzung des Arbeiterinnen-Kutikulawachses recht ähnlich, da hier ebenfalls die Alkylester dominierten (32 % \pm 4,2), gefolgt von den Alkanen und Alkenen (21 % \pm 1,8 und 21 % \pm 1,9). Ein klarer Unterschied zwischen den Kutikulawachsen von Drohnen und Arbeiterinnen ergab sich bei der Substanzklasse der 2-Methylalkane. Der Anteil dieser Substanzen am Drohnen-

und dem für die Königinnen ($19 \% \pm 5,1$) (Tab. II.6). Innerhalb der Klasse der Alkylester gab es Unterschiede im Isomerenmuster. Alkylester von Arbeiterinnen und Drohnen waren ebenso wie die Alkylester der Wabenwache in einem Kettenlängenbereich von C_{36} bis C_{54} und wiesen ausschließlich einen C_{18} ungesättigten und C_{16} gesättigten Säureanteil auf. Alkylester der Königinnen wiesen Kettenlängen von C_{26} bis C_{52} auf und waren durch das Vorkommen von C_{14} , C_{16} , C_{18} ungesättigten und C_{12} , C_{14} , C_{16} , C_{18} gesättigten Säureanteilen charakterisiert.

Tabelle II.6: Relative chemische Zusammensetzung der Fraktionen 1 bis 3 von Kutikulawachsen unterschiedlicher Kasten und Geschlechter.

Substanz- klassen	Relative Mengenanteile (%) ^a		
	Mittelwerte \pm 95 % Vertrauensbereiche		
	Arbeiterinnen (n=6)	Drohnen (n=6)	Königinnen (n=4)
Alkane	19 \pm 5,0	21 \pm 1,8	39 \pm 10,6
Alkene	23 \pm 5,7	21 \pm 1,9	4,6 \pm 2,89
Alkadiene	7,6 \pm 2,22	2,5 \pm 0,33	n.d. ^b
2-Methylalkane	1,4 \pm 0,26	11 \pm 1,6	19 \pm 5,1
Ester	31 \pm 6,1	32 \pm 4,2	15 \pm 12,4
Ungesättigte	12 \pm 4,8	4,7 \pm 0,80	7,0 \pm 2,47
Ester			
Hydroxy- Ester	2,3 \pm 1,22	2,4 \pm 1,22	2,9 \pm 1,84
Säuren	0,17 \pm 0,309	0,02 \pm 0,061	0,07 \pm 0,101
Alkohole	1,3 \pm 0,49	1,2 \pm 0,57	0,92 \pm 0,181
Nicht identifiziert	2,4 \pm 1,10	3,8 \pm 1,28	12 \pm 5,3

^a Die angegebenen Werte beziehen sich auf die Gesamtmenge der Fraktionen 1 bis 3; das Detektionslimit lag bei 0,01%, Kommastellen wurden entsprechend gesetzt.

^b n.d. = nicht detektiert

Statistik. Mittels der Diskriminantenfunktionsanalyse konnten die Kutikulawachse der verschiedenen Kasten und Geschlechter anhand der Anteile der Substanzklassen an der Fraktion 1 bis 3 hochsignifikant ($p < 0.001$) unterschieden werden. Die Anteile der Säuren, Alkohole und unidentifizierten Substanzen wurden nicht berücksichtigt. Es trugen die Alkadiene, Alkene, 2-Methylalkane, Alkylester und Alkane zu der Diskriminierung bei. Mit Hilfe der Diskriminantenfunktion 1 konnten 74 % der Fraktionen 1 bis 3 der Wachse unterschieden werden, zusammen mit der Diskriminantenfunktion 2 waren es 100 % (Abb. II.8).

Da bei den Kutikulawachsen die Kohlenwasserstoffe ebenfalls einen wesentlichen Anteil zur Unterscheidung der Wachse beitrugen, wurden auch hier nur die Bestandteile der Fraktion 1 (Alkane, Alkene Alkadiene und 2-Methylalkane) zur Unterscheidung herangezogen (Tab. II.7).

Tabelle II.7: Relative chemische Zusammensetzung der Fraktion 1 von Kutikulawachsen unterschiedlicher Kasten und Geschlechter.

Substanz- Klassen	Relative Mengenanteile (%) ^a		
	Mittelwerte \pm 95 % Vertrauensbereiche		
	Arbeiterinnen (n=6)	Drohnen (n=6)	Königinnen (n=4)
Alkane	38 \pm 6,5	38 \pm 2,1	63 \pm 2,4
Alkene	44 \pm 4,0	38 \pm 2,0	7,6 \pm 5,6
Alkadiene	15 \pm 3,2	4,5 \pm 0,32	n.d. ^b
2-Methyl- alkane	2,7 \pm 0,37	20 \pm 1,9	30 \pm 3,4

^a Die angegebenen Werte beziehen sich auf die Gesamtmenge der 1. Fraktion; das Detektionslimit lag bei 0,01%, Kommastellen wurden entsprechend gesetzt.

^b n.d. = nicht detektiert

Anhand dieser Substanzklassen lassen sich die Kutikulawachse genauso gut unterscheiden ($p < 0,001$) wie anhand der Substanzklassen der Fraktion 1 bis 3. Die Unterscheidung war möglich aufgrund der Substanzklassen der 2-Methylalkane, Alkene und Alkane. Mit der Diskriminantenfunktion 1 konnten 84,6 % und zusammen mit der Funktion 2 konnten 100 % der Unterscheidung anhand der Fraktion 1 erreicht werden (Abb. II.8).

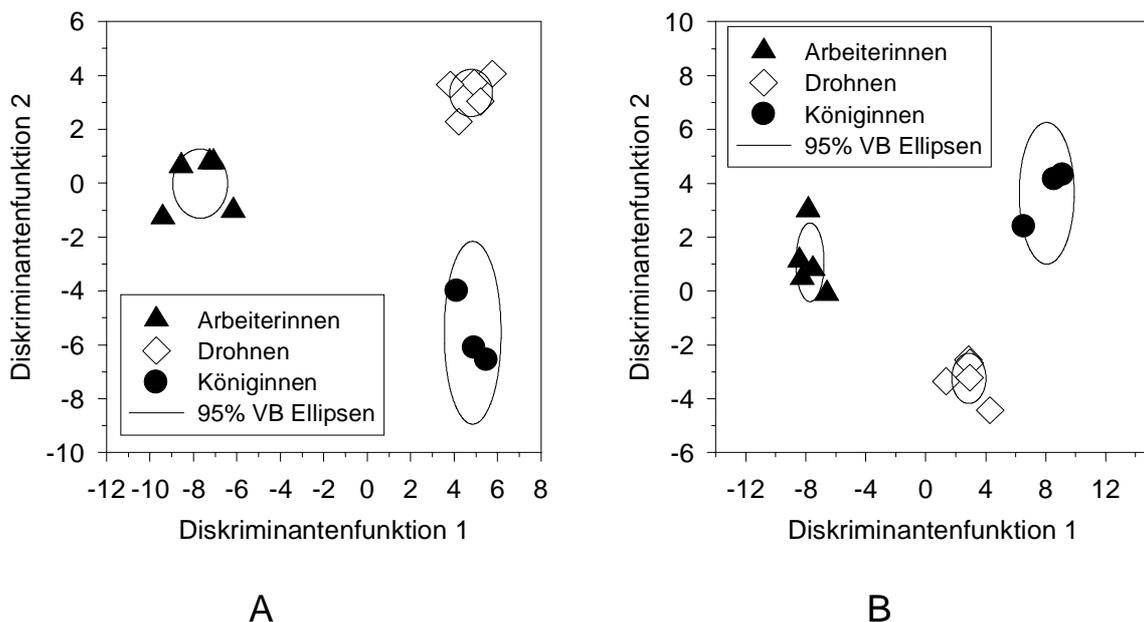


Abbildung II.8: Diskriminantenfunktionsanalysen von Kutikulawachsen unterschiedlicher Kasten und Geschlechter: Unterscheidung der Wachse aufgrund der Fraktionen 1 bis 3 (A) und der Fraktion 1 (B) (VB = Vertrauensbereich).

