

**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-Freisetzen 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- Freisetzung- 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 Bezugsgroße 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.

2 Methodik

2.1 Methodischer Ansatz

Für die Umweltüberwachung werden geeignete Verfahren benötigt, mittels derer sich der Eintrag und die Verbreitung von GVO durch definierte Größen vergleichbar, d.h. standardisiert, erheben lassen. Die gewonnenen Ergebnisse müssen in Modelle zur Risikobewertung eingegliedert werden können. Beim gegenwärtigen Stand der Technik bieten sich auf der Expositionsebene Ansätze über technische und biologische Pollensammler an. Beide Verfahren ergänzen sich und sind in Zusammenhang zu sehen.

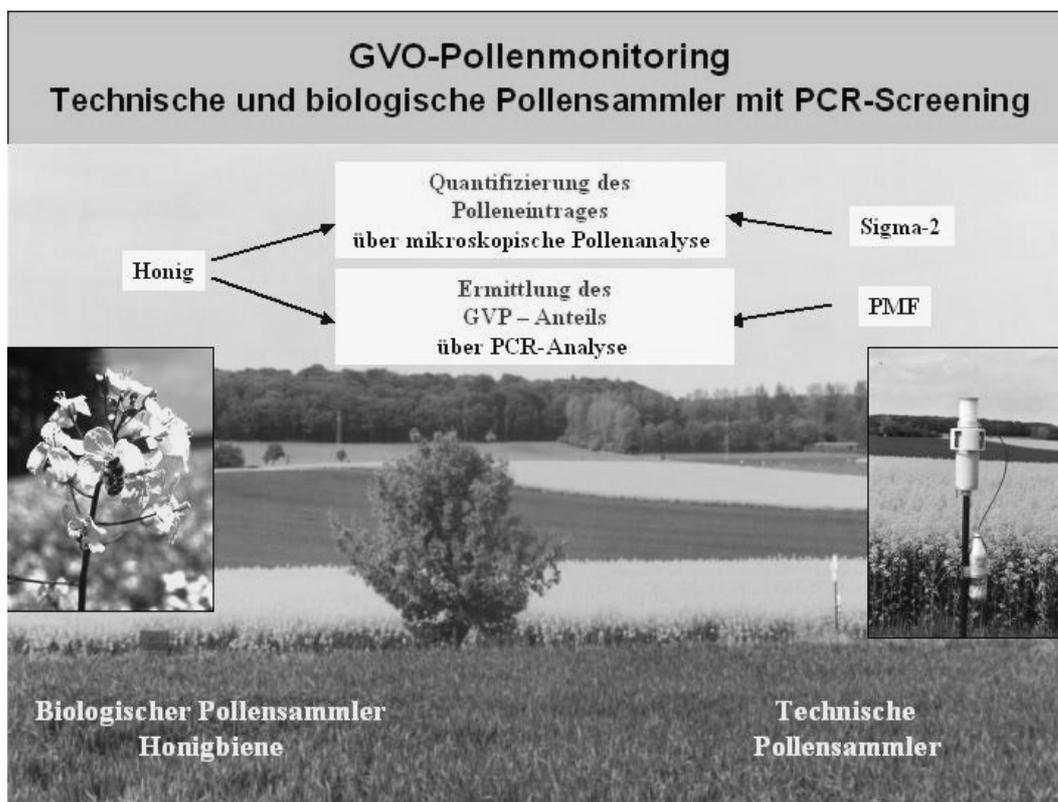


Abb. 2.1.1: Technische und biologische Pollensammler zur Erfassung der Exposition für das Monitoring der Umweltwirkungen von GVO

Über **technische Pollensammler** lassen sich Eintrag und Verbreitung von GVO über den Luftpfad via Pollen erfassen.

Zur Charakterisierung des Polleneintrages sind drei definierte physikalische Größen zu unterscheiden:

Konzentration, Deposition und Fluss.

Die **Konzentration C** gibt die Pollenmenge pro m³ Luft an. Die Pollenkonzentration an einem Messort unterliegt, entsprechend der Freisetzungsdynamik, starken tageszeitlichen Schwankungen und ist direkt abhängig von der Windgeschwindigkeit. C kann nach Kenntnis von Lage und Größe der Anbauflächen über Ausbreitungsmodelle flächendeckend abgeschätzt werden. C ist eher eine toxikologisch relevante Größe, wenn die Wirkung in direkter Beziehung zu einem festen Luftvolumen steht, z.B. Atemvolumen bei Allergikern, die Pollen mit der Atemluft inhalieren.

Für die Umweltwirkungen von GVO ist hingegen vielmehr der horizontale **Pollenfluss F** [Pollen/m²] von Bedeutung, der die Menge an Pollenmaterial definiert, das während des Blühzeitraumes über die Luft herangetragen wurde und für Wirkungen zur Verfügung steht, z.B. für Auskreuzungen.

Weiterhin ist die Menge an transgener Pollen-DNA relevant, die auf einer Fläche wie dem Boden als Niederschlag eingetragen wird (**vertikale Deposition D**).

Beide Größen lassen sich über Ausbreitungsrechnungen ausgehend von der Konzentration C berechnen. Für den Fluss geht hier das passierte Luftvolumen über die Windgeschwindigkeit ein, für die Deposition u.a. die Partikel- und akzeptorabhängige Depositionsgeschwindigkeit.

Die Messergebnisse aus der stichprobenartigen Erfassung des Polleneintrages über technische Pollensammler müssen Bezüge zu den definierten physikalischen Größen und den Ausbreitungsmodellen zulassen. Hierbei sollte der erhobene Parameter möglichst nahe an den biologisch relevanten Einflussgrößen Deposition und Fluss ansetzen. Als weitere Bedingungen soll sich der Polleneintrag nach Art und Anzahl am Standort quantifizieren, sowie der GVO-Eintrag möglichst konstruktübergreifend (Screening) nachweisen lassen. Des Weiteren muss es möglich sein, die Geräte überall im Gelände einzusetzen. Das bedeutet, sie müssen ohne Strom und aufwändige

Installationen auskommen. Um eine entsprechend große Stückzahl zu realisieren, müssen die Geräte kostengünstig sein. Im Betrieb müssen sie wartungsarm funktionieren. Die Anzahl Proben pro Jahr sollte möglichst gering ausfallen.

Für diese Aufgabe eignen sich insbesondere **technische Passivsammler**, die über längere Zeiträume Pollen integrativ sammeln und standortgetreue Aussagen über die per Luftstrom eingetragenen Pollenmengen erlauben.

Ergänzend hierzu stehen **biologische Pollensammler**, wie die Honigbiene, die aktiv blühende Pflanzen anfliegen und deren Pollen sammeln. Über die Pollenanalyse im Honig lassen sich dann flächenrepräsentative Aussagen zur Verbreitung blühender, Pollen-freisetzender Pflanzen im Raum und damit der Verbreitung von GVO gewinnen.

Beide Verfahren ergänzen sich, so dass in unserem Ansatz für das Pollenmonitoring der kombinierte Einsatz von technischen und biologischen Pollensammlern vorgesehen wurde.

In dem Vorhaben wurde der Stand der Technik systematisch im Hinblick auf geeignete Verfahren hin geprüft. Hierbei zeigte sich, dass gute Voraussetzungen gegeben sind, jedoch für die spezifischen Aufgaben im GVO-Monitoring noch bestimmte Weiterentwicklungen und Verfahrensprüfungen im Hinblick auf einen standardisierten Einsatz erforderlich sind. Diese werden in den Kap. 2.2 für den technischen Pollensammler, in Kap. 2.3 für die biologische Sammlerin und für die PCR in Kap. 2.5 dargelegt.

Die Freilandprüfungen zur Validierung der Verfahren werden in Kap. 2.6 und 2.7 erläutert. Sie beinhalten die Prüfung der grundlegenden Kriterien für die Standardisierung: Sensitivität, Nachweisgrenze, Reproduzierbarkeit und Repräsentanz. Methodisch wurde dies über Kopplung mit Ausbreitungsmodellen (Kap. 2.4) und Gradientenprüfungen vollzogen. Der Prüfansatz ist nicht mit einer späteren Anwendung im Monitoring zu verwechseln.

Die statistischen Auswertungen sind methodisch in Kap. 2.8 dargelegt. Sie münden in eine Abschätzung der erforderlichen Fallzahlen für ein Umweltmonitoring von GVO.

Die Ergebnisse und deren Diskussion in Kap. 3 beziehen sich auf die methodischen Grundlagenprüfungen, die entsprechenden Bewertungen in Kap. 4. Einen Ausblick, wie das Pollenmonitoring im Umweltmonitoring von GVO umgesetzt werden kann, findet sich dann in Kap. 5.

2.2 Technischer Pollensammler:

Sigma-2 mit Pollenmassenfilter PMF

2.2.1.1 Stand der Technik

Zu Vorhabensbeginn wurden die aus der Literatur bekannten Pollensammelverfahren auf ihre Eignung für das Vorhabensziel geprüft. Pollen und Sporen werden den partikelförmigen Bioaerosolen zugeordnet. Die dazugehörige Wissenschaftsdisziplin ist die Aerobiologie.³⁵

In der wissenschaftlichen Literatur sind zahlreiche technische Verfahren zum Pollensammeln beschrieben. Für eine Übersicht der physikalischen Sammelprinzipien und Verfahren siehe u.a. May (1967), Society for General Microbiology (1967), Silver (Ed.) (1970), Gregory (1973), Edmonds (ed) (1979), Raynor (1979), Garland & Nicholson (1991) und Niessner (1993)³⁶ sowie die nach VDI/DIN standardisierten Verfahren für Stäube (VDI-Richtlinien 2119). Ein KRdL-Ausschuss³⁷ befasst sich derzeit mit der Standardisierung eines aktiven Bioaerosol-Sammlers, mit Schwerpunkt allerdings für Sporen. Es sind weit über 100 Verfahren und Gerätetypen bekannt, die auf unterschiedlichen Sammelprinzipien beruhen und jeweils für bestimmte Untersuchungszwecke ausgelegt sind. Ein für alle Zwecke gleichermaßen geeignetes Gerät schließt sich aus physikalischen Gründen aus.

In Anlehnung an Gregory (1973) und Raynor et al. (1979) lassen sich folgende physikalische Sammelprinzipien nennen, auf die hier nicht näher eingegangen werden kann: Gravitation, Sedimentation; Deposition; Impaktion; Filtration; Ansaugen; elektrostatische Abscheidung; thermische Abscheidung; Massenfraktionierung; Lösen und Auswaschen. Es werden Aktiv- und Passivgeräte unterschieden.

³⁵ International Association für Aerobiology (IAA)

³⁶ Für aktuelle Entwicklungen siehe auch die Homepages der International Association of Aerobiology [<http://www.isao.bo.cnr.it/aerobio/iaa/index.html>] sowie der nationalen Polleninformationsdienste (PID) [<http://www.adiz.de/>]

³⁷ Kommission Reinhaltung der Luft im VDI/DIN

Für die Erfassung einer Pollenkonzentration ist der Begriff „isokinetisch“ bedeutsam³⁸. Viele Aktivgeräte, wie z.B. die Burkard-Falle als Standardgerät der Polleninformationsdienste, saugen über eine elektrische Pumpe ein bestimmtes Luftvolumen pro Zeiteinheit ein (z.B. 10 l/ min). Entspricht die Geschwindigkeit der Luftsäule am Einlass der Windgeschwindigkeit der Aussenluft, so erfolgt isokinetisches Sammeln und die Konzentration der Pollen im eingesaugten Luftstrom entspricht der der Aussenluft. Dies ändert sich jedoch gravierend mit Änderungen der Windgeschwindigkeit: Ist diese geringer als am Einlass, so bildet sich ein Einsaugtrichter, der leichtere und kleinere Teilchen bevorzugt mitnimmt, größere auf Grund ihrer Trägheit jedoch aussen vorbei gehen lässt. Bei höheren Windgeschwindigkeiten wiederum bildet sich ein Luftstau am Einlass, so dass kleinere Teilchen mit dem Luftstrom aussen vorbei geführt werden, größere Teilchen hingegen auf Grund ihrer Trägheit übermäßig in den Einlass gelangen. Wird zusätzlich, wie bei der Burkard-Falle, der Volumenstrom weder gemessen noch auf Normbedingungen bezogen und reguliert, entstehen von der Temperatur und dem Luftdruck abhängige zusätzliche Fehler. Ebenso beeinflussen Turbulenzen und Richtungsänderungen des Einlasses das Ergebnis.

Neben dem sogenannten Einlasseffekt ist die Art und Weise der Abscheidung der Partikel vom Luftstrom für die Effizienz entscheidend. Die Partikelabscheidung ist von den Partikeleigenschaften abhängig. Beispielsweise wirken Teilchengröße bzw. Masse sowohl bei der Sedimentation in der Luft als auch bei der Deposition auf eine waagerechte Fläche und bei der Impaktion gegen eine senkrechte Fläche. Hierauf wird in späteren Kapiteln noch näher eingegangen (Kap. 2.2.1 und 2.2.2).

Derartige Effekte, die hier beispielhaft ausgeführt wurden, bedingen, dass Aerosolsammler jeweils nur für die Erfassung bestimmter Fraktionen unter bestimmten Sammelbedingungen ausgelegt sind, z.B. die Erfassung der Konzentration bei

³⁸ siehe Kap. 2.1 für Parameter Konzentration, Deposition und Fluss

Partikelfractionen $<1\mu$, zwischen 1 und 10μ (z.B.: Sporen) oder Grobstaubpartikel über 10μ , zu letzteren die Pollen gehören (von $10 - 120\mu$).

Von den in der Literatur bekannten technischen Pollensammlern sind Aktivgeräte für das Umweltmonitoring von GVO ungeeignet, da diese entweder Strom benötigen, nur für kurze Sammelzeiträume bis zu wenigen Tagen ausgelegt oder zu teuer sind (Burkard-Falle [Hirst, Lanzonii], Rotorod, Anderson-Impaktor, Zyklon-Sammler, Low volume Sammler [z.B.: KleinfILTERGERÄT], High volume Sammler [z.B.: Digital]). Unter den in Frage kommenden Passivsammlern scheidet wiederum viele aus, da diese entweder für das Sammeln luftgetragener Pollen wenig geeignet sind, für qualitatives Sammeln ausgelegt sind und keine ausreichenden quantitativen Bezüge zulassen, die Matrix keine GVO-Analysen erlaubt oder die Geräte insgesamt nicht ausreichend standardisierbar sind (hierzu gehören mit Vaseline bestrichene Objektträger mit und ohne Regenschutz, bestrichene Sticks, Tauberfalle, Cour Trap, nach oben offene und der Witterung ausgesetzte Petrischalen oder Fangschalen für Insekten wie Gelbschalen, Bergerhoff-Geräte, usw.). Im Folgenden werden einige bekannte Pollensammelverfahren vorgestellt und diskutiert.

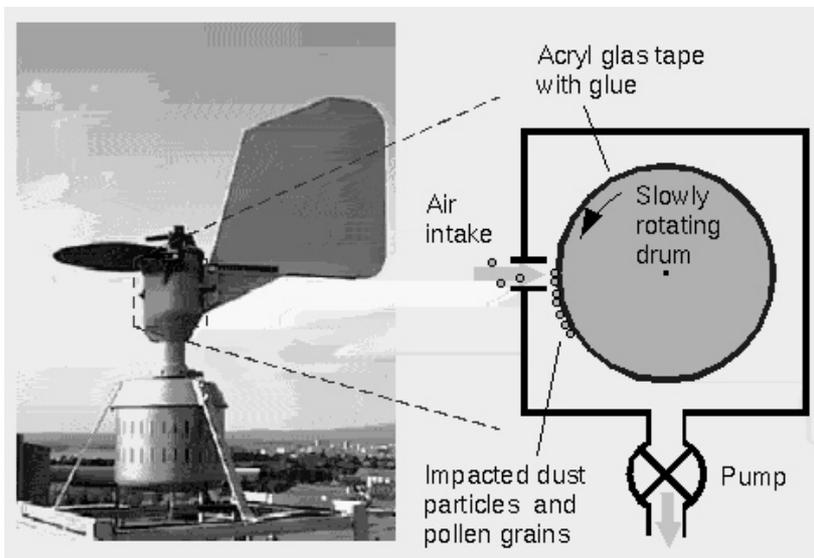


Abb. 2.2.1: Burkard-Pollenfalle mit Sammelprinzip

(http://bienemaja.informatik.uni-freiburg.de/Pollen/pollen_sampling.html)

Das in Deutschland und Europa gebräuchliche Standardgerät der Polleninformationsdienste (PID)³⁹ zur Pollenflugvorhersage für Allergiker ist die Pollen- und Sporenfalle nach Hirst (1958), die unter dem Namen Burkard-Falle bekannt ist (Abb. 2.2.1)⁴⁰. Die Burkard-Falle gehört zu den volumetrischen⁴¹ Aktivgeräten. Durch einen schlitzförmigen Einlass, der über eine Windfahne ausgerichtet wird, wird ein konstanter Luftstrom angesaugt (10 l/min), der senkrecht auf einen mit Haftmittel beschichteten Träger geführt wird. Während die Luft umgelenkt wird, scheiden sich Partikel wie Pollen auf Grund ihrer Trägheit auf dem Haftträger ab (Impaktion). Dieser wird hierbei auf einer Trommel stetig weitergeführt (Umlauf in der Regel 7 Tage), so dass die Pollenfänge nach mikroskopischer Auszählung chronologisch zugeordnet werden können. Die Erfassung und mikroskopische Auswertung ist über die nationalen Polleninformationsdienste intern standardisiert. Die Zielvariable ist die Pollenkonzentration in der Luft [Anzahl Pollen pro m³]. Nachteilig für das GVO-Monitoring ist, dass die Geräte relativ teuer und wartungsintensiv sind sowie Strom und Installationen benötigen, so dass sie für eine Anwendung in der Fläche nicht in Frage kommen. Das vorhandene Messnetz der Polleninformationsdienste ist auf humanallergologische Zwecke ausgerichtet und nimmt in der Regel agrarferne Lagen (Stadtzentren) ein. Diese können zwar als Referenzstandorte für das GVO-Monitoring genutzt werden. Da das Probenmaterial aus einer Burkard-Falle im Routinebetrieb neben der Pollenzählung nicht gleichzeitig auch für die PCR verwendet werden kann, müssten diese Standorte allerdings für die molekularbiologischen GVO-Nachweise mit Parallelgeräten oder entsprechenden Zusatzeinrichtungen versehen werden.

³⁹ <http://www.pollenstiftung.de> (ca. 55 Standorte in Deutschland)

⁴⁰ Hersteller: Burkard-Ltd, England; im südlichen Europa ist der Hersteller Lanzonii (Italien) verbreitet.

⁴¹ Sammeln mit definiertem Luftvolumen

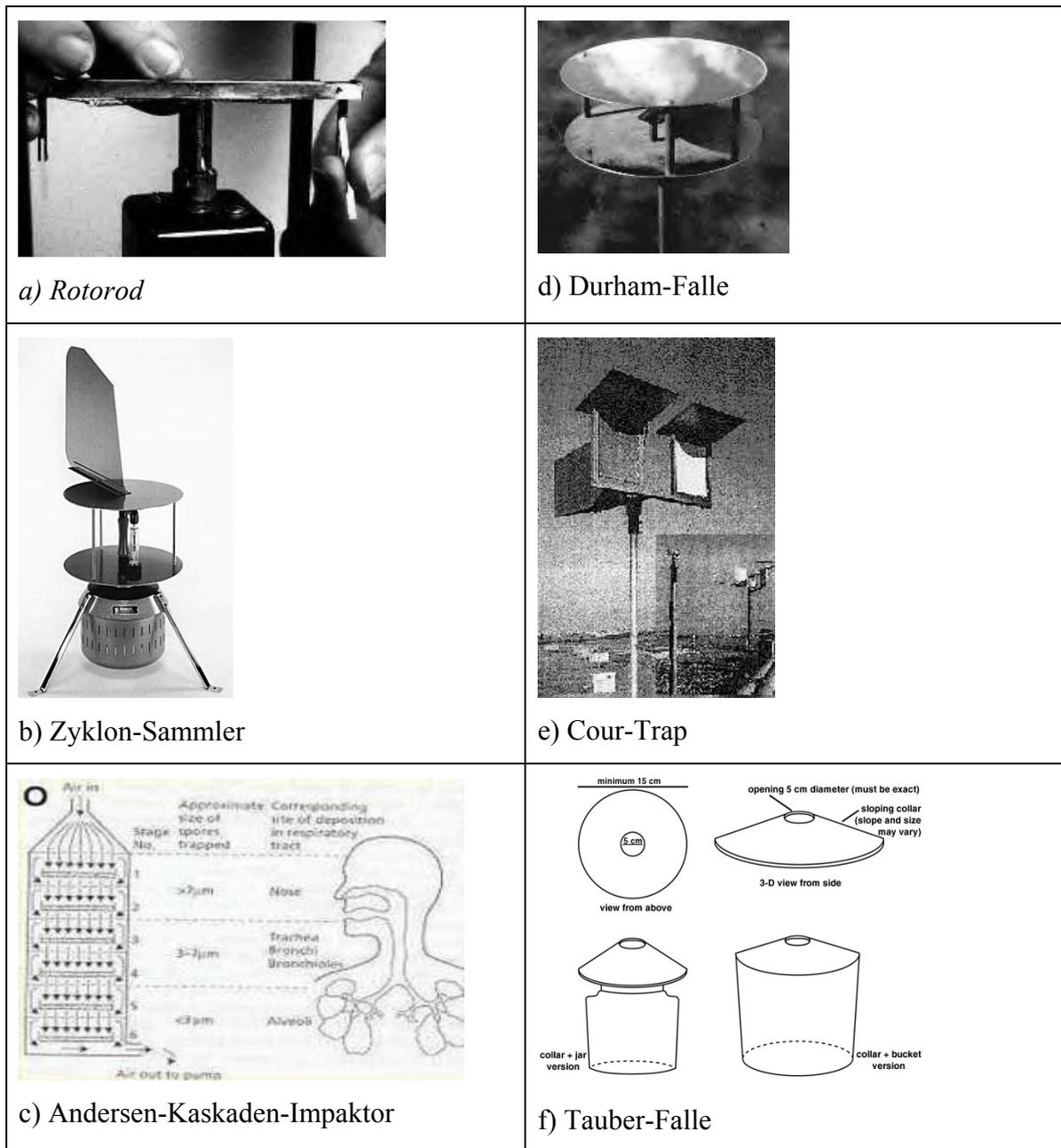


Abb. 2.2.2: Auswahl weiterer gebräuchlicher Pollensammler (Quellen: a, d, e von Homepage der Spanish Aerobiology Network; b Burkard-Ltd; c aus <http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/airborne.htm>; f Pollen Monitoring Network nach Tauber 1965)

Abb. 2.2.2 enthält eine Auswahl weiterer gebräuchlicher Pollensammler. Bei den Polleninformationsdiensten vornehmlich im nordamerikanischen Raum ist der Rotorod (a) verbreitet⁴². Er ist als Aktivgerät funktional einfach und deutlich kostengünstiger als die Burkhard-Falle. Das Funktionsprinzip beruht auf der Impaktion: Zwei dünne, mit haftaktiven Trägermaterial versehene Stäbe sind auf einem Rotor angeordnet. Die Stäbe werden mit hoher Drehzahl durch die Luft geführt, wobei sie ein bestimmtes Luftvolumen durchstreichen, so dass von den eingesammelten Pollen auf die Konzentration geschlossen werden kann. Der Rotorod liefert nach Kalibrierung verlässliche Daten zur Pollenkonzentration⁴³. Auf Grund der relativ kleinen Akzeptorflächen im Verhältnis zur Impaktionsrate besteht leicht die Gefahr der Sättigung, so dass der Rotorod besonders für Kurzzeitmessungen geeignet ist oder, wie im Routinebetrieb üblich, Intervallmessungen gefahren werden müssen. Auf Grund der geringen Sammelmengen ist er für die hier gestellten Aufgaben im GVO-Monitoring jedoch nicht geeignet.

Speziell für molekularbiologische Untersuchungszwecke geeignet sind neuere Entwicklungen von Zyklon-Sammlern⁴⁴. Mit dem Burkard-Cyclone-Sampler (b) lassen sich partikelförmige Aerosole abscheiden und ohne weitere Trägermatrizes direkt in geeignete Probengefäße überführen. Für Kurzzeitmessungen stellen diese Geräte das derzeitige Mittel der Wahl für GVO-Analysen dar. Die technische Realisierung dieser Aktivgeräte ist derzeit noch relativ teuer. Sie benötigen eine hohe und geregelte Pumpenleistung, sind zudem wartungsintensiv und für den Dauerbetrieb nicht geeignet. Daher kommen sie für das GVO-Monitoring derzeit nicht in Frage.

Für die Erfassung partikelförmiger Aerosole findet weltweit, insbesondere für humanmedizinische Zwecke, der Andersen-Kaskaden-Impaktor (c) Verwendung (Abb. 2.2.2). Über eine Vakuumpumpe wird Luft angesaugt und durch einen Set übereinanderangeordneter Impaktoren geleitet. Diese sind so konstruiert, dass eine

⁴² Multidata Co, USA; <http://www.co.forsyth.nc.us/EnvAffairs/pollen/>

⁴³ Frenz & Elander (1996)

⁴⁴ Burkard-Ltd (<http://www.burkard.co.uk/>)

sukzessive Trennung der Partikelfractionen nach Größenklassen (Masse) erfolgt, so dass sich toxikologische Bewertungen (Lungengängigkeit etc.) ableiten lassen. Das Gerät benötigt eine geregelte und hohe Pumpenleistung, Installation und Strom. Dazu kommt, dass das Gerät relativ teuer ist und somit für das GVO-Monitoring weniger geeignet ist.

Relativ kostengünstig und einfach sind hingegen Passivgeräte. Ein Beispiel zeigt in Abb. 2.2.2f die für vegetationskundliche und paläobotanische Fragen entwickelte Tauber-Falle⁴⁵. Sie besteht aus einem zylindrischen Gefäß, in dem sich eine konservierende Sammelflüssigkeit befindet. Zwischen Abdeckung, die vor Regen schützt, und Gefäß befindet sich ein Spalt, durch den die Pollen mit der Luft eingeweht werden. Die Tauber-Falle verbleibt in der Regel die gesamte Vegetationszeit im Gelände. Der hohe Anteil an Fremdbestandteilen macht für die Pollenanalyse eine aufwändige Aufbereitung mit Acetolyse erforderlich, so dass nur eine optische Pollenbestimmung anhand der Exine möglich ist und keine PCR. Daher scheidet das Verfahren für das GVO-Monitoring aus.

Ein andere gängige Methode ist mit Vaseline oder einem anderen Haftmittel bestrichene Objektträger an der Luft liegend oder auch hängend zu exponieren. Bei der Durham-Falle (Abb. 2.2.2d) werden die Objektträger zusätzlich vor Witterungseinflüssen geschützt. Wenngleich diese Verfahren probate Mittel für einfache und rasch durchzuführende Kurzzeit-Untersuchungen darstellen können, kommen sie für das GVO-Monitoring nicht in Frage, da sie keine quantitativen Aussagen zulassen und als nicht reproduzierbar und standardisierbar gelten (Gregory 1973).

Ein interessanter Pollenpassivsammler ist die Cour-Falle, die im Agrarsektor, insbesondere im Weinbau Verwendung findet (Abb. 2.2.2e). An eine Windfahne ist vorne ein durch ein Regendach geschützter Rahmen befestigt, der mit einem haftmittelgetränkten, winddurchlässigen Tuch bespannt ist. Die Luft streicht durch das Tuch und die Pollen verbleiben darin. Vergleiche mit Aktivgeräten zeigten, dass passable Resultate erzielbar sind, wenn die Sättigungsgrenzen des dünnen Tuchstoffes

⁴⁵ Tauber 1974

beachtet werden.⁴⁶ Die Aufbereitung der Proben zur Pollenzählung erfordert eine Azetolyse, so dass eine PCR nicht möglich ist.

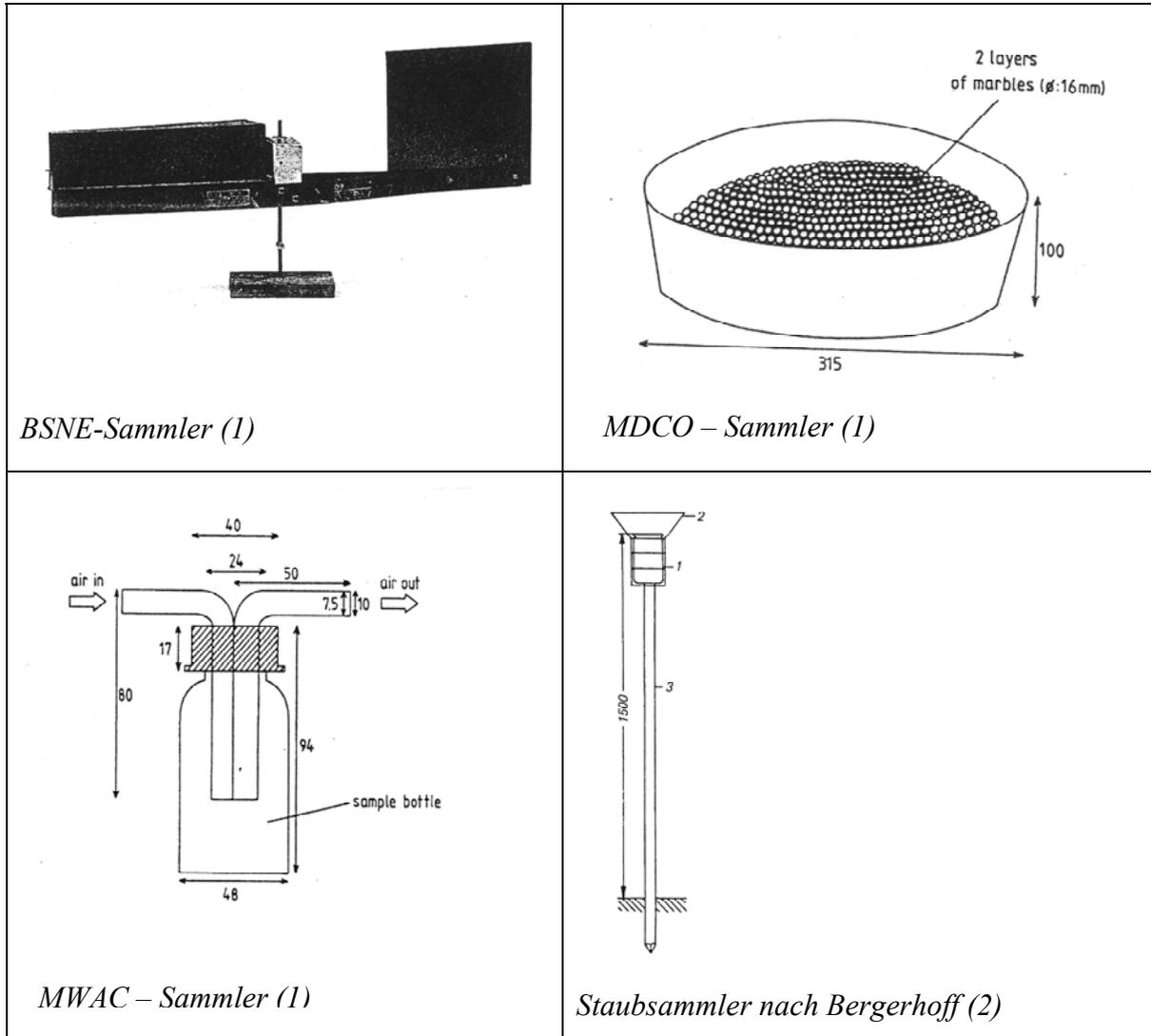


Abb. 2.2.3: Beispiele für Partikel-Passivsammler (Quellen: (1) Goossens & Offer (1999); (2) VDI-Richtlinie 2119, Blatt 2 (1996))

In Abb. 2.2.3 sind vier Passivsammler aufgeführt, die potentiell für das GVO-Monitoring geeigneter erschienen. Unter den verschiedenen Passivsammelgeräten für partikelförmige Aerosole weisen nach Goossens & Offer (1999) der MDCO zur

⁴⁶ Ferreira et al. 2001

Erfassung der vertikalen Deposition sowie der BSNE und, etwas eingeschränkter, der MWAC für die Erfassung des horizontalen Flusses gute Eignung auf. Die beiden letzteren benötigen eine Windfahne zur Ausrichtung; es zeigte sich, dass bei der erforderlichen Qualität in der technischen Ausführung dies im Endergebnis den Sammler relativ teuer machte und anfällig bei Installation und Betrieb, so dass den Sammlern deswegen keine erste Priorität eingeräumt wurde. Der MDCO ist äußerst preisgünstig, jedoch wird die nach oben offene und exponierte Konstruktion, die für die Erfassung von Staubverfrachtungen in ariden Wüstengegenden entwickelt und dafür sehr geeignet ist, für Pollen in unseren Breiten als ungünstig bewertet⁴⁷.

Beim Bergerhoff-Verfahren werden nach oben offene Auffanggefäße (Einmachgläser) exponiert und die darin gesammelten Staubniederschläge gravimetrisch und analytisch ausgewertet. Es ist ein in der BRD weitverbreitetes Konventionsverfahren zur Immissionsüberwachung von Staub (VDI 2119 Bl. 2 1996), über das langjährige Erfahrungen zur Stauberfassung vorliegen, nicht jedoch zur Erfassung von Pollen und Sporen. Als nach oben offener Sammler unterliegt er denselben, oben angeführten grundsätzlichen Einschränkungen, die ihn weniger geeignet zur Pollenflugerfassung machen. Da zudem die Proben nicht vor Licht geschützt sind und Algen- und üpilzbewuchs stattfindet, sind die Proben für aerobiologische Analysen unbrauchbar. Beim Medizin-Meteorologischen Dienst des Deutschen Wetterdienstes in Freiburg (DWD) fand daher bereits in den 80ziger Jahren eine Weiterentwicklung statt, die zum VDI standardisierten Staubpassivsammler Sigma-2 führte (VDI-Richtlinie 2119 Blatt 4 1997). Dieser wird vom DWD zur Erfassung von Staubbestandteilen an Kurstandorten sowie zur Pollenerfassung verwendet.⁴⁸ Er stellte den einzigen Passivsammler dar, für den eine aussagekräftige Standardisierung zur Pollenerfassung über eine VDI/DIN-Richtlinie vorlag. Auf Grund der Intention, möglichst zeitnah geeignete Verfahren zur Verfügung zu haben, wurde der Sigma-2 als geeignetes Basisgerät zur Erfassung des

⁴⁷ Wegen Witterungseinfluss, Insekten und Verrottung

⁴⁸ Derzeit ca. 80 Kurstandorte; mehrere Forschungsvorhaben im In- und Ausland zur Pollenerfassung (<http://www.dwd.de>)

Polleneintrages nach Art und Quantität herangezogen. Der Sigma-2 wird in 2.2.2 ausführlicher erörtert und ist dort in Abb. 2.2.5 dargestellt.

2.2.1.2 Verfahrensentwicklung

Die Arbeiten zur Entwicklung eines für ein GVO-Monitoring geeigneten technischen Pollenakkumulators wurden von F. Hofmann, Ökologiebüro, in Zusammenarbeit mit Dipl.-Ing. G. Breitfuß, Breitfuß Messtechnik GmbH, und mit Unterstützung durch V. Dietze und Dr. E. Schultz (DWD, Freiburg) durchgeführt.

Als Basisgerät zur quantitativen Bestimmung des Polleneintrages diene der Depositionssammler Sigma-2⁴⁹ nach VDI 2119, Blatt 4. Die beim DWD gemachten Erfahrungen anhand allergologisch relevanter Pollen führten zur Einschätzung, dass die Sammelmenge zu gering für molekulargenetische PCR-Analysen zur Prüfung des GVO-Eintrages ausfällt. Aus diesem Grund erfolgte die Entwicklung einer geeigneten Zusatzvorrichtung, dem „Pollenmassenfilter“ PMF⁵⁰, der mit dem Sigma-2 zusammen eingesetzt werden kann und die Aufgabe hat, ausreichende Pollenmengen einzufangen.

Das Gerät wurde hierbei für einen etwa vierwöchigen Sammelzeitraum dergestalt dimensioniert und optimiert, dass die Pollenmengen mindestens den Verfahrensgrenzen der PCR entsprechen. In Abb. 2.2.4 wird die Aufgabenteilung der technischen Pollensammler Sigma-2 und PMF für ein GVO-Monitoring veranschaulicht.

Für die technische Entwicklung und den Bau der PMF-Sondervorrichtungen wurde die Firma Breitfuß Messtechnik GmbH in Harpstedt beauftragt. Die Validierung im Freiland erfolgte in 2001 (siehe Kap. 2.7).

⁴⁹ Bezug: SSP, Horben bei Freiburg (<http://www.ssp-europe.com>)

⁵⁰ Eingetragenes Gebrauchsmuster DE 201 17 632.7 (F. Hofmann, Ökologiebüro [<http://www.oekologiebuero.de>]); Bezugsquelle: Ökologiebüro und Breitfuß Messtechnik GmbH, Harpstedt (<http://www.breitfuss.de>); Patentanmeldung DE 103 27 327.1-52.

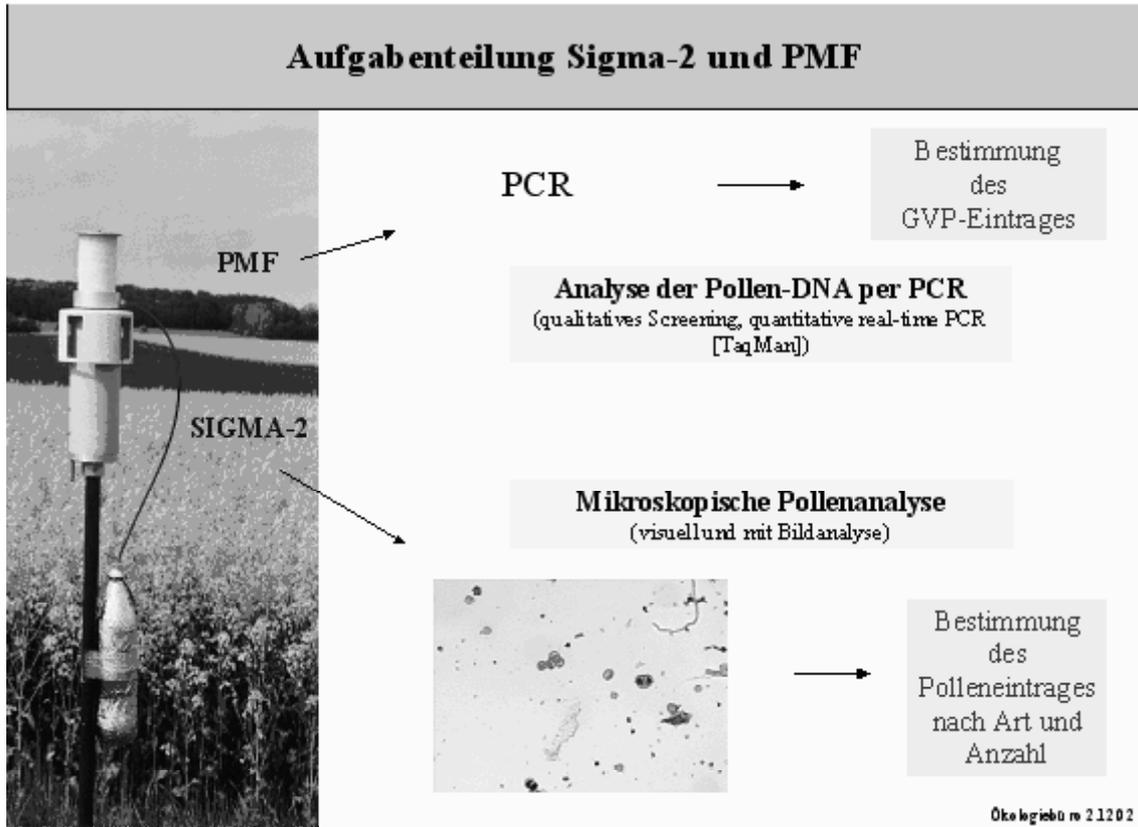


Abb. 2.2.4: Die Aufgabenteilung der technischen Pollensammler Sigma-2 und PMF für das Monitoring der Umweltwirkungen von GVO.

2.2.2 Sigma-2

Ein zur Probenahme von luftgetragenen Partikeln, z.B. Pollen, geeignetes Passivsammelgerät ist der Depositionssammler „Sigma-2“ nach VDI 2119 Blatt 4 (1997). Der Sigma-2 - Sammler wurde vom Deutschen Wetterdienst (DWD) zur Staubprobenahme für Partikel $> 2,5 \mu\text{m}$ Partikeldurchmesser entwickelt (Schultz 1993, 1994a; 1994b; 1999). Hierzu gehören auch Pollen, die artspezifische Durchmesser von $5 - 120 \mu\text{m}$ aufweisen. Er wird routinemäßig vom DWD in einem bundesweiten Messprogramm zur Luftüberwachung in Kurorten eingesetzt, sowie in diversen Forschungsvorhaben im In- und Ausland (Österreich, Schweiz, Argentinien, Brasilien, siehe: Endlicher et al. 1996; Eltschka et al. 1994; Alessandro et al. 1999). Die

Auswertung der Partikelniederschläge auf den Haftfolien erfolgt quantitativ visuell unter mikroskopischer Vergrößerung sowie unter Anwendung bildanalytischer Verfahren. Hierbei sind biogene Partikel, wie Pollen, durch Einfärbung und/oder aufgrund der Eigenfluoreszenz sicher von anderen Luftstaubpartikeln, wie mineralische Stäube, Reifenabrieb, Ruß etc., zu unterscheiden.

2.2.2.1 Bau und Funktion

Bau und Funktion des Sigma-2 werden in Abb. 2.2.5 veranschaulicht. Der Sigma-2 besteht aus einem Sedimentationszylinder, der nach oben durch eine Haube abgedeckt ist. Sowohl in dem Zylinder, wie auch in der Abdeckhaube sind seitlich je vier Fenster angebracht, durch die Luft weitgehend ungehindert in den Sedimentationszylinder gelangen kann. Der Sedimentationszylinder hat die Funktion einer Beruhigungskammer für die Umgebungsluft, so dass die in der Luft enthaltenen Partikel auf eine Haftfolie am Boden des Zylinders absinken. Der Sigma-2 ist damit als Depositionssammler anzusprechen. Nach der Exposition werden die Haftfolien entnommen, im Labor präpariert und dann die Partikel gemäß der VDI-Richtlinie unter dem Mikroskop bestimmt und ausgezählt.

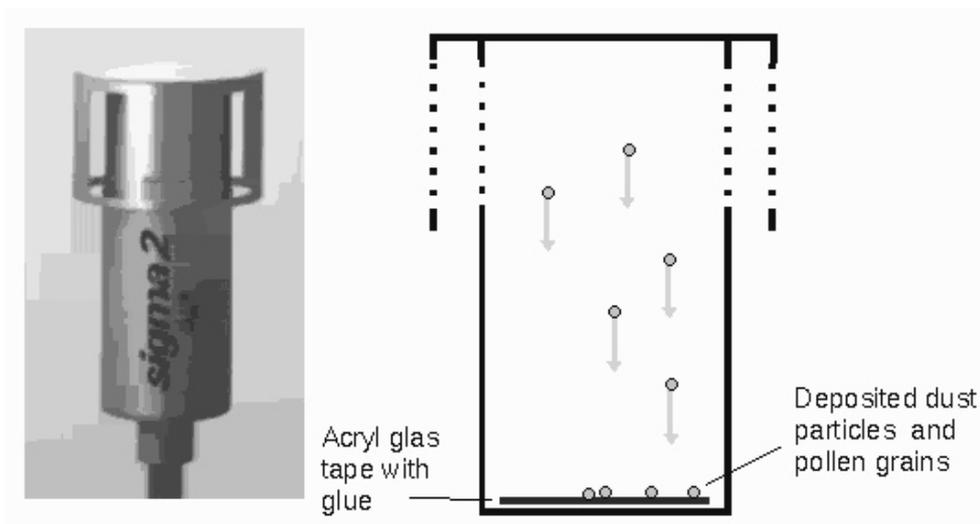


Abb. 2.2.5: Bau und Funktionsweise des Passivsammlers Sigma-2.

(http://bienemaja.informatik.uni-freiburg.de/Pollen/pollen_sampling.html)

2.2.2.2 Expositionsdauer

Bei den Statusuntersuchungen des DWD in den Kurorten werden die Staubhaftfolien 7 Tage im Sigma-2 ausgebracht. Entsprechend den in unserem Vorhaben genannten Zielen für ein Umweltmonitoring von GVO wurden die Haftfolien abweichend hiervon über den Blühzeitraum der Pflanzen exponiert (4-6 Wochen, siehe Kap. 2.7).

2.2.2.3 Transport und Präparation

Nach Entnahme der Haftfolien aus dem Sigma-2 im Gelände wurden diese auf den Trägern in verschließbare, durchsichtige Plastiktransportdosen überführt und innerhalb von 48 Stunden an den DWD versandt. Die Präparation erfolgte dann im Labor des DWD mit routinemäßig etablierten Verfahren. Die Proben wurden im Trockenschrank drei Stunden bei 50°C konditioniert. Für die Durchlichtmikroskopie wurden aus den Folien anschließend Ausschnitte von 18 mm x 18 mm ausgestanzt, auf Glas-Objektträger überführt, mit Safranin angefärbt und mittels Lack zu Dauerpräparaten verschlossen.

2.2.2.4 Mikroskopische Pollenzählung

Die mikroskopische Pollenzählung erfolgte sowohl qualitativ visuell als auch quantitativ durch Vermessung mit dem Bildanalyse-System Digitrace der Fa. IMATEC beim DWD in Freiburg. Als Mikroskop stand das ZEISS Axioplan 2mot zur Verfügung, das mit einem steuerbaren xy-Probenstisch der Fa. Märzhäuser und einem Autofocussystem (z) ausgestattet war. Die bildanalytische Vermessung der Pollen auf den Objektträgern erfolgte bei 10-facher bis 20-facher Vergrößerung. Die Einheit ist in Abb. 2.2.6 dargestellt.



*Abb. 2.2.6: Bildanalyseeinheit beim DWD mit Präzisionsmikroskop (Zeiss),
hochauflösender CCD-Kamera und Rechnerkopplung (Foto: DWD)*

Die Präparate wurden sowohl visuell mit dem Auge als auch bildanalytisch ausgewertet. Hierzu wurden auf den Präparaten festgelegte Stützstellen angefahren und über die CCD-Kamera Bilder eingezogen. Die Auswertung erfasste eine Zählfläche von insgesamt 110 oder 120 mm². Die Einzelbilder wurden gespeichert.

Ein Beispiel mit Rapspollen ist in Abb. 2.2.7 dargestellt.

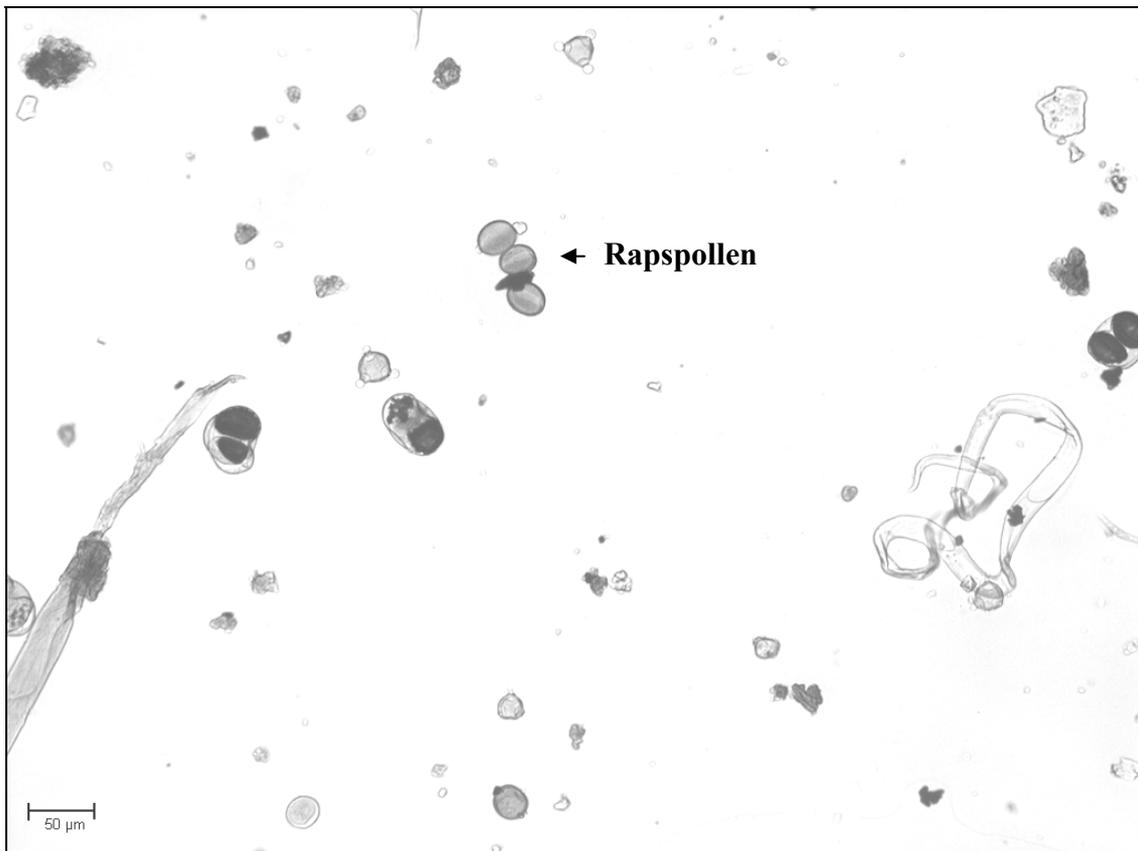


Abb. 2.2.7: Ausschnitt einer präparierten Haftfolie mit Rapspollen unter dem Mikroskop (Foto: DWD)

Die Auswertung umfasste die Gesamtpollenanzahl und die Pollenanzahl von Koniferen sowie von Raps, Mais, Zuckerrübe und Kartoffel. Hierzu wurden in Vorversuchen zur Etablierung des Verfahrens Referenzproben und entsprechende Bildarchive angelegt. Die bildanalytische Auswertung und Unterscheidung der Pollen erfolgte mit einer Echtfarbbildverarbeitung durch die Verknüpfung morphometrischer und morphologischer Messparameter.

Der visuelle Nachweis der Pflanzenpollen erfolgte in der Regel auf Gattungsebene, da eine Arten- oder gar Sortendifferenzierung in der Regel nicht möglich ist (siehe Tab. 3.1.8). Des Weiteren ist der Reifezustand des Pollens zu beachten, da dieser zu morphologischen Varianzen führt.

2.2.2.5 Auswertung

Die Messergebnisse wurden als Pollenanzahl N_{Z_Sigma} über die Zählfläche A_{Z_Sigma} angegeben. Diese Angabe bezieht sich auf den Sammel-/Expositionszeitraum τ (tau).

Die Pollenbelegung der gesamten Sigma-Haftfolie [N_{H_Sigma}] berechnet sich dann wie folgt:

$$N_{H_Sigma} = N_{Z_Sigma} \cdot \frac{A_{H_Sigma}}{A_{Z_Sigma}} \quad \text{in} \quad \left[\frac{n \text{ Pollen}}{\text{Haftfolie}} \right] \quad (1)$$

wobei gilt: N_{H_Sigma} : Pollenanzahl auf der Sigma-Haftfolie

N_{Z_Sigma} : Pollenanzahl auf Zählfläche der Haftfolie

A_{H_Sigma} : Fläche der Haftfolie in mm^2 [65mm x 65mm= 4.225 mm^2]

A_{Z_Sigma} : Zählfläche in mm^2 [z.B.: 110 mm^2]

Der Polleneintrag am Standort über den Expositionszeitraum τ wurde als Pollendeposition pro m^2 im Zeitraum τ angegeben und leitet sich wie folgt ab:

$$D_{\tau_Sigma} = \frac{N_{Z_Sigma} \cdot 10^6}{A_{H_Sigma} \cdot \tau} \quad \text{in} \quad \left[\frac{n \text{ Pollen}}{\text{m}^2 \cdot \tau} \right] \quad (2)$$

wobei gilt: D_{τ_Sigma} : Pollendeposition pro m^2 im Expositionszeitraum τ

τ : Expositionszeitraum in d Tagen

Standardbezugsfläche $1 \text{ m}^2 = 10^6 \text{ mm}^2$

Da in unserem Versuch die Expositionszeit den Hauptblühzeitraum umfasste, stellt D_{τ} gleichzeitig die für die Bewertung wesentliche Gesamtmenge des Polleneintrages über die Blühperiode im Jahr dar. Ansonsten erhält man diese als Summe der aufeinander folgenden Einzeldepositionen.

Die gemessene Pollendeposition diente dann in der statistischen Auswertung als definierte Größe für Bezüge zur Ausbreitungsrechnung (siehe Kap. 2.6 und Kap. 2.8).

Nach Berücksichtigung der Verteilungsform der Daten durch log-Transformation⁵¹ erfolgte die statistische Auswertung im Hinblick auf Sensitivität, Reproduzierbarkeit, Nachweisgrenze, Hintergrundbelastung und Fallzahlen (s. Kap. 2.5).

2.2.2.6 Weitere Auswertemöglichkeiten mit Erläuterungen zum Sammelverhalten des Sigma-2

Als Standardgröße wird vielfach die Depositionsrage als mittlere Eintragsrate pro m² und Tag über den Erfassungszeitraum angegeben. Die Pollendepositionsrage D_{d_Sigma} berechnet sich wie folgt:

$$D_{d_Sigma} = \frac{D_{\tau_Sigma}}{\tau} \quad \text{in} \quad \left[\frac{n \text{ Pollen}}{m^2 \cdot d} \right] \quad (3)$$

wobei gilt: D_{d_Sigma} : mittlere Pollendepositionsrage pro m² und Tag

τ : Expositionszeitraum in d Tagen

Unter Annahme einer Depositionsgeschwindigkeit v_{di} lässt sich die mittlere Pollenkonzentration über den Sammelzeitraum aus der Pollendepositionsrage wie folgt abschätzen:

$$C_{Sigma} = \frac{D_{d_Sigma}}{v_{d_i, Sigma}} \cdot f_{sd} \quad \text{in} \quad \left[\frac{n \text{ Pollen}}{m^3} \right] \quad (4)$$

wobei gilt:

C_{Sigma} : mittlere Pollenkonzentration in der Luft

D_{d_Sigma} : Depositionsrage der Pollen pro m² und Sekunde

⁵¹ Für Auswertungen von Pollenmessdaten in der Luft wird in der Regel eine log-normal-Verteilung angesetzt, die in einem begrenzten Dosisbereich eine gute Annäherung darstellt. Systematische Auswertungen von weltweiten Befunden aus Burkard-Falle und Rotorod ergaben über den gesamten Dosisbereich bessere Anpassungen über eine Gamma-Verteilung (Comtois 2000). Bei hohen Dosen (Nahbereich) erscheint der Kurvenverlauf steiler als exponentiell, bei geringen Dosen flacher, bei weiten Entfernungen ergibt das höhere Dosen als bei exponentiellem Kurvenverlauf erwartet. Die Verläufe sind abhängig von der Messtechnik.

$v_{d_i, \text{Sigma}}$: spezifische Depositionsgeschwindigkeit der Pollenart i im Sigma-2
 f_{sd} : Umrechnungsfaktor Sekunde auf Tag [=1/86.400]

Eine experimentelle Kalibrierung und Validierung des Sigma-2 unter Feldbedingungen wurde durch Vergleichsmessungen mit dem WRAC (WideRangeAerosolClassifier; VDI 1997) an einem Testaerosol durchgeführt. Der technisch extrem aufwändige WRAC gilt als ein Referenzgerät für annähernd isokinetisches Sammeln über ein breites Partikelspektrum.

Anders als bei Staubpartikeln ist die effektive Depositionsgeschwindigkeit $v_{d_i, \text{Sigma}}$ für die meisten Pollenarten jedoch nicht genau bekannt. Dafür sind bestimmte Annahmen zu machen, die im Folgenden erläutert werden:

Beim Sigma-2 trägt die Geometrie des Gerätes mit den versetzten Einlassöffnungen zu einer windberuhigten Zone im Innenraum bei, in dem die Sedimentation vorherrschend wirksam ist (Sedimentationsstrecke). Die Sammeleffizienz des Einlasses wird von der Anströmung beeinflusst und ist abhängig von der Pollenart. Die Gesamtsammeleffizienz des Sigma-2 kann nach Thompson et al. (1994) als das Produkt aus Sammeleffizienz des Einlasses mal der Sammeleffizienz des Kollektors im Innenraum beschrieben werden:

$$E_{Sigma} = E_{I_{Sigma}} \cdot E_{K_{Sigma}} \quad (5)$$

wobei gilt:

E_{Sigma} : Sammeleffizienz des Sigma-2

$E_{I_{Sigma}}$: Inlet-Sammeleffizienz für Sigma-2

$E_{K_{Sigma}}$: Kollektor-Sammeleffizienz im Innenraum des Sigma-2

Berücksichtigt man die Sammeleffizienz des Sigma-2 über einen Faktor⁵², so lässt sich aus der Endsinkgeschwindigkeit v_s die effektive Depositionsgeschwindigkeit $v_{d_i, \text{Sigma}}$ für

⁵² mittlere Annäherung; bei differenzierter Betrachtung von Windverhältnissen und Pollenarten ist dieser durch eine entsprechende Funktion zu ersetzen

den Sigma-2 auf der Grundlage des Stokes'schen Gesetzes wie folgt näherungsweise bestimmen:

$$v_{d_{Sigma}} = f_{E_{Sigma}} \cdot v_s = f_{E_{Sigma}} \cdot 0,003 \cdot d_{ae}^2 \text{ in } \left[\frac{cm}{s} \right] \text{ für } 1 < d_{ae} < 100 \mu m \quad (6)$$

wobei: $v_{d_{Sigma}}$: spezifische Depositionsgeschwindigkeit der Pollen für Sigma-2

v_s : spezifische Endsinkgeschwindigkeit der Pollen in Luft

$f_{E_{Sigma}}$ Faktor für Sammeleffizienz des Sigma-2

d_{ae} : aerodynamische Durchmesser in μm für kugelförmige Partikel
mit Pollendichte ρ ($\rho = 1 \text{ g/cm}^3$)

Der aerodynamische Durchmesser ist für viele Pollenarten ebenfalls nicht exakt bekannt. Da die aerodynamischen Eigenschaften von Pollen stark differieren können, muss dieser, und letztlich v_d , für jede Pollenart unter Freilandbedingungen bestimmt werden. Hilfsweise wurde vom DWD der geometrische Durchmesser verwendet unter Annahme einer mittleren Pollendichte von $\rho = 0,75$ und einem mittleren dynamischen Gestaltfaktor für Pollen κ [κ] = 1,5 (Hinds, 1982):

$$v_s = 0,003 \cdot d_{geo}^2 \cdot \frac{\rho}{\kappa} \quad (7)$$

Daraus ergaben sich als Sinkgeschwindigkeit v_s für die Zielarten Raps, Mais und Zuckerrübe im Sigma-2 folgende Erwartungswerte:

Pollenart	Pollen- durchmesser	berechnete Sink- geschwindigkeit	Literatur- werte	Literatur- werte
	d_{geo}	v_s	v_s	v_d
	μm	cm/s	cm/s	cm/s
Raps	25 - 35	0,9 – 1,8	1,1 ⁽²⁾	0,9 – 1,7 ^(1; 4)
Mais	80 – 125	10 – 24	21 - 32 ⁽³⁾	20-40 ⁽¹⁾
Zuckerrübe	20 - 30	0,6 – 1,3		
Gesamtpollen	5 – 125			1,4 ⁽⁵⁾

Tab. 2.2.1: Erwartungswerte für die Sinkgeschwindigkeit v_s der Pollen von Raps, Mais und Zuckerrübe mit Angabe von Vergleichswerten aus der Literatur

(1) Emberlin (1999)

(2) Dietze, unveröff.

(3) Aylor (2002)

(4) McCartney & Lacey (1991)

(5) DWD, empirisch für Pollengesamtzahl Sigma versus Burkard (s.u.)

Bei der Freisetzung von Pollen kann ein Teil der Körner nicht nur einzeln vorliegen, sondern auch als Päckchen. Insbesondere Pollenarten wie Raps, die Pollenkitt aufweisen, neigen dazu. Chamberlain (1967) führte diesen Aspekt aus und zeigte an Beispielen, wie sich v_d in Abhängigkeit von Pollenzahl und Geometrie ändert (z.B.: bei 3 Pollen im Dreieck um 20%). Er kommt zur Bewertung, dass sich unter praktischen Gesichtspunkten v_d nur relativ geringfügig ändert.

Ein Vergleich der Ergebnisse zur Ermittlung der Pollenkonzentration aus dem passiven Depositionssammler Sigma-2 erfolgte in 2002 über 14 Wochen mit entsprechenden Ergebnissen aus dem volumetrischen Standardaktivgerät Burkard-Falle (10 l/min, jeweils 7 d Sammelzeitraum) beim DWD in Freiburg. Die Ergebnisse der Vergleichsmessungen für die Pollengesamtzahl sind in Abb. 2.2.8 dargestellt. Aus dem Vergleich ergab sich ein effektives $v_{d_Sigma} = 1,4 \text{ cm/s}$ zur Berechnung der

Pollenkonzentration aus der Pollendeposition des Sigma-2 für die Pollengesamtzahl.
Die Kurven sind nahezu deckungsgleich und hochsignifikant korreliert.

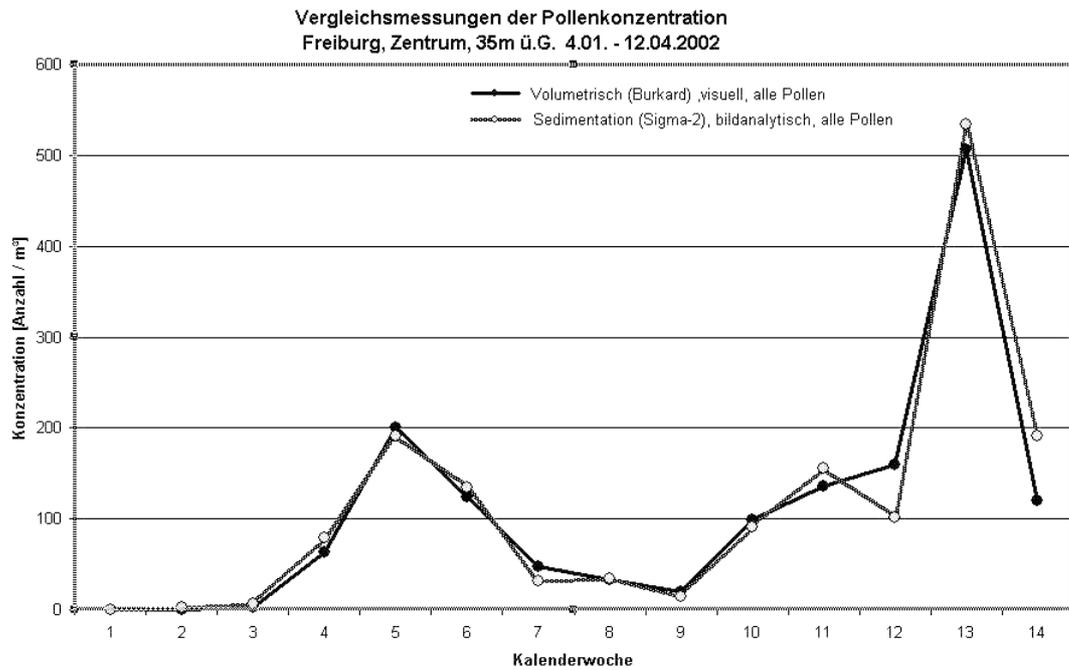


Abb. 2.2.8: Vergleichsmessungen des Passivgerätes Sigma-2 zur Burkard-Falle, dem Standardaktivgerät der Polleninformationsdienste in der BRD und in weiten Teilen Europas (Quelle: Mitteilung DWD 2003)

2.2.3 Der Pollenmassenfilter PMF

Ziel war es, ein über längere Zeit (mehrere Wochen) im Freiland einsetzbares passives Sammelgerät zu entwickeln, das eine für molekularbiologische Analysen der Pollen-DNA ausreichend große Probenmenge an Pollen sammelt.

2.2.3.1 Bau und Funktion des PMF

Bau und Funktion des PMF gehen aus Abb. 2.2.9 hervor. Die Abbildungen zeigen die entwickelte Endform als Grundlage der derzeit in Arbeit befindlichen VDI Richtlinie 4030 Bl. 3. Der PMF ist als Zusatzgerät auf den Sigma-2 montiert (a) und über eine Schlauchverbindung mit der Sammelflasche verbunden. In Bildteil b ist der Aufriss zu sehen. Zur Erläuterung der Bau- und Funktionsweise wird der PMF in Abb. 2.2.10 als Komplettansicht und in seine Einzelteile zerlegt abgebildet.

Der PMF weist eine zylindrische Form auf. Er besteht aus dem Basisteil mit Auffangschale und Ablauf sowie eingelassenen Stabhalterungen, dem Filterkörper sowie der Abdeckung⁵³. Der Filtermantel des PMF ist aus kreisrunden, innen hohlen Gewebefiltern zu einem geschichteten Mantelkörper zusammengesetzt. Die Zylinderform stellt sicher, dass der Filter, in Radialrichtung gesehen, unabhängig von der Windrichtung immer dieselbe projizierte Expositionsfläche hat. Entsprechend der Dimensionierung des Filterkörpers und den vorherrschenden Windverhältnissen passiert ein bestimmtes Luftvolumen den Filter. Die einzelnen Filterpads bestehen aus haftaktiven, thermisch verbundenen und beschichteten Polypropylen-Fasern (\varnothing ca. 100 μm). Die Faserdichte des geschichteten Filterkörpers nach innen ist homogen und weist eine vertikal periodische Veränderung auf. Letztere Anordnung vermindert zusätzlich Staudruckeffekte und erhöht die Filtereffizienz.

⁵³ Der obere Deckel wurde zunächst als Flachversion, später als spitz zulaufendes Kegeldach ausgeführt, um den Ansitz von Vögeln zu verhindern.

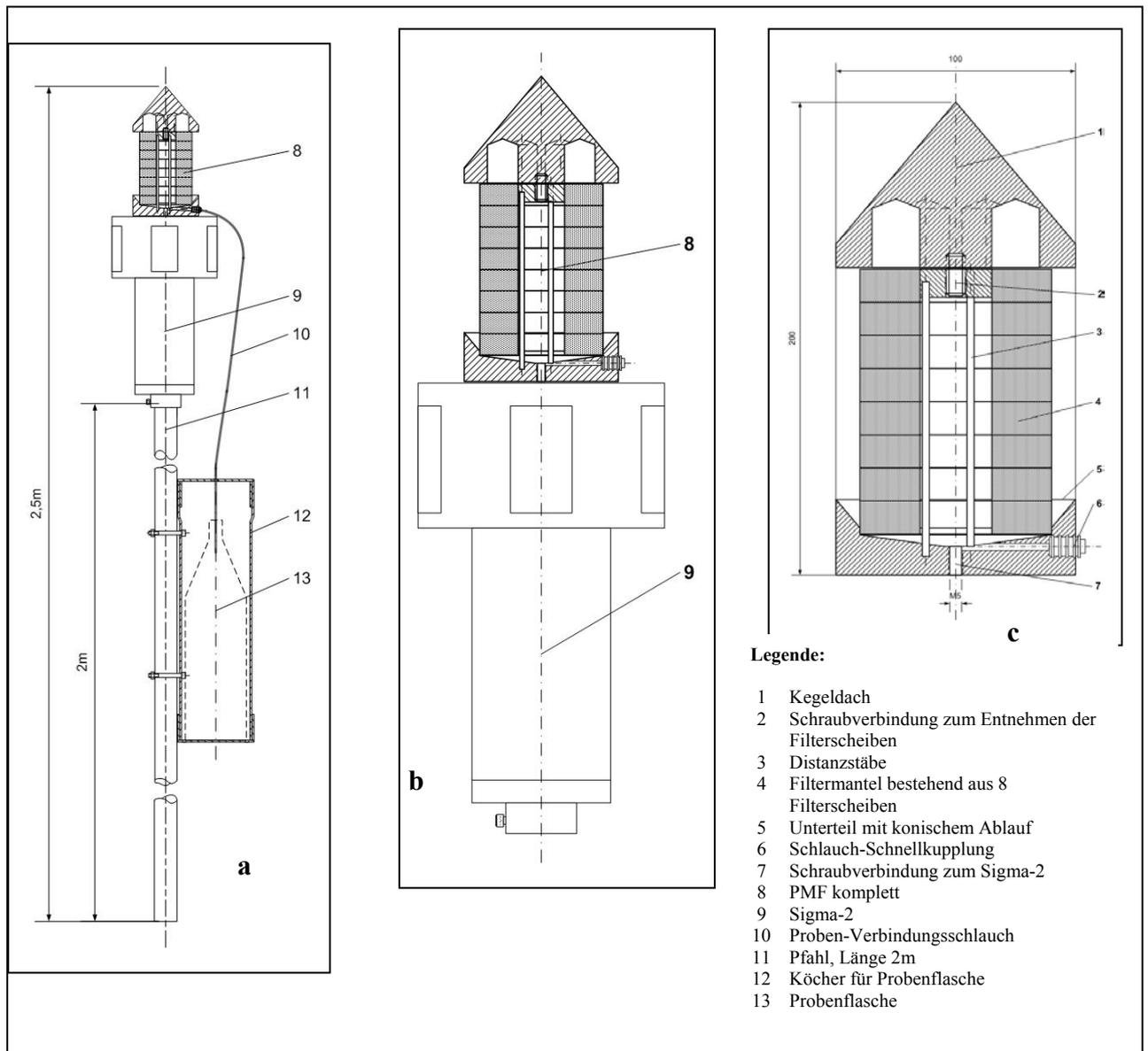


Abb. 2.2.9: Bau und Funktion des PollenMassenFilters PMF.

a) Gesamtansicht des technischen Pollensammlers

b) Probenahmeeinheit PMF montiert auf Sigma-2

c) Aufriss PMF

Der Aufbau des Filtermantels ist so beschaffen, dass er einen sehr geringen Strömungswiderstand⁵⁴ aufweist und nur ein geringer Staudruck entsteht, so dass die Luft den Filter nahezu ungehindert durchströmt, gleichzeitig jedoch Partikel über 10 µm, zu denen die Pollen mit Durchmessern von 10-120 µm gehören, zu einem hohen Grade zurückgehalten und ausgefiltert werden⁵⁵. Die Faserdicke und Gewebearbeit kann unter physikalischen Aspekten als optimal für Partikel größer 10 µm gewertet werden, ohne dass dabei ein Zusetzen des Filterkörpers bei längerer Exposition erfolgt.

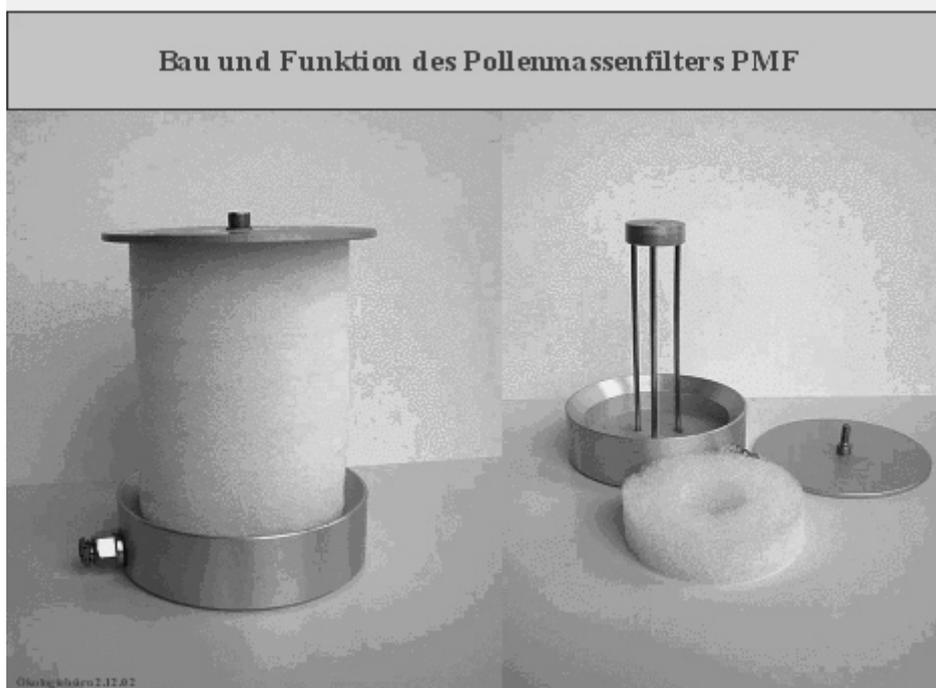


Abb. 2.2.10: Ansichten des PMF zu Bau und Funktion mit Einzelteilen.

Der PMF wurde für längere Expositionszeiten über mehrere Wochen ausgelegt, so dass die Hauptblühperioden der Pflanzen mit wenigen Proben erfasst werden können (siehe Kap. 2.7). Empfohlen werden 1-4 Wochen. Die Dimensionierung des PMF war hierbei angepasst an die Anforderungen in Bezug auf die erforderliche Pollenmenge für die

⁵⁴ Der Strömungswiderstand ΔP beträgt für ein Filterpad bei vertikaler Durchströmung ca. 30 Pa bei 1 m/s Nenndurchströmgeschwindigkeit

⁵⁵ Der Abscheidegrad für Partikel $> 10 \mu\text{m}$ beträgt nach DIN EN 779 ca. 90 % bei vertikaler Durchströmung eines Filterpads.

PCR und den in Mitteleuropa vorherrschenden Windverhältnissen. Dies ergab eine projizierte Fläche, in Windrichtung gesehen, von $10\text{ cm} \times 8\text{ cm} = 80\text{ cm}^2$.

Bei trockener Witterung werden Partikel, wie Pollen, festgehalten. Bei Regen werden diese ausgewaschen und der Filter damit gleichzeitig regeneriert. Damit kein Sammelgut verloren gehen kann, ist als Bestandteil eine Auffangeinrichtung für das vom Filter ablaufende Regenwasser vorgesehen. Durch einen im Boden eingelassenen Ablauf wird das aufgefangene Regenwasser über einen inerten Schlauch zu einer 1,5 l PET-Sammelflasche geleitet⁵⁶. Für die gesammelte Pollenprobe wird eine Rückgewinnung der Pollen aus dem Filterkörper sowie aus dem aufgefangenen Regenwasser dann im Labor vorgenommen (siehe Kap. 2.2.3.2). Hierdurch kann auch die aufgefangene Niederschlagsmenge nachvollzogen werden.

In der ersten Freilandperiode im Frühjahr 2001 wurde gelegentlich Vogelansitz beobachtet, was in Einzelfällen zu Kotanlagerungen führte. Um dieses zu vermeiden, wurde der PMF, der in der ersten Version ein Flachdach aufwies, im Folgenden standardmäßig mit einem Kegelspitzdach versehen.

2.2.3.1.1 PMF-Varianten

Unter Beibehaltung der Filtereinheit als funktionales Grundprinzip wurden im Verlauf des Vorhabens verschiedene Varianten des PMF entwickelt, die die Palette der Anwendungsmöglichkeiten erweitern und hier methodisch ergänzend erwähnt werden.

2.2.3.1.1.1 PMF-M mit integriertem Membranfilter

Im unteren Basisteil des PMF kann eine Abscheidevorrichtung integriert werden, so dass die im Regenwasser vorhandenen festen Partikel, wie Pollen, bereits im PMF vom Regenwasser getrennt werden. In der Version PMF-M ist dies durch einen Membranfilter (12 μm Porengröße) auf einer Glasfritte umgesetzt. Erste Testversuche mit Prototypen des PMF-M im Freiland erfolgten in 2002.

⁵⁶ Wir danken der Bremer Erfrischungsgetränke GmbH sowie der Vilsa Mineralbrunnen AG für die Bereitstellung der PET-Sammelflaschen.

2.2.3.1.1.2 PMF-L mit Lüfter

Das Ausführungsbeispiel PMF-L weist im Bereich des Deckels einen Lüfter auf, durch den in der Sammelkammer ein leichter Unterdruck erzeugt wird. Dadurch wird zusätzlich das Aufbauen eines Staudruckes vermindert. Des Weiteren kann der PMF dann auch in windberuhigten Bereichen, wie Innenräumen und Höhlen verwendet werden.

Beim PMF-L-k wurde ein elektrischer, mittels Batterie, Akku oder Solarzellen gespeister Lüfter integriert, der eine konstante Drehzahl und Lüfterleistung aufweist. Im Vorhaben wurden Prototypen des L-k technisch realisiert.

In der Version L-e sind Mittel vorgesehen, durch die die Lüftergeschwindigkeit und damit der in der Sammelkammer erzeugte Unterdruck in Abhängigkeit von der Windgeschwindigkeit elektronisch eingeregelt wird. Dies erfolgt vorzugsweise so, dass die Geschwindigkeit des Lüfters und damit der in der Sammelkammer erzeugte Unterdruck den Staudruck vor dem Filter aufhebt. In diesem Fall wird isokinetisches Sammeln angestrebt.

In der Ausführung L-w wird alternativ der Lüfter durch den Wind angetrieben. Hierdurch sind externe Mittel zur Energieversorgung nicht mehr erforderlich. Darüber hinaus ist die Geschwindigkeit des Lüfters automatisch von der Windgeschwindigkeit abhängig geregelt. Durch entsprechende Dimensionierung wird dafür gesorgt, dass der Unterdruck in der Sammelkammer den Staudruck vor dem Filter aufhebt.

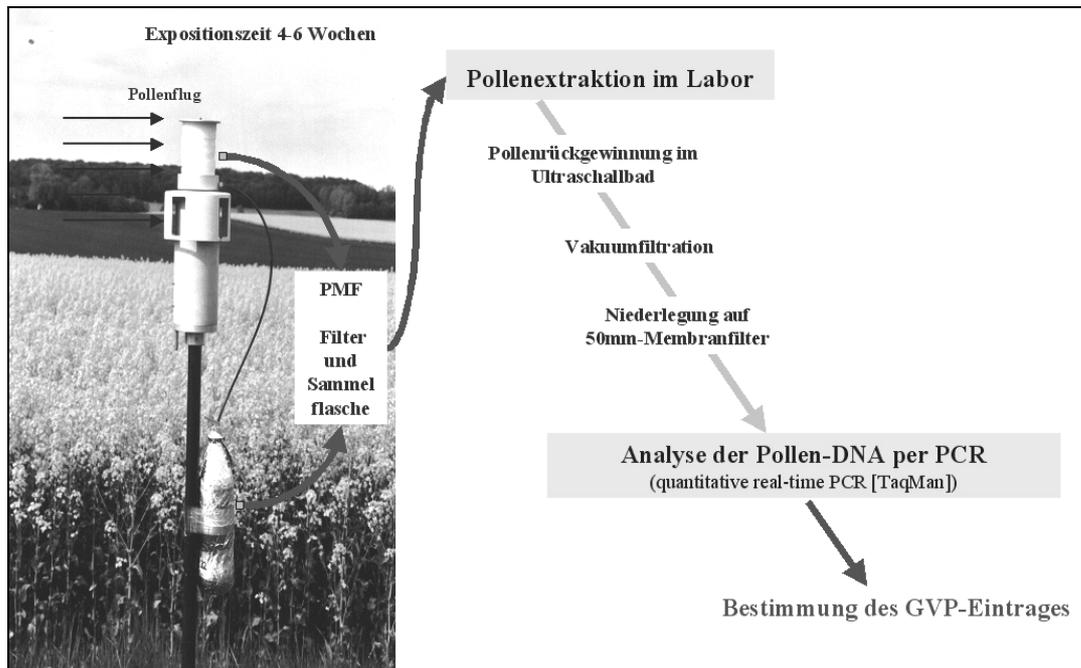


Abb. 2.2.11: Analysegang mit Aufbereitung der Pollenproben aus dem PMF

2.2.3.2 Probengewinnung und -aufbereitung

Nach Abschluss der Freilandexposition wurden die Luftstaubpartikel mit den Pollen aus den Filterkörpern und den Sammelflaschen im Labor rückgewonnen. Die Proben können dann entweder pur (z.B. in einem Eppendorf-Gefäß) oder auf einer geeigneten Matrix niedergelegt werden. In dem Vorhaben wurden hierzu Membranfilter verwendet. Diese wurden in Parallelproben geteilt und in die PCR-Analytik für die Bestimmung des GVO-Eintrages überführt. Probenahme und Aufbereitung sind in Abb. 2.2.11 schematisch dargestellt und werden im Folgenden genauer beschrieben.

2.2.3.2.1 Probenahme im Gelände

Zur Probenentnahme im Gelände wurden die Filterkörper für den Transport in verschließbare Gefäße überführt. Die Sammelflaschen wurden zur späteren Bestimmung der Niederschlagsmenge mittels einer elektronischen Präzisionswaage (Maul tronic S) auf 0,5-1 g genau im Gelände ausgewogen. Es erfolgte dann ein Ausspülen der Basiseinheit mit ca. 100 ml Spülflüssigkeit in die Sammelflasche, so dass

noch verbleibende Restmengen an Pollen mit erfasst wurden. Die Proben wurden in Alufolie verschlossen, dunkel und kühl gelagert und innerhalb von 48 Stunden im Labor aufbereitet.

2.2.3.2.2 *Pollenrückgewinnung im Labor*

Die Pollenrückgewinnung aus den Filterpads und der Flüssigkeit in den Sammelflaschen erfolgte im Labor unter Anwendung eines Ultraschallbades und einer Abscheidung aller festen Partikel mit den Pollen als Filterkuchen auf 50mm-Membranfilter (Cellulose-Nitrat 12 µm) über Vakuumfiltration.⁵⁷ Die Proben wurden auf den Membranfiltern in Petrischalen mit Steg überführt, luftgetrocknet und dunkel bei Raumbedingungen aufbewahrt. In Abb. 2.2.12 sind exemplarisch 16 Proben auf den Membranfiltern gezeigt. Die Unterschiede in Belegung und Färbung spiegeln hierbei die Unterschiede der jeweiligen Standortverhältnisse in Bezug auf Pollenflug und Luftstaubzusammensetzung wider.

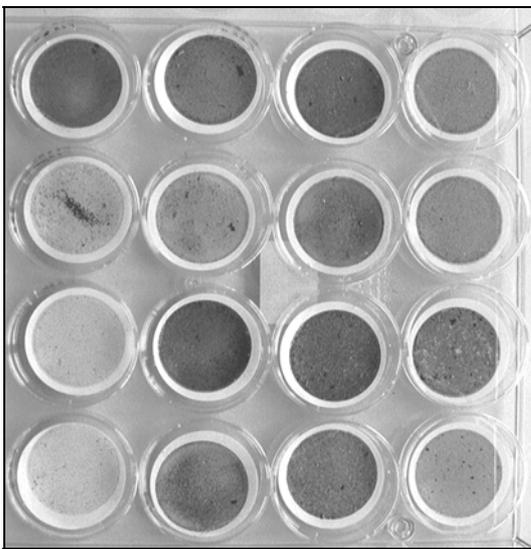


Abb. 2.2.12: Pollenproben aus dem PMF, niedergelegt auf Membranfilter. Die Membranfilter wurden in Petrischalen aufbewahrt. Die Färbung kennzeichnet die Zusammensetzung der Luftstaubproben.

⁵⁷ Schutzrechtlich gesichertes Verfahren, Patentanmeldung DE 103 27 327.1-52: Rechte bei F. Hofmann, Ökologiebüro.

2.2.3.2.3 *Probenaufteilung für die PCR-Analytik*

Die Membranfilter mit den PMF-Proben wurden für die PCR-Analytik in zwei Parallelproben und eine Rückstellprobe aufgeteilt. Ein Teil der Rückstellprobe wurde zur Auszählung der Pollen weiterverarbeitet (siehe Kap. 2.2.3.3.1). Die Unterproben wurden direkt in 12 ml-Sarstedt-Röhrchen überführt und ans PCR-Labor übergeben. Die PCR-Analytik ist in Kap. (2.4) erläutert.

2.2.3.3 *Auswertung*

2.2.3.3.1 *Pollenbestimmung und -zählung*

Zur Kontrolle der Probenqualität und Abschätzung der gesammelten Pollenmengen wurden die Filterkuchen mit den Pollenproben auf den Membranfiltern unter dem Binokular⁵⁸ untersucht. Fotografische Aufnahmen erfolgten über eine angeschlossene Digitalkamera⁵⁹ bei entsprechender Vergrößerung (80-240fach).

Für die quantitative Pollenanalyse wurde aus Segmenten der Membranfilterproben der Filterkuchen in eine Suspension überführt und diese im Nds. Landesinstitut für Bienenkunde in Celle (K. von der Ohe) ausgezählt. Das Verfahren wurde im Bieneninstitut Celle auf Grundlage der Präparationsschritte nach DIN 10760 zur Pollenanalyse im Honig entwickelt (s. Kap. 2.3.5 ff). Bestimmt wurden die Gesamtpollenzahl sowie die Anteile an Raps-, Mais- und Zuckerrübenpollen auf folgende Weise:

Die in Suspension befindlichen Pollenproben werden mittels MS1 Minishaker IKA homogenisiert. 1 ml Homogenisat wird mit 1 ml Aqua dest.⁶⁰ versetzt und 5 Min. zentrifugiert bei 1000g. Nach der Abnahme des Überstandes wird das Sediment auf einen Objektträger überführt, mit drei Tropfen Aqua dest. nachgespült und auf 22 x 22 mm ausgestrichen. Nach der Trocknung (ca. 1 h) erfolgt die Einbettung in

⁵⁸ Nikon MSZ1000 Stereo Zoom 0,8-8x, Plan Apo WD 70 (1x) Objektiv, C-W10xA/22 Okkular mit Zählrastrer und P-IBSS-Strahlenteiler

⁵⁹ Nikon Coolpix 995 an C-Mount Adapter und P-IBSS

⁶⁰ Bei Zea-Filterproben (Mais) 2 ml Lösung eingesetzt

Kaiser's Glycerin-Gelatine und das Abdecken mit einem Deckglas (Größe 22 x 22 mm).

Die Auszählung erfolgte unter 400-facher Vergrößerung⁶¹ derart, dass die jeweiligen Pollenarten in der 5., 10., 15., 20., 25. und 30. Reihe des Gesichtsfeldes komplett ermittelt wurden.

Die relative Häufigkeit X der Pollenart i in Prozent wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$X_i = \frac{n_i \cdot 100}{n_{gesamt}} \quad \text{in } [\%] \quad (2.2.1)$$

wobei gilt: X_i relative Häufigkeit der gesuchten Pollenart in Prozent
 n_i Anzahl der gesuchten Pollenart
 n_{gesamt} Gesamtzahl der ausgezählten Pollenkörner

Die absolute Pollenanzahl im Probensegment (= eingesetzte ml der Lösung) ergibt sich wie folgt:

$$N_{Z_{MF}} = \frac{n_i \cdot R_{gesamt}}{R_{zähl}} \quad \text{in } \left[\frac{n \text{ Pollen}}{\text{Zählsegment}} \right] \quad (2.2.2)$$

wobei gilt: $N_{Z_{MF}}$: Pollenanzahl auf Zählausschnitt (Segment) der Probe
 n_i gemessene Anzahl der Pollen
 $R_{zähl}$ Anzahl der ausgezählten Reihen
 R_{gesamt} Gesamtzahl der Reihen

⁶¹ Mikroskop Provis, Olympus

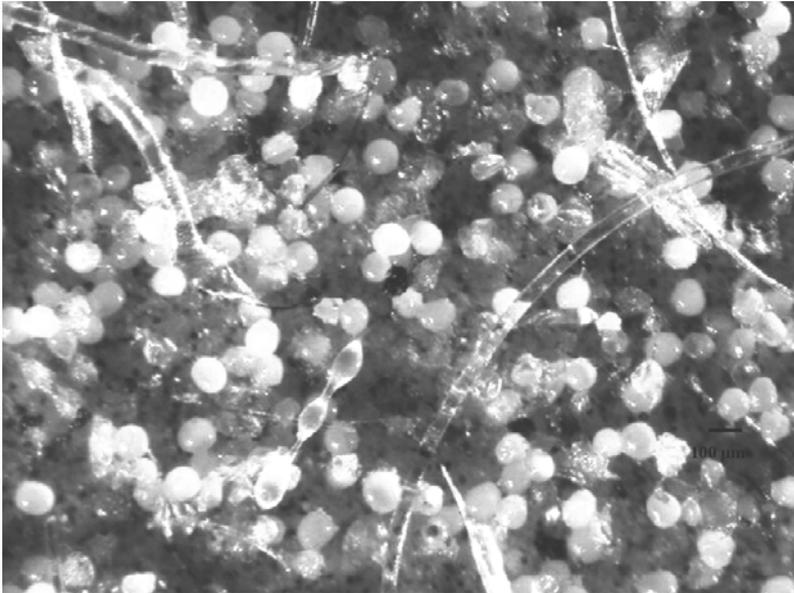


Abb. 2.2.13: Filterkuchen einer PMF-Probe mit Maispollen unter dem Binokular
(160fache Vergrößerung)

2.2.3.3.2 Pollenmenge pro Probe

Die gesammelten Pollenmengen pro PMF-Probe im Expositionszeitraum für die Arten Raps, Mais, Zuckerrübe sowie der Pollengesamtzahl ergaben sich aus den Messwerten der Pollenzählungen unter Berücksichtigung der jeweilig ausgezählten Anteile wie folgt:

$$N_{PMF} = N_{Z_{MF}} \cdot \frac{A_{MF}}{A_{Z_{MF}}} \text{ in } \left[\frac{n \text{ Pollen}}{PMF\text{-Probe}} \right] \quad (2.2.8)$$

wobei: N_{PMF} : Pollenanzahl in der PMF-Probe

$N_{Z_{MF}}$: Pollenanzahl auf Zählsegment

A_{MF} : Fläche der Membranfolie in mm^2 [45mm x 45mm= 2.025 mm^2]

$A_{Z_{MF}}$: Fläche des Zählsegmentes in mm^2 [z.B: 250 mm^2]

Die Pollenmenge pro Probe ist die entscheidende Größe für die Beurteilung der Eignung des PMF, ausreichend Pollen für die PCR-Analytik zu sammeln.

2.2.3.3.3 Pollenfluss F_{PMF}

Der Pollenfluss gibt die am Standort per Wind antransportierte Pollenmenge über den Expositionszeitraum τ als standardisierte Größe pro qm^2 Bezugsfläche an. Der PMF filtert die Pollen aus dem Luftstrom und beschreibt damit vornehmlich einen horizontalen Fluss⁶². Die Bezugsfläche ist senkrecht zur Windrichtung ausgerichtet. Der über den PMF erfasste Pollenfluss F_{PMF} wurde nach folgender Formel ermittelt und kann in Bezug zur Ausbreitungsrechnung gesetzt werden:

$$F_{PMF\tau} = \frac{N_{PMF} \cdot 10^6}{A_{MF} \cdot \tau} \quad \text{in} \quad \left[\frac{n \text{ Pollen}}{m^2 \cdot \tau} \right] \quad (2.2.9)$$

wobei gilt: $F_{PMF\tau}$: Pollenfluss pro m^2 über Expositionszeitraum τ

A_S : Standardbezugsfläche $1 \text{ m}^2 = 10^6 \text{ mm}^2$

τ : Sammel- (Expositions-) -zeitraum in d Tagen
Standardbezugsfläche $1 \text{ m}^2 = 10^6 \text{ mm}^2$

2.2.3.4 Weitere Auswertemöglichkeiten mit Erläuterungen zum Sammelverhalten des PMF

2.2.3.4.1 Pollenkonzentration

Über die mittlere Windgeschwindigkeit lässt sich die Luftsäule abschätzen, die den Filterkörper mit einer projizierten Querschnittsfläche von 80 cm^2 im Expositionszeitraum τ passierte:

$$V_{PMF\tau} = \frac{A_{PMF}}{A_s} \cdot v_w \cdot t_\tau \quad \text{in} \quad \left[m^3 \text{ Luft} \right] \quad (2.2.10)$$

⁶² Hierbei sollen auch Anteile an trockener und nasser Deposition eingeschlossen sein, die auf die senkrechte Akzeptorfläche gelangen.

- wobei: $V_{PMF\tau}$: passiertes Luftvolumen des PMF im Expositionszeitraum τ
 A_{PMF} : projizierte Expositionsfläche des PMF [$8 \times 10 \text{ cm}^2 = 0,08 \text{ m}^2$]
 A_S : Standardbezugsfläche 1 m^2
 v_w : mittlere Windgeschwindigkeit im Zeitraum τ
 t_τ : Expositionszeitraum τ in sec [=24 x 60 x 60 x d Tage]

Bezieht man die über den PMF gemessene Pollenmenge auf diese Luftsäule, lässt sich daraus die mittlere Pollenkonzentration C_{PMF} abschätzen, die über den Expositionszeitraum τ herrschte, wobei die spezifische Sammeleffizienz des PMF zu berücksichtigen ist:

$$C_{PMF} = \frac{F_{PMF\tau}}{f_{PMF_i} \cdot V_{PMF\tau}} \quad \text{in} \quad \left[\frac{n \text{ Pollen}}{m^3} \right] \quad (2.2.11)$$

- wobei: C_{PMF} : mittlere Pollenkonzentration pro m^3 im Sammelzeitraum τ
 f_{PMF_i} : spezifische Sammeleffizienz des PMF für Pollenart i

Die spezifische Sammeleffizienz f_{PMF_i} ist für das Pollenspektrum empirisch noch zu ermitteln (siehe Kap. 2.2.3.4.2). Unter der Annahme von f_{PMF} gleich 100% lässt sich die Mindestkonzentration $C_{PMF_{min}}$ an Pollen in der Luft ermitteln.

2.2.3.4.2 *Sammeleffizienz des PMF*

Beim PMF ist der Filterkörper mit einer großen Akzeptorfläche direkt dem Luftstrom ausgesetzt. Für die Betrachtung der Sammeleffizienz ist dies von maßgeblichem Vorteil gegenüber solchen Geräten, die eine Einlassgeometrie besitzen, wie dies bei den derzeitigen Standard-Aktivgeräten Burkhard-Falle, Kleinfiltergerät und Zyklonsammler der Fall ist. Dadurch entfällt die erhebliche Problematik der Sammeleffizienz am Einlass für den PMF. Gleichzeitig weist der Filter nur einen geringen Luftwiderstand auf, so dass kein wesentlicher Staudruck entsteht und die Luft den Filterkörper durchströmt. Der PMF kommt damit einem „idealen Aerosolsammler“ nach May (1967) für Partikel über $10 \mu\text{m}$ sehr nahe. Gegenüber der Konstruktion von May sammelt der

PMF zusätzlich in allen Windrichtungen gleichermaßen und verzögerungsfrei. Damit sind Probleme eliminiert, die andere Geräte mit Ausrichteeinheiten, wie z.B. Windfahnen (Burkhard, Zyklon-Sammler, May-Impinger, MWAC, BSNE), auf Grund deren Trägheit aufweisen. Insbesondere bei Schwachwindlagen und Turbulenzen können diese systematische Fehlbefunde bewirken.⁶³

Die Sammeleffizienz beim PMF kann als das Produkt aus der Sammeleffizienz des Filterkörpers mal der Wiederfindungsrate nach Probenaufbereitung beschrieben werden:

$$E_{PMF} = E_F \cdot W_P \quad (2.2.12)$$

- wobei: E_{PMF} : Sammeleffizienz des PMF gesamt
 E_F : Sammeleffizienz des Filterkörpers
 W_P : Wiederfindungsrate für Pollen nach Probenaufbereitung

Wenngleich der Filterkörper des PMF nur einen geringen Luftwiderstand aufweist, ist nicht anzunehmen, dass der gesamte Luftstrom ungehindert durch den Filterkörper passiert. Ein geringer Teil wird diesen umströmen. Des Weiteren ist anzunehmen, dass die Pollen nicht zu 100% im Filterkörper zurückgehalten werden.

Für die Abscheidung von Partikeln in Tiefenfiltern, die aus einem Wirrfasergelege dünner Fäden mit hoher Porosität bestehen, wirken verschiedene physikalische Prozesse in komplexer Weise zusammen, so dass bei entsprechendem Aufbau insgesamt der Effekt eines hohen Abscheidegrades für die gewünschten Partikelfractionen bei anhaltend hoher Luftdurchlässigkeit erzielt werden kann. Eine Darlegung der Filtertheorie findet sich bei Brown (1993) und Kowalski et al. (1999). Als maßgebliche Prozesse bei Tiefenfilter sollen hier erwähnt werden:

- Trägheit (insbesondere bei Partikel $> 1 \mu\text{m}$);
- Sedimentation;
- Sperr-Effekt (Partikelgröße $0,3 - 1 \mu\text{m}$);

⁶³ Bei der Burkard-Falle sind z.B. entsprechende Minderbefunde bei Maispollen bekannt, die schwer und träge sind.

- Diffusion (Brown'sche Molekularbewegung bei Partikel $< 0,3 \mu\text{m}$);
- Haftung (an den Fasern über van-der-Waals und Kapillarkräfte).

Beim PMF sind konstruktionsbedingt zusätzlich zu erwähnen:

- Sedimentation im Innenraum und
- Transport mit den Niederschlägen.

Da Pollen sämtlich zur Partikelfraktion größer $1 \mu\text{m}$ gehören, spielen Sperreffekt und Diffusion bei der Pollenabscheidung im PMF eine untergeordnete Rolle. Auf die schwerkraftbedingte Sedimentation wurde bereits im Kapitel zum Sigma-2 eingegangen, so dass hier ergänzend die Trägheit als Wirkungsprinzip bei der Partikelabscheidung im Tiefenfilter erläutert werden soll:

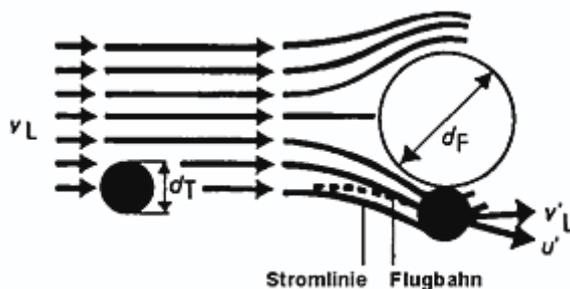


Abb. 2.2.14: Trägheit als Wirkungsprinzip bei Tiefenfilter. (aus: Handbuch der Klimatechnik, C.F. Müller)

Während leichtere Partikel im Luftstrom um die Fasern herumgeführt werden, prallen größere Partikel auf Grund ihrer Trägheit auf die Fasern, werden dadurch gegenüber dem Luftstrom aus der Bahn geworfen und so nach und nach verlangsamt bis sie an den Fasern durch die Haftkräfte hängen bleiben oder, wie im PMF berücksichtigt, nach unten sinken und absedimentieren. Nach Gregory (1973) nimmt die Wirkung der Trägheitsabscheidung an zylindrischen Objekten, wie sie eine Faser im Querschnitt darstellt, mit Annäherung der Faserdicke an die Partikelgröße zu.

Die Filtereffizienz eines Filterkörpers wird nach DIN EN 779 wie folgt aus dem Verhältnis der Luftkonzentration vor und nach Passieren des Filterkörpers definiert:

$$E_{F_i} = 1 - \frac{C_R}{C_0} \quad \text{in } [\%] \quad (2.2.13)$$

wobei: E_{F_i} : Filtereffizienz für Partikelfraktion i

C_0 : Ausgangskonzentration im Luftstrom vor dem Filter

C_R : Restkonzentration im Abluftstrom nach Passieren des Filters

Für die verwendeten Filterpads mit progressivem Schichtaufbau sind die entsprechenden Kenngrößen bei vertikaler Durchströmung zum Luftwiderstand als Abscheidegrad in Abhängigkeit von der Partikelfraktion sowie als Staubspeicherkapazität gemäß DIN EN 1822-1 bekannt. Für den aus den einzelnen Filterpads übereinandergeschichteten Mantelkörper des PMF ist dies nicht exakt der Fall, jedoch gilt ein diskontinuierlicher, sägezahnartiger Verlauf in vertikaler Schnittrichtung, der aerodynamisch begünstigend zum Abbau eines Staudruckes wirkt. In horizontaler Querrichtung nimmt der Luftwiderstand mit Annäherung an den Filterkörperperrand ab, wo nur noch einzelne Fasern entgegenstehen. In waagerechter Richtung von außen zur Filterachse im Zentrum herrscht eine gleichmäßige Faserdichte vor bis zum Erreichen des innenliegenden, windberuhigten freien Sedimentationsraumes.

2.3 Biologische Pollensammlerin Honigbiene

Die Arbeiten, die im Zusammenhang mit dem Einsatz der biologischen Pollensammlerin Honigbiene (*Apis mellifera*) anfielen, wurden verantwortlich von U. Schlechtriemen, **TIEM** Integrierte Umweltüberwachung GbR, mit fachlicher Unterstützung durch das Niedersächsische Landesinstitut für Bienenkunde in Celle⁶⁴ durchgeführt.



Abb. 2.3.1: Die Pollensammlerin Honigbiene (Apis mellifera) an einer Rapsblüte im Feld Sickinge (Bild: von der Ohe)

2.3.1 Grundlagen

Ausgehend von der Überlegung, ein schnell und weitgehend flächendeckend einsetzbares Instrument zum biologischen GVO-Monitoring mittels Honigbiene zu erhalten, galt es, vorhandene Imkerstrukturen zu ermitteln und diese zur Mitarbeit zu gewinnen. Die bestehenden Verbände und Beratungsringe verhielten sich kooperativ. Das Thema GVO nimmt für das imkerliche Produkt Honig eine große Bedeutung ein. So war Interesse vorhanden und, letztlich entscheidend, die Kooperationsbereitschaft gut.

⁶⁴ Dr. von der Ohe und MitarbeiterInnen

2.3.2 Lebensraum und Sammelverhalten der Biene

Honigbienen können nur als ganzes Volk überleben, d.h. es ist ganzjährig für eine geschützte Behausung mit einem Volumen von ca. 60 – 80 l zu sorgen. In Abb. 2.3.2 ist eine transportable „Beute“ zu sehen, Abb. 2.3.3 zeigt ein Bienenvolk bei der Arbeit. Neben einer geeigneten Unterbringung ist auch das nach Art und Umfang nachhaltige Nahrungsangebot (Tracht) für das Überleben wichtig. Die eingebrachten Substanzen wechseln im Laufe des Jahres: zuckerreiche Säfte in Form von Nektaren und/oder Honigtau werden als Energiespender benötigt und auf Vorrat in größerer Menge in die Wabenkörper eingelagert (s. Abb. 2.3.5).



Abb. 2.3.2: Bienenstock (Beute). Transportable Kunststoffbox mit einem Bienenvolk Besatz des Nieders. Landesinstitutes für Bienenkunde in Celle.

In den Nektartröpfchen, die sich am Grunde der Blütenkelche sammeln, befinden sich von Natur aus die pflanzeigenen Pollenanteile, die auch durch die Bienenaktivitäten beim Nektarsammeln frei werden. Zusätzlich streifen die Pollensammlerinnen innerhalb des Bienenvolkes aktiv Pollenanteile von den Staubgefäßen ab und transportieren diese in den so genannten Höschen am Bein (Abb. 2.3.4). Neben den blütenbürtigen Pollen

können sich in einem gewissen Umfang auch windgetragene Fremdpollen im Blütenkörper sammeln. Weiterhin wechseln Nektar- und Pollenangebot im Laufe der Jahreszeiten. Somit werden durch die Sammeltätigkeit der Biene eine Vielzahl von Nektaren und Pollen eingetragen.

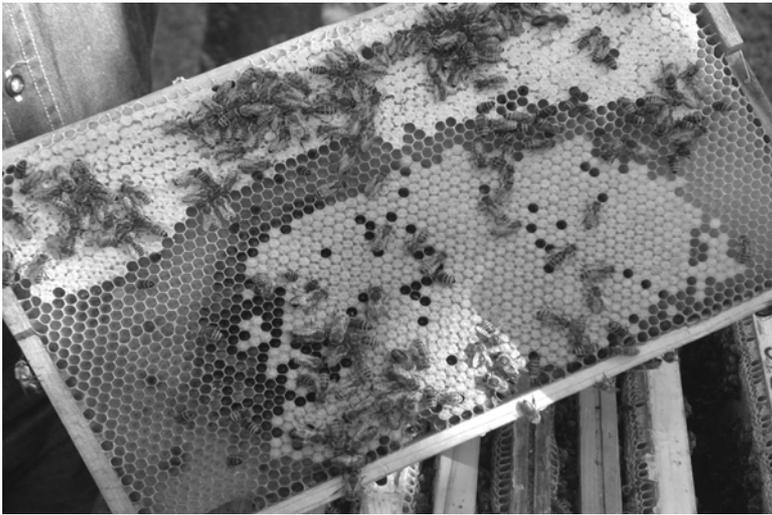


Abb. 2.3.3: Bienenwabe im Holzrahmen mit Honig (oberer Bereich), Brut (unterer Bereich) und Arbeiterinnen. Ein Teil der Wabenzellen ist bereits verdeckelt.



Abb. 2.3.4: Die Biene als Pollensammlerin mit Pollenhöschen.

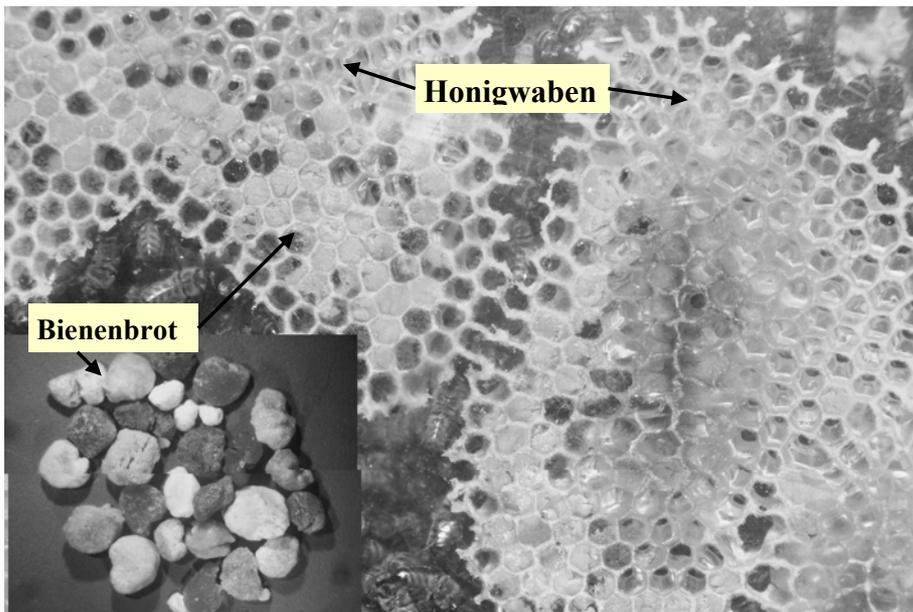


Abb. 2.3.5: Matrix Honig und Bienenbrot.

Für die Brutaufzucht ist die Versorgung mit Mischpollen aus verschiedenen Pflanzenarten notwendig. Dieser wird getrennt als Eiweiß-, Fett- und Mineralstoffspender in Form von so genanntem „Bienenbrot“ ebenfalls im Wabenkörper eingebaut (s. Abb. 2.3.5). Für den Bestand eines normalen Bienenvolkes werden mindestens 150 kg Nektar und Honigtau sowie ca. 30 – 60 kg Pollen im Jahr benötigt, wobei der Nahrungsbedarf je nach Volksstärke und Brutaktivität im Lauf des Jahres schwankt. Als Raumbedarf in einem durchschnittlich ergiebigen Gebiet wird eine Fläche von ca. 0,3 ha/Volk angenommen, um bei *einer* Honigernte ganzjährig versorgt zu sein. Die Honigentstehung ist zusammenfassend in Abb. 2.3.6 schematisiert dargestellt.

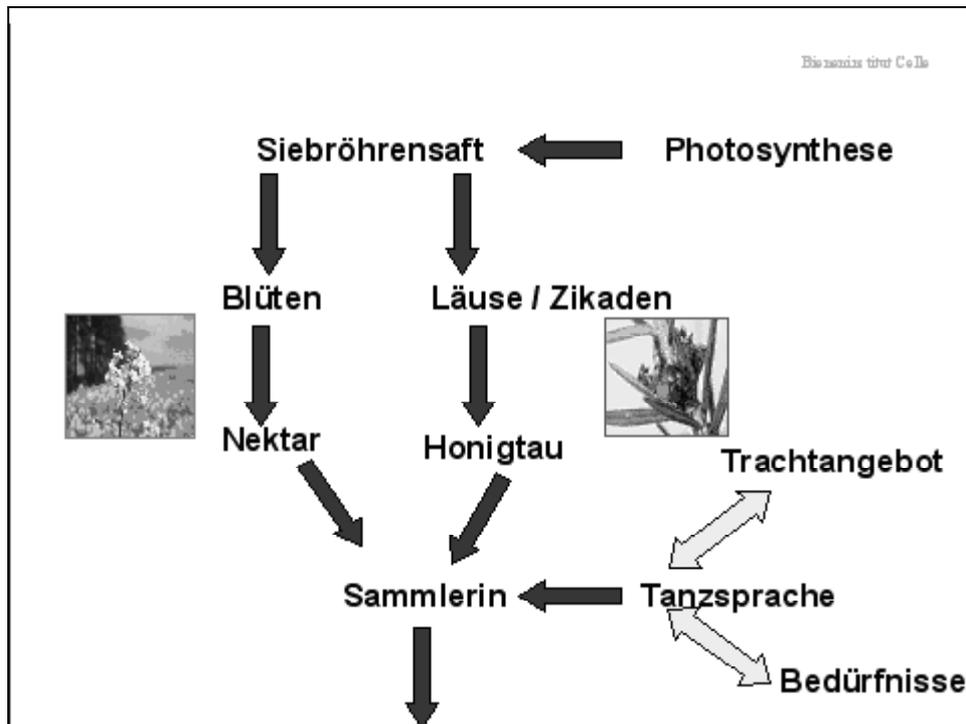


Abb. 2.3.6: Die Honigentstehung

Die Jahreszeit und besonders die Lufttemperatur bestimmen die Flugaktivität der Sammlerinnen. Unter günstigen Bedingungen können Nektarsammlerinnen bis zu 5 km weit fliegen; die „wirtschaftliche“ Entfernung liegt aber zwischen 1,5 und 2,5 km. Pollensammlerinnen überbrücken dagegen auch Distanzen von 6 – 7 km, um an geeignete Trachtquellen zu gelangen. Die Ausführungen stützen sich auf Seeley (1985), Winston (1987), Zander & Weiss (1964). Abb. 2.3.7 illustriert die Flugdistanzen und Sammelbereiche der Honigbiene projiziert auf das Untersuchungsgebiet in Sickinge.



Abb. 2.3.7: Flugdistanzen und Sammelbereiche der Honigbiene, projiziert auf das Untersuchungsgebiet mit dem Rapsfeld Sickinge als Zentrum.

2.3.3 Standorte, Flugzeiten, Versuchslauf

Insgesamt standen für die Untersuchungs- und Referenzflächen Völker von 20 Imkern sowie des Niedersächsischen Landesinstitutes für Bienenkunde zur Verfügung. Bei den Imkern handelte es sich überwiegend um Freizeitimker. Zwei Imker waren als Nebenerwerbsimker tätig, ein Berufsimker belegte als Wanderimker im Raum Sickinge drei Standorte.

Für den Frühjahrsversuch Raps in Sickinge (23 Bienenstöcke) und die Referenzräume Kelheim und Bayerischer Wald (8 Standorte) kamen zusammen 31 Bienenvölker, bzw. Volksgemeinschaften zum Einsatz; am Standort B 13 in Sickinge erfolgte dabei eine Parallelbeprobung.

Die Sommersversuche zum Mais und zur Zuckerrübe wurden in Sickte mit 10, Aachen mit 5 und Schwarzenau mit 7, also nochmals mit 22 Bieneneinsätzen begleitet. Insgesamt sind somit 53 Standorte mit Bienenvölkern bestückt worden. In Schwarzenau erfolgte an den Standorten 90 und 92 ebenfalls eine Parallelbeprobung. Eine detaillierte Standortdokumentation mit Beschreibung der Verhältnisse ist im Anhang aufgeführt.

Beim Aufstellen der Bienenvölker wurde darauf geachtet, dass ein gewisser Schutz durch Umgebungsstrukturen (Sträucher, Hecken o.ä.) vorhanden war. Dabei spielte sowohl der kleinklimatische begünstigende, als auch der optisch abschirmende Aspekt eine Rolle, sowie die Einhaltung der entsprechenden Vorschriften für Wanderimker aus der *Bienenseuchen-Verordnung*.

Grundlage für die Auswahl der Standorte im Bereich Sickte waren die Ausbreitungsrechnungen und die Gebietsverhältnisse (s. Kap. 2.6). In Zusammenarbeit mit dem Nds. Landesinstitut für Bienenkunde, dem Imkerverein der Region⁶⁵ sowie der BBA⁶⁶ wurde nach geeigneten Aufstellungsorten gesucht und diese nach Ortsbesichtigung festgelegt. Hierbei wurden zunächst ortsansässige Standortimker berücksichtigt und für die verbliebenen Bereiche kamen Wanderimker und institutseigene Völker zum Einsatz.

Bei den Standortimkern bestanden überwiegend feste Einheiten in Form von Bienenhäusern oder feststehenden Kunststoff(Styropor)boxen (Beuten) mit Volksstärken von 4-25, im Mittel 7. Dies entspricht imkerlicher Praxis und gewährleistet einen nachhaltigen Honigertrag. Die Völker des Niedersächsischen Landesinstitutes wurden als Einzelbeuten aufgestellt. Die Anlieferung und das Aufstellen erfolgten zu einer frühen Morgenstunde, um eine möglichst hohe Ruhe im Bienenvolk zu gewährleisten.

Während die Bienenvölker der Standortimker ihre Flugaktivitäten den meteorologischen Bedingungen anpassen (mindestens + 8° C und Sonnenschein) und damit regional zu

⁶⁵ Herr Koch

⁶⁶ Dr. Brasse und Mitarbeiter des Versuchsgutes der BBA

unterschiedlichen Zeiten mit ihren Sammelflügen beginnen, orientieren sich die Wanderimker an dem Zustand und der Entwicklung des vorhandenen und/oder zu erwartenden Trachtangebotes.

Das Frühjahr 2001 war in der gesamten Bundesrepublik sehr kühl und für die allgemeine Bienenaktivität eher nachteilig. Mit Beginn der Rapsblüte erfolgte in Sickingen das Aufstellen der Wandervölker zum 28.04.2001. Die Völker des Landesinstitutes konnten erst mit Einsetzen der vollen Rapsblüte am 04.05.2001 aufgestellt werden, da diese z.T. direkt in der Nähe der Freisetzungsfäche angesiedelt waren und eine sofortige Ernährungssicherheit gewährleistet sein musste.

Die Standorte im Referenzraum Kelheim wurden in Abstimmung mit dem Vorhaben Bayern I (Dr. Theenhaus, LfU) gewählt und mit Unterstützung der Bayerischen Landesanstalt für Bienenzucht in Erlangen⁶⁷ sowie den vor Ort tätigen Imkern durchgeführt. Hierbei waren 6 Standortimker und ein Wanderimker beteiligt. In Zusammenarbeit mit der Nationalparkverwaltung Bayerischer Wald wurde ein Standortimker, der in der Nähe des Forschungsstandortes Forellenbach zum Integrierten Monitoring tätig ist, ausgewählt.⁶⁸ Im Raum Kelheim und im bayerischen Wald setzten maßgebliche Flugaktivitäten der Bienen gleichfalls witterungsbedingt verzögert erst spät im April mit Beginn der Haupt-Rapsblüte ein. Anzumerken ist, dass im südlichen Kelheimer Raum Raps und Rübsen unter Hopfen angebaut wird. Durch frühere Aussaattermine begann dort die Blüte bereits Anfang April, ca. 3-4 Wochen vor den anderen Beständen.

Trotz der widrigen Witterungsbedingungen zu Beginn des Rapsversuches waren keine bestandsgefährdenden Entwicklungen auszumachen. Es zeigte sich aber, dass eine kontinuierliche Beobachtung durch die Beteiligten notwendig war. Je nach Stärke und Vorkommen des Trachtangebotes wurden 1 oder 2 Honigräume bei den frei aufgestellten Beuten aufgesetzt, um den Eintrag von reinem Nektar und die

⁶⁷ Dr. Mautz und Herr Härtl als zuständiger Fachberater

⁶⁸ Dr. Beudert, Herr Höcker

Entwicklung von brutfreiem Honig zu gewährleisten. Während der ersten Versuchsperiode fiel ein Standort (21) in Sickinge durch Diebstahl der Völker aus. Dieser Verlust konnte durch Substituierung mit dem Standort B 21a aufgefangen werden.

Zum Ende des Raps-Versuchszeitraumes wurden die mobilen Institutsvölker im Raum Sickinge am 28.5.01 wieder eingesammelt. Zum 30./31.05.2002 erfolgte hier die Ausschleuderung des Honigs. Somit konnten „volkreine“ Honige gewonnen werden, wohingegen die Honige der beteiligten Imker nach imkerlicher Praxis als Mischhonige der jeweils vorhandenen Völker erzeugt wurden. Die Honigernte der Imker lief im Jahr 2001 über einen Zeitraum von Ende Mai bis Anfang Juni.

Im Referenzraum Kelheim lieferten die Imker in Absprache mit der LfU und der Außenstelle des bayerischen Bieneninstitutes die Honigproben mit Ende der Rapsblüte Anfang Juni an die Imkerstation des Klosters Weltenburg. Hier wurden die örtlichen Honige gesammelt und versandfertig gemacht.

Zwischen dem 20.07.2001 und 16.08.2002 erfolgte das erneute Aufstellen von 10 Institutsvölkern zur Begleitung des Mais- Freisetzungsversuches in Sickinge. Zusätzlich wurden noch ein Standortimker und ein Wanderimker beteiligt. In dieser zweiten Periode war durch Verschluss des Flugloches das Volk am Standort B79 in Sickinge abgestorben, so dass hier keine aussagefähige Honigernte erfolgen konnte.

Die Honigernte der Imker erfolgte zum Ende der Maisblüte Anfang bis Mitte August. Zusätzlich wurde von allen Völkern Wabenmaterial für die Gewinnung des Bienenbrottes sichergestellt.

Für den Rüben/Mais-Versuch in Aachen wurden durch den langjährig tätigen Imker⁶⁹ vier Völker vom dortigen festen Bienenstandort (64) auf dem Gutsgelände Melaten in eine andere Region transportiert (umgewandert), um die heimische Standortprägung aufzuheben. Nach ca. 2 Wochen erfolgte die Rückführung und Platzierung im Umfeld der Freisetzungsfelder, so dass vom 20.06.2001 bis 09.08.2001 eine Sammeltätigkeit

⁶⁹ Herr Vossen

der Bienen gewährleistet war. Das Volk 62 hatte dabei die Umgewöhnung nicht angenommen und nahm wieder den alten Standort an. In Aachen wurden die Honigproben zeitgleich mit dem Abbau der technischen Sammler zum 09.08.01 gesondert gezogen.

Bis auf den Verlust eines Volkes wurden in keinem der verbliebenen 52 Völker Ausfälle durch Krankheiten oder Parasiten festgestellt.

2.3.4 Probengewinnung

Die Probengewinnung von Honig erfolgt auf standardisierte Weise über die „Gute Imkerliche Praxis“, deren Schritte in Abb. 2.3.8 dargelegt sind.

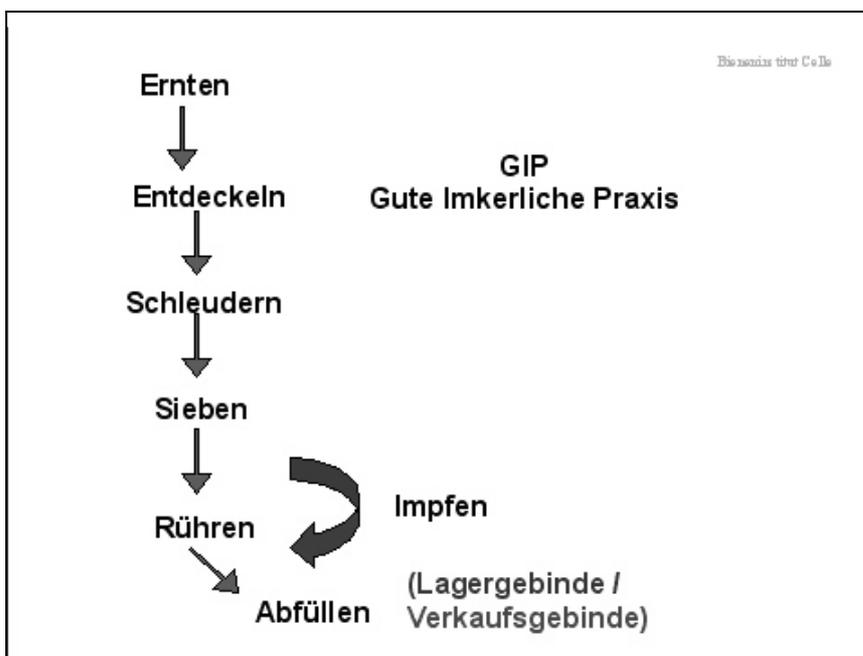


Abb. 2.3.8: Standardisierte Probengewinnung von Bienenhonig nach Guter Imkerlicher Praxis

Als Probenmenge wurden von jeder Ernte zwei 500g-Gläser der ausgeschleuderten Honige abgezweigt. Von allen Proben gingen je ein Glas zur Pollenidentifikation und -auszählung an das Nds. Landesinstitut für Bienenkunde (Kap. 2.3.5), das andere wurde für die molekularbiologische PCR-Analyse tiefgefroren eingelagert und an die

GeneScan Analytics GmbH übergeben. Für die PCR-Analysen siehe Kap. 2.4. Im bayerischen Referenzraum Kehlheim wurde zusätzlich 1 Glas für die PCR-Analysen im bayerischen Modellprojekt an der LfU in Augsburg⁷⁰ verwendet.

Mit Abschluss der sommerlichen Sammelperiode wurden zusätzlich zum Honig auch Teile des Wabenkörpers gesammelt, in denen das sog „Bienenbrot“ eingelagert war. Für die anstehenden Untersuchungen wurden Wabenteile von ca. 20 cm² ausgeschnitten und tiefgefroren.

2.3.5 Melissopalynologische Untersuchung

Pollenanalysen im Honig haben eine lange Tradition und beschreiben eine eigene Wissenschaftsdiziplin, die Melissopalynologie. Die Pollenanalysen in diesem Vorhaben wurden im Nds. Landesinstitut für Bienenkunde in Celle durchgeführt. Alle gesammelten Honig- und Wabenproben wurden in tiefgefrorenem Zustand (-20°C) bis zur Untersuchung aufbewahrt.

Die mikroskopische Pollenanalyse erfolgte auf Grundlage der nach DIN 10760 bestehenden Vorschrift zur qualitativen Bestimmung und Klassifikation von Pollen im Honig⁷¹. Die botanischen Pflanzennamen und Systematik beruhen auf dem Standardwerk von Zander (1993)⁷². Zur besseren Vergleichbarkeit sind ergänzend die Pflanzenfamilie sowie der nach Einschätzung am weitesten verbreitete Vulgärnamen angeführt. Die Zuordnung wurde anhand von Referenzpräparaten der Celler Melissopalynologischen Sammlung (v. d. Ohe & v. d. Ohe 2000) vorgenommen.

Zusätzlich erfolgte eine quantitative Bestimmung der Pollen für die im GVO-Monitoring als prioritär eingestuften Pflanzen Raps, Mais und Zuckerrübe sowie die Bestimmung der Pollengesamtzahl.

⁷⁰ siehe Projektzwischenbericht des Vorhabens Bayern I (Dr. Theenhaus)

⁷¹ Louveau et al. (1978), Behm et al. (1996), v. d. Ohe & v. d. Ohe (1998 und 2000)

⁷² gilt für die Pollenanalysen in allen Matrices der biologischen und technischem Sammler

Die Analyse von Referenzproben ergab, dass Pollen von Raps (*Brassica napus*) grundsätzlich schwer respektive nicht von anderen Arten der Gattung *Brassica*, hier besonders Rübsen (*B. rapa*) mikroskopisch im Routinebetrieb zu unterscheiden sind. Bei Vergleich mit Referenzpräparaten wäre eine Differenzierung und exakte Ansprache denkbar. Andere Gattungen innerhalb der Brassicaceae, wie z.B. Sinapis (Senf), Cardamine (Schaumkraut), Rorippa (Sumpfkresse) und andere sind dagegen sowohl von der Gattung *Brassica* als auch untereinander deutlich abzugrenzen und zu differenzieren.



Abb. 2.3.9: Melissopalynologie. Arbeitsplatz mit Mikroskop und digitaler Bildbearbeitung im Nds. Landesinstitut für Bienenkunde, Celle.

2.3.5.1 Bestimmung der Pollenarten im Honig und der relativen Häufigkeit einzelner Arten

Die Norm des Deutschen Instituts für Normung (DIN 10760) dient der Bestimmung der Pollenarten und der relativen Häufigkeit einzelner Pollenarten in Bezug auf die Pollengesamtzahl.

Dazu wird von den im Honig suspendierten Pollenkörnern ein mikroskopisches Präparat angefertigt. Die Pollen werden identifiziert und der prozentuale Anteil einzelner beteiligter Pollenarten an der Gesamtheit der ausgezählten Pollen berechnet.

Die Probenvorbereitung und Präparation wurde wie folgt durchgeführt:

Nach Homogenisierung (Rühren) und Reinigung der Honigprobe von groben Verunreinigungen werden 10 g Honig in 20 ml Aqua dest. gelöst und 10 min bei 1000 g zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird abgegossen und erneut 20 ml Aqua dest. hinzugefügt. Anschließend wird 5 min bei 1000 g zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird dekantiert, wobei das Zentrifugenglas (Nennvolumen mind. 40 ml, spitz zulaufend) fortwährend schräg nach unten gehalten wird, um möglichst viel der verbleibenden Flüssigkeit auf ein saugendes Papier ablaufen zu lassen. Das Sediment wird umgerührt und mittels einer Pasteur-Pipette (Nennvolumen 1 ml) auf einen Objektträger mit einer Fläche von 22 x 22 mm ausgestrichen und auf einer Wärmeplatte (max. 40°C) getrocknet. Anschließend wird der Ausstrich mit einem Deckgläschen abgedeckt, das mit bei max. 40°C verflüssigter Kaiser's Glyceringelatine (Merck) kreuzförmig versehen ist. Durch dieses Vorgehen wird eine optimale Verteilung der Gelatine und ein perfektes Quellen der Pollen erreicht.

Das Auszählen der Pollen geschieht folgendermaßen:

Die mikroskopische Vergrößerung ist so zu wählen, dass die Anzahl der Pollenkörner im Blickfeld überschaubar ist. Für die anstehenden Untersuchungen hat sich eine 400-fache Vergrößerung (Mikroskop Provis, Olympus) als geeignet erwiesen. Es werden mindestens 500 Pollen in 100er Schritten kumulativ gezählt. Dabei werden in fünf gleichmäßig über das Präparat verteilten Reihen je 100 Pollenkörner mittels Pollenzählgerät gezählt.

Die hierbei identifizierten Pollenarten werden vermerkt, die Pollenanzahlen der gesuchten Arten ausgezählt.

Die relative Pollenhäufigkeit der gesuchten Pflanzenart (X_p) in Prozent wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$X_P = \frac{n_P \cdot 100}{n_{gesamt}} \quad \text{in } [\%] \quad (2.3.1)$$

wobei: X_p relative Pollenhäufigkeit der gesuchten Pflanzenart in Prozent
 n_p Anzahl der Pollen der gesuchten Pflanzenart
 n_{gesamt} Gesamtzahl der ausgezählten Pollenkörner

2.3.5.2 Bestimmung der absoluten Pollenanzahlen im Honig

Die Bestimmung der absoluten Pollenanzahlen im Honig für Raps, Mais, Zuckerrübe sowie der Pollengesamtzahl erfolgte auf der Basis der Präparationsschritte nach DIN 10760 (2.3.5.1). Das Verfahren wurde für die Quantifizierung im Landesinstitut für Bienenkunde wie folgt modifiziert⁷³:

5 g Honig werden in 10 ml Aqua. dest. gelöst und bei 1000 g zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird dekantiert, Restflüssigkeit auf saugfähigem Papier abgesogen. Das Sediment wird mit 0,5 ml Aqua. dest. aufgefüllt und homogenisiert. 0,1 ml Suspension werden auf einer Fläche von 22 x 22 mm auf einem Objektträger ausgestrichen. Nach Trocknung (ca. 1 h) Einbettung in Kaiser's Glycerin-Gelatine (Merck) und Abdecken mit Deckglas (Größe 22 x 22 mm).

Die Auszählung erfolgt unter 400-facher Vergrößerung (Mikroskop Provis, Olympus) dann derart, dass die jeweiligen Pollenarten in der 5., 10., 15., 20., 25. und 30. Reihe des Deckgläschens komplett ermittelt werden und daraus die Pollenanzahl in der Probe entsprechend hochgerechnet wird.

⁷³ K. von der Ohe

$$N_p = \frac{m_p \cdot R_{gesamt}}{R_{zähl}} \quad \text{in} \quad \left[\frac{n \text{ Pollen}}{g \text{ Honig}} \right] \quad (2.3.2)$$

wobei: N_p Pollenanzahl der gesuchten Pflanzenart pro g Honig
 m_p ermittelte Anzahl der Pollen
 $R_{zähl}$ Anzahl der ausgezählten Reihen
 R_{gesamt} Gesamtzahl der Reihen

2.3.5.3 Bestimmung der absoluten Pollenanzahlen in der Matrix Bienenbrot

Die Bestimmung der Pollenarten und Pollenanzahlen im Bienenbrot erfolgte ebenfalls auf der Grundlage der Methode zur Pollenanalyse nach DIN 10760:

Aus den Wabenstücken (ca. 50 x 50 mm bis maximal 100 x 100 mm) wird der Pollen entnommen und das Gewicht ermittelt. Dann wird die Probe mit gleichen Gewichtsteilen Aqua dest. versetzt und bis zur vollständigen Homogenisierung mittels Magnetrührer gerührt (ca. 2 h). 1 ml Suspension wird mit 5 ml Aqua dest. versetzt und davon 50 µl auf den Objektträger (Größe 22 x 22 mm) ausgestrichen. Nach der Trocknung (ca. 1 h) erfolgt die Einbettung in Kaiser's Glycerin-Gelatine und das Abdecken mit einem Deckglas (Größe 22 x 22 mm).

Die Präparate wurden unter 400-facher Vergrößerung (Mikroskop Provis, Olympus) absolut nach Maispollen durchgesehen. Die so ermittelten Pollenanzahlen beziehen sich auf 50 µl Lsg. = 0,008 g Bienenbrot.

2.4 PCR-Verfahren für molekularbiologische DNA-Nachweise

2.4.1 Ausgangssituation

Den Stand von GVO-Analyseverfahren fassten Bonfini et al. (2001) zusammen. Nach dem Stand der Technik kamen für unser Vorhaben primär PCR-Methoden (polymerase-chain-reaction) in Frage, da nur diese eine ausreichende Sensitivität und Spezifität aufweisen. Mit dem sogenannten PCR-Screening lassen sich nach Hemmer (1997) durch geschickte Kombination weniger Konstrukte die überwiegende Mehrzahl aller derzeitiger GVO nachweisen (siehe Tab. 2.4.1).⁷⁴ Der PCR-Nachweis von GVO in Pollen-DNA wurde in der Literatur mehrfach geführt⁷⁵.

Zum Zeitpunkt des Vorhabensbeginns gab es jedoch noch keine etablierten Routineverfahren, die ein GVO-Screening oder gar quantitative Nachweise erlaubten. In der Arbeit von Petersen et al. (1996) beispielsweise wurde zwar der PCR-Nachweis in einzelnen Pollenkörner von *Beta vulgaris* qualitativ gezeigt, jedoch traf dies nicht für single-copy-Gene der Kern-DNA zu. Es galt ausschließlich für multi-copy-Gene der Chloroplasten-DNA, die in hundert und mehr Kopienanzahl vorlagen. Für die Matrix Pollen in Honig konnte auf ein aktuell publiziertes Verfahren von Waiblinger et al. (1999) zugegriffen werden, die den Nachweis von Rapspollen-DNA mit qualitativer PCR beschrieben.

Für ein Umweltmonitoring von GVO, das länderübergreifend durchzuführen ist, werden ausreichend standardisierte Verfahren gefordert, die laborübergreifend zu reproduzierbaren Ergebnissen führen. Nach Anklam et al. (2002) sind die in Tab. 2.4.2 gezeigten Entwicklungsschritte zu durchlaufen und die in Tab. 2.4.3 aufgelisteten Parameter anzuführen. Für die relativ neue Technik PCR wurden, vor allem durch die

⁷⁴ Zur Problematik von Markern und Entwicklungstendenzen siehe Brinker & Piechulla (1999).

⁷⁵ Hudson et al. (2001); Henry et al. (2002); Gaskell et al. (1996)

Novel Food Verordnung initiiert, entsprechende Arbeiten auf breiter Basis begonnen. Zu Beginn des Vorhabens lagen jedoch nur wenige systematische Ergebnisse vor. Sie konzentrierten sich vor allem auf den Lebens- und Futtermittelbereich⁷⁶.

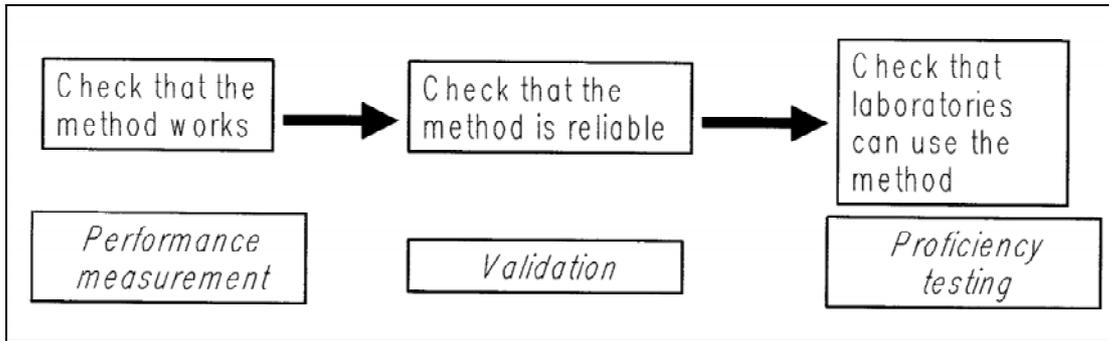
Für den molekularbiologischen Nachweis von GVO in Pollen-DNA waren deshalb für unser Vorhaben noch Entwicklungsarbeiten durchzuführen.

Generic GMO markers	Identifiable Products (total 28)
<i>P-35S*</i>	22
<i>NOS 3'</i>	16
<i>P-35S*, NOS 3'</i>	26 (or 27)
<i>P-35S*, NOS 3', E9 3', als</i>	28
<i>nptII</i>	17
<i>P-35S*, nptII</i>	25
<i>P-35S*, nptII, NOS 3'</i>	26 (or 27)
<i>P-NOS*</i>	7
<i>P-35S*, P-NOS*</i>	25

als = acetolactate synthase gene (sulfonylurea tolerance)
E9 3' = 3' sequence of small subunit of rbcS (ribuose-1,5-bisphosphate carboxylase) E9 gene from pea
NOS = nopaline synthase gene
NOS 3' = nos terminator sequence from *Agrobacterium tumefaciens*
nptII = neomycin-phosphotransferase II
P-35S = cauliflower mosaic virus 35S promoter sequence
*P-35S** = P-35S including derivatives
P-NOS 3' = nos promoter sequence from *Agrobacterium tumefaciens*

Tab. 2.4.1: Screening Strategie nach Hemmer 1997 (aus Bonfini 2001)

⁷⁶ Siehe dazu: Bonfini (2001); Berdal & Jensen (2001); Hübner et al. (2001); Kay & Van der Eede (2001); Hudson et al. (2001); Park et al. (2002); Tao et al. (2001); Weiss und v. Haeseler (1997); Winkler & Schauz (1998)



Tab. 2.4.2: Entwicklungsschritte Richtung Routineverfahren nach Anklam (2002)

Term	Description
Specificity	The probability of obtaining a negative result, given that there is no analyte present
Linearity	Proportionality of the signal to the amount of reference material, demonstrated by the calculation of a regression line with the adequate statistical method.
Range	Range of analyte concentrations over which the method is considered to perform in a linear manner
Accuracy	Comparison with a reference procedure or the recovery by the assay of a known added amount of analyte
Precision	Intra-laboratory variation (repeatability) and inter-laboratory variation (reproducibility). The recommended data include standard deviation, relative standard deviation (coefficient of variation) and confidence interval.
Detection Limit	Limit of Detection (LOD) Minimum level at which the analyte can reliably be detected
Quantitation limit	Limit of Quantitation (LOQ): is determined by analysis of known samples and establishes the minimum level at which the analyte can be quantified.
Robustness	Stability of the method; reliability of the method with respect to deliberate variations in the method parameters.

Tab. 2.4.3: Parameter für Verfahrens-Validierung und Standardisierung
(nach Anklam 2002)

2.4.2 Überblick über die Vorgehensweise

Die Arbeiten zu den PCR-Screeningverfahren wurden von GeneScan Analytics GmbH, vormals Hanse Analytik GmbH, in Bremen durchgeführt.

Zu Beginn des Vorhabens in 2000 wurde, basierend auf den Arbeiten von Waiblinger et al. (1999) und den bei GeneScan vorhandenen Routineverfahren, die Lyse- und Extraktionseffizienz von Pollen-DNA für Raps-, Mais- und Rübenpollen aus Honigproben systematisch geprüft und ein Verfahren entwickelt, das auf der CTAB-Extraktion und gelektrophoretischem PCR-Nachweis beruht. Im Frühjahr 2001 wurden damit Versuche durchgeführt an Raps-Pollenmaterial, das aus einem Gewächshausversuch der BBA stammte und das sowohl in Suspension als auch auf verschiedenen Trägermatrizes für die technischen Sammler (Sigma-2 und PMF) gebracht wurde. Die Versuche verliefen qualitativ mit positivem Ergebnis und ohne feststellbare Inhibitionen. Es folgten dann Versuche über Verdünnungsreihen, die Nachweisgrenzen im Bereich von 50-100 Pollen erwarten ließen.

Daraufhin wurden die ersten Realproben aus den technischen Sammlern (PMF) analysiert, die aus den Freilandversuchen zum Raps im Frühjahr 2001 mittlerweile vorlagen. Hierbei ergab sich, dass bei 39 von 53 Proben ein DNA-Nachweis möglich war. Bei 25 Proben wurden Rapspollen-DNA und bei 14 Proben ein GVO-Eintrag von HR-Rapspollen detektiert. Bei 14 Proben traten Probleme mit PCR-Hemmungen auf, die DNA-Nachweise verhinderten.

Parallel vereinbarten die PCR-Labore des NLÖ Niedersachsen (Dr. Wieland, Dr. Hofmann), des LfU Bayern (Dr. Zeitler) und von GeneScan Analytics GmbH in Bremen (M. Foth, Dr. Kruse,) in Zusammenarbeit mit dem Institut für Statistik, Uni Bremen (W. Wosniok), TIEM Integrierte Umweltüberwachung (U. Schleichriemen) und dem Ökologiebüro (F. Hofmann) einen Ringversuch unter den beteiligten Labors zur systematischen Prüfung und Weiterentwicklung der PCR-Verfahren zur DNA-Analytik aus Pollen durchzuführen.

Im ersten Schritt wurde die Sensitivität des PCR-Verfahrens vergleichend geprüft. Hierzu wurden aus einer DNA-Stammlösung aus HR-Raps-Samen Verdünnungsreihen hergestellt⁷⁷ und in jedem Labor die Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Nachweisgrenze des jeweiligen dort verwendeten PCR-Verfahrens ermittelt. Zum Einsatz kamen dabei zwei qualitative PCR-Verfahrensansätze, die auf der klassischen PCR mit gelelektrophoretischer DNA-Bestimmung basierten (NLÖ, GeneScanAnalytics), sowie eine quantitative real-time PCR (TaqMan, LfU).

In einem zweiten Schritt wurde, zusätzlich zu den DNA-Analysemethoden, die Effizienz der DNA-Extraktion aus Rapspollen miteinbezogen. Hierzu wurden vom Ökologiebüro Verdünnungsreihen in Form von Pollensuspensionen in mehrfacher Wiederholung hergestellt. Der Versuchsdurchgang zeigte jedoch, dass die Aufbereitung und DNA-Analyse von Pollen laborübergreifend zu keinem reproduzierbaren Ergebnis führte.

Das in einem dritten Schritt weiterentwickelte Analyseverfahren der LfU⁷⁸ unter Verwendung eines Qiagen Extraktionskits mit quantitativer real-time PCR [TaqMan]) erbrachte signifikante und aussichtsreiche Resultate. Das Verfahren wurde in einem vierten Durchgang von GeneScan Analytics⁷⁹ bestätigt und systematisch bis in den unteren Dosisbereich zur Bestimmung der Nachweisgrenzen erweitert. Die Ergebnisse des Ringversuches belegten, dass mit dem ausgearbeiteten Verfahren (Qiagen-Kit mit real-time PCR [TaqMan]) ein Nachweis von DNA aus Rapspollen laborübergreifend reproduzierbar und mit signifikanten Ergebnissen möglich ist.

Es wurde dann von GeneScan Analytics eine Übertragung des im Ringversuch etablierten TaqMan-Verfahrens auf Pollen von Mais und Zuckerrübe vorgenommen, mit dem die weiteren Realproben anschließend analysiert wurden.

Parallel erfolgte die Ausarbeitung eines quantitativen Verfahrens für die PCR-Analyse der Pollen-DNA in der Matrix Bienenhonig. Hierbei erwies sich, dass das zunächst

⁷⁷ HR-Winterraps (Aventis), Stammlösung präpariert durch Dr. Wieland/Dr. Hofmann, NLÖ Niedersachsen

⁷⁸ Dr. Zeitler

⁷⁹ M. Foth

angelegte Protokoll nach Waiblinger et al. (1999) zu Problemen bei der Pollen-DNA-Extraktion führte. Das Verfahren wurde daraufhin methodisch weiterentwickelt und nach Erzielung quantitativ reproduzierbarer Ergebnisse im Frühjahr 2002 schließlich auf die Analyse der Honigproben aus den Freilandversuchen in 2001 für Raps, Mais und Zuckerrübe angewandt. Hierbei wurde in allen 41 Honigproben erfolgreich Rapspollen-DNA nachgewiesen, Hemmungen waren nicht mehr zu verzeichnen. Bei 11 von 23 Honigen aus den Raps-Versuchen bei Sickinge wurde das Vorkommen von HR-Rapspollen quantitativ detektiert, in den Sommerhonigen waren keine GVO-Pollen nachweisbar.

2.4.3 Vorversuche

In Vorversuchen erfolgten die Recherche und Prüfung der Spezifität der PCR-Primer für die relevanten Spezies Raps, Mais und Zuckerrübe nach den von den Saatgutproduzenten zur Verfügung gestellten Informationen (Aventis Crop Science für HR-Raps, KWS für VR-Zuckerrübe und Bt- und HR-Mais). Die GVO mit den Konstrukten sind im Kap. 2.7 dokumentiert. Die spezifischen Primer sind in den folgenden Abschnitten für die jeweiligen Verfahren aufgeführt.

Um zu zeigen, dass aus Pollen PCR-taugliche DNA extrahierbar, d.h. ausreichend frei von inhibitorischen Substanzen ist, wurden aus Honig Rapspollen isoliert, daraus die DNA und mit Hilfe Chloroplasten-spezifischer Primer eine PCR durchgeführt. Die erwarteten spezifischen Amplikons konnten dargestellt werden. Dies belegte, dass nicht nur aus Pollen PCR-taugliche DNA isoliert werden kann, sondern dass dies auch in der Matrix Honig möglich ist. Eine Nachweisgrenze konnte aus diesem Versuch nicht abgeleitet werden, da die Kopienzahl der chloroplastidären Zielsequenz in Pollen unbekannt ist (Petersen et al. 1996).

Des Weiteren wurde geprüft, ob die zur Verwendung anstehenden Matrizes der technischen Sammler⁸⁰ frei von inhibitorischen Effekten sind, indem definierte Mengen

⁸⁰ Haftfolie des Sigma-2, Filtervlies und Membranfilter des PMF, wässrige Lösung, Ultraschallbad-Lösung

frischer Rapspollen, die aus einem Gewächshausversuch der BBA stammten, auf die unterschiedlichen Trägermatrizes appliziert und die DNA-analytisch bestimmt wurden. Dazu wurden diese zusammen mit den anhaftenden Pollen lysiert, aus dem Lysat wiederum die DNA isoliert und dann mit Hilfe Raps-spezifischer Primer ein definierter DNA-Teilbereich amplifiziert. Dies gelang bei allen Matrizes.

Um einen Sensitivitäts-Wert der eingesetzten Raps-spezifischen Primer zu bekommen, wurde aus HR-Rapssamen, die von der Firma Aventis Crop Science zur Verfügung gestellt wurden, DNA isoliert und über DNA-Verdünnungsreihen konnten im Mittel 3 Pollen nachgewiesen werden.

2.4.4 DNA-Extraktionsverfahren

Die Pollen-DNA wurde mit verschiedenen Methoden aus den Matrizes (Pollensuspension, Membranfilterproben, Honigproben) extrahiert.

2.4.4.1 CTAB-Methode

Die Probe mit den Pollen (Pollensuspension, Membranfilterproben) in ein 13 ml Sarstedt-Rörchen geben, 2 ml CTAB-Puffer (2 % CTAB, 0,1 M Tris HCL (pH 8,0), 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl und 50 µl Proteinase K (20 mg/ml) hinzugeben und über Nacht bei 60°C lysieren. Für 10 min bei 5000 xg zentrifugieren, je 1 ml Puffer in ein 2 ml Eppendorf-Cup geben, 900 µl Chloroform hinzugeben, 30 sec mischen und für 10 min bei 12000 xg zentrifugieren. Den Überstand in ein neues Eppendorf-Cup überführen, 0,8 Vol. Isopropanol hinzugeben, mischen und für 30 min bei RT inkubieren. Die gefällte DNA 10 min bei 12000 xg zentrifugieren, 2x mit 70% EtOH waschen und jeweils 5 min bei 12000 xg zentrifugieren. Das DNA-Pellet in 60 µl H₂O oder TE-Puffer aufnehmen, bis zur Verwendung bei -20°C lagern. Von dieser Lösung jeweils 5 µl in die PCR einsetzen.

2.4.4.2 Qiagen DNeasy Tissue Kit

2.4.4.2.1 Pollensuspension

Die Probe wurde mit den Pollen in ein 13 ml Sarstedt-Röhrchen gegeben und pro 1 cm² PMF-Filter wurde 1 ml steriles H₂O zugeführt. Die Pollen wurden mindestens für 1 h bei RT unter Schütteln vom Filter gelöst und anschließend für 10 min bei 5000 xg zentrifugiert. Der Filter wurde entfernt und das Pellet in 1 ml H₂O gelöst. Weiter unter 2.4.4.2.4.

2.4.4.2.2 PMF-Proben

Die Probensegmente mit den Pollen wurden in ein 13 ml Sarstedt-Röhrchen gegeben und pro 1 cm² PMF-Filter wurde 1 ml steriles H₂O zugeführt. Die Pollen wurden mindesten für 1 h bei RT unter Schütteln vom Filter gelöst und anschließend für 10 min bei 5000 xg zentrifugiert. Der Filter wurde entfernt und das Pellet in 1 ml H₂O gelöst. Weiter unter 2.4.4.2.4.

2.4.4.2.3 Honigproben

Aus den Honigproben wurden 10 g Honig in ein 50 ml Sarstedt-Röhrchen eingewogen, mit 30 ml sterilem H₂O gemischt und für 1h bei 40°C gelöst. Anschließend wurde für 30 min bei 10.000 xg zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml H₂O gelöst. Weiter unter 2.4.4.2.4.

2.4.4.2.4 Extraktion

Zu den in 1ml gelösten Pellets wurde 1 ml Lösung X1 (20 mM Tris (pH 8,0), 20 mM EDTA, 200 mM NaCl, 4% SDS), 48 µl 1 M DTT und 20 µl Proteinase K (5 mg/ml) hinzugegeben und über Nacht in einem Thermomixer bei 900 UPM und 55°C inkubiert. Anschließend wurde 200 µl Puffer A1 und 200 µl Ethanol hinzugegeben, gemischt und diese Lösung auf ein DNeasy Minisäulchen (Qiagen: DNeasy Tissue Kit 250) gegeben. Dann wurde 1 min bei 6000 xg zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen und 500 µl Puffer AW1 auf die Säule gegeben, wiederum wurde für 1 min bei 6000 xg

zentrifugieren. Der Durchfluss wurde verworfen und auf die Säule 500 µl Puffer AW2 gegeben und für 3 min zum Trocknen der Säule bei mindesten 12000 xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Zum Eluieren der DNA wurde 60 µl H₂O auf die Säule gegeben, 1 min inkubiert und bei 8000 xg zentrifugiert. Bis zum weiteren Gebrauch wurde bei –20°C gelagert. In die PCR wurden 5 µl dieser Lösung eingesetzt.

2.4.5 PCR-Methoden

2.4.5.1 PCR mit Gelelektrophorese

Rapspollen wurden auf das Vorhandensein auf Raps-DNA (Nachweis von Teilbereichen der Phosphoenolpyruvate Carboxylase) nach Hellebrand et al. (1998) sowie mittels einer Screening-Analyse (35S-Promotor und NOS-Terminator (§35 LMBG)) auf das Vorhandensein gentechnisch veränderter Pollen analysiert. Zur Differenzierung positiver Proben wurden diese nach einem positiven Screening-Ergebnis auf das Vorhandensein von SeedLink™-, LibertyLink™- und RoundupReady™-Raps analysiert (Eigenentwicklung GeneScan Analytics GmbH).

Nach der PCR wurden die Amplifikate auf ein 2,5% Agarosegel aufgetragen und für 30 min bei 5V/cm Laufstrecke elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und fotografiert.

Maispollen wurden neben einer Screening-Analyse auf das Vorhandensein von Mais-DNA (Eigenentwicklung GeneScan Analytics GmbH) analysiert.

Bei Zuckerrübenpollen wurde in Ermangelung eines Pflanzenspezies-spezifischen Systems nur auf das Vorhandensein des 35S-Promotors analysiert.

Die Proben wurden routinemäßig gespiked zur Kontrolle von PCR-Hemmung und Nebeneinflüssen, des Weiteren wurden Blindproben mit einbezogen.

Das Verfahren ist in Abschnitt 2.4.6.2.1 beispielhaft näher ausgeführt.

2.4.5.2 Real-time PCR (TaqMan)

Des Weiteren wurde die RealTime-PCR (TaqMan) eingesetzt. Bei diesem Verfahren befindet sich neben den 2 Primern für die PCR ein dritter mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markierten Primer. Dieser Primer bindet während der PCR zwischen den beiden anderen Primern und wird aufgrund der Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase während der PCR hydrolysiert. Hat dieser Primer während der PCR gebunden und wurde hydrolysiert, ist ein Fluoreszenzsignal detektierbar. Liegt er jedoch im nativen Zustand vor, ist kein Fluoreszenzsignal detektierbar. Dabei korreliert die Fluoreszenz-Intensität direkt mit der vorhanden Menge an Ziel-DNA. Als Ergebnis erhält man sog. Ct-Werte (Cycle of Threshold). Der Ct ist der Zyklus in der PCR, bei dem die PCR in die exponentielle Phase übergeht. Durch den Vergleich der Ct-Werte der Proben-DNA mit Standards bekannter DNA-Mengen ist später eine quantitative Aussage möglich.

Die Rapspollen wurden auf das Vorhandensein auf Raps-DNA (Eigenentwicklung GeneScan Analytics GmbH) sowie mittels einer Kombination aus Screening-Analyse (35S-Promotor) und spezifischer Analyse (Nachweis von Teilbereichen von LibertyLink™-Raps) auf das Vorhandensein gentechnisch veränderter Pollen analysiert.

Die Maispollen wurden neben einer Screening-Analyse (35S-Promotor) auf das Vorhandensein von Mais-DNA (Eigenentwicklung GeneScan Analytics GmbH) analysiert.

Bei Zuckerrübenpollen wurde in Ermangelung eines Pflanzenspezies-spezifischen Systems nur auf das Vorhandensein des 35S-Promotors analysiert.

2.4.6 Laborübergreifende Versuche zur Bestimmung von Sensitivität, Nachweisgrenze, Reproduzierbarkeit und Fallzahlen

2.4.6.1 Statistik

2.4.6.1.1 Analyse-Verfahren mit primären ja/nein-Resultaten (qualitative PCR mit Gelelektrophorese)

2.4.6.1.1.1 Bestimmung der Dosis-Wirkungsbeziehung

Die Resultate dieser Verfahren bestehen für jede verwendete DNA-Menge x bei den DNA-Lösungen x aus der Zahl n der Messungen sowie der Zahl r der positiven Nachweise (responses), separat für jedes DNA-Merkmal (z.B: 35S, PAT etc.). Im Falle der Pollenproben ist die DNA-Menge durch die Pollenanzahl x zu ersetzen. Die empirische relative Häufigkeit r/n (r = Anzahl positive Resultate, n = Anzahl Messungen) des Nachweises von GVO-Material wird durch eine logistische Beziehung mit der beteiligten gegebenen DNA-Menge x verknüpft:

$$\frac{r}{n} \approx p(x) = \frac{1}{1 + \exp[-(a + b \cdot \log x)]}$$

Diese Gleichung beschreibt die Beziehung zwischen DNA-Menge Anzahl Pollen x und Wahrscheinlichkeit des Nachweises durch eine Messung. Zur sprachlichen Vereinfachung wird diese Beziehung auch dann als Dosis-Wirkungs-Beziehung bezeichnet, wenn x eine DNA-Menge oder Pollenanzahl ist.

Die Koeffizienten a und b in der obigen logistischen Gleichung werden per Maximum-Likelihood-Schätzung bestimmt, wobei die binomiale Fehler-Struktur der beobachteten Häufigkeiten r berücksichtigt wird. Die Größe des Koeffizienten b entscheidet über den Zusammenhang zwischen Nachweiswahrscheinlichkeit und DNA-Menge: ein Wert von $b = 0$ bedeutet, dass es keinen Zusammenhang zwischen DNA-Menge und

Nachweiswahrscheinlichkeit gibt. Anders ausgedrückt heißt das: das Verfahren ist nicht in der Lage, die DNA-Menge zu erkennen.

Es muss also geprüft werden, ob der aus den Daten geschätzte Wert für b signifikant größer als 0 ist. Dazu werden exakte Tests eingesetzt, da die meistens gebräuchlichen asymptotischen Tests für Datensätze mit den hier verwendeten n -Zahlen und meistens $r = 0$ bzw. $r = n$ nicht angemessen sind.

2.4.6.1.1.2 Fallzahlbestimmung

Auf der Grundlage der zuvor berechneten Dosis-Wirkungs-Beziehungen wird die notwendige Zahl m von Messungen bestimmt, mit der eine vorgegebene DNA-Menge bzw. Anzahl Pollen x mit einer Sicherheit von 80/ 90/ 95/ 99 % nachgewiesen werden kann. Die Sicherheiten 80/ 90/ 95/ 99 % entsprechen den Risiken $\beta = 20/ 10/ 5/ 1$ % von falsch negativen Aussagen, d.h. die vorhandene DNA-Menge bzw. Anzahl Pollen nicht zu erkennen. Die Anzahl nötiger Messungen m ergibt sich unter Verwendung der oben berechneten Beziehung aus:

$$\beta = (1 - p(x))^m$$

entsprechend

$$m = \frac{\log(\beta)}{\log(1 - p(x))}.$$

Die resultierenden Anzahlen m sind für einen Bereich von $1 \leq x \leq 10000$ pg DNA in den Abbildungen für die DNA-Lösungen und entsprechend mit x als Anzahl Pollen für die Pollenmatrizes dargestellt. Die Nachweisgrenzen ergeben sich ebenfalls aus den Abbildungen, in dem für die geplante Anzahl Messungen und das gewählte Sicherheitsniveau die dazugehörige Nachweisgrenze (in DNA-Menge oder Anzahl Pollen) abgelesen wird. Der angegebene Wert wurde rechnerisch ermittelt.

2.4.6.1.2 Quantitative Analyse-Verfahren mit Anzahlen als Resultate (quantitative real-time PCR, TaqMan)

Der Ergebnisse aus der quantitativen PCR wurden über eine lineare Regression von erwarteter Zyklenzahl zur Dosis als Dosis-Wirkungs-Beziehung ausgewertet:

$$c_t = a + b * \lg \text{Dosis}.$$

Die Wahrscheinlichkeit, eine Dosis nicht zu erkennen entspricht der Wahrscheinlichkeit, dass mehr als n Zyklen nötig sind bis die PCR gestoppt wird, wobei n die Anzahl der Zyklen darstellt (in der Regel zwischen 40 und 50). Entsprechend gilt für die Wahrscheinlichkeit:

$$\text{Pr}(\text{erwartete Zyklen} + \text{Zufallsfehler} > 45) = \text{Pr}(t > 45 - (a + b * \lg \text{Dosis})) =: p,$$

wobei ‚Pr‘ für ‚Wahrscheinlichkeit (probability)‘ steht. Hierbei weist p eine t-Verteilung mit n-2 Freiheitsgraden auf. Die Fallzahl m ergibt sich bei $p^m < \beta$ aus:

$$m = (\lg \beta) / (\lg p).$$

In der Anfangsphase des Projekts zeigte sich bei den Vorversuchen zur Bestimmung von Nachweisgrenzen zum Teil ein erheblicher Anteil solcher Messungen, bei denen die verfahrenstechnische Begrenzung bei 45 bzw. 50 Zyklen (Zensierung, censoring) sehr häufig auftrat. Diese Erscheinung führt zu einer verzerrten Schätzung der Regressionsparameter a und b, wenn die begrenzenden Werte wie reguläre Messwerte in das Regressionsverfahren einbezogen werden. Um dieser Situation zu begegnen, wurde ein eigenes Schätzverfahren für eine Regression mit zensierten Werten entwickelt und angewendet, welches unverzerrte Schätzwerte für a und b auch bei Anwesenheit von vielen Werten auf der Abbruchgrenze liefert. Da diese Situation nach Veränderung der Messstrategie nicht mehr auftrat, wird darauf verzichtet, das entwickelte Verfahren hier darzustellen. Es steht jedoch im Prinzip weiterhin für die Auswertung von solchen PCR-Daten zur Verfügung, die einen hohen Anteil (bis 50%) von zensierten Werten aufweisen.

2.4.6.1.3 Standardisierung der Nachweisgrenze für Methodenvergleich

Aus einer Probe an Pflanzen- oder Pollenmaterial, die eine bestimmte Menge DNA enthält, wird diese extrahiert und anschließend in einem verfahrensmäßig einstellbaren Volumen an wässriger Lösung aufgenommen (z.B. 80 µl). Für die PCR-Analyse wird nunmehr eine bestimmte Teilmenge aus der DNA-Probenlösung eingesetzt, das als PCR-Aliquot bezeichnet wird (z.B. 5 µl). Das eingesetzte Aliquot für die PCR enthält so einen entsprechend reduzierten Anteil an der DNA-Probenmenge bzw. Pollenanzahl (im Beispiel 1/16). Das verfahrensspezifisch in bestimmten Grenzen variabel gestaltbare Verhältnis Aliquot zu Probenmenge geht damit unmittelbar in die Bestimmung der Nachweisgrenze ein und ist daher für einen Methodenvergleich zu berücksichtigen.

Für die meisten gängigen PCR-Verfahren muss für jedes nachzuweisende Konstrukt eine gesonderte PCR gefahren werden. Will man also aus einer Probe eine bestimmte Anzahl an Konstrukten nachweisen, ist ein entsprechend ausreichendes Verhältnis von PCR-Aliquot zur DNA-Probenmenge einzuhalten. Das obige Verhältnis 1 zu 16 ließe also maximal die Bestimmung von 16 verschiedenen Konstrukten zu.

Die unterste (absolute) Nachweisgrenze des PCR-Verfahrens wäre dann erreicht, wenn die gesamte DNA-Menge der Probe in das PCR-Aliquot für den Nachweis eines einzelnen Konstruktes in einem Analysegang eingesetzt wird. Dies wird zwar in der Praxis kaum relevant sein, jedoch ergibt dies eine standardisierbare Größe, die das Verfahren kennzeichnet und damit für Vergleiche sinnvoll ist.

Für die Aufgabe des allgemeinen Umweltmonitorings von GVO in der Praxis, das die Kontrolle der Einwirkung von mehreren relevanten Konstrukten ermöglichen soll, ist eine Optimierung im Hinblick auf die Nachweismöglichkeit mehrerer Konstrukte sowie die Möglichkeit, Kontroll- und Mehrfachanalysen durchzuführen gefordert, so dass dementsprechend eine höhere Verdünnung einer Probe anzulegen ist.

Für Vergleichsverfahren wurde daher folgende Standardisierung zu den Nachweisgrenzen der PCR vorgenommen:

1. Als absolute Nachweisgrenze des PCR-Verfahrens gilt die DNA-Menge bzw. Anzahl Pollen im PCR-Aliquot. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die gesamte DNA-Menge aus der Pollenprobe in einem PCR-Aliquot, hier 5 µl, eingesetzt wird. Mindestens ist eine Kopie des Gens erforderlich.
2. Als Standard-Nachweisgrenze in Bezug auf den PCR-Nachweis von bis zu 16 Gen-Konstrukten. Die DNA-Menge der Probe wird in 80 µl Lösung aufgenommen, das Volumen eines einzelnen PCR-Aliquots beträgt 5 µl, so dass die DNA-Menge jeder einzelnen PCR 1/16 der DNA-Menge bzw. Pollenanzahl der Gesamtprobe entspricht.

2.4.6.2 Sensitivität der PCR-Verfahren in DNA-Lösungen

Zunächst wurde die Sensitivität der PCR-Verfahren ohne Extraktion über DNA-Lösungen aus HR-Rapssamenmaterial vergleichend geprüft. Hierzu wurde vom PCR-Labor des Niedersächsischen Landesamt für Ökologie (Dr. Hofmann) aus Samen von HR-Raps (Saatgut von Aventis) in Sickle eine DNA-Stammlösung präpariert und daraus jeweils drei Unterproben an die beteiligten Labore gesendet. Als nachzuweisende Merkmale wurden PEP, 35S und PAT festgelegt.

2.4.6.2.1 Qualitative PCR über Gelelektrophorese

Für die Analyse mittels qualitativer PCR (2.4.5.1) bei der GeneScan Analytics GmbH wurde zunächst die DNA-Konzentration der drei mit R1, R2 und R3 bezeichneten Unterproben der DNA-Lösungen vermessen, die im Mittel 455 ng/µl betrug (445 ng/µl, 482 ng/µl, 438 ng/µl).

Alle Proben wurden mit sterilem Wasser verdünnt und je 5 µl mit den drei folgenden Primer-Systemen PCR-amplifiziert (50 Zyklen):

- PEP (Phosphoenol-Pyruvat-Carboxylase): Raps-Kontroll-Reaktion, d.h. PEP-Primer sollten generell aus Raps-DNA - gentechnisch modifiziert oder unverändert – ein definiertes Amplikon produzieren.

- PAT (Phosphinotricin-Acetyltransferase): Spezifische Nachweisreaktion für bestimmte gentechnisch veränderte Rapsorten.
- 35S (Promotor-Sequenz aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus): Screening-Reaktion, d.h. ein positives PCR-Signal ist ein starkes Indiz für das Vorhandensein einer gentechnischen Modifikation.

Hierbei wurden Verdünnungsreihen für jede der drei Lösungen mit 1 zu 100 / 1.000 / 10.000 / 50.000 / 75.000 / 100.000-fach sowie reine H₂O-Proben und Kontrollen angefertigt.

Die erzeugten PCR-Produkte wurden Agarose-gelelektrophoretisch aufgetrennt und photographisch dokumentiert und wie in Abb. 2.4.1 dargestellt ausgewertet. Der Verfahrensgang ist wie folgt:

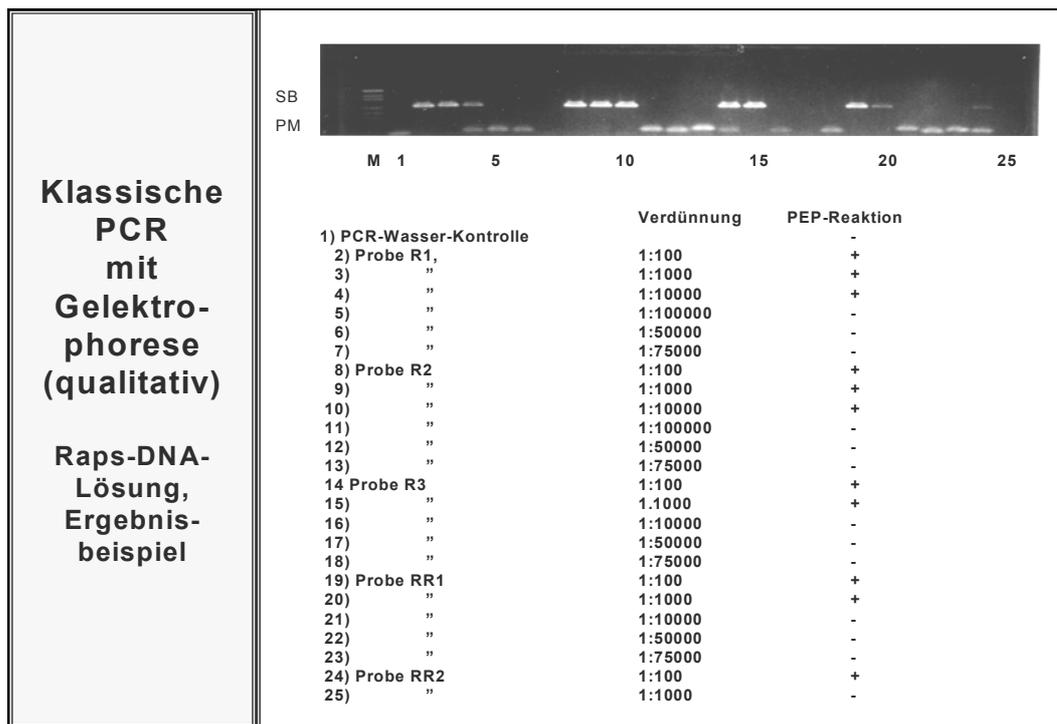


Abb. 2.4.1: Qualitative PCR mit Gelelektrophorese

In der Agarose-Gelelektrophorese wurden 2,5%ige TAE⁸¹-Gele angewandt. Die Laufzeit betrug 30-45 Minuten, die Spannung 10 Volt/cm Gel. Gefärbt wurde nach dem Lauf in einem Ethidiumbromid / Laufpuffer-Bad. Zur Orientierung finden sich in der fotografischen Dokumentation die Abkürzung „SB“, was spezifische Bande bedeutet, also die PCR-Produkte anzeigt. „M“ steht für Marker, ein Gemisch von DNA-Fragmenten definierter Längen. Marker dienen allgemein zur Längenabschätzung von DNA-Fragmenten und als Kontrolle der Elektrophorese-Bedingungen. „PM“ steht für Primer-Multimere. Obwohl laut Theorie gar nicht möglich, sieht man in der Regel nach gelelektrophoretischer Auftrennung von PCR-Produkten eine vorlaufende, meist unscharfe Bande. Diese Bande besteht aus aneinander gelagerten Primern, sogenannte Multimere. Primer werden der PCR-Reaktion im Überschuss zugegeben, so dass nach Ende der Reaktion der Pool an Primern häufig nicht aufgebraucht wurde. Primer-Multimere können manchmal von den zu erwartenden PCR-Produkten – besonders wenn diese sehr kurz sind – nur schwer unterschieden werden. Auch deshalb ist eine Positiv-Kontrolle unbedingt zu empfehlen.

Die Rohwerte der PCR über die Verdünnungsreihen sind in Tab. 2.4.4 aufgeführt.

⁸¹ Tris/Acetate/EDTA, identisch mit dem Elektrophorese-Puffer

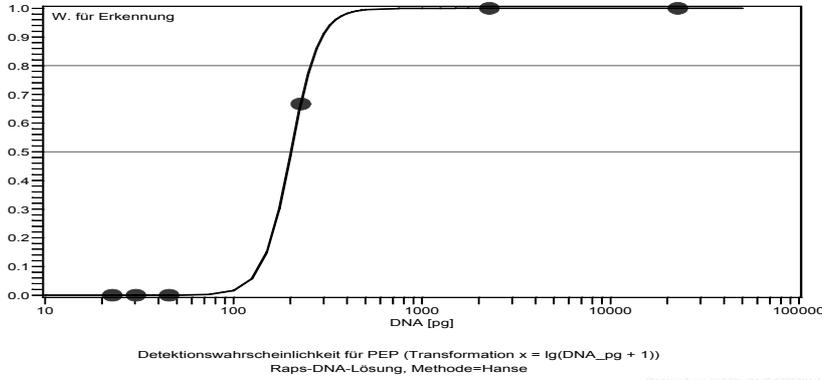
	DNA-Konzentration [pg/μl]	DNA-Menge [pg]	Anzahl DNA-Kopien	PEP	PAT	35S
H ₂ O	0	0	0	-	-	-
R1.1	4.550	22.750	9.285	+	+	+
R2.1	4.550	22.750	9.285	+	+	+
R3.1	4.550	22.750	9.285	+	+	+
R1.2	455	2.275	928	+	+	+
R2.2	455	2.275	928	+	+	+
R3.2	455	2.275	928	+	+	+
R1.3	45,5	227,5	92,8	+	+	+
R2.3	45,5	227,5	92,8	-	+	+
R3.3	45,5	227,5	92,8	+	+	+
R1.4	9,1	45,5	18,5	-	-	-
R2.4	7,6	45,5	18,5	-	-	-
R3.4	7,6	45,5	18,5	-	-	-
R1.5	6,0	30,3	12,3	-	-	-
R2.5	6,0	30,3	12,3	-	-	-
R3.5	6,0	30,3	12,3	-	-	-
R1.6	4,5	22,7	9,2	-	+	-
R2.6	4,5	22,7	9,2	-	+	-
R3.6	4,5	22,7	9,2	-	-	-
+: nachgewiesen						
-: nicht nachgewiesen						
angesetzte Masse für 1 Raps-DNA Kopie, diploid: 2,45 pg						

Tab. 2.4.4: Rohdaten der PCR aus der Verdünnungsreihe der Raps-DNA-Lösungen

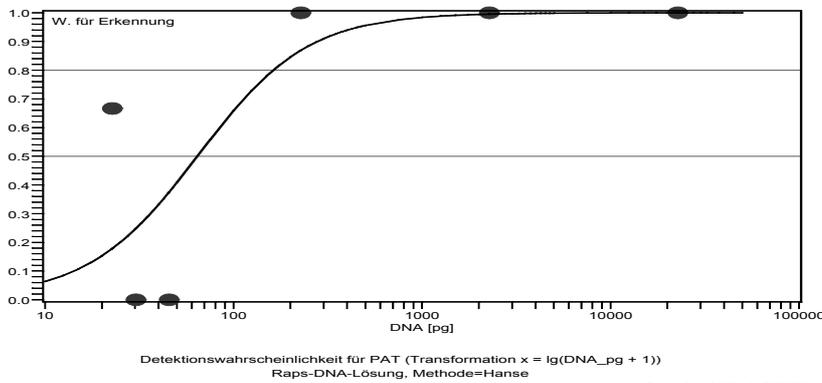
x=DNA_pg, y=pep (PEP), Conditional Exact Tests				
Effect	Test	Statistic	p-Value Exact	Mid
lgDNA_pg	Score	9.6487	0.0009	0.0007
	Probability	0.000466	0.0079	0.0077
x=DNA_pg, y=pat (PAT), Conditional Exact Tests				
Effect	Test	Statistic	p-Value Exact	Mid
lgDNA_pg	Score	7.0921	0.0047	0.0047
	Probability	0.000094	0.0017	0.0016
x=DNA_pg, y=35S (35S), Conditional Exact Tests				
Effect	Test	Statistic	p-Value Exact	Mid
lgDNA_pg	Score	9.1746	0.0004	0.0003
	Probability	0.000200	0.0014	0.0013

Tab. 2.4.5: Logistische Regression für PCR-Daten

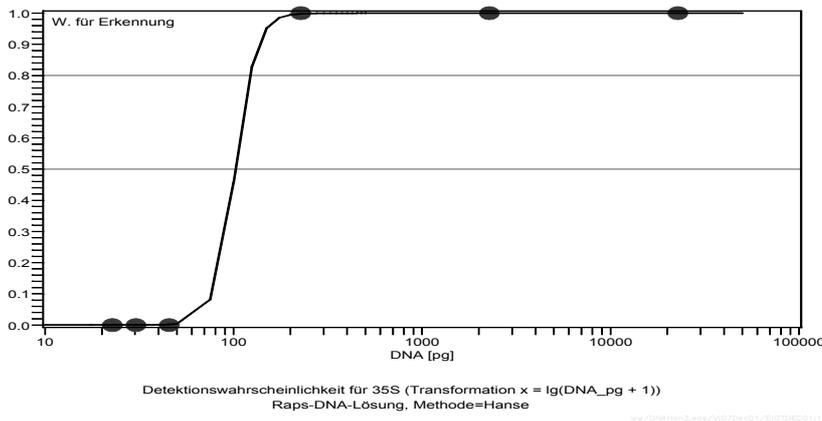
Die Ergebnisse aus den statistischen Testverfahren enthält Tab. 2.4.5. Sie sind grafisch veranschaulicht in den Abb. 2.4.2 a-c.



a)
Wahrscheinlichkeit der Erkennung des **PEP**-Merkmals durch eine Messung, in Abhängigkeit von der DNA-Menge
Verfahren: GeneScan
Signifikanz:
p = 0.0079

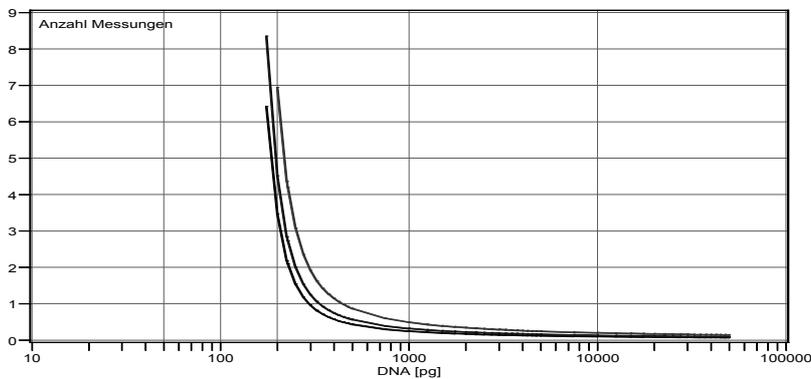


b)
Wahrscheinlichkeit der Erkennung des **PAT**-Merkmals durch eine Messung, in Abhängigkeit von der DNA-Menge
Verfahren: GeneScan
Signifikanz:
p = 0.0017

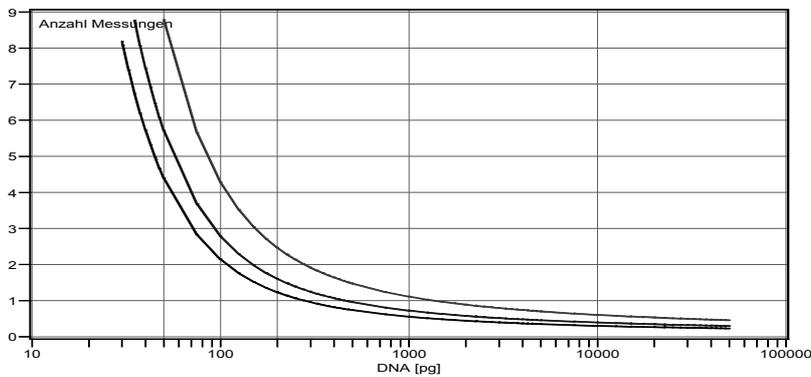


c)
Wahrscheinlichkeit der Erkennung des **35S**-Merkmals durch eine Messung, in Abhängigkeit von der DNA-Menge
Verfahren: GeneScan
Signifikanz:
p = 0.0014

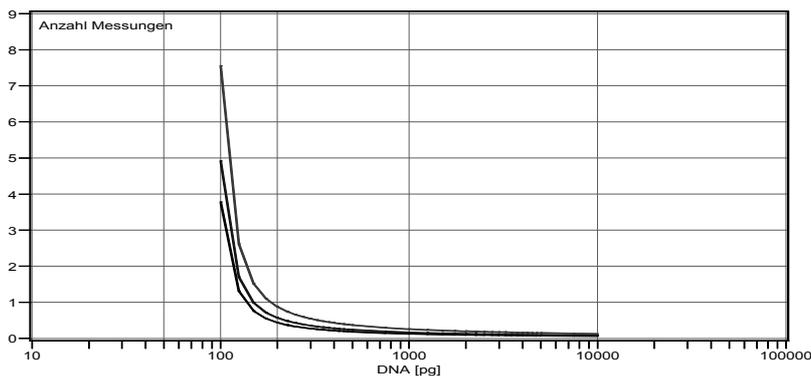
Abb. 2.4.2: Wahrscheinlichkeit der Erkennung der Merkmale aus der qualitativen PCR für DNA-Lösungen



Anzahl Messungen für P(falsch negativ) < 10%, 5%, 1%
PEP in Raps-DNA-Lösung, Methode=Hanse (Transformation $x = \lg(\text{DNA_pg} + 1)$)



Anzahl Messungen für P(falsch negativ) < 10%, 5%, 1%
PAT in Raps-DNA-Lösung, Methode=Hanse (Transformation $x = \lg(\text{DNA_pg} + 1)$)



Anzahl Messungen für P(falsch negativ) < 10%, 5%, 1%
S35 in Raps-DNA-Lösung, Methode=Hanse (Transformation $x = \lg(\text{DNA_pg} + 1)$)

a) Notwendige Anzahl Messungen, um die Anwesenheit des **PEP**-Merkmals in Raps-DNA-Lösung in der auf der horizontalen Achse angegebenen Menge mit einer Sicherheit von 80% (obere Linie), 90% (mittlere Linie), 95% (untere Linie) nachzuweisen.

b) Notwendige Anzahl Messungen, um die Anwesenheit des **PAT**-Merkmals in Raps-DNA-Lösung in der auf der horizontalen Achse angegebenen Menge mit einer Sicherheit von 80% (obere Linie), 90% (mittlere Linie), 95% (untere Linie) nachzuweisen

c) Notwendige Anzahl Messungen, um die Anwesenheit des **35S**-Merkmals in Raps-DNA-Lösung in der auf der horizontalen Achse angegebenen Menge mit einer Sicherheit von 80% (obere Linie), 90% (mittlere Linie), 95% (untere Linie) nachzuweisen.

Abb. 2.4.3: Erforderliche Fallzahlen zum Nachweise der Merkmale in Raps-DNA-Lösung mit qualitativer PCR

Die statistischen Prüfungen der Nachweisgrenzen und Fallzahlen belegen für den Nachweis der untersuchten Genabschnitte in den Raps-DNA-Lösungen mit dem obigen PCR-Verfahren signifikante Beziehungen. Aus der daraus abgeleiteten Bestimmung der erforderlichen Fallzahlen ergibt sich, dass für sichere Nachweise Mehrfachbestimmungen erforderlich sind. Hierbei ist für das intendierte Monitoring davon auszugehen, dass im Falle positiver oder uneindeutiger Nachweise Nachmessungen vorgesehen sind.

Für sichere Nachweise mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% sind dann mit der qualitativen PCR-Verfahren bei Doppelproben für die Merkmale folgende, in Tab. 2.4.6 dargestellten, Bereiche als Bestimmungsgrenzen anzugeben.

Merkmal	Nachweisgrenzen bei Doppelbestimmung	Raps-DNA-Kopie (diploid)	entspr. Anzahl DNA-Kopien
	pg DNA	pg/Kopie	n
PEP	250	2,45	102
PAT	150	2,45	61
35S	100	2,45	40

Tab. 2.4.6: Nachweisgrenzen der qualitativen PCR für Raps-DNA-Lösungen bei Doppelproben für Monitoring

2.4.6.2.2 *Quantitative real-time PCR (TaqMan)*

Die zur Verfügung gestellten DNA-Lösungen wurden im LfU (Dr. R. Zeitler) mit der RealTime-PCR (TaqMan, ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems) auf folgende Parameter analysiert:

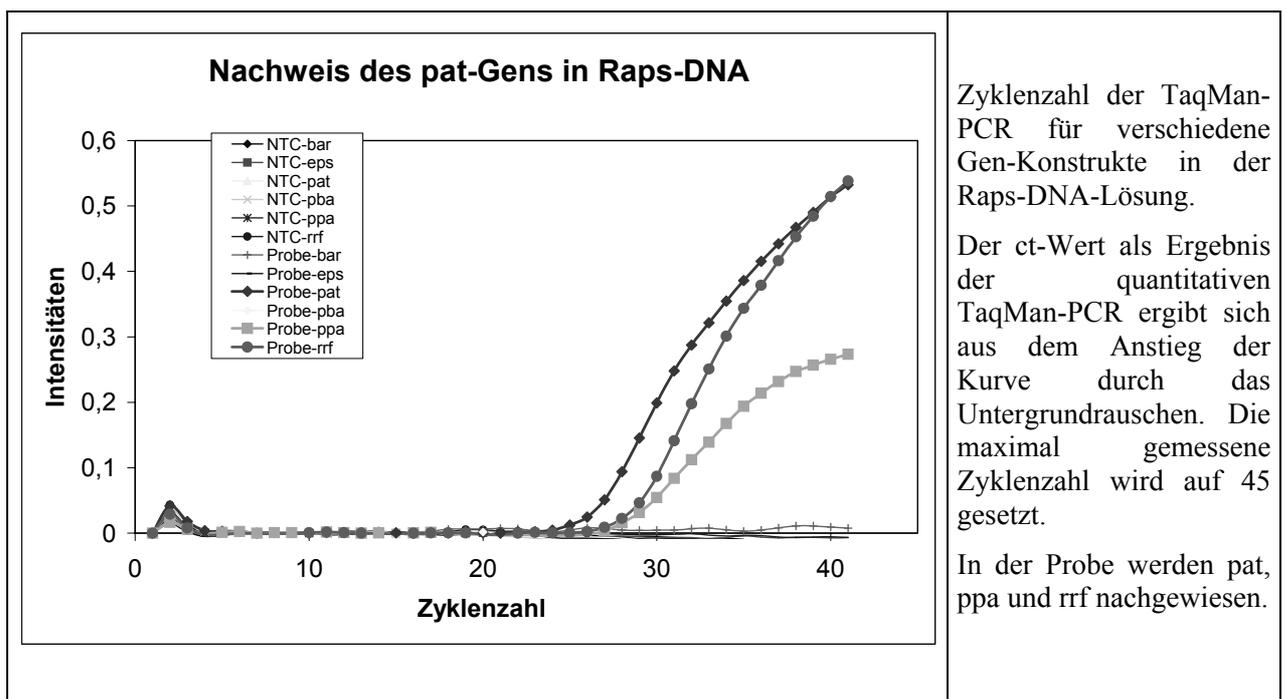
Parameterabkürzung	Beschreibung der Parameter
bar	Nachweis des bar-Gens z.B. aus RF1/MS1
pat	Nachweis des pat-Gens z.B. aus Falcon 6/AC
eps	Nachweis des epsps-Gens z.B. aus GT73
ppa	Nachweis des 35S-Promotor-pat-Genkonstrukts z.B. aus Falcon 6/AC
pba	Nachweis des PssuAra-bar-Genkonstrukts z.B. aus RF1/MS1
rrf	Nachweis des PEPC-Gens aus Raps

Tab. 2.4.7: Untersuchte Parameter in der TaqMan-PCR bei den Raps-DNA-Lösungen

Bei den aufgelisteten Parametern handelt es sich um Nachweise von DNA-Sequenzen, die in transgenen Rapslinien vorkommen können. In Abb. 2.4.4 wird die Entwicklung der parameterspezifischen Fluoreszenzreaktion mit der PCR-Zyklenzahl gezeigt, die die Spezifität der durchgeführten Untersuchungen belegt. Es wurden jeweils 23 ng DNA aus der Probe für die TaqMan-PCR eingesetzt. Unter diesen Bedingungen können demnach in der Probe DNA-Sequenzen für das pat- und das 35S-Promotor-pat-Genkonstrukt nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde ein positiver Nachweis für ein Raps-spezifisches Gen, die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC), geführt.

Zur Validierung der pat- und ppa-Methode wurden jeweils 5 Wiederholungsmessungen in folgenden Verdünnungsschritten der Probe vorgenommen:

1:1; 1:10; 1:100; 1:400; 1:1600; 1:1:6400



Zyklenzahl der TaqMan-PCR für verschiedene Gen-Konstrukte in der Raps-DNA-Lösung.

Der ct-Wert als Ergebnis der quantitativen TaqMan-PCR ergibt sich aus dem Anstieg der Kurve durch das Untergrundrauschen. Die maximal gemessene Zyklenzahl wird auf 45 gesetzt.

In der Probe werden pat, ppa und rrf nachgewiesen.

Abb. 2.4.4: Spezifität der TaqMan (Quelle: Zeitler, LfU)

DNA Menge	Anzahl Raps-DNA Kopien	ppa	pat
pg	n	Ct-Werte	Ct-Werte
22.250	9.081	34,32	30,26
22.250	9.081	34,30	30,17
22.250	9.081	34,27	30,35
22.250	9.081	34,58	30,25
22.250	9.081	33,99	30,16
2.225	908	37,25	33,60
2.225	908	37,78	34,10
2.225	908	37,70	33,85
2.225	908	37,55	33,58
2.225	908	37,55	33,76
222,5	90,8	40,82	37,71
222,5	90,8	41,09	37,05
222,5	90,8	41,62	37,46
222,5	90,8	41,10	36,89
222,5	90,8	40,83	37,03
55,6	22,7	43,76	39,04
55,6	22,7	43,80	39,83
55,6	22,7	43,31	38,50
55,6	22,7	42,26	38,87
55,6	22,7	42,70	38,74
13,9	5,6	45,00	45,00
13,9	5,6	45,00	41,98
13,9	5,6	44,90	42,45
13,9	5,6	43,79	41,39
13,9	5,6	43,36	45,00
3,4	1,4	45,00	45,00
3,4	1,4	45,00	45,00
3,4	1,4	44,91	45,00
3,4	1,4	44,72	45,00

Tab. 2.4.8: *Ergebnisse der TaqMan-PCR der Raps-DNA-Lösungen (angesezte Masse für 1 Raps-DNA Kopie, diploid: 2,45 pg)*

Regression für den Nachweis von pat in Raps-DNA					
The REG Procedure, Model: MODEL1, Dependent Variable: ct					
Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	431.86492	431.86492	775.25	<.0001
Error	28	15.59783	0.55707		
Corrected Total	29	447.46275			
Root MSE		0.74637	R-Square	0.9651	
Dependent Mean		40.90867	Adj R-Sq	0.9639	
Coeff Var		1.82447			
Parameter Estimates					
Parameter Variable	DF	Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	47.50342	0.27325	173.84	<.0001
lgDNA_pg	1	-2.93717	0.10549	-27.84	<.0001

Regression für den Nachweis von ppa in Raps-DNA					
The REG Procedure, Model: MODEL1, Dependent Variable: ct					
Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	431.86492	431.86492	775.25	<.0001
Error	28	15.59783	0.55707		
Corrected Total	29	447.46275			
Root MSE		0.74637	R-Square	0.9651	
Dependent Mean		40.90867	Adj R-Sq	0.9639	
Coeff Var		1.82447			
Parameter Estimates					
Parameter Variable	DF	Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	47.50342	0.27325	173.84	<.0001
lgDNA_pg	1	-2.93717	0.10549	-27.84	<.0001

Tab. 2.4.9: Ergebnisse der Regressionsanalyse, TaqMan-PCR, Raps-DNA-Lösungen

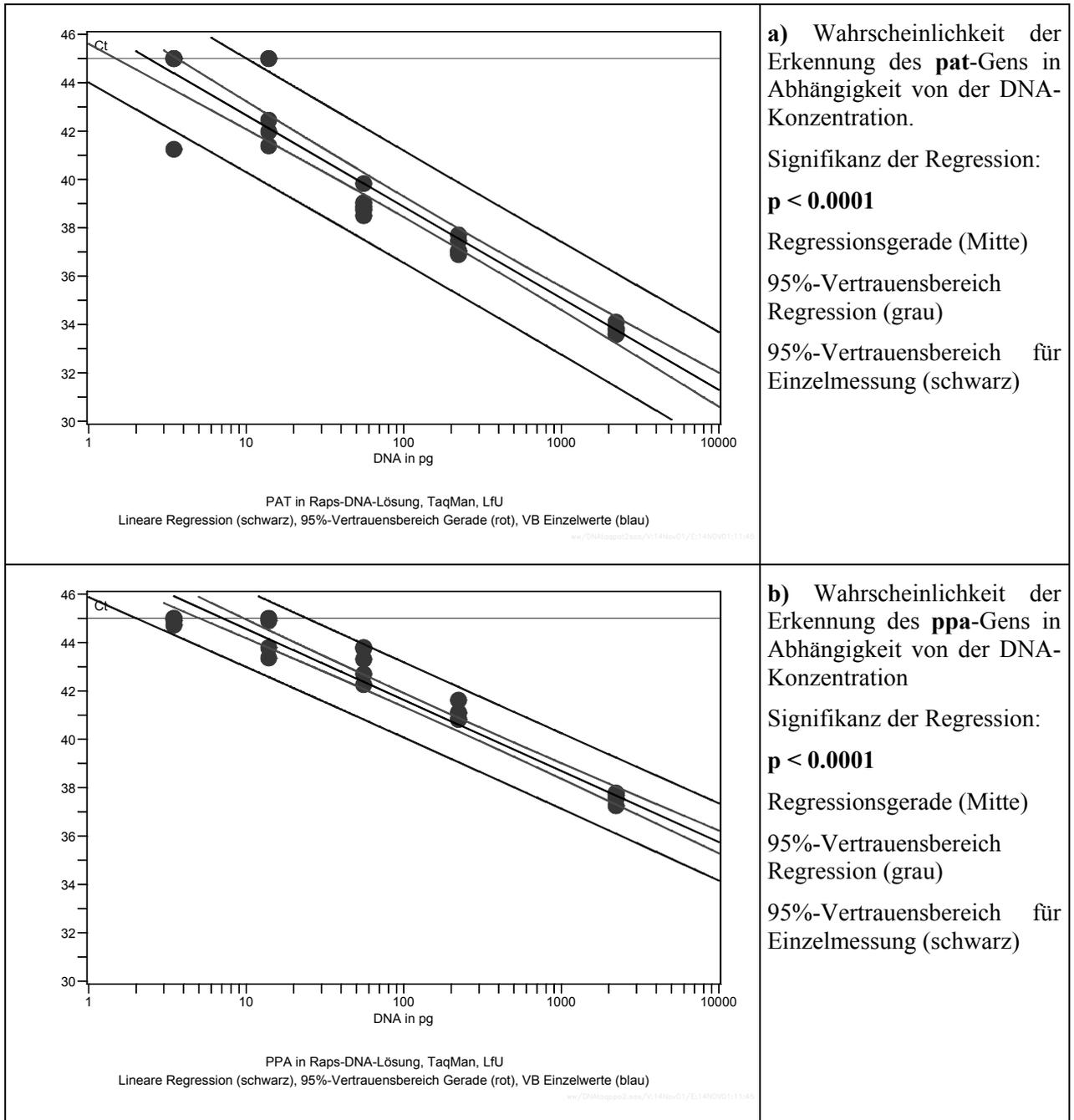


Abb. 2.4.5: Wahrscheinlichkeit der Erkennung der Merkmale aus der quantitativen TaqMan-PCR für Raps-DNA-Lösungen

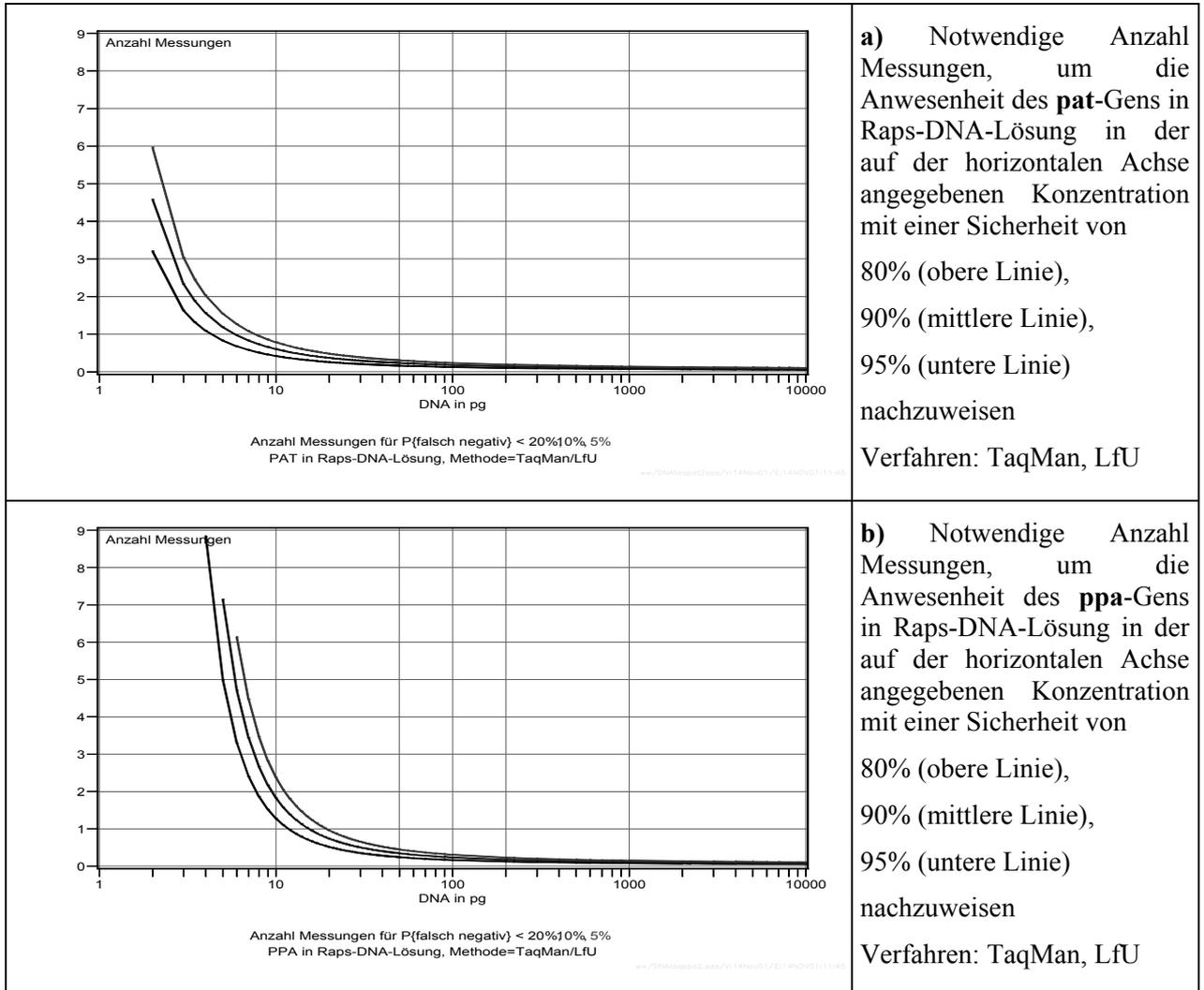


Abb. 2.4.6: Erforderliche Fallzahlen zum Nachweise der Merkmale in Raps-DNA-Lösung mit quantitativer TaqMan-PCR

Die statistischen Prüfungen der Nachweisgrenzen und Fallzahlen belegen für den Nachweis der untersuchten Genabschnitte in den Raps-DNA-Lösungen mit dem obigen PCR-Verfahren signifikante Beziehungen. Aus der daraus abgeleiteten Bestimmung der erforderlichen Fallzahlen ergibt sich, dass für sichere Nachweise Mehrfachbestimmungen zu empfehlen sind. Hierbei ist für das intendierte Monitoring

davon auszugehen, dass im Falle positiver oder uneindeutiger Nachweise Nachmessungen vorgesehen sind.

Für sichere Nachweise mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% sind dann mit obigem PCR-Verfahren (TaqMan, LfU) bei Doppelbestimmungen für die Merkmale folgende Bereiche als absolute Nachweisgrenzen anzugeben:

Merkmal	Nachweisgrenzen bei Doppelbestimmung	Raps-DNA-Kopie (diploid)	entspr. Anzahl DNA-Kopien
	pg DNA	pg/Kopie	n
ppa	12 pg DNA	2,45	4,9
pat	5 pg DNA	2,45	2,0

Tab. 2.4.10: Nachweisgrenzen der qualitativen PCR für Raps-DNA-Lösungen bei Doppelproben für Monitoring

2.4.6.3 Rapspollen

Im nächsten Schritt wurden vom Ökologiebüro HR-Rapspollen-Suspensionen hergestellt und in Form von Verdünnungsreihen zur Verfügung gestellt. Die ermittelten Nachweisgrenzen und Fallzahlen stellten sich für die qualitative und quantitative PCR wie folgt dar:

2.4.6.3.1 Qualitative PCR über CTAB-Extraktion und Gelelektrophorese

Die qualitative PCR erfolgte nach dem in Kap. (2.4.4.1) beschriebenen Verfahren in einem GeneAmp 9700 Thermocycler (Applied Biosystems) über 50 Zyklen.

Der Nachweis erfolgte auf folgende Parameter:

- Spezifischer Nachweis von GV-Raps: Teil des synthetischen PAT-Gens. Länge des Amplikons: 121 bp.
- Promotor-Screening: Teil des CAMV 35S. Länge des Amplikons: 123 bp.
- Spezies-Nachweis Raps: Teil des PEP-Gens. Länge des Amplikons: 248 bp.

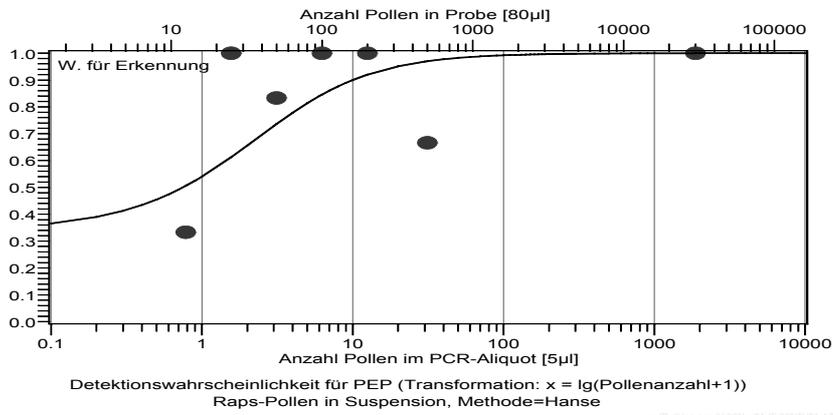
Die erzeugten PCR-Produkte wurden Agarose-gelelektrophoretisch aufgetrennt und photographisch dokumentiert wie im vorigen Abschnitt zu den DNA-Lösungen beschrieben (Kap. 2.4.6.1). Die Rohdaten aus der PCR sind in Tab. 2.4.11 enthalten. Die Ergebnisse der statistischen Analyse befinden sich in Tab. 2.4.12 und werden in Abb. 2.4.7 a-c veranschaulicht.

Pollenanzahl	pep	35S	pat
30000	+	+	+
30000	+	+	+
500	+	+	+
500	+	+	+
500	-	-	-
200	+	+	+
200	+	-	+
200	+	+	+
100	+	+	+
100	+	+	-
100	+	+	+
50	+	+	+
50	+	+	-
50	-	-	-
50		-	-
50	+	+	+
50		-	+
50		-	-
50	+	+	+
50	+	+	+
25	+	-	-
25	+	+	+
25	+	-	+
25		+	-
25		-	+
25		+	+
12,5	-	-	-
12,5	+	+	-
12,5	-	-	-
12,5		-	-
H ₂ O	-	-	-
H ₂ O	-	-	-
H ₂ O	-	-	-

Tab. 2.4.11: Ergebnisse der qualitativen PCR von Raps-Pollen-Suspensionen

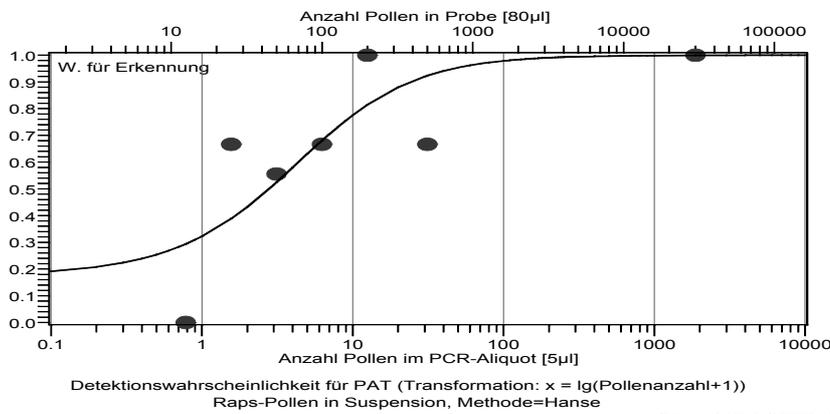
x=Anzahl Pollen, y= pep (PEP) , Conditional Exact Tests				
		p-Value		
Effect	Test	Statistic	Exact	Mid
Anzahl Pollen	Score	6.4667	0.0079	0.0079
x= Anzahl Pollen, y= pat (PAT) , Conditional Exact Tests				
		p-Value		
Effect	Test	Statistic	Exact	Mid
Anzahl Pollen	Score	7.5822	0.0022	0.0022
x= Anzahl Pollen, y= 35s (35S) , Conditional Exact Tests				
		p-Value		
Effect	Test	Statistic	Exact	Mid
Anzahl Pollen	Score	6.4672	0.0062	0.0062

Tab. 2.4.12: Logistische Regression für qualitative PCR-Daten, Raps-Pollen-Suspension



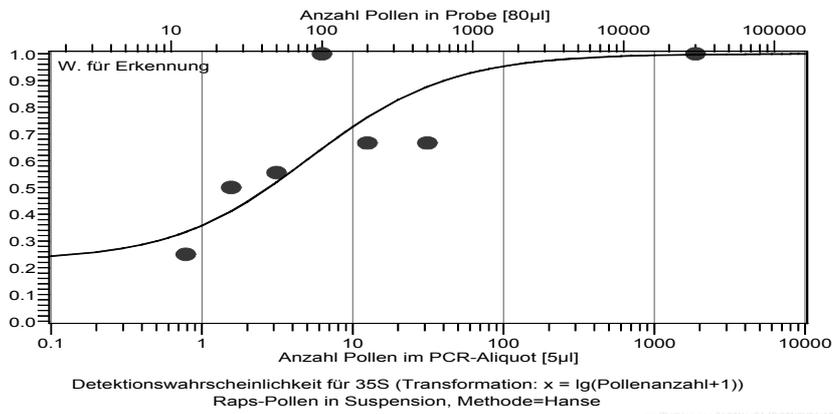
a) Wahrscheinlichkeit der Erkennung des PEP-Merkmals durch eine Messung in Abhängigkeit von der Rapspollenanzahl:

Signifikanz: $p = 0,0079$



b) Wahrscheinlichkeit der Erkennung des PAT-Merkmals durch eine Messung in Abhängigkeit von der Rapspollenanzahl:

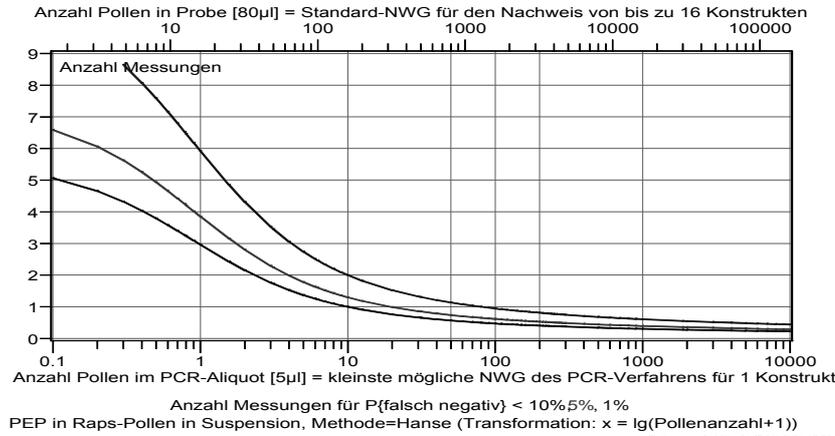
Signifikanz: $p = 0,0022$



c) Wahrscheinlichkeit der Erkennung des 35S-Merkmals durch eine Messung in Abhängigkeit von der Rapspollenanzahl:

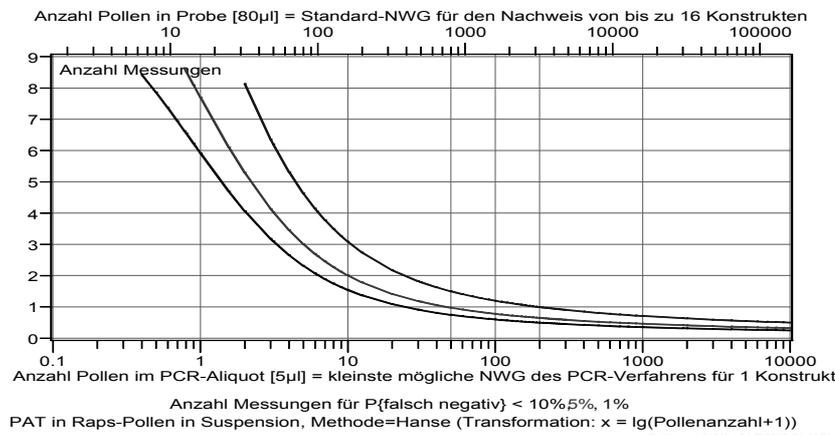
Signifikanz: $p = 0,0062$

Abb. 2.4.7: Wahrscheinlichkeit der Merkmalerkennung in der qualitativen PCR bei Raps-Pollen in Suspension: Skala oben bezogen auf Standardprobe (80 µl) für bis zu 16 Konstrukt-nachweise; Skala unten bezogen auf Pollenanzahl im einzelnen PCR-Aliquot (5 µl)



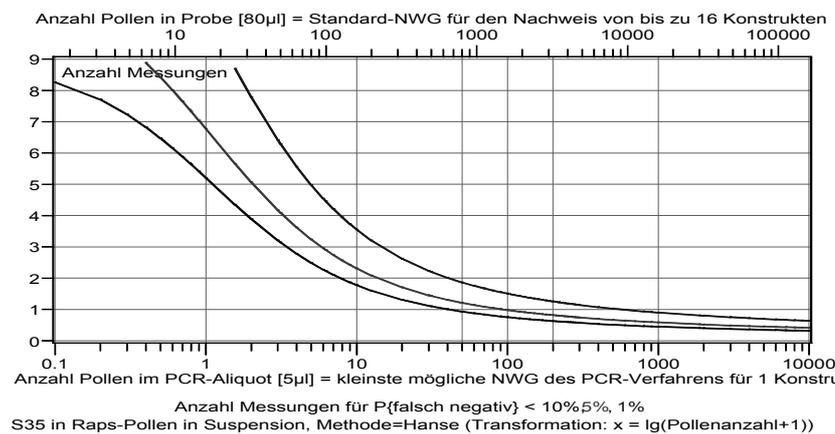
a) Notwendige Anzahl Messungen, um die Anwesenheit des PEP-Merkmals in Raps-Pollen-Suspension in Abhängigkeit von der Pollenanzahl mit einer Sicherheit nachzuweisen von:

- 90% (untere Kurve),
- 95% (mittlere),
- 99% (obere)



b) Notwendige Anzahl Messungen, um die Anwesenheit des PAT-Merkmals in Raps-Pollen-Suspension in Abhängigkeit von der Pollenanzahl mit einer Sicherheit nachzuweisen von:

- 90% (untere Kurve),
- 95% (mittlere),
- 99% (obere)



c) Notwendige Anzahl Messungen, um die Anwesenheit des 35S-Merkmals in Raps-Pollen-Suspension in Abhängigkeit von der Pollenanzahl mit einer Sicherheit nachzuweisen von:

- 90% (untere Kurve),
- 95% (mittlere),
- 99% (obere)

Abb. 2.4.8: Erforderliche Fallzahlen der qualitativen PCR für Raps-Pollensuspensionen

Gen	Anzahl Wiederholungs-messungen	Nachweisgrenzen des PCR-Verfahrens			
		Standardisierte NWG Nachweis von bis zu 16 Genen in einer Probe		Absolute NWG Gesamte DNA-Probenmenge für Nachweis eines Gens	
		Rapspollenanzahl n in Gesamtprobe 80 µl		Rapspollenanzahl n in PCR-Aliquot 5 µl	
		p	5%	1%	5%
Fallzahl m					
PEP	4	12	26	0,8	1,6
	3	20	50	1,3	3,1
	2	45	140	2,8	8,8
	1	300	2.000	19	125
PAT	4	45	110	2,8	6,9
	3	75	230	4,7	14
	2	215	850	13	53
	1	3.000	25.000	188	1.563
35S	4	45	90	2,8	5,6
	3	70	165	4,4	10
	2	155	450	9,7	28
	1	1.000	7.000	63	438

Tab. 2.4.13: Standardisierte und absolute Nachweisgrenzen des PCR-Verfahrens für die angegebenen Rapspollen-Gene bei angegebener Anzahl m an Mehrfachbestimmung und Einhaltung einer bestimmten Irrtumswahrscheinlichkeit p

Gen	Anzahl Wiederholungsmessungen		Absoluter Nachweisgrenzenbereich der PCR von Rapspollen-DNA			
	p	5%	Rapspollen-DNA in pg		1%	
	Fallzahl m	von	bis	von	bis	
PEP	4	1,8	2,7	3,9	5,9	
	3	3,0	4,5	7,5	11,3	
	2	6,8	10,1	21,0	31,5	
	1	45,0	67,5	300,0	450,0	
PAT	4	6,8	10,1	16,5	24,8	
	3	11,3	16,9	34,5	51,8	
	2	32,3	48,4	127,5	191,3	
	1	450,0	675,0	3.750,0	5.625,0	
35S	4	6,8	10,1	13,5	20,3	
	3	10,5	15,8	24,8	37,1	
	2	23,3	34,9	67,5	101,3	
	1	150,0	225,0	1.050,0	1.575,0	

Tab. 2.4.14: Abschätzung der absoluten Nachweisgrenze der PCR von Rapspollen als DNA-Menge für Vergleiche mit den Nachweisgrenzen für die Raps-DNA-Lösungen aus den vorangegangenen Versuchen bei Anzahl m an Mehrfachbestimmungen und Einhaltung einer bestimmten Irrtumswahrscheinlichkeit. Bezug: Pollenanzahl im PCR-Aliquot 5 µl

Annahme: Ein Rapspollen enthält je nach Reifezustand 2-3 haploide Kern-DNA-Genomsätze, so daß gilt: 2-3 DNA Kopien / pro Rapspollen; Gewicht einer haploiden Raps Kern-DNA Kopie: ca. 1,2 pg.

Die genaue Anzahl der vielfach vorliegenden DNA-Kopien aus den Chloroplasten und Mitochondrien sind unbekannt. Der Nachweis von multi-copy-Genen in einzelnen

Pollenkörner (z.B. in den Chloroplasten) ist daher einfacher zu realisieren und wurde bereits in den Vorversuchen (2.4.3) sowie in der Literatur (Petersen et al. 1996) gezeigt.

Die statistischen Prüfungen der Nachweisgrenzen und Fallzahlen belegen für den Nachweis der untersuchten DNA-Abschnitte in den Rapspollen mit dem obigen PCR-Verfahren signifikante Beziehungen. Aus der daraus abgeleiteten Bestimmung der erforderlichen Fallzahlen in den Abb. 2.4.8 a-c ergab sich, dass für sichere Nachweise Mehrfachbestimmungen anzulegen sind. Hierbei ist für das intendierte Umweltmonitoring von GVO davon auszugehen, dass im Falle positiver oder uneindeutiger Nachweise Nachmessungen vorgesehen sind.

Die Nachweisgrenzen als erforderliche Anzahl an Mehrfachmessungen zur Einhaltung einer entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeit sind für $p = 5\%$ und 1% in den Tab. 1.2 für die Pollenanzahlen angegeben. Für ein Umweltmonitoring von GVO ist die Kontrolle mehrerer Konstrukte aus einer Probe erforderlich. Mit den herkömmlichen PCR-Verfahren bedingt dies eine entsprechende Aufteilung der Gesamtprobe in mehrere PCR-Aliquots, die mindestens der Anzahl der nachzuweisenden Gene entspricht. Der hier angesetzte Standardansatz geht von 1 zu 16 aus. Für einen Verfahrensvergleich wurde zusätzlich die maximal erzielbare, absolute Nachweisgrenze bei Verwendung der gesamten DNA-Menge in einem Nachweis angegeben.

Für sichere Nachweise von Rapspollen-DNA mit dem derzeitigen PCR-Verfahren (GeneScan Analytics) empfehlen sich als Schlussfolgerung mindestens Doppelbestimmungen. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% sind als absolute NWG mindestens 13 Rapspollen im Aliquot erforderlich um die Konstrukte nachzuweisen, bei $p = 1\%$ sind 53 Pollen notwendig.

Die standardisierte NWG für den Nachweis von bis zu 16 Genen erfordert bei Doppelmessungen und $p=5\%$ konstruktabhängig mindestens 45-215 Pollen in der Probe, für $p=1\%$ sind 140-850 notwendig.

Zum Vergleich mit den Nachweisgrenzen aus den DNA – Lösungen wurden in Tab. 1.3 die den Pollenzahlen entsprechenden DNA-Mengen der PCR-Aliquots rechnerisch ermittelt, wobei von 2-3 haploiden Kern-DNA-Sätzen pro Rapsollen (je nach Reifezustand) und einem Gewicht von ca. 1,2 pg pro haploider Raps-DNA ausgegangen wurde. Die absolute NWG der PCR liegt konstruktabhängig im Bereich von 6 bis 49 pg DNA bei Doppelmessung und $p=5\%$.

Zum Vergleich lagen die NWG der reinen DNA-Lösungen im Bereich von 10-20 pg DNA.

2.4.6.3.2 *Quantitative real-time PCR mit Qiagen-Extraktion und TaqMan*

Unter Verwendung des Qiagen-Extraktionsverfahrens wurde beim LfU in Augsburg (Dr. Zeitler) ein Verfahren zum Nachweis der Rapsollen-DNA für die quantitative TaqMan-PCR entwickelt (2.4.6.2.2). Das Verfahren wurde zunächst anhand von Verdünnungsreihen einer Raps-Pollensuspension im Bereich von 400-4.000 Pollen (bezogen auf 80 µl Standardprobe) getestet. Der Dosisbereich wurde dann anschließend von von GeneScan Analytics in Bremen bis in den Bereich der unteren Nachweisgrenze von <10 Pollen für folgende Parameter erweitert:

ACC	Nachweis des ACCase-Gens aus Raps
Pat/35S	Nachweis des Pat/35S – Überganges

Die Ergebnisse aus der der PCR befinden sich in Tab. 2.4.15. Die Resultate aus der statistischen Analyse des Dosis-Wirkungszusammenhanges über die Regressionsanalyse sind in Tab. 2.4.16 wiedergegeben, die sich daraus ergebenden Fallzahlenberechnungen sind in Abb. 2.4.9 ersichtlich.

Anzahl Pollen	6		10		15		20		25		50	
System	ACC	Case Pat	ACC	Case Pat	ACC	Case Pat	ACC	Case Pat	ACC	Case Pat	ACC	Case Pat
Ct	39,35	50	50	50	50	41,80	50	50	50	50	38,41	37,92
	50	50	50	50	50	50	50	50	38,79	50	37,32	37,66
									50	50	40,05	50
									50	50	50	50
Anzahl Pollen	100		200		500		1000					
System	ACC	Case Pat	ACC	Case Pat	ACC	Case Pat	ACC	Case Pat				
Ct	36,44	36	36,05	44	34,90	34,44	33,18	33				
	36,82	37	36,02	36	33,89	34,16	33,39	34				
	35,90	37	34,74	36	34,24	35,07	33,18	33				
	37,34	35	36,11	36	33,21	33,52	35,76	34				
Anzahl Pollen	12		20		30		40		50		100	
System	ACC	Case Pat	ACC	Case Pat	ACC	Case Pat	ACC	Case Pat	ACC	Case Pat	ACC	Case Pat
Ct	50	39,26	50	50	39,71	50	50	39,23	39,03	39,28	37,45	39,18
	50	40	38,52	38,81	39,81	39,86	50	50	38,66	38,15	50	39,58
									39,14	40	38,98	40
									39,68	50	38,77	39,49

Tab. 2.4.15: Ergebnisse der TaqMan Kalibrierung für Rapspollen
 Ct-Werte bis 40: nachgewiesen, zwischen 40 und 45: unklar
 (Wiederholung der PCR notwendig), oberhalb von 45: nicht nachgewiesen

Regression für den Nachweis von pat/35S in Raps-Pollen-Suspension, Ansatz 30µl + 60µl, Aliquot 5 µl					
The REG Procedure, Model: MODEL1, Dependent Variable: ct,					
Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	580.60482	580.60482	85.37	<.0001
Error	46	312.83511	6.80076		
Corrected Total	47	893.43993			
Root MSE		2.60783	R-Square	0.6499	
Dependent Mean		40.17813	Adj R-Sq	0.6422	
Coeff Var		6.49066			
Parameter Estimates					
Parameter Variable	DF	Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	44.35404	0.58817	75.41	<.0001
lg Anz_Poll Aliqu	1	-5.75788	0.62316	-9.24	<.0001
Regression für den Nachweis von acc in Raps-Pollen-Suspension, Ansatz 30µl + 60µl, Aliquot 5 µl					
The REG Procedure, Model: MODEL1, Dependent Variable: ct					
Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	590.23982	590.23982	97.88	<.0001
Error	46	277.39126	6.03024		
Corrected Total	47	867.63108			
Root MSE		2.45566	R-Square	0.6803	
Dependent Mean		39.78938	Adj R-Sq	0.6733	
Coeff Var		6.17164			
Parameter Estimates					
Parameter Variable	DF	Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	43.99980	0.55385	79.44	<.0001
lg Anzahl_Pollen	1	-5.80546	0.58680	-9.89	<.0001

Tab. 2.4.16: Ergebnisse der Regressionsanalyse, TaqMan-PCR, Pollensuspension

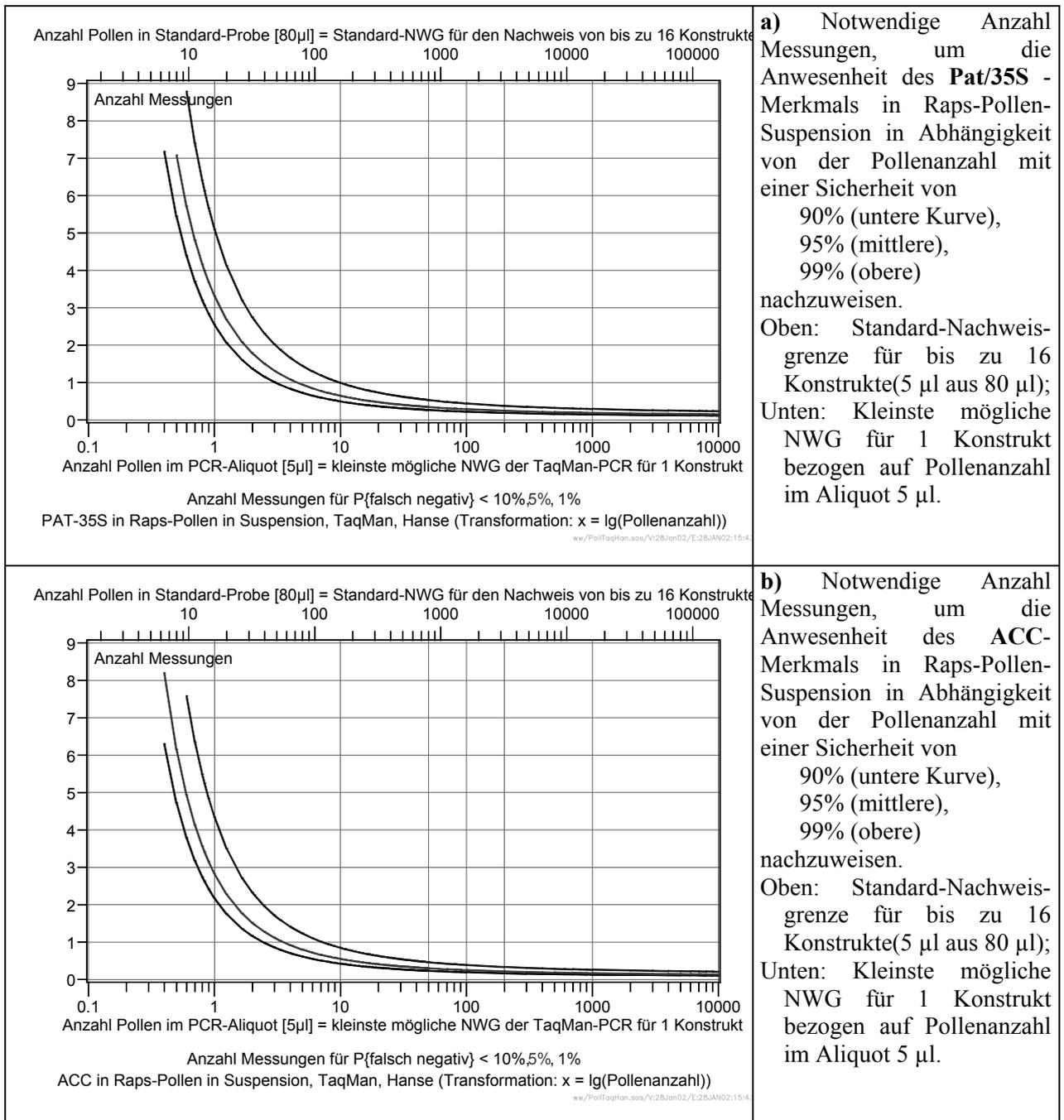


Abb. 2.4.9: Sensitivität, Nachweisgrenze und Fallzahlen der quantitativen TaqMan-PCR für Rapspollen: Oben: Standard-Nachweisgrenze für bis zu 16 Konstrukte (5 µl aus 80 µl); Unten: Kleinste mögliche NWG für 1 Konstrukt bezogen auf Pollenanzahl im Aliquot 5 µl

Gen	Anzahl Wiederholungsmessungen	Nachweisgrenzen des PCR-Verfahrens			
		Standardisierte NWG Nachweis von bis zu 16 Genen in einer Probe		Absolute NWG Gesamte DNA-Probenmenge für Nachweis eines Gens	
		Rapspollenanzahl n in Gesamtprobe 80 µl		Rapspollenanzahl n in PCR-Aliquot 5 µl	
		p	5%	1%	5%
Fallzahl m					
ACC	4	13	18	0,8	1,1
	3	16	24	1,0	1,5
	2	24	42	1,5	2,6
	1	56	117	3,5	7,3
Pat/35S	4	13	21	0,8	1,3
	3	18	30	1,1	1,9
	2	29	50	1,8	3,1
	1	74	160	4,6	10

Tab. 2.4.17: Standardisierte und absolute Nachweisgrenzen des TaqMan-PCR-Verfahrens mit Qiagen-Extraktion in Anzahl Rapspollen bei angegebener Anzahl m an Mehrfachbestimmung und Einhaltung einer bestimmten Irrtumswahrscheinlichkeit p

Gen	Anzahl Wiederholungs-messungen	Nachweisgrenzen des PCR-Verfahrens							
		Standardisierte NWG				Absolute NWG			
		Nachweis von bis zu 16 Konstrukten in einer Probe				Gesamte DNA-Probenmenge für Nachweis eines Gens			
		Anzahl Raps-DNA-Kopien (haploid) in Gesamtprobe 80 µl				Anzahl Raps-DNA-Kopien (haploid) im PCR-Aliquot 5 µl			
p	5%		1%		5%		1%		
Fallzahl m	von	bis	von	bis	von	bis	von	bis	
ACCase	4	26	38	35	53	1,6	2,4	2,2	3,3
	3	32	48	48	72	2,0	3,0	3,0	4,5
	2	48	72	83	125	3,0	4,5	5,2	7,8
	1	112	168	234	350	7,0	10,5	14,6	21,9
Pat/35S	4	26	38	42	62	1,6	2,4	2,6	3,9
	3	35	53	61	91	2,2	3,3	3,8	5,7
	2	58	86	99	149	3,6	5,4	6,2	9,3
	1	147	221	320	480	9,2	13,8	20,0	30,0

Tab. 2.4.18: *Abschätzung der standardisierten und absoluten Nachweisgrenzen des TaqMan-PCR-Verfahrens mit Qiagen-Extraktion als Anzahl DNA-Kopien für die Rapspollen (haploid) bei angegebener Anzahl m an Mehrfachbestimmung und Einhaltung einer bestimmten Irrtumswahrscheinlichkeit p. Annahme: Ein Rapspollen enthält je nach Reifezustand 2-3 haploide Kern-DNA-Genomsätze.*

Gen	Anzahl Wiederholungsmessungen	Absoluter Nachweisgrenzenbereich der PCR von Rapspollen-DNA			
		Menge Rapspollen-DNA in pg			
	p	5%		1%	
	Fallzahl m	von	bis	von	bis
ACCase	4	1,9	2,9	2,6	4,0
	3	2,4	3,6	3,6	5,4
	2	3,6	5,4	6,2	9,4
	1	8,4	12,6	17,5	26,3
Pat/35S	4	1,9	2,9	3,1	4,7
	3	2,6	4,0	4,6	6,8
	2	4,3	6,5	7,4	11,2
	1	11,0	16,6	24,0	36,0

Tab. 2.4.19: *Abschätzung der absoluten Nachweisgrenze der PCR von Rapspollen als DNA-Menge in pg für Vergleiche mit den Nachweisgrenzen für die Raps-DNA-Lösungen aus den vorangegangenen Versuchen bei Anzahl m an Mehrfachbestimmungen und Einhaltung einer bestimmten Irrtumswahrscheinlichkeit p. Bezug: Pollenanzahl im PCR-Aliquot 5 µl: Annahme: Ein Rapspollen enthält je nach Reifezustand 2-3 haploide Kern-DNA-Genomsätze. Dies ergibt für das Gewicht einer haploiden Raps Kern-DN- Kopie ca. 1,2 pg*

Die untersuchten Gene werden als single-copy-Gene eingestuft, so dass die NWG sich hierauf bezieht. Die genaue Anzahl von vielfach vorliegenden DNA-Kopien aus Chloroplasten und Mitochondrien sind dagegen unbekannt. Der Nachweis von derartigen multi-copy-Genen in einzelnen Pollenkörner ist daher einfacher zu realisieren und wurde bereits in Vorversuchen (2000) sowie in der Literatur (Petersen et al. 1996) gezeigt.

Die statistischen Prüfungen der Nachweisgrenzen und Fallzahlen belegen für den Nachweis der untersuchten Rapspollen mit der TaqMan-PCR und der Qiagen-Extraktion signifikante Beziehungen. Die Ergebnisse der LfU aus Kap. 3 konnten in der Tendenz bestätigt und bis in den Nachweisgrenzenbereich erweitert werden. Die absolute Nachweisgrenze lag bei Doppelmessungen und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p=0.05$ im Bereich unter 2 Pollen im 5 μ l-Aliquot und unter 25 Pollen in der Standard-Gesamtprobe. Umgerechnet in Anzahl haploider Raps-DNA-Kopien sind die Nachweisgrenzen konstruktabhängig und bezogen auf die Standardprobe von 80 μ l, die bis zu 16 DNA-Nachweise erlaubt, im Bereich von 48 – 86 Kopien anzusiedeln. Als absolute NWG im 5 μ l - Aliquot ergibt sich ein NWG-Bereich von 3-5,4 Kopien. Dies entspricht bei einem angenommenen Gewicht eines haploiden Rapsgenoms von 1,2 pg einer DNA-Menge von 3,6 – 6,5 pg.

2.4.6.4 Mais- und Zuckerrübenpollen

Synonym zu der Bestimmung der Nachweisgrenze von Rapspollen, wurde die Nachweisgrenze für Mais- und Zuckerrübenpollen ermittelt. Aufgrund des Fehlens eines pflanzenspezifischen Nachweissystems wurden die Zuckerrübenpollen nur auf das Vorhandensein des 35S-Promotors analysiert.

Anzahl Pollen	6		10		15		20		25		50	
System	HMG	Pat										
Ct	50	37,32	37,6	35,94	36,41	35,39	37,92	36,19	50	37,16	37,47	36,69
	36,3	36,3	37,31	50	37,01	36,5	40,08	35,05	41,28	50	38,57	36,55
	36,54	50	36,75	34,68	36,73	36,26	37,15	50	37,51	37,42	38	36,1
									37,3	50	38,2	36,25
Anzahl Pollen	100		200		500		1000		10000		20000	
System	HMG	Pat										
Ct	35,34	34,22	34,57	33,32	34,78	35,31	34,77	34,72	31,83		30,23	
	34,95	35,41	35,36	35,55	34,7	34,26	36,5	36,67				
	35	36,63	35,26	34,79	35,23	34,9	35,42	36,5				
	35,51	35,58	36,38	37,53	35,22	34,82	38,04	35,73				

Tab. 2.4.20: Ergebnisse aus dem Nachweis des HMG- und des Pat-Gens mittels TaqMan-Analyse Zyklen bei verschiedenen Konzentrationen von Maispollen zur Bestimmung der Nachweisgrenze. DNA-Lösung gesamt: 60 μ l, eingesetzte DNA-Lösung in PCR: 5 μ l, Zyklen: 50.

Ct-Werte bis 40: nachgewiesen, zwischen 40 und 45: unklar (Wiederholung der PCR notwendig), oberhalb von 45: nicht nachgewiesen. Die Konzentrationen von 10.000 und 20.000 Pollen wurden in einer Verdünnung von 1:10 in die Analyse eingesetzt.

Anzahl Pollen	6	10	15	20	25	50
System	35S	35S	35S	35S	35S	35S
Ct	30,46 29,15 30,14	30,27 29,33 31,74	29,96 29,19 30,38	29,04 29,22 30,51	30,56 29 29,57 29,1	33,05 28,65 29,84 28,41
Anzahl Pollen	100	200	500	1000	5000	10000
System	35S	35S	35S	35S	35S	35S
Ct	28,05 27,63 28,05 28,12	26,24 27,22 26,82 27,06	26,31 26,58 27,83 26,45	26,17 26,71 26,19 26,32	29,51 28,74	24,31 23,87

Tab. 2.4.21: Ergebnisse aus dem Nachweis des 35S-Promotors mittels TaqMan-Analyse Zyklen bei verschiedenen Konzentrationen von Zuckerrübenpollen zur Bestimmung der Nachweisgrenze. DNA-Lösung gesamt: 60 µl, eingesetzte DNA-Lösung in PCR: 5 µl, Zyklen: 50. Ct-Werte bis 40: nachgewiesen, zwischen 40 und 45: unklar (Wiederholung der PCR notwendig), oberhalb von 45: nicht nachgewiesen. Die Konzentrationen von 5000 und 10000 Pollen wurden in einer Verdünnung von 1:10 in die Analyse eingesetzt.

Der Verlauf der Zyklenzahl in Beziehung zur Dosis ist in Abb. 2.4.10 am Beispiel der Zuckerrübenpollen dargestellt. Der Dosisbereich wurde soweit gefahren, dass die Limits der PCR sowohl im unteren als auch im oberen Dosisbereich zu erkennen sind. Der quasi lineare Verlauf in der Mitte beschreibt den validen Dosisbereich. Der badewannenartige Kurvenverlauf (IDP-Typ) ist für viele technische Systeme wie auch der PCR bekannt. Da aus dem Kurvenverlauf ein ct-Werte nicht eindeutig auf eine Konzentration bezogen ist, ergibt sich für die Routine die Notwendigkeit mindestens eine Doppelanalyse mit Verdünnungsschritt zu fahren.

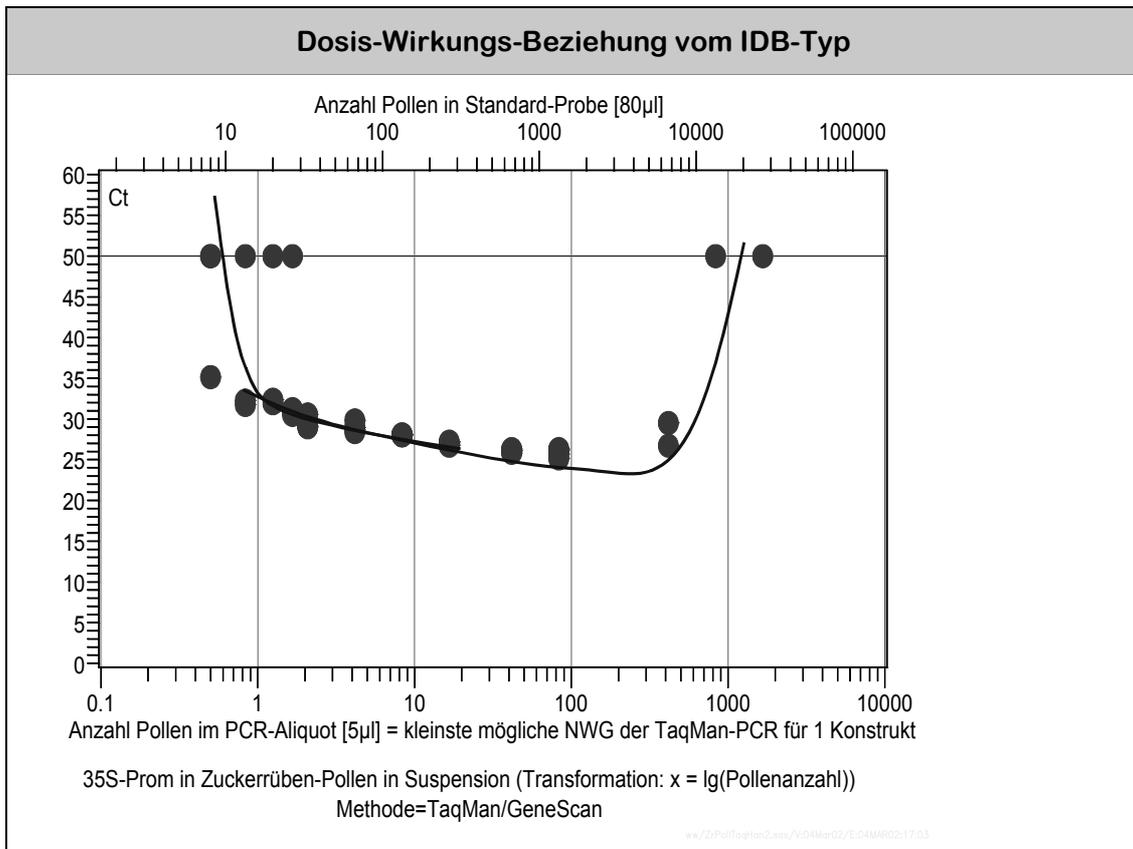


Abb. 2.4.10: Beziehung von Pollenanzahl und Zyklenzahl der TaqMan – PCR für Zuckerrübenpollen über den gesamten Dosisbereich

2.4.6.5 Rapspollen in Honig

Das aus der Literatur bekannte Verfahren nach Waiblinger et al. (1999) für den Rapspollennachweis in Honig zeigte sich in Vorversuchen als nicht hinreichend sensitiv und reproduzierbar. Nach umfangreicher Analyse der einzelnen Verfahrensschritte wurde ein verbessertes Verfahren für die Matrix Honig (s. 2.4.4.2.3 und 2.4.5.2) entwickelt, dessen Sensitivität und Reproduzierbarkeit anhand der Honigprobe B13.2 mit bekannter Rapspollenanzahl anhand einer Verdünnungsreihe untersucht wurde. Die Ergebnisse finden sich in Tab. 2.4.22. Das Verfahren wurde anschließend bei der LfU Augsburg bestätigt.

g Honig	0,05	0,1	0,2	0,5	1	5	10	20
Anzahl Pollen Probe	164	329	657	1.643	3.285	16.425	32.850	65.700
Anzahl Pollen/5µl	14	27	55	137	275	1.370	2.740	5.480
System	ACCcase							
Ct	38,29 36,29	38,16 37,70		33,07 33,09	30,90 30,91	28,76 28,73	27,77 27,68	29,13 28,88
System	LL							
Ct	50,00 50,00	50,00 50,00	38,60 39,30	37,32 37,34	35,24 35,83	33,58 33,65	32,61 32,39	33,11 32,99

Tab. 2.4.22: Ergebnisse aus dem Nachweis von ACCase und LL mit TaqMan-PCR in der Verdünnungsreihe der Referenzhonigprobe B13.2 (3.285 Rapspollen/g Honig, 90% GVO-Anteil) zur Kalibrierung der Raps-honigproben. DNA-Lösung gesamt: 60 µl, eingesetzte DNA-Lösung in PCR: 5 µl, Zyklen: 50. Ct-Werte bis 40: nachgewiesen, oberhalb von 45: nicht nachgewiesen..

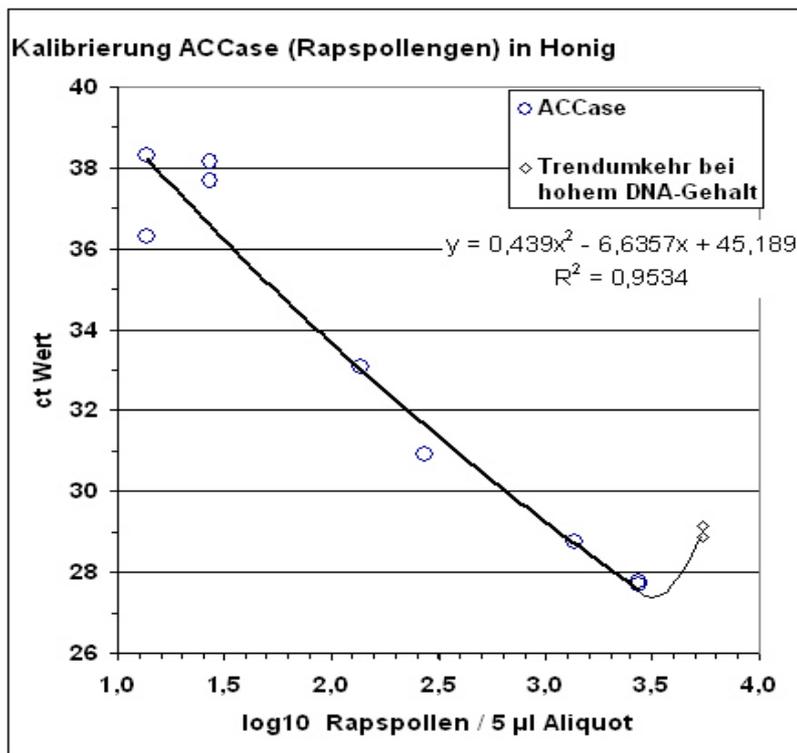


Abb. 2.4.11: Beziehung von Pollenanzahl und Zyklenzahl der TaqMan – PCR für ACCase (Raps) in Pollen-DNA aus Verdünnungsreihe der Referenzhonigprobe B13.2 über den gesamten Dosisbereich. Funktion gilt

zwischen: $27,6 < ct < 38,3$ und $14 < n < 2.800$ und bei mindestens Doppelmessung und 2 Verdünnungsschritten

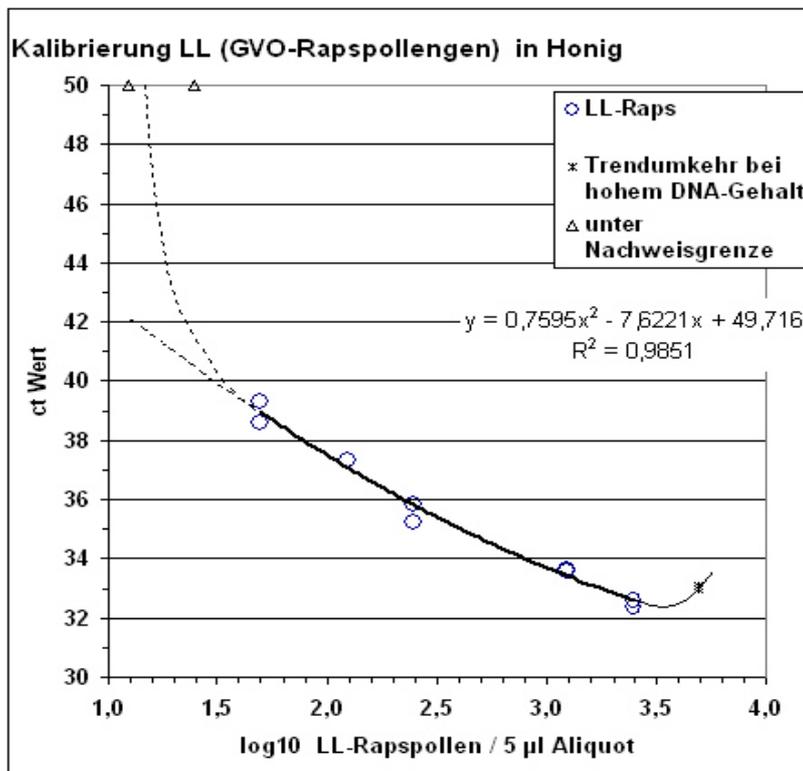


Abb. 2.4.12: Beziehung von Pollenzahl und Zyklenzahl der TaqMan – PCR für LL-Raps (HR-Raps) in Pollen-DNA aus Verdünnungsreihe der Referenzhonigprobe B13.2 über den gesamten Dosisbereich. Funktion gilt zwischen: $32,3 < ct < 39,3$ und $49 < n < 2.500$ Pollen und bei mindestens Doppelmessung und 2 Verdünnungsschritten

Die grafische Darstellung der Ergebnisse sind in den Abb. 2.4.11 und Abb. 2.4.12 dargestellt. Sie belegen einen statistisch signifikanten Zusammenhang der Ergebnisse der TaqMan-PCR mit den eingesetzten Pollen-DNA-Mengen der Honigproben für sowohl ACCase als auch LL. Hierbei sind deutlich die spezifische Sensitivität und die gute Reproduzierbarkeit über einen breiten Dosisbereich sowie dessen oberen und unteren Grenzen zu erkennen. Die Ergebnisse des Regressionszusammenhanges konnten damit zur Kalibrierung der Honiganalysen verwendet werden.

2.4.7 Fazit der methodischen Untersuchungen zur PCR von Pollen-DNA

Die statistischen Auswertungen ergaben, dass sich mit den entwickelten PCR-Verfahren spezifisch und reproduzierbar DNA sowohl in Raps-, Mais als auch für Zuckerrübenpollen nachweisen lässt. Zur Gewährleistung einer ausreichend sicheren Aussagekraft sind Doppelbestimmungen erforderlich und es sollten mindestens 100 Pollen der nachzuweisenden Pollenart in der Probe vorliegen.

2.5 Ausbreitungsrechnung und Parameter für Polleneinfluss

Im Vorhaben wurden Pollenausbreitungsrechnungen durchgeführt, die zwei Zielen dienen:

1. In der Planungsphase lieferte eine Ausbreitungsrechnung die Grundlage für die Positionierung der Sammler. Ziel war es hier, die zur Verfügung stehende Anzahl von Sammlern an Standorten in der Umgebung der Freisetzungsflächen dergestalt zu positionieren, dass diese in Bezug auf den GVO-Einfluss die Variation im Untersuchungsgebiet abdecken. Dies benötigt eine möglichst gleichmäßige Verteilung über den gesamten Einflussgradienten.
2. In der Auswertungsphase wurden die gemessenen Pollenmengen dem nach aktueller Ausbreitungsrechnung zu erwartenden Pollenfluss gegenübergestellt. Die Ausbreitungsrechnung diente somit als Hilfsmittel der Sammler-Beurteilung. Im Fokus stand hierbei die Gradientenprüfung, d.h. inwieweit vermag der Sammler einen zu erwartenden Pollengradienten wiederzugeben (Sensitivität), wo liegen die Nachweisgrenzen und wie ist die Reproduzierbarkeit einzuschätzen.

In beiden Anwendungen sollte die Ausbreitungsrechnung das spezifische Ausbreitungsverhalten der Pollenart sowie die unterschiedlichen Windrichtungen und Entfernungen berücksichtigen. In dem Vorhaben wurde hierfür ein traditionelles Gauß-Modell verwendet. Da mittlerweile komplexere Modelle, wie Lagrange-Partikel-Modelle zur Verfügung stehen, soll die Entscheidung für das Gauß-Modell im folgenden begründet werden:

Pollen gehören mit 10-120 μm zu den gröberen Luftstaubpartikeln. Je nach Art, Größe, Form und Gewicht weisen sie unterschiedlich hohe Sinkgeschwindigkeiten auf, die ihre Ausbreitung im Luftstrom beeinflussen. In der Literatur finden sich je nach Untersuchungszweck verschiedene Modelle zur Pollenausbreitung. Eine ausführliche Diskussion findet sich in den grundlegenden Werken zur Aerobiologie von Edmonds (1979) [mit Diskussion verschiedener Modellansätze, u.a. Gauß-Modell], Gregory

(1973) und Raynor (1976); speziell zum Thema Pollenausbreitung und GVO siehe auch Okubo & Levin (1989) [Ausbreitungstheorie], Treu & Emberlin (2000) [Raps, Mais und Zuckerrübe], Lavigne et al. (1996 und 1998) [Raps], Hunt et al. (2001) [Modellierung von Ausbreitung und Auskreuzung], Feil & Schmid (2002) [Isolationsabstände], Loos et al. (2002) [Mais, Lagrange Partikel-Modell], Laredo (2003) [Modellierung der Ausbreitung], GENEERA (2003) [Raps, individuenorientierte Modellierung] und Helbig et al. (2004) [mesoskaliges Modell KAMM/DRAIS, Pollenflugvorhersage].

Die verwendeten Verfahren der Ausbreitungsrechnung beruhen auf verschiedenen Typen von Modellen, die bei bleibender Abhängigkeit von Ziel und Datenlage eine historische Entwicklung widerspiegeln, in der gleichartige Probleme mit unterschiedlichen (in der Regel komplexer werdenden) Ansätzen angegangen wurden.

Distanzmodelle, wie z.B. Isolationsabstände, betrachten die Ausbreitung als im wesentlichen von der räumlichen Distanz zwischen Quelle und Betrachtungsort abhängig. Meteorologische Effekte und Merkmale des überstrichenen Raums werden höchstens implizit berücksichtigt, so z. B. bei empirischen Modellen (räumliche Regression) oder Box-Modellen (Kompartiment-Modellen), die funktionale Beziehungen zwischen räumlichen Einheiten herstellen. Meteorologische Modelle (z.B. Gauß-Modell, AUSTAL86) benutzen zusätzlich zu den rein geographisch definierten Abständen auch klimatische Gegebenheiten, im wesentlichen Windrichtung und -geschwindigkeit und beziehen die Diffusion und Sinkgeschwindigkeit der Teilchen mit ein. Ein direkt an Partikeln orientiertes Modell ist das Lagrange-Modell, von dem es sowohl Nahbereichsversionen (z.B: LASAT [Ing.-Büro Janicke], AUSTAL2000 [TA Luft 2002]) wie auch mesoskalige Versionen gibt. Des weiteren sind bei der Ausbreitung von GVO auch sogenannte individuenorientierte Modellierungen anzuführen (BMBF-Vorhaben GENEERA).

Die Entscheidung für einen speziellen Ansatz beruht in der Regel auf einer Reihe von Kriterien:

- **Rechenaufwand.** Dieser war für lange Zeit eine streng limitierende Größe bei der Entscheidung für ein Modell und ist es im Prinzip auch heute noch, obwohl sich die Grenzen deutlich verschoben haben. Das Gauß-Modell hatte seit der Einführung in den 60er Jahren einen Standard-Charakter, da seine Verwendung mit einem akzeptablen Kompromiss von Genauigkeit und Rechenzeit verbunden war. Dementsprechend ist dieses Modell weit verbreitet, die Vor- und Nachteile sind auf Grund der langjährigen Anwendung bekannt und über die inhärenten Festlegungen von Koeffizienten liegen Erfahrungswerte vor.
- **Verfügbares Vorwissen.** Mit der Komplexität eines Modells steigt in der Regel auch das notwendige Vorwissen, das in Form von Modellparametern eingebracht werden muss. Geringes Vorwissen ist daher ebenso ein limitierender Faktor wie hoher Rechenaufwand. Die Verwendung eines komplexen Modells bedeutet nicht zwangsläufig „bessere“ Resultate, besonders nicht bei unsicheren Eingaben. Hier liegen bei der Anwendung neuerer, komplexerer Modelle, wie z.B. Lagrange-Partikelmodelle, individuenorientierte Modellierung etc., für die Pollenausbreitung wesentliche Einschränkungen.
- **Notwendigkeit der räumlichen/ meteorologischen Differenzierung.** Variable räumliche und meteorologische Bedingungen verlangen ein entsprechend eingerichtetes Modell (z.B. ein Partikel- und Strömungsmodell), aber dann natürlich auch die entsprechend differenzierte Eingabe der Bedingungen, mit denen das Modell arbeiten soll. Für die Berechnung der Pollenausbreitung stehen bisher nur erste Ansätze im Forschungsrahmen und keine ausreichenden Erfahrungen zur Verfügung, und in Konsequenz gibt es auch keine weitreichende Verbreitung von und Erfahrung mit den Modellergebnissen. Von der Verwendung eines differenzierten Modells ohne entsprechend differenzierte (und begründete) Eingabe war für unser Vorhaben keine Verbesserung gegenüber einfacheren Modellen zu erwarten.
- **Modellierung vom extremen Nah- oder Fernbereich.** Die meisten Modelle, zumal das Gauß-Modell, sind weder für den extremen Nahbereich (wenige Meter von

der Quelle) noch für große Entfernungen (mehrere hundert Kilometer) entwickelt. Die Modellierung in diesen Bereichen sollte nur mit entsprechend spezialisierten Ansätzen erfolgen. Partikel-Modelle wiederum haben ihre Stärke im Nahbereich und erfordern spezielle Maßnahmen im Fernbereich.

- Kurzzeit-Beschreibung vs. Beschreibung eines länger andauernden Zustands. Zu unterscheiden ist zwischen einer Ausbreitungsrechnung für ein Kurzzeitereignis (Episoden- / Störfallmodell) und der mittelnden Aussage über längerfristige Zeiträume. Präzