

**Frieder Hofmann, Ulrich Schlechtriemen,
Werner Wosniok und Mathias Foth**

GVO-Pollenmonitoring

**Technische und biologische Pollenakkumulatoren
und PCR-Screening für ein Monitoring von
gentechnisch veränderten Organismen**



GVO-Pollenmonitoring

**Technische und biologische Pollenakkumulatoren
und PCR-Screening für ein Monitoring von
gentechnisch veränderten Organismen**

Förderkennzeichen (UFOPLAN) 200 89 412

**Frieder Hofmann
Ulrich Schlechtriemen
Werner Wosniok
Mathias Foth**

Titelbild:

Foto links: Technischer Pollensammler Sigma-2 und PMF (Foto: Hofmann)

Foto rechts: Honigbiene (*Apis mellifera*) an einer Rapsblüte (Foto: von der Ohe)

Bearbeiter:

Dipl.-Biol. Frieder Hofmann
(Projektleiter)

Ökologiebüro Hofmann
Rennstieg 25; 28205 Bremen
f.hofmann@oekologiebuero.de

Dipl.-Forstwirt Ulrich Schlechtriemen

TIEM Integrierte Umweltüberwachung GbR
Nörten-Hardenberg

Dipl.-Math. Werner Wosniok

Institut für Statistik
Universität Bremen

Dipl.-Biol. Matthias Foth

GeneScan Analytics GmbH
Bremen

Unter Mitarbeit von:

Dipl.-Ing. Gernot Breitfuß

Breitfuß Messtechnik GmbH, Harpstedt

Volker Dietze

Deutscher Wetterdienst GF Medizin-

Dr. Eckart Schultz

Meteorologie (DWD), Freiburg

Dr. Werner von der Ohe

Nieders. Landesinstitut für Bienenkunde,
Celle

Katharina von der Ohe

Dr. Beatrix Tappeser

Öko-Institut GmbH, Freiburg

Fachbetreuung:

Dipl.-Ing. Frank Berhorn

Bundesamt für Naturschutz (BfN)

Dipl.-Biol.'in Anne Mieke

Umweltbundesamt (UBA)

Dr. Barbara Schieferstein

Bremer Innovations-Agentur GmbH (BIA)

Dr. Detlef Pukrop

Bund-Länder Modellprojekt gefördert durch den Senator für Bau und Umwelt des Landes Bremen (SBU), den Senator für Gesundheit, Jugend, Soziales und Arbeit des Landes Bremen (SGJSA) und das Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. Im Auftrag des Umweltbundesamtes und des Bundesamtes für Naturschutz und der Bremer Innovations-Agentur (BIA).

Die Beiträge der Skripten werden aufgenommen in die Literaturdatenbank „*DNL-online*“ (www.dnl-online.de).

Die BfN-Skripten sind nicht im Buchhandel erhältlich.

Herausgeber: Bundesamt für Naturschutz
Konstantinstr. 110
53179 Bonn
Telefon: 0228/8491-0
Fax: 0228/8491-200
URL: www.bfn.de

Der Herausgeber übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie für die Beachtung privater Rechte Dritter. Die in den Beiträgen geäußerten Ansichten und Meinungen müssen nicht mit denen des Herausgebers übereinstimmen.

Nachdruck, auch in Auszügen, nur mit Genehmigung des BfN.

Druck: BMU-Druckerei

Gedruckt auf 100% Altpapier

Bonn - Bad Godesberg 2005

ABSTRACT

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1	Problemstellung und Zielsetzung	1
1.1.1	Die rechtliche Verpflichtung für das GVO-Monitoring	2
1.1.2	Spezifische Anforderungen an das GVO-Monitoring	3
1.1.3	Ansatz für eine praktikable Monitoring-Strategie	5
1.1.4	Die Bedeutung des Pollenmonitorings	7
1.2	Projektbeschreibung.....	10
1.2.1	Verfahrensentwicklung	10
1.2.2	Freilandprüfungen	11
1.2.3	Ergebnisse	12
1.3	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	15
1.3.1	Wissenschaftliche Aspekte.....	15
1.3.2	Wirtschaftliche Aspekte	17
2	METHODIK	19
2.1	Methodischer Ansatz.....	19
2.2	Technischer Pollensammler: Sigma-2 mit Pollenmassenfilter PMF	23
2.2.1.1	Stand der Technik	23
2.2.1.2	Verfahrensentwicklung	32
2.2.2	Sigma-2	33
2.2.2.1	Bau und Funktion.....	34
2.2.2.2	Expositionsdauer.....	35
2.2.2.3	Transport und Präparation.....	35
2.2.2.4	Mikroskopische Pollenzählung.....	35
2.2.2.5	Auswertung.....	38
2.2.2.6	Weitere Auswertemöglichkeiten mit Erläuterungen zum Sammelverhalten des Sigma-2.....	39
2.2.3	Der Pollenmassenfilter PMF	44

2.2.3.1	Bau und Funktion des PMF	44
2.2.3.2	Probengewinnung und -aufbereitung	49
2.2.3.3	Auswertung	51
2.2.3.4	Weitere Auswertemöglichkeiten mit Erläuterungen zum Sammelverhalten des PMF ..	54
2.3	Biologische Pollensammlerin Honigbiene.....	59
2.3.1	Grundlagen	59
2.3.2	Lebensraum und Sammelverhalten der Biene	60
2.3.3	Standorte, Flugzeiten, Versuchslauf	64
2.3.4	Probengewinnung	68
2.3.5	Melissopalynologische Untersuchung	69
2.3.5.1	Bestimmung der Pollenarten im Honig und der relativen Häufigkeit einzelner Arten ..	70
2.3.5.2	Bestimmung der absoluten Pollenanzahlen im Honig	72
2.3.5.3	Bestimmung der absoluten Pollenanzahlen in der Matrix Bienenbrot.....	73
2.4	PCR-Verfahren für molekularbiologische DNA-Nachweise.....	74
2.4.1	Ausgangssituation	74
2.4.2	Überblick über die Vorgehensweise	77
2.4.3	Vorversuche	79
2.4.4	DNA-Extraktionsverfahren	80
2.4.4.1	CTAB-Methode	80
2.4.4.2	Qiagen DNeasy Tissue Kit.....	81
2.4.5	PCR-Methoden.....	82
2.4.5.1	PCR mit Gelelektrophorese	82
2.4.5.2	Real-time PCR (TaqMan).....	83
2.4.6	Laborübergreifende Versuche zur Bestimmung von Sensitivität, Nachweisgrenze, Reproduzierbarkeit und Fallzahlen	84
2.4.6.1	Statistik	84
2.4.6.2	Sensitivität der PCR-Verfahren in DNA-Lösungen.....	88
2.4.6.3	Rapspollen	101
2.4.6.4	Mais- und Zuckerrübenpollen.....	116
2.4.6.5	Rapspollen in Honig	118
2.4.7	Fazit der methodischen Untersuchungen zur PCR von Pollen-DNA	121
2.5	Ausbreitungsrechnung und Parameter für Polleneinfluss.....	122
2.5.1	Beschreibung der durchgeführten Ausbreitungsrechnungen	128

2.5.2	Parameter für das GVO-Pollenmonitoring	135
2.6	Verfahrensprüfungen im Freiland: Methodischer Ansatz über Pollengradienten	138
2.7	Untersuchungsgebiete und GVO	138
2.7.1	Untersuchungsstandorte im Raum Sickinge [HR-Raps]	140
2.7.2	Referenzräume Kelheim und Bayerischer Wald [Raps]	150
2.7.3	HR-Mais in Sickinge	153
2.7.4	VR-Zuckerrübe und Bt-Mais in Aachen	156
2.7.5	Bt-Mais in Schwarzenau	159
2.7.6	Ergänzungsstandorte: Bremen, Nörten-Hardenberg, Freiburg	160
2.8	Statistik	161
2.8.1	Behandlung von Werten unter der Nachweisgrenze bei Pollenzählungen	161
2.8.2	Verteilung von Pollendaten und Dichteschätzung	161
2.8.3	Zusammenhang zwischen beobachtetem und erwarteten Pollenfluss, statistische Ermittlung von Nachweisgrenze, Sensitivität und Reproduzierbarkeit	164
2.8.4	Statistische Ermittlung von Nachweiswahrscheinlichkeit und Fallzahlen	167
2.8.5	Pollenspektrum	168
2.8.6	Statistische Ermittlung von Nachweiswahrscheinlichkeit, Fallzahl und Raumrepräsentativität bei der Honigbiene	169
3	ERGEBNISSE MIT DISKUSSION	170
3.1	Technische Pollensammler: Sigma-2 und PMF	170
3.1.1	Ergebnisse zur Praktikabilität der Sammler und zur Standortwahl	170
3.1.2	Passivsammler Sigma-2	171
3.1.2.1	Ergebnisse der Pollenzählungen für die Rapsperiode	171
3.1.2.2	Sensitivität, Nachweisgrenze und Reproduzierbarkeit	176
3.1.2.3	Sicherheit des Nachweises und erforderliche Fallzahlen	179
3.1.3	Pollenmassenfilter PMF	184
3.1.3.1	Pollenmengen	184
3.1.3.2	Ergebnisse der PCR-Analysen	187
3.1.3.3	Sensitivität, Nachweisgrenze und Reproduzierbarkeit	188
3.1.3.4	Sicherheit des Nachweises und erforderliche Fallzahlen	191
3.1.4	Ergebnisse aus der Sommerperiode für Mais und Zuckerrübe	195

3.1.5	Pollenspektrum des technischen Sammlers	200
3.2	Biologische Pollensammlerin Honigbiene	204
3.2.1	Entwicklung der Bienenvölker	204
3.2.2	Ergebnisse der Pollenanalysen im Honig und Bienenbrot.....	204
3.2.2.1	Mikroskopische Pollenanalyse im Honig	205
3.2.2.2	Mikroskopische Pollenanalyse im Bienenbrot.....	213
3.2.3	Auswertung in Bezug auf Nachweis des GVO-Einflusses, repräsentative Sammelbereiche und Fallzahlen für das GVO-Monitoring	217
3.2.3.1	Statistische Ermittlung von Nachweiswahrscheinlichkeit und Fallzahlen zur Raumüberwachung unter Einbeziehung der quantitativen PCR-Ergebnisse	220
3.3	Vergleich der Pollenspektren aus biologischem und technischem Sammler	223
3.4	PCR.....	229
3.4.1	Ergebnisse der Vorversuche	229
3.4.2	Pollenproben aus den technischen Sammlern.....	229
3.4.3	Bienenhonig	234
4	BEWERTUNG.....	238
4.1	Technische Pollensammler.....	238
4.1.1	Sigma-2	238
4.1.2	PMF	239
4.2	Biologische Pollensammler: Matrix Bienenhonig	241
4.3	PCR.....	244
5	SCHLUSSFOLGERUNGEN	245
5.1	Monitoring der Umweltwirkungen von GVO	245
5.2	Die Rolle des Pollenmonitorings.....	251
5.3	Die Umsetzung des Pollenmonitorings in der Praxis - Probenahmedesign	252
5.4	Kosten des Pollenmonitoring	255

5.5	Bedeutung der Ergebnisse für Abstandsregelungen und Koexistenz von GVO und konventionellem/Biolandbau	256
6	WEITERE SCHRITTE ZUR UMSETZUNG DES GVO-POLLENMONITORINGS	260
7	LITERATUR.....	261
	ANHANG	275

ABSTRACT

The aim of the project was to develop a standardisable method for monitoring genetically modified organisms (GMOs), in order to produce geographical and temporal documentation of GMO loads and their distribution using physical-mechanical and biological pollen accumulators in combination with PCR screening. The mechanical pollen trap was developed during the project from the Sigma-2 passive sampler conforming to the VDI 2119, Sheet 4 standard, and, as additional equipment, the PMF pollen mass filter. The honey bee, with honey as medium, was tested as a potential biological pollen collector. The pollen load was microscopically identified and quantified according to the type and quantity of pollens in the samples obtained from the mechanical pollen traps, and in the honey medium. Molecular biological DNA screening methods based on polymerase chain reaction (PCR) were refined in order to identify pollen loads from GMOs (qualitative PCR and quantitative real-time PCR). The methods were validated for standardised application in GMO monitoring using defined pollen gradients in areas surrounding crops of transgenic HR rape, HR and Bt corn and VR sugar beet. In 2001, a total of 81 sites in the vicinity of experimental GM crop fields were studied. In quadrants measuring up to 8 x 8 km² in area, and in corresponding reference areas, physical-mechanical pollen traps and beehives were positioned, on the basis of findings from pollen distribution models, at various distances and wind directions, such that a gradient test could be conducted on several different scales. The result of statistical analysis showed that the methods used are sensitive, reproducible and representative, and that they are suitable for GMO monitoring. Evaluation of the pollen spectra showed that more than 140 species were collected, and that mechanical and biological collectors complemented each other ideally. Finally, the sample sizes necessary for GMO monitoring were estimated and a strategy for monitoring GMOs outlined.

1 Zusammenfassung

1.1 Problemstellung und Zielsetzung

In Anbetracht einer zu erwartenden steigenden Anzahl von Freisetzungen mit gentechnisch veränderten Organismen (GVO) steht gemäß der EU-Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG verpflichtend der zügige Aufbau einer bundesweiten, naturraumrepräsentativen Umweltüberwachung von GVO an. Die Wirkungen, die von GVO ausgehen können, sind in ein komplexes Netzwerk von Ökosystem-Komponenten eingespannt, die für das „Risk Assessment und Management“¹ von GVO eine Langzeitbeobachtung erforderlich machen. Eine wesentliche Aufgabe für das Monitoring liegt hierbei in der raum-zeitlichen Dokumentation der Exposition in Form von Eintrag und Verbreitung der Transgene und der gentechnisch veränderten Organismen (GVO)². Pollen stellen dabei ein entscheidendes Transfer-Element (Vektor) dar, über das Genmaterial in andere Kompartimente des Ökosystems eingebracht werden kann. Dies kann zu potentiell adversen Wirkungen auf biologisch-ökologischer Ebene führen sowie auch unerwünschte und schädliche Auswirkungen auf den Landbau selbst nach sich ziehen, wie Erfahrungen aus Kanada, den USA und Mexiko lehren³. In den EU-Guidelines zum Risk Assessment & Management wurden daher dem langfristigen Schutz von Mensch und Natur sowie der nachhaltigen Gewährleistung der Koexistenz von GVO, konventionellem und Ökolandbau, eine hohe Priorität eingeräumt.⁴ Da die Risiken, die mit der Freisetzung von GVO verbunden sein können, vorab nur unzureichend wissenschaftlich geklärt werden können – insbesondere was potenzielle Langzeitfolgen angeht – wurde in der EU verpflichtend ein Monitoring der Umweltwirkungen von GVO vorgeschrieben, die eine Zulassung zum Inverkehrbringen nach Part C der EU-Richtlinie erhalten. Das Monitoring ist Part des

¹ IMPEL (2003)

² EU-Freisetzungsrichtlinie 2001/18; Eckpunktepapier der Bund/Länder-AG in UBA (2001) Kap. 2.1.2; UBA (2003).

³ Friesen et al. (2003), Quist & Chapela (2001), Clark (1997, 2001), Marvier (2002)

⁴ Consumer Voice (2003)

Risk Assessment & Management und hat regulatorische Funktionen, u.a. soll es als Frühwarnsystem fungieren, um gegebenenfalls noch gegensteuern zu können.

Das Modellprojekt setzt hier auf der Expositionsebene an. Ziel war die Entwicklung und Prüfung eines standardisierbaren Pollenmonitorings. In dem Vorhaben wurden die Verfahrensgrundlagen für die technische Erfassung und mathematische Auswertung geschaffen, die es ermöglichen, das Pollenmonitoring zeitnah als erste Stufe des GVO-Monitorings einzusetzen. Dazu wurden die Einsatzmöglichkeiten von technischen und biologischen Pollensammlern und von PCR-Screening-Verfahren zum Nachweis der Genkonstrukte geprüft, diese Verfahren weiterentwickelt und über Freilandtests im Hinblick auf eine zukünftig standardisierbare Anwendung im GVO-Monitoring validiert. Die statistische Auswertung schätzte schließlich die erforderlichen Fallzahlen⁵ ab in Abhängigkeit von den Beobachtungswahrscheinlichkeiten für das GVO-Monitoring in der Bundesrepublik. Dadurch wird eine effiziente Umsetzung des Pollenmonitorings ermöglicht.

1.1.1 Die rechtliche Verpflichtung für das GVO-Monitoring

Die EU-Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG vom 21. März 2001 gilt mit Wirkung vom Oktober 2002 in der EU und muss in nationales Recht umgesetzt werden. Sie gilt auch für die GVO, die unter die neuen EU-Verordnungen zu GVO in Lebens- und Futtermittel fallen.⁶ Die Freisetzungsrichtlinie schreibt die Etablierung eines EU-weiten Langzeit-Monitoring-Programms für gentechnisch veränderte Organismen verpflichtend vor. Langjährige Überwachung und Beobachtung ausgewählter und allgemeiner Umweltparameter sollen die Auswirkungen von gentechnisch veränderten Organismen auf Mensch und Umwelt möglichst frühzeitig erkennen lassen. Falls es zu unerwünschten Wirkungen kommt, können daraus Maßnahmen für Gegenaktivitäten abgeleitet werden. Dazu sind für den jeweiligen GVO sowohl spezifische Effekte als auch allgemeine Wirkungen zu überwachen, Referenzzustände zu erheben sowie

⁵ Probenanzahl als Anzahl Standorte mal Probenahmefrequenz

⁶ EU-Verordnung 1829 (2003) und EU-Verordnung 1830 (2003)

sofortige und spätere Wirkungen zu beobachten. Weiterhin sollen auch Effekte einbezogen werden, die nur indirekt mit der Anwendung des GVO zusammenhängen, wie z.B. Folgen veränderter Anbauweisen. Die in der EU-Richtlinie genannten Kriterien für eine GVO-Umweltüberwachung sind in jedem Mitgliedsland der EU zu erfüllen und in Form von verbindlichen, GVO-spezifischen Überwachungsplänen umzusetzen. Deutschland befindet sich mit anderen Ländern hier im Verzug.

1.1.2 Spezifische Anforderungen an das GVO-Monitoring

Im Focus der derzeitigen Diskussion steht die Frage, wie Umwelteffekte von GVO mit einem Monitoring wissenschaftlich am besten zu beobachten und zu erfassen sind und wie sie am besten die bereits im Vorfeld der Zulassung durchgeführten Untersuchungen der Risikoforschung (Richtlinie 2018/EG: Part A und B; UVP) ergänzen. Am weitesten gediehen ist dies im Bereich gentechnisch veränderter Pflanzen (GVP), worauf sich auch diese Arbeit bezieht. Derzeit liegen einige Vorschläge für die Umsetzung vor, die mehr oder weniger umfassend sind, es mangelt jedoch an einem schlüssigen Gesamtkonzept, mit dem die wesentlichen Ziele erreicht werden können und das zusätzlich als praktikabel eingeschätzt wird⁷.

Aufgabe des Monitorings ist es weder die vorgeschaltete Risikoforschung, die Begleitforschung noch Grundlagen- und Ökosystemforschung zu ersetzen, sondern, wie in der EU-Richtlinie vorgeschrieben, einen davon abgegrenzten und ergänzend zu sehenden Umweltüberwachungsauftrag zu übernehmen. Monitoring stellt ganz im Sinne des Risk Assessment & Risk Managements⁸ keine Zweitaufgabe der Begleitforschung dar. Es soll durch umfassende Feldbeobachtung Erkenntnislücken schließen, die aus den räumlich, zeitlich und ökologisch reduzierten Versuchen im Vorfeld der Zulassung resultieren. Das GVO-Monitoring ist das in der Freisetzungsrichtlinie vorgesehene Instrument, um zu prüfen, ob und inwieweit im Freiland gegebenenfalls feststellbare

⁷ UBA (2003); Züghart & Breckling (2003); Biosafety (2002); Raubuch & Schieferstein (2002); Brauner & Tappeser (2001); Miklau et al. (2001); UBA (60/2001); Neemann & Scherwaß (1999); Ammann & Vogel (1999); UBA (58/1996; UBA (77/1998)

⁸ IMPEL (2003)

Umweltveränderungen mit der Freisetzung von GVO zusammenhängen. Durch diese Zielstellung unterscheidet es sich von der Allgemeinen Umweltbeobachtung. Das Monitoring soll zu nachvollziehbaren und länderübergreifend vergleichbaren Ergebnissen führen, aus denen sich Konsequenzen ableiten lassen. Dies erfordert eine Standardisierung der Verfahren im Monitoring.⁹

Angesichts multipler Ursachen und komplexer Zusammenhänge sind im Kontext von GVO keine streng kausalen Beweisketten zu erwarten, vielmehr kommt es, wie in vielen anderen Umweltbereichen auch, auf Nachvollziehbarkeit und Plausibilität an. Ein wesentliches Problem bei der Umsetzung des GVO-Monitorings sind die sehr geringen Beobachtungswahrscheinlichkeiten, da z.B. potenzielle Langzeitwirkungen von GVO sich erst mit der Zeit über Generationen aufbauen und nur begrenzte Möglichkeiten zur Beobachtung im Monitoring bestehen werden. Das Monitoring als Frühwarnsystem soll jedoch möglichst schnell unerwünschte Wirkungen feststellen, um entsprechend gegenlenken zu können.

Ausreichende Beobachtungswahrscheinlichkeiten machen dann hohe Fallzahlen (d.h. Anzahl Probenstandorte und Probenahmefrequenz) notwendig. Die Exposition in Form der Verbreitung der eingebrachten Transgene und GVO lässt sich dabei prinzipiell günstiger ermitteln als ökologische Wirkungen, für die längere Latenzzeiten anzunehmen sind. Allerdings bringt auch die Umsetzung des GVO-Monitorings die Gefahr mit sich, angesichts einer wachsenden Vielfalt an GVO und entsprechenden potentiellen GVO-Wirkungen einer Parametervielfalt den Vorzug zu geben, und dann aufgrund begrenzter Ressourcen an zu wenigen Standorten das Monitoring zu praktizieren. Daraus resultiert die Gefahr systematisch falsch-negativer Befunde. Dabei kommt noch der Unterschied von Eintrittswahrscheinlichkeit der Effekte zu den von den Erfassungsmethoden abhängigen, stets geringer ausfallenden Beobachtungswahrscheinlichkeiten ins Spiel. Für ein erfolgversprechendes GVO-Monitoring sind deshalb eine naturraumrepräsentative Erfassung mit entsprechend hohen

⁹ siehe Richtlinienarbeit beim VDI, Fachbeirat „Monitoring der Umweltwirkungen von GVO“, <http://www.vdi.de>

Standortzahlen, die die Variabilität im Untersuchungsraum reflektieren, sowie lange Beobachtungszeitreihen wesentlich und erforderlich. Nur so können Zusammenhänge zwischen beobachteten Umweltveränderungen und der Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen überhaupt schlüssig und nachvollziehbar geprüft werden.

1.1.3 Ansatz für eine praktikable Monitoring-Strategie

Der Zusammenhang von GVO-Freisetzungen und beobachteten Wirkungen auf die Schutzgüter soll möglichst schlüssig erkannt werden. Allein mit der Beobachtung von ökologischen Veränderungen lässt sich dies nicht erreichen, da für die meisten potentiellen Wirkungen eine hohe Variabilität und multiple Ursachenzusammenhänge gelten. Für ausreichend sichere Aussagen ist in solchen Zusammenhängen vielmehr die Betrachtung mehrerer Ebenen erforderlich, die miteinander verknüpft werden müssen: 1. GVO- Freisetzungs- bzw. anbauorte , 2. Exposition, 3. Wirkung und 4. Integrierte Bewertung. Hierbei wird im Monitoring dies nur exemplarisch und repräsentativ erfolgen können. Für plausible Nachweise von spezifischen, auf die Freisetzung von GVO zurück zu führende Wirkungen sind dann räumliche und zeitliche Zusammenhänge über die genannten vier Ebenen ausschlaggebend. Ein solcher Ansatz wurde in diesem Vorhaben folgendermaßen konzipiert:

Bei Kenntnis der Lage der Quellen lässt sich die Verbreitung von GVO via Pollen und andere Vektoren über Ausbreitungs- und Expositionsmodelle abschätzen. Über geeignete Akkumulationsindikatoren, wie das Pollenmonitoring, lässt sich dann der GVO - Einfluss im Gelände feststellen und die Modelle exemplarisch überprüfen. Auf der Expositionsebene kann dies zeitnah bei relativ günstigen Beobachtungswahrscheinlichkeiten erfolgen. Deutlich schwieriger werden die Beobachtungsmöglichkeiten dagegen bei den ökologischen Reaktionswirkungen, wie z.B. bei Artenverschiebungen in Nachbarschaftsflächen, Auskreuzungen etc.. Hier ist über Dekaden mit sehr geringen Beobachtungswahrscheinlichkeiten zu rechnen. Viele potenzielle Wirkungen wie z.B. horizontaler Gentransfer und Genpooledriften dürften sich für lange Zeiträume ganz einer systematischen Freilandbeobachtung entziehen. Die

Expositionsbestimmung von GVO kann dann als Filter und Lenkungsinstrument dienen:

1. Wirkungsuntersuchungen können gezielt auf Orte gelenkt werden, wo die Beobachtungschancen besonders groß sind, 2. kann die Exposition als Indikator zur Abschätzung von solchen Effekten dienen, die sich der unmittelbaren Beobachtung entziehen.

Unser Ansatz baut auf der Kenntnis zu den Anbaugebieten und Freisetzungsorten (Anbauregister) auf und nimmt über Modelle Expositionsabschätzungen vor, die dann gezielt im Freiland überprüfbar sind. Auf der Expositionsebene kann ein Screening ermitteln, ob GVO vorkommen oder eingetragen werden. Hierbei lassen sich ca. 80% der derzeitigen GVO nachweisen.¹⁰ Ist dies der Fall, so erfolgt eine Spezifizierung des GVO und eine eingehende Raumanalyse. Auf diese Weise ergeben sich bereits wesentliche Erkenntnisse zum Eintrag und zur Verbreitung von GVO in Deutschland als Grundlage von Risikoabschätzungen. Zugleich können GVO-spezifische, meist aufwändige Untersuchungen auf der Wirkungsebene gelenkt werden. Über diese örtliche Konzentration von Wirkungsuntersuchungen eröffnet sich ein machbarer Weg für das GVO-Monitoring auch angesichts einer zunehmenden Vielfalt von GVO.

Um zur Klärung von Wirkungszusammenhängen die geeigneten Standorte auszuwählen, ist es aus statistischen Gründen erforderlich, die Variationsbreite über

- die in die Umwelt ausgebrachten Transgene und GVO,
- die naturräumliche Vielfalt der Wirkungsorte sowie
- die Einflussintensität der jeweiligen GVO

zu erfassen. Das Spektrum bezieht (Haupt-) Anbaugebiete, sensible Zonen wie Schutzgebiete, sowie Referenzbereiche repräsentativ ein. Dieser Ansatz schafft dann auch die notwendigen Voraussetzungen, um gegebenenfalls Konsequenzen zu ziehen und politische Festlegungen, wie die angestrebte Koexistenz von GVO-Anbau und

¹⁰ siehe Kap. 2.4

GVO-freien Zonen, z.B. für den konventionellen und Ökolandbau, überprüfbar umzusetzen und nachhaltig einzuhalten.

In dieser Monitoringstrategie sind „case-specific“ und „general surveillance“ integrierte Aspekte. Ein effizientes Monitoring erfordert aus statistischen Gründen ein Basismessnetz an Dauerbeobachtungsstandorten, das schätzungsweise in der Größenordnung von 500-1.000 Standorten in der Bundesrepublik anzusiedeln ist – ansonsten besteht die Gefahr, systematisch falsch-negative Resultate zu erzeugen¹¹. Diese Größenordnung entspricht auch Erfahrungen aus anderen Umweltbeobachtungsprogrammen des Bundes, der Länder und der EU¹². Das angesprochene Basismessnetz lässt sich je nach Bedarf durch weitere Standorte und Erhebungsparameter ergänzen, die bei der Entwicklung neuer gentechnisch veränderter Organismen notwendig werden.

Der hier vorgestellte integrierte Ansatz kommt gegenüber einem primär auf Wirkung reduzierten Ansatz mit erheblich weniger Probenstandorten aus und erhöht gleichzeitig die Aussagekraft.

1.1.4 Die Bedeutung des Pollenmonitorings

Das Pollenmonitoring erfüllt eine doppelte Funktion: Im Rahmen der Umweltüberwachung von GVO stellt es einen Akkumulationsindikator dar, über den sich der Eintrag und die Verbreitung von GVO (Exposition) dokumentieren lässt. Pollen kann darüber hinaus aber auch als Indikator zur Abschätzung weiterer Parameter auf Wirkungsseite dienen, die im Monitoring nicht direkt erhoben werden bzw. nicht direkt beobachtbar sind.

Über die Pollensammler lässt sich die potenzielle Ausbreitung von GVO quantifizieren, wobei über molekularbiologische Verfahren wie die PCR der konkrete Nachweis von GVO geführt wird.

¹¹ siehe Kap. 3 und 4; Marvier (2002)

¹² von Klitzing et al. 1998.

Auf der Ebene der Exposition sind besonders solche Verfahren effizient, die konstruktübergreifend GVO-Nachweise (Screening) mit einer integrierenden Matrix als Akkumulationsindikatoren¹³ ermöglichen. Neben Pollen, der einen wesentlichen Vektor zur Verbreitung von GVO darstellt, kommen weitere Matrizes in Frage, wie Pflanzenmischproben, die Losung¹⁴ von pflanzenfressenden Wildtieren, Sedimente, Klärschlamm sowie im Boden gespeicherte Samen. Unter den potentiellen Verbreitungseinheiten (Diaspora) und Expositionsparameter weist Pollen den Vorzug auf gut erfassbar zu sein.

Für das Pollenmonitoring kann auf bereits existierende Sammel- und Analyseinstrumente aufgebaut werden. Dazu stehen technische und biologische Pollensammler (z.B. Honigbiene) und molekularbiologische Analyseverfahren (PCR) zur Verfügung. Mit Hilfe von PCR-Screening-Verfahren lassen sich über den Nachweis weniger Konstrukte – die allerdings in vielen GVO vorkommen - ca. 80% der derzeit gängigen GVO-Konstrukte in einem Probengang erfassen (siehe Kap 2.3). Damit existieren beim Pollenmonitoring Verfahrensgrundlagen, mit denen die Exposition von GVO über Pollen sowie das Vorkommen pollenfreisetzender gentechnisch veränderter Pflanzen im Freiland effizient überprüfbar wird.

Das Ziel des vorliegenden Vorhabens war, die vorhandenen Verfahren hinsichtlich einer zeitnahen Umsetzung im GVO-Monitoring im Hinblick auf Standardisierung zu prüfen, entsprechend weiterzuentwickeln und in Freilandtests zu validieren.

Pollen können in großen Mengen über Wind und Insekten von den Anbauflächen der GVO über weite Strecken verfrachtet werden. Mit ihrer DNA verbreiten sie dabei auch transgene Konstrukte¹⁵.

Der Pollenflug von GVO stellt zwei Expositionswirkungen dar:

¹³ Beim Monitoring ist es sinnvoll, zwischen Indikatoren zur Beschreibung von Akkumulations- und Reaktionswirkungen zu unterscheiden (Arndt et al. 1987, Zimmermann et al. 1994). Akkumulationsindikatoren dienen zur Erfassung der Exposition von Stoffen in der Umwelt, hier der Dokumentation von Eintrag und Verbreitung der transgenen DNA und der GVO. Indikatoren zur Reaktionswirkung beschreiben die auf Grund der Exposition hervorgerufenen biologischen und ökologischen Veränderungen.

¹⁴ Kot von Wildtieren

¹⁵ Treu & Emberlin (2000)

1. Vertikaler Gentransfer: Pollenflug kann zu Ein- und Auskreuzung führen, d.h. Befruchtung einer Pflanze oder auch anderen, artverwandten Pflanzensorten/arten, so dass es zu einer Kreuzung kommen kann. Hierbei spielt die Dauer der Keimfähigkeit des Pollens, die von mehreren Stunden bis Tagen reichen kann, die meteorologischen Bedingungen sowie die zeitliche Überlappung von Freisetzungsperiode und Empfängnisbereitschaft der Narbe eine wesentliche Rolle. Kommt anschließend die Pflanze zur Samenreife, kann sie einen erneuten Ausgangspunkt für Verbreitung und Vermehrung des Transgens bilden.¹⁶
2. Eintrag der transgenen DNA in das Ökosystem: Als Wirkungen kommen horizontaler Gentransfer und toxische Effekte in Frage. Pollen dienen als Nahrungsgrundlage zahlreicher Insekten und Mikroorganismen im Boden. Hierbei kommt es zum Kontakt mit der transgenen DNA und gegebenenfalls auch mit Toxinen, die durch die Transgene exprimiert werden¹⁷. Im Gegensatz zum vertikalen Gentransfer spielt die Befruchtungsfähigkeit des Pollens dabei keine Rolle mehr, wohl aber Abbau und Umbau der DNA und ihrer Begleitsubstanzen. Angesichts der teilweise enormen Mengen an Pollen, die produziert und verfrachtet werden, entstehen erhebliche Pollenflüsse in die Umgebung.¹⁸ Außer den Effekten toxinhaltiger Pollen kann potentiell DNA, z.B. durch

¹⁶ Bei einer mittleren Windgeschwindigkeit von 1-3 m/s und 5-10 m/s bei Starkwindlagen in Deutschland beträgt die Geschwindigkeit des Pollenfluges 3,6-11 km pro Stunde im Durchschnitt und 18-36 km bei stärkeren Winden. Selbst bei wenigen Stunden Befruchtungsfähigkeit empfindlicher Pollen beträgt die potentielle Reichweite von Auskreuzungen mehrere km, im Falle widerstandsfähiger Pollenarten und günstigen klimatischen Bedingungen mehrere hundert Kilometer. Wirkungen wie Einkreuzung sind bei Rapspollen bis in mehrere km Entfernung nachgewiesen, dito bei Zuckerrüben- und Roggenpollen, selbst bei den schweren Maispollen sind Auskreuzungen von >0,3% in über 500m entfernten Rezeptorbeständen nachgewiesen. Gängige Isolierabstände bei der Züchtung von Mais liegen je nach Land zwischen 200m und 5.000m. [Feil & Schmid (2002)] Für aktuelle Darstellungen des Pollenfluges unter dem Aspekt Auskreuzung von GVO siehe dort und Treu & Emberlin (2000).

¹⁷ Feil & Schmid (2002)

¹⁸ Beispiele: Eine Maispflanze setzt ca. 10-50 Millionen Pollen frei, dies ergibt ca. 200 Milliarden bis 1 Billion Pollen (~150 kg Pollen) pro Hektar Maisfläche [Emberlin 2000]. Für Zuckerrübe liegt die Menge gar bei ca. 1 Milliarde Pollen pro Pflanze und ca. 25 Billionen Pollen pro ha (Knapp 1986). Bei Raps ergab sich nach unseren Ergebnissen eine geschätzte effektive Quellstärke von ca. 50-100 Milliarden Pollen/ha. Roggen wird bei ca. 17 Billionen Pollen/ha veranschlagt (Feil & Schmid 2002). Zu den stärksten Pollenquellen gehören in unseren Breiten auch einige Baumarten, u.a. Koniferen (Pinus, Picea), Birken, Haselnuss und Erle, einige Gräser, Brennnessel, Beifuß u.a.. Die enormen freigesetzten Pollenmengen bedingen, dass trotz relativ hoher Sinkgeschwindigkeit noch erhebliche Pollenflüsse in die weitere Umgebung (km-weite Entfernung) existieren. Einige konkrete Angaben zu Raps und Mais finden sich im Abschnitt 1.2.3 und in den Kap. 2 und 3 dieser Arbeit. Für eine aktuelle Literaturlauswertung siehe Feil & Schmid (2002) und Treu & Emberlin (2000).

Mikroorganismen im Boden und im Darm von Tieren, übertragen werden (horizontaler Gentransfer). Aufgrund ungünstiger Beobachtungsmöglichkeiten im Rahmen eines regulären Monitorings wird dies aber kaum direkt erfassbar sein. Risikoabschätzungen für solche potenziellen, aber nicht direkt beobachtbaren Effekte lassen sich im Freiland nur über Indikatoren prüfen wie sie beispielsweise in der Exposition gegeben sind ¹⁹.

1.2 Projektbeschreibung

1.2.1 Verfahrensentwicklung

In dem Vorhaben kamen technische und biologische Pollensammler zum Einsatz: Als technischer der nach VDI standardisierte Passivsammler Sigma-2²⁰ mit der speziell entwickelten Zusatzvorrichtung, dem Pollenmassenfilter PMF²¹, als biologische Pollensammlerin die Honigbiene mit der Matrix Honig²². Die Pollenproben des Sigma-2 wurden zur mikroskopischen qualitativen und quantitativen Bestimmung des Polleneintrages aus der Luft unter Einsatz von bildanalytischen Verfahren verwendet. Dagegen dienten die PMF-Proben zusätzlich der molekularbiologischen DNA-Analyse zur Bestimmung des GVO-Eintrages mittels qualitativer PCR und quantitativer real-time PCR (TaqMan). Die Pollen in den Honigproben wurden mikroskopisch bestimmt, ausgezählt und die Pollen-DNA ebenfalls mit der PCR analysiert. Hierbei wurden die relativ neuen PCR-Verfahren zum Nachweis von GVO in Pollen weiterentwickelt und laborübergreifende Versuche zur Qualitätssicherung durchgeführt.

Das Verfahren des Pollenmonitorings ist in Abb. 2.1.1 in Kap. 2.1 skizziert. Beide Verfahren, technischer und biologischer Pollensammler, ergänzen sich in der

¹⁹ Ermittlung von Eintrittswahrscheinlichkeiten in Laborexperimenten, Expositionsermittlung im Freiland, Risikoabschätzung über stochastische Dosis-Wirkungs-Zusammenhänge

²⁰ VDI 2119 Bl. 4 (1997)

²¹ schutzrechtlich gesichert

²² Geprüft wurden auch Pollenabstreifer und Bienenbrot, die sich für das GVO-Monitoring als weniger geeignet erwiesen

Dokumentation von Eintrag und Verbreitung von GVO. Die Darstellung der Methodik mit der Entwicklung der Verfahren ist in Kap. 2 genauer ausgeführt.

1.2.2 Freilandprüfungen

Die Validierung des neu entwickelten Verfahrens zum Pollenmonitoring erfolgte anhand definierter Pollengradienten in der Umgebung von Freisetzungsfeldern von transgenem HR-Raps, HR- und Bt-Mais und VR-Zuckerrübe. Es wurden 2001 insgesamt 72 Standorte mit technischen Sammlern und Bienenstöcken bestückt. Die Standorte lagen in der Umgebung von GVO-Versuchsfeldern sowie in entsprechenden Referenzgebieten in Niedersachsen, Bayern, Nordrhein-Westfalen und Bremen. Vorgaben aus Pollenausbreitungsmodellen in unterschiedlichen Entfernungen und Windrichtungen ermöglichten es, Gradientenprüfungen über mehrere Größenordnungen vorzunehmen.²³ Die Versuchsbeschreibungen finden sich in Kap. 2. Geprüft wurden Sensitivität, Nachweisgrenze und Reproduzierbarkeit der Verfahren im Hinblick auf einen standardisierten Einsatz im Monitoring.

Die Gradientenprüfung nach Vorgaben aus Ausbreitungsrechnungen weist gegenüber Versuchsansätzen, die auf Entfernungsangaben und Messgerätevergleichen beruhen, erhebliche Vorteile auf:

- a) Über die Ausbreitungsrechnung lassen sich die Einflüsse unterschiedlicher Windrichtung, -geschwindigkeit, Entfernung und Pollenflugverhalten berücksichtigen;²⁴
- b) Sie ist präziser als technische Referenzverfahren zur Bestimmung des Polleneintrages, die bisher nicht in ausreichender Stückzahl anwendbar sind;²⁵
- b) Sie schafft flächendeckende Vorhersagewerte zur Verteilung des Polleneintrages;

²³ Die Größe der Untersuchungsräume ging bis 64 km² mit Entfernungen von bis zu 5 km zu den Versuchsfeldern.

²⁴ Feil & Schmid (2002) zeigen im Literaturvergleich die Variation von Entfernungsangaben bei Experimenten zur Pollenausbreitung und zu Isolationsdistanzen. Sie beklagen zurecht die mangelnde Aussagekraft von Entfernungsangaben, wenn die für die Pollenausbreitung wesentlichen meteorologischen Bedingungen nicht mit einbezogen werden.

²⁵ s. Kap. 2, u.a Gregory (1973), Grinshpun et al. 1994

c) Sie liefert mathematisch eindeutig definierte, jederzeit nachvollziehbare und damit übertragbare Prüfgrößen;²⁶

d) Für die Anwendung im GVO-Monitoring stellt die Methode eine rationale, das heißt nachprüfbar BezugsgroÙe dar, die zur Entwicklung eines effizienten Probenahmedesigns und für wirkungsbezogene Risikoabschätzungen notwendig ist.²⁷

1.2.3 Ergebnisse

In den Proben aus den technischen Sammlern sowie im Honig wurden die Pollen von Raps, Mais und Zuckerrübe sowie von insgesamt über 150 weiteren Kultur- und Wildpflanzen nachgewiesen.

Die mit dem Sigma-2 erfassten Pollen konnten mikroskopisch bestimmt und damit der Polleneintrag quantifiziert werden. Hierbei wurde der Einsatz der Bildanalyse getestet, wobei die entsprechenden Referenzdatenbanken an Agrarpollen noch im Aufbau begriffen sind. Innerhalb von 2-4 Wochen, in denen Raps blühte, traten in den Proben des Sigma-2 Pollenbelegungen auf, die im Bereich von 23.000 -110.000 für die Gesamtpollenanzahl lagen. Die Rapspollenanzahl lag im Mittel bei 800 und schwankte - je nach Lage zu den Feldern - von unter der Nachweisgrenze (NWG = 35 Pollen) bis 4.300 Pollen im Maximum.

Die mit dem PMF erfassten Pollenmengen erreichten in diesem Zeitraum Werte von 66.000 bis 2.1 Millionen Gesamtpollenanzahl pro Probe. Die Rapspollenanzahlen lagen zu 90% über 800 Pollen pro Probe, der Mittelwert bei 48.000, und der Maximalwert bei 560.000.

Aus den Ringversuchen zur PCR-Analytik (s. Kap. 2.4) ergab sich, dass für eine molekulargenetische Bestimmung des GVO-Polleneintrages eine Größenordnung von 100 Pollen pro Probe je Zielart erforderlich ist. Die Ergebnisse belegen, dass durch die Entwicklung der Zusatzvorrichtung PMF ausreichende Pollenmengen erfasst werden.

²⁶ Richter & Seppelt (2002)

²⁷ DiGiovanni & Larsen (2002), Hidalgo et al. (2002)

Bei den technischen Sammlern ließen sich die Gradienten des Rapspolleneintrages aus den GVO-Feldern erkennen, abhängig von Windrichtung, -stärke und Entfernung. Auch eine regionale Hintergrundbelastung war ableitbar, die der Anbaudichte im Raum entspricht. Die Zusammenhänge zur Pollen-Ausbreitungsrechnung erwiesen sich sowohl beim Sigma-2 als auch beim PMF als statistisch hoch signifikant. Daraus ließen sich Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Nachweisgrenzen ermitteln. Gleichzeitig war es möglich, einen Mindestumfang von Fallzahlen für das GVO-Monitoring zu berechnen (s. Kap. 3). Die technischen Sammler repräsentierten den Eintrag von GVO über die Luft. In Bezug auf das Pollenspektrum wurden im PMF alle geprüften prioritären GVO (Raps, Mais und Zuckerrübe) sowie luftbürtige Pollen von über 90 weiteren Pflanzenarten/-gattungen ohne Einschränkungen erfasst. Beim Sigma-2 galt dasselbe für Raps, Zuckerrübe und luftbürtige Pollen. Ebenso konnten zwar Maispollen nachgewiesen werden, jedoch reichten die Ergebnisse nicht für eine abschließende Beurteilung der Eignung des Sigma-2 aus.²⁸

Anders als bei den technischen Sammlern bleiben die Resultate im Bienenhonig von den meteorologischen Ausbreitungsverhältnissen unabhängig. Sie lassen typische, entfernungsabhängige Sammelbereiche erkennen, die das aktive Sammelverhalten der Honigbienen widerspiegeln. Bienenhonig repräsentierte die in einem Umkreis der Sammelstelle etablierten blühenden Trachtpflanzen. Neben attraktiven Trachten wie Raps wurden im Honig auch Pollen zahlreicher anderer blühender Pflanzen erfasst, darunter auch Windblütler, die die Biene selbst nicht anfliegt. Das Pollenspektrum umfasste über 130 unterscheidbare Pflanzenarten bzw. gattungen (s. Kap. 3), die das Spektrum der technischen Sammler ergänzten. Im Bienenhonig konnten GVO-Nachweise noch bis in 4 km Entfernung zu den transgenen Rapsfeldern erfolgen. Hierbei ließen sich Sammelbereiche unterscheiden, in denen die Nachweiswahrscheinlichkeit mit einer Probe im Nahbereich bei über 95% lag und, im logistischen Kurvenverlauf abnehmend, in 4 km Entfernung bei 5%.

²⁸ In aktuellen Versuchen in Bayern (Beismann et al. 2003) konnten hinreichend Maispollen in den Proben aus den Sigma-2 – Sammlern nachgewiesen werden.

Für das Umweltmonitoring von GVO ergänzten sich somit das technische und biologische Verfahren ideal. Insgesamt liessen sich über die technischen und biologischen Sammler ein Pollenspektrum von etwa 150 Pflanzenarten/-gattungen differenzieren. Mit dem Pollenmonitoring werden somit auch zukünftige, zur Freisetzung anstehende GVO miterfasst.²⁹

Probleme gab es bei der Stabilität der PCR-Nachweise von GVO. Diese konnten im Verlauf des Vorhabens über quantitative real-time PCR-Verfahren für Bienenhonig gelöst werden, für die Matrizes der technischen Sammler jedoch noch nicht ausreichend zuverlässig.

Die relativ neuen PCR-Verfahren zum Nachweis von GVO in Pollen und allgemein Pflanzenmaterial stellen für absehbare Zeit das Mittel der Wahl dar. Beim derzeitigen Stand ist die PCR noch als das limitierende Glied in der Verfahrenskette zu werten. Die PCR-Verfahren befinden sich jedoch stark in Entwicklung, so dass hier weitere Fortschritte zu erwarten sind. Entsprechende Arbeiten finden derzeit im Rahmen des Bund-Länder-Vorhabens des Landes Bayern³⁰ sowie in Bremen³¹ statt. Zur Qualitätssicherung und Standardisierung der PCR-Verfahren wurden jüngst mehrere Fachausschüsse, u.a. beim VDI/DIN, eingerichtet³².

Um statistisch abgesicherte Fallzahlen ableiten zu können, wurden in der statistischen Auswertung Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Nachweisgrenze der biologischen und technischen Pollensammelverfahren in Bezug zu Pollenkonzentration und -fluss aus den Pollenausbreitungsmodellen geprüft. Die ermittelten Fallzahlen garantieren bestimmte Aussagesicherheiten im Monitoring. Das mathematisch definierte Bezugssystem der Ausbreitungsmodelle erlaubt hierbei eine generelle, überall nachvollziehbare

²⁹ siehe Lheureux et al. (2003) für die in der EU anstehenden GVO (z.B. transgene Gehölze mit veränderter Holzzusammensetzung (Lignin/Cellulose-Verhältnis) für die Papierherstellung, GVO mit veränderten Inhaltsstoffen für die Arzneimittelproduktion sowie für die Rohstoff- und Energiegewinnung, transgene Getreidesorten wie Weizen, Roggen, transgene Rebsorten etc.); von besonderer Brisanz sind GVP zur Arzneimittelerzeugung, entsprechende Freisetzungen wurden in den USA bereits begonnen.

³⁰ Beismann et al. (2003)

³¹ Impetus GmbH & Co KG; BIA Bremen

³² Fachausschuss zur PCR-Analytik von GVO im Kompetenzfeld Biotechnologie im VDI

Übertragbarkeit der Ergebnisse. Damit liegen die Voraussetzungen für einen standardisierten Einsatz im Monitoring vor.

Eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse erfolgt in den Berichtsteilen 3 und 4.

1.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

Das im Forschungsprojekt entwickelte Verfahren zum Pollenmonitoring ermöglicht einen wissenschaftlich fundierten und effizienten Beitrag für das GVO-Monitoring zur Erfüllung der EU-Freisetzungrichtlinie und der mit der Novelle des Gentechnik-Gesetzes anstehenden Regelungen. Mit dem Modellprojekt konnten Grundlagen für die rasche Umsetzung eines bundesweiten Pollenmonitorings im Rahmen der Umweltüberwachung von gentechnisch veränderten Pflanzen geschaffen werden.

1.3.1 Wissenschaftliche Aspekte

Mit dem Forschungsprojekt wurde belegt, dass sowohl die angewandten technischen Pollensammler als auch die biologische Sammlerin Honigbiene für das GVO-Monitoring zur Bestimmung von Eintrag und Verbreitung von GVO (Exposition) geeignet sind. Beide Sammelverfahren ergänzen sich dabei, so dass ein kombinierter Einsatz empfohlen wird.

Im Vorhaben wurde der Pollenmassenfilter (PMF) neu entwickelt und in Kombination mit dem Passivsammler Sigma-2 nach VDI 2119, Bl. 4, eingesetzt. Damit steht nun ein technischer Pollensammler zur Verfügung, der als Passivgerät überall im Gelände einsetzbar ist. Mit ihm kann der Polleneintrag am Standort nach Art und Anzahl gemäß dem Stand der Technik quantifiziert werden. Durch die Neuentwicklung des PMF können auch die notwendigen Pollenmengen für molekularbiologische GVO-Nachweise gewonnen werden.

Die Sammel- und Nachweisverfahren wurden über Gradientenprüfungen im Freiland hinsichtlich ihrer grundlegenden Eignung für das GVO-Monitoring auf Sensitivität, Nachweisgrenze, Reproduzierbarkeit, Raumcharakteristik und Sammeleffizienz geprüft.

Für einen biologischen Pollenakkumulator konnte, basierend auf der Honigbiene und der Matrix Honig, ein geeignetes Verfahren für ein GVO-Monitoring entwickelt werden. Um noch einen quantitativen Konstrukt-Nachweis zu erhalten, lässt sich mit einem Bienenvolk ein Bereich von bis zu 20 km² überwachen. Ein GVO-Honigmonitoring kann sowohl technisch als auch organisatorisch unmittelbar unter Mitwirkung der in Deutschland tätigen Imker umgesetzt werden.

Für den molekularbiologischen Nachweis von transgenen Abschnitten in Pollen-DNA wurden PCR-Verfahren in einem Ringversuch beteiligter Labors geprüft und weiter entwickelt. Für die Matrix Bienenhonig wurde ein geeignetes Verfahren basierend auf der TaqMan-PCR realisiert. Für die technisch gesammelten Pollenproben gelang dies nur teilweise: Bei einem Drittel der Proben traten noch Inhibitionsprobleme auf, die jedoch als prinzipiell lösbar angesehen werden. Die in Bezug auf die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der PCR-Verfahren verbliebenen Probleme sind im Vorhaben der TU München (Beisman et al. 2003) in Bearbeitung, wo auch Aspekte zur Raumrepräsentativität von Punktsammlern bearbeitet werden. Für den Sigma-2 ist der Aufbau einer Referenzdatenbank für die Bildanalyse sowie die Ermittlung des erfassbaren Pollenspektrums in den Naturräumen Deutschland mit Schwerpunkten im Agrarraum erforderlich.

Das Pollenmonitoring mit den technischen und biologischen Pollensammlern ist derzeit Gegenstand der VDI/DIN-Richtlinienarbeit zur Standardisierung von Verfahren für das GVO-Umweltmonitoring. Diese Ergebnisse sollen auch in entsprechende Richtlinienarbeiten auf europäischer Ebene (CEN) einfließen.³³

Aus wissenschaftlicher Sicht stünde für die Umsetzung des aus biologischen und technischen Sammlern kombinierten Pollenmonitorings im GVO-Monitoring als nächster Arbeitsschritt an, ein statistisch abgesichertes Probenahmedesign zu entwickeln und mit repräsentativem Testlauf in einer größeren Region zu erproben.

³³ VDI-Richtlinienentwurf 4330 Bl. 3, Kompetenzfeld Biotechnologie im VDI, Ausschuss „Monitoring der Umweltwirkungen von GVO“

1.3.2 Wirtschaftliche Aspekte

Die entwickelten Verfahren zu den technischen als auch zu den biologischen Pollensammlern bieten erhebliche funktionale und wirtschaftliche Vorteile.

Die technischen Sammler Sigma-2 und PMF sind als Passivgeräte konzipiert. Durch ihre Stromunabhängigkeit können sie über längere Zeit ohne Wartung betrieben und überall im Gelände eingesetzt werden. Der Stückpreis für den technischen Pollensammler (Sigma-2 mit PMF) wird bei etwa 1.000 € zu realisieren sein. Gegenüber standardmäßig erhältlichen Aktivgeräten sind sie erheblich preisgünstiger³⁴. Hinzu kommt, dass die Passivsammler wartungsärmer und damit günstiger im Betrieb sind als die Aktivgeräte.

Für den biologischen Sammler Honigbiene im GVO-Monitoring kann die Umsetzung unter maßgeblicher Beteiligung der vor Ort tätigen Imker erfolgen. Lediglich zu einem geringen Prozentsatz ist mit ergänzender Bestückung von Standorten durch die Landesbieneninstitute zu rechnen. Als Probe genügt ein Glas Honig, das normal erworben werden kann, zuzüglich eines vom Imker auszufüllenden Begleitformulars. Die Kosten für die Probenahme fallen daher denkbar günstig aus. Das entwickelte Honigmonitoring ist technisch und logistisch unmittelbar umsetzbar.

Die Kosten für das Pollenmonitoring hängen weiterhin vom Stand der mikroskopischen Bildanalyse sowie zur PCR-Analytik ab, die beide derzeit in rascher Entwicklung sind.

Der Betrieb eines GVO-Monitoring-Messnetzes könnte in Verbindung mit bestehenden Messnetzen des Polleninformationsdienstes (PID: 55 Standorte), des Deutschen Wetterdienstes (DWD: 168 Standorte) sowie anderweitigen Umweltmessstationen (Immissionsmessnetz, Bodendauerbeobachtungsflächen etc.) durchgeführt werden. Besonders effizient im Hinblick auf das GVO-Monitoring ist die Kopplung mit Standorten von Imkern, die bevorzugt im Agrarraum in der Nähe geeigneter Trachtquellen liegen, in nahezu allen Naturräumen der Bundesrepublik präsent sind,

³⁴ Geeignete Aktivgeräte wie die Burkard-Falle kosten im Erwerb ab 5.000 € aufwärts pro Stück, Low-Volume-Sammler ab ca. 10.000 € und High-Volume-Sammler ab ca. 20.000 €. Der Betrieb ist personalintensiv.

und damit die anderen Messnetze ergänzen. Insgesamt ist natürlich die Probenahmestrategie im Monitoring (siehe Kap. 4) zu beachten, in die die Standorte sich einfügen müssen.

Für das Pollenmonitoring liegen damit wesentliche wissenschaftliche, technische und logistische Voraussetzungen für eine zeitnahe Umsetzung vor.