II.3.4. Kutikulawachse unterschiedlicher Berufsgruppen. Um die chemische Zusammensetzung von Kutikulawachsen unterschiedlicher Berufsgruppen zu vergleichen, wurden Kutikulawachse von Innendienstbienen, von Sammlerinnen und Hofstaatbienen gewonnen. Hierbei wurde der unfraktionierte Gesamtextrakt zur Analyse herangezogen. Insgesamt waren sich die Kutikulawachse in ihrer chemischen Zusammensetzung sehr ähnlich. Die Kohlenwasserstoffe stellten einen Anteil von 33 % (Innendienstbienen und Hofstaatbienen) bis 37 % (Sammlerinnen), der Gesamttergerhalt lag bei 48 % bei den Innendienstbienen, bei 50 % bei den Hofstaatbienen und war mit 58 % bei den Sammlerinnen signifikant am höchsten. Die Sammlerinnen wiesen in den Alkylestern ($39 \% \pm 6,9$) und den ungesättigten Estern ($17 \% \pm 3,2$) die höchsten Anteile, in den Säuren ($4,3 \% \pm 1,04$) dagegen den niedrigsten Anteil auf. Bei den Hofstaatbienen fand sich der höchste Anteil an Säuren ($6,9 \% \pm 2,14$) und Alkenen ($18 \% \pm 6,4$) (Tab. II.8).

Tabelle II.8: Relative chemische Zusammensetzung der Gesamtextrakte der Kutikulawachse unterschiedlicher Berufsgruppen.

Relative Mengenanteile (%) ^a			
Mittelwerte ± 95 % Vertrauensbereiche			
Substanz- klassen	Innendienstbienen (n=6)	Sammlerinnen (n=6)	Hofstaatbienen (n=6)
Alkane	17±7,3	15±3,8	14±3,2
Alkene	16±2,7	15±3,5	18±6,4
Alkadiene	3,0±0,87	2,4±0,57	3,9±0,94
2-Methylalkane	0,97±0,215	0,94±0,376	1,3±0,69
Ester	34±8,7	39±6,9	35±9,7
Ungesättigte Ester	12±1,9	17±3,2	12±2,9
Hydroxy- Ester	1,8±1,07	1,4±1,64	2,8±2,47
Säuren	6,2±1,26	4,3±1,04	6,9±2,14
Unges. Säuren	0,28±0,244	0,04±0,094	0,35±0,261
Alkohole	1,6±0,52	2,3±0,84	1,8±1,16
Nicht identifiziert	6,1±4,80	3,6±0,95	4,9±1,50

^a Die angegebenen Werte beziehen sich auf die Gesamtextrakte; das Detektionslimit lag bei 0,01%, Kommastellen wurden entsprechend gesetzt.

Statistik. Die Diskriminantenfunktionsanalyse führte zu einer hochsignifikanten Unterscheidung der Berufsgruppen anhand der Gesamtextrakte der Kutikulawachse mit $p < 0,001$. Die Unterscheidung basierte auf den Substanzklassen der ungesättigten Ester, Alkadiene, Alkohole, Ester und Säuren. Mit der Diskriminantenfunktion 1 wurden schon 97,4 % der Wachse unterschieden, mit der Diskriminantenfunktion 2 war die Unterscheidung komplett (100 %). Vor allen Dingen die Sammlerinnen konnten anhand der graphischen Auftragung der Diskriminantenfunktionen gut von den anderen Berufsgruppen unterschieden werden (Abb. II.9). Bei den Innendienstbienen und den Hofstaatbienen war die Auftrennung nicht so deutlich.

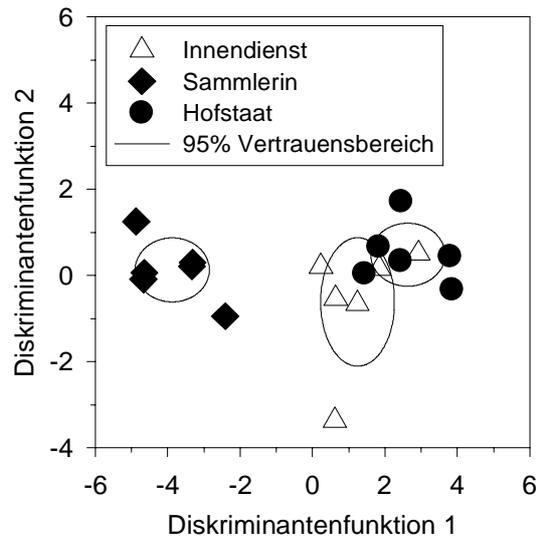


Abbildung II.9: Diskriminantenfunktionsanalyse von Kutikulawachsen unterschiedlicher Berufsgruppen: Unterscheidung aufgrund der Substanzklassen der Gesamtextrakte.

II.3.5. Klassifikation von Waben- und Kutikulawachsen. Anhand der Wabenwache unterschiedlichen Alters und der Kutikulawache verschiedener Kasten und Geschlechter wurde geprüft, ob mit der Diskriminantenfunktionsanalyse eine Klassifikation der Wache möglich ist und wie genau mit Hilfe dieser Klassifikationen die Wache den verschiedenen Klassen zugeordnet werden können.

Wabenwache. Unbekannte Wabenwache können mit den folgenden Gleichungen (Klassifikationsfunktionen 1a bis 1d)) eindeutig den verschiedenen Altersklassen Wachsschuppen (WS), junges Wachs (JW), mittelaltes Wachs (MW) und altes Wachs (AW) zugeordnet werden. Die aufgestellten Klassifikationsfunktionen führen zu den Klassifikationswerten (scores: S_{WS} , S_{JW} , S_{MW} , S_{AW}) durch Einsetzen der jeweiligen relativen Mengenanteile der entsprechenden Substanzklassen.

$$S_{WS} = -276,23 - 28,17dien + 16,58en + 4,45an + 3,99ues + 7,07es \quad (1a)$$

$$S_{JW} = -321,62 - 39,79dien + 23,43en + 3,88an + 2,76ues + 7,73es \quad (1b)$$

$$S_{MW} = -328,82 - 0,56dien + 23,07en + 3,65an + 2,48ues + 7,68es \quad (1c)$$

$$S_{AW} = -524,94 + 314,15dien - 14,32en + 13,84an - 1,03ues + 8,44es \quad (1d)$$

Die Klassifikation erfolgte mit Hilfe der relativen Anteile der Alkadiene (dien), Alkene (en), Alkane (an), der ungesättigten Ester (ues) und der Ester (es) an der Gesamtmenge der Fraktionen 1 bis 3 der Wabenwachse.

Eine Beschränkung auf die Analyse der Fraktion 1 der verschiedenen Wabenwachse vereinfachte die Klassifikationsfunktionen (2a bis 2d) erheblich, denn zur Klassifikation genügten die Alkadiene (dien) und die Alkane (an):

$$S_{WS} = -1100,95 + 157,76\text{dien} + 28,64\text{an} \quad (2a)$$

$$S_{NW} = -1044,96 + 183,99\text{dien} + 27,56\text{an} \quad (2b)$$

$$S_{MW} = -1198,27 + 247,88\text{dien} + 27,89\text{an} \quad (2c)$$

$$S_{AW} = -2278,43 + 423,26\text{dien} + 31,67\text{an} \quad (2d)$$

Kutikulawachse. Die Klassifikationsfunktionen für die Kutikulawachse der Arbeiterinnen (AR), Drohnen (DR) und Königinnen (KÖ) basierend auf der relativen chemischen Zusammensetzung der Fraktionen 1 bis 3 (3a bis 3c) wurden mit den Substanzklassen der Alkadiene (dien), Alkene (en), 2-Methylalkane (ma), Ester (es) und der Alkane (an) aufgestellt:

$$S_{AR} = -1444,16 + 46,58\text{dien} + 22,41\text{en} + 78,53\text{ma} + 46,13\text{es} + 25,29\text{an} \quad (3a)$$

$$S_{DR} = -2139,40 + 46,42\text{dien} + 28,37\text{en} + 101,45\text{ma} + 56,83\text{es} + 29,40\text{an} \quad (3b)$$

$$S_{KÖ} = -1852,61 + 42,18\text{dien} + 23,76\text{en} + 94,90\text{ma} + 52,97\text{es} + 28,17\text{an} \quad (3c)$$

Auch bei den Kutikulawachsen führte eine Analyse der Fraktion 1 zu vereinfachten Klassifikationsfunktionen (4a bis 4c):

$$S_{AR} = -1370,30 + 26,23\text{an} + 37,11\text{en} + 36,58\text{ma} \quad (4a)$$

$$S_{DR} = -1817,52 + 29,56\text{an} + 42,28\text{en} + 46,21\text{ma} \quad (4b)$$

$$S_{KÖ} = -1777,70 + 29,44\text{an} + 39,98\text{en} + 46,94\text{ma} \quad (4c)$$

Alle Klassifikationsfunktionen wurden überprüft, indem die analytischen Daten von Wachsproben desselben Stockes, die nicht zur Erstellung der Funktionen dienten, eingesetzt wurden. Eine Probe pro Klasse wurde getestet und in allen Fällen ergaben sich richtige Zuordnungen zu den jeweiligen Klassen der Wachse.

II.4. Diskussion

II.4.1. *Wabenwachse unterschiedlicher Altersklassen.* Vergleiche mit bisher veröffentlichten Daten zur chemischen Zusammensetzung von Wabenwachsen der Honigbiene *Apis mellifera carnica* Pollm. zeigen weitestgehende Übereinstimmung mit den hier gezeigten Ergebnissen. Streibl (1966) befaßte sich mit den Kohlenwasserstoffen des Wabenwachses und fand dabei einen gesamten Anteil in jungem Wachs von 13,8 %. Davon waren 66 % Alkane, 32 % Alkene und 2 % verzweigte Alkane. Die Werte stimmen bis auf die fehlenden Alkadiene mit dem hier analysierten jungen Wabenwachs überein. Außer den nachgewiesenen 2-Methylalkanen kommen auch 11-Methylalkane in geringen Mengen im Bienenwachs vor (Stransky 1966). Mit der hier verwendeten DB-1-Säule und den Temperatur- und Druckprogrammen der Wachsanalyse konnten die langen Hydroxyester nur unvollständig bestimmt werden. In einer Zulassungsarbeit (Tietz 2000) konnten die Hydroxyester als Ester aus Hydroxysäuren (hauptsächlich C₁₆- und C₁₈- Hydroxysäuren) und den zugehörigen Alkoholen im Kettenlängenbereich von C₄₀ bis C₅₂ identifiziert werden. Ausführliche Studien über die Zusammensetzung der Ester des Wabenwachses (Alkylester, Hydroxyester, Diester, Triester, Hydroxydiester) finden sich bei Stransky und Streibl (1971), Stransky et al. (1971), Tulloch (1971) und Tulloch (1980). In einer neueren Studie von Aichholz und Lorbeer (1999) wurde für das Wabenwachs von *Apis mellifera* mittels Hochtemperatur-Gaschromatographie ein Diester-Anteil von 7 % beschrieben. Jedoch fanden sie keine Alkadiene und 2-Methylalkane im kürzeren Kettenlängenbereich. Bisher gibt es nur sehr wenige, ältere Studien, die sich mit dem Altern des Wabenwachses befassen. Huber (1814) verglich Wachsschuppen mit frisch verbautem Wachs anhand der Löslichkeit der Wachse in Terpentin und berichtet von einem weißlichen Rückstand bei verbautem Wachs. Jordan et al. (1940) verglichen altes mit jungem Wabenwachs anhand der Iodzahl. Es finden sich keine neueren Studien zur chemischen Zusammensetzung verschieden alter Wabenwachse.

Mit den hier gezeigten Ergebnissen kann der Prozeß der Alterung des Wabenwachses nachvollzogen werden. Die chemischen Unterschiede im Wabenwachs, die auf das Altern der Waben zurückzuführen sind, sind wahrscheinlich durch zwei parallel ablaufende Prozesse verursacht. Die Abnahme der mittleren Kettenlänge (Median_{ges}) im Laufe des Alterns (Prozeß 1) könnte durch lipolytische Enzyme bedingt sein, welche die Bienen während der Verarbeitung von Wachsschuppen zu Wabenwachs zusetzen (Hepburn 1986). Bei diesen Enzymen könnte es sich um Esterasen handeln, wodurch die Abnahme der langen Ketten zugunsten der kürzeren Ketten zu erklären wäre. Der zweite Prozeß scheint eher ein spontaner

Abnahme der relativen Anteile der Alkane und die gleichzeitige Zunahme der Anteile der Alkene, Alkadiene und 2-Methylalkane in der ersten Fraktion (Prozeß 2) könnte durch verschiedene Flüchtigkeiten dieser Substanzklassen aufgrund unterschiedlicher Bereiche der Kettenlängen zu erklären sein. Die Alkane des Wabenwachses wiesen einen Kettenlängen-Median von 28 C-Atomen auf, die Alkene des Wabenwachses besaßen einen Kettenlängen-Median von 33 C-Atomen. Um ein Maß für die unterschiedliche Flüchtigkeit dieser Substanzen zu bekommen, wurden die Dampfdrücke von kurzkettigen Alkanen und Alkenen anhand der Wagner-Gleichung (Reid et al. 1988) berechnet und für längere Alkane und Alkene durch eine Extrapolation abgeschätzt. Der Dampfdruck betrug danach für ein n-Octacosan $2 \cdot 10^{-8}$ Pa, für ein Tritriaconten $2 \cdot 10^{-11}$ Pa (bei 20 °C und 1 bar). Somit sind nach dieser Abschätzung die Alkane des Wabenwachses wesentlich flüchtiger als die Alkene, womit die Zunahme der Alkene im Laufe des Alters erklärt werden könnte.

Die Zusammensetzung von Kohlenwasserstoffen in Wabenwachsen variiert zwischen verschiedenen Kolonien, was zum Teil durch genetische Unterschiede in den Kolonien erklärt werden kann (Breed et al. 1995b). Die hier gezeigten Ergebnisse beziehen sich auf Wabenwachse einer einzelnen Kolonie. Weitere Untersuchungen hierzu sind zwingend notwendig, um die interkolonialen Unterschiede mit den gefundenen Unterschieden in Wabenwachsen eines Stockes vergleichen zu können. Auch muß die hier aufgestellte Hypothese über das Altern der Wabenwachse an anderen Kolonien getestet werden.

Da das olfaktorische System der Bienen sehr sensitiv auf Kohlenwasserstoffe reagiert (Page et al. 1991), könnte es sein, daß die klar unterscheidbaren Wachszusammensetzungen der unterschiedlich alten Wabenwachse für die Bienen Erkennungsschlüssel (Kapitel I.5.) darstellen, die sie zur Unterscheidung verschiedener Wabenbereiche des Nests einsetzen könnten, denn unterschiedliche Regionen im Nest werden von den Bienen für unterschiedliche Aufgaben genutzt. So bevorzugen Bienen bei der Aufbewahrung von Nektar und Pollen alte Wabenregionen gegenüber neugebauten Waben (Free and Williams 1974). Alte Zellen, die als Brutzellen genutzt wurden, sind mit einer Seide ausgekleidet, die von den Larven produziert wurde. Nach dem Schlüpfen der Jungbienen wird diese Seide von den Bienen mit einer dünnen Wachsschicht überzogen. Im Rahmen dieser Studie wurde die Seide vor den chemischen Analysen entfernt. Die Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung der verschiedenen Altersstufen beruhen also rein auf der Chemie der Wachse.

II.4.2. Tanzbodenwachs. Zwischen Tanzbodenwachs und Nicht-Tanzbodenwachs konnte bei der chemischen Zusammensetzung sowohl auf der Ebene der Substanzklassen als auch auf der Ebene der Einzelsubstanzen kein Unterschied gefunden werden. Zur Etablierung des hier verwendeten Tanzbodens war auf eine unbeduftete Quelle dressiert worden, so wurde die Markierung mit Blütendüften von vornherein ausgeschlossen. Bei den Versuchen von Tautz und Lindauer (1997) (Veränderung der Lage des Tanzbodens im Stock) wurde ebenfalls mit einer unbedufteten Futterquelle gearbeitet, und die Bienen fanden den Tanzboden nach veränderter Lage wieder. Bienen scheinen also in der Lage zu sein, den Tanzboden auch ohne eingetragene Blütendüfte markieren zu können. Es könnte sich also bei der Markierung um ein Pheromon handeln, welches die Bienen während des Schwänzeltanzes (eventuell aus den Tarsaldrüsen) auf den Tanzboden aufbringen. Durch die Aufbereitung gingen eventuell flüchtige Komponenten des Waxes verloren, auch könnte aufgrund einer Limitierung der Analyse von Substanzen kürzerer Kettenlängen (z.B. C₈-C₁₂) Unterschiede in diesem Kettenlängenbereich nicht detektiert werden. Damit ist die Markierung mittels eines relativ flüchtigen Pheromons nicht ausgeschlossen. Auch wäre es denkbar, daß sich das Wabenwachs im Bereich des Tanzbodens von einem Nichttanzbodenwachs in seiner Eigenschaft, Vibrationen weiterzuleiten, unterscheidet. Die Markierung des Tanzbodens beruht jedoch nicht auf einer unterschiedlichen chemischen Zusammensetzung des Wabenwaxes in diesem Bereich des Stockes.

II.4.3. Kutikulawachse unterschiedlicher Kasten und Geschlechter. In einer Studie von Blomquist et al. (1980) bestanden Hexanextrakte von Arbeiterinnen-Kutikulawachs zu 58 % aus Kohlenwasserstoffen, zu 34 % aus Estern und zu 9 % aus Säuren und polarerer Substanzen. Der Anteil der Ester liegt bei der genannten Studie deutlich unter dem hier gefundenen Esteranteil, was wahrscheinlich auf eine unvollständige Extraktion des Kutikulawaxes mit Hexan zurückzuführen ist. Eventuell sind die Extrakte durch die lange Extraktionsdauer von 10 min mit Kohlenwasserstoffen aus der Hämolymphe (Francis et al. 1989) verunreinigt, wodurch der Kohlenwasserstoffanteil zu höheren Anteilen verschoben würde. Ebenfalls mit Hexanextrakten arbeiteten auch McDaniel et al. (1984) und Francis et al. (1989). Die Untersuchungen von Arbeiterinnen- und Drohnen- und Königinnen-kutikulawachsen beschränkten sich rein auf die Kohlenwasserstoffe. In der Studie von Francis et al. (1989) wurden ebenso wie in den hier gezeigten Analysen erhöhte Anteile von verzweigten Alkanen bei den Drohnen und Königinnen gegenüber den Arbeiterinnen nachgewiesen.

Die hier untersuchten Kutikulawachse der Bienen sind sehr wahrscheinlich mit Wabenwachs kontaminiert, da durch den engen Kontakt der Bienen zur Wabe ein Austausch von Wachs zwischen der Kutikula und den Waben stattfindet (Breed et al. 1995a). Dies kann jedoch im biologische Kontext für die Bienen durchaus von Bedeutung sein, denn Bienen präsentieren ihren Nestgenossinnen auch kein reines Kutikulawachs, sondern ein Kutikulawachs, das mit Wabenwachs „verunreinigt“ ist.

Bei den Ausbeuten der Kutikulawachse weisen Arbeiterinnen trotz der kleinsten Oberfläche die größte Menge an Wachs auf. Da die Arbeiterinnen gegen Ende September abgesammelt wurden und bis dahin die Produktion von Waben im Stock abgeschlossen sein sollte, kann davon ausgegangen werden, daß die größere Menge an Wachs nicht daran lag, daß die Wachsdrüsen zur Produktion von Wabenwachs noch aktiv waren und dadurch Wachsschuppen mit extrahiert wurden. Obwohl die Drohnen eine größere Körperoberfläche aufweisen als die Arbeiterinnen und sie ebenfalls dem Austausch von Wabenwachs mit Kutikulawachs im Stock ausgesetzt waren, ist die Menge an Kutikulawachs doch vergleichsweise niedrig. Die geringe Menge von Wachs auf den Königinnen ist durch das geringe Alter von 1-2 Tagen bedingt. Bei 1-2 Jahre alten begatteten Königinnen wurde fast dreimal soviel Kutikulawachs nachgewiesen (eigene Daten: $245 \pm 54 \mu\text{g}$ pro Königin, $n=7$).

Die Kutikulawachse von Bienen spielen in der Verwandtenerkennung und in der Erkennung von Nestgenossinnen eine entscheidende Rolle (Getz et al. 1986, Getz und Smith 1986, Getz et al. 1988, Getz und Page 1991, Page et al. 1991, Breed und Stiller 1992). Aufgrund der hier gefundenen Unterschiede zwischen den Kutikulawachsen von Arbeiterinnen, Drohnen und Königinnen könnte auch eine Erkennung von Kasten und Geschlechtern durch die Honigbienen möglich sein. Die Kohlenwasserstoffprofile der Bienen sind in gewissen Grenzen veränderlich und die Umgebung der Bienen (z. B. Wabenwachse oder Blütendüfte) hat darauf einen erheblichen Einfluß (Howard 1993, Breed et al. 1995a). Nach Page et al. (1991) werden Kutikulakohlenwasserstoffe zwischen sozialen Gruppen von Individuen übertragen. Somit könnten auch für unterschiedliche Berufsgruppen der Bienen (und daher unterschiedliche Umgebung und unterschiedlicher Kontakt zu anderen Bienen) verschiedene chemische Zusammensetzungen der Kutikulawachse als Erkennungsschlüssel dienen.

II.4.4. Kutikulawachse unterschiedlicher Berufsgruppen. Anhand der chemischen Analyse konnten drei Berufsgruppen (Sammlerinnen, Innendienstbienen und Hofstaatbienen) deutlich unterschieden werden. Die Unterschiede in den Wachsen der verschiedenen Berufsgruppen waren nicht durch altersabhängige Unterschiede in den Kutikulawachsen bedingt (Blomquist

Beobachtungsstock abgefangen wurden, in dem alle Bienen annähernd gleich alt waren, konnten sich Berufsgruppen aus einer Gruppe gleich alter Bienen differenzieren. Altersabhängige Unterschiede im Kutikulawachs waren demnach nicht zu erwarten, zumal die Bienen in einem Alter von ca. 2-3 Wochen abgefangen wurden. In diesem Alter sind keine großen Schwankungen in der chemischen Zusammensetzung des Kutikulawachses zu erwarten. (Blomquist et al. 1980). Ein weiterer Grund für eine unterschiedliche Zusammensetzung der Kutikulawachse könnte eine Wachsschuppenproduktion der Innendienstbienen sein. Allerdings konnten keine Bienen bei der Sekretion von Wachsschuppen beobachtet werden und es müßten bei einer Wachsschuppenproduktion die Anteile der Ester am Kutikulawachs erhöht sein (Blomquist et al. 1980), was bei den Innendienstbienen nicht der Fall war.

In der statistischen Analyse grenzte sich die Gruppe der Sammlerinnen am deutlichsten ab. Die beiden Berufsgruppen, die sich ständig im Stock aufhielten, waren schlechter zu unterscheiden, was auf den intensiveren Kontakt beider Gruppen mit dem Wabenwachs zurückzuführen sein könnte. Allerdings spricht der niedrigere Esteranteil bei Innendienstbienen und Hofstaatbienen gegen diese Vermutung, da bei einem intensiveren Kontakt mit dem Wabenwachs, welches einen viel höheren Esteranteil als das Kutikulawachs ausweist, der Estergehalt der Kutikulawachse bei Innendienstbienen und Hofstaatbienen aufgrund der stärkeren Verunreinigung mit Wabenwachs höher sein müßte.

Mit den hier durchgeführten Analysen wurden zum ersten Mal Unterschiede in den Kutikulawachsen verschiedener Berufsgruppen von Honigbienenarbeiterinnen nachgewiesen. Aufgrund der Unterschiede in den Kutikulawachsen der Berufsgruppen könnten Honigbienen in der Lage sein, diese verschiedenen Gruppen anhand der Kutikulawachse zu unterscheiden.

II.4.5. Statistik. Die hier angewandte Diskriminantenfunktionsanalyse bewegt sich aufgrund der geringen Anzahl der Stichproben in den einzelnen Gruppen der Wachse in einem Grenzbereich der Zulässigkeit. Durch die geringe Anzahl der Stichproben im Vergleich zu den Variablen ist bei der Diskriminantenfunktionsanalyse die Wahrscheinlichkeit eines Fehlers 1. Art, nämlich eine Signifikanz anzunehmen, die eigentlich nicht existiert, erhöht. Um diesen Fehler zu minimieren, wurden die Signifikanzniveaus für die Diskriminantenfunktionsanalysen sehr konservativ gewählt ($p \geq 0,01$, nicht signifikant; $0,01 > p \geq 0,001$, signifikant; $p < 0,001$, hochsignifikant). Der Fehler 1. Art wurde in den hier durchgeführten Analysen zusätzlich durch die *a priori*-Klassifikation der Stichproben in die

Stichproben in jeder Gruppe und durch die sehr gute Trennung der Gruppen verringert (Lachenbruch und Goldstein 1979, Lachenbruch und Clarke 1980, Aitchison 1986).

Die Methode der Wahl wäre eine Hauptkomponentenanalyse, eine datenreduzierende Technik, welche die Information aus einer großen Anzahl an Variablen in wenige neue Variablen zusammenfaßt (Reyment 1989). Allerdings werden diese neuen Variablen (Faktoren) aus mehrere alten Variablen gebildet. Bei den hier vorliegenden Daten wurden aus bis zu acht verschiedenen Substanzklassen als Variablen bis zu drei Faktoren gebildet. In jeden einzelnen dieser Faktoren gingen sämtliche Substanzklassen mit ein. Dadurch konnten die für diese Studie sehr wichtigen Informationen darüber, in welchen Substanzklassen die chemischen Unterschiede der Wachse liegen, nicht gewonnen werden. Somit wurde trotz der geringen Anzahl der Stichproben und dem bestehenden Risiko des Fehlers 1. Art die Diskriminantenfunktionsanalyse angewandt, um die Substanzklassen identifizieren zu können, in denen die chemischen Unterschiede der Wachse liegen. Eine Erhöhung der Stichproben war aus ökonomischen Gründen nicht möglich, denn die chemische Analytik von Wachsen ist sehr zeit- und arbeitsintensiv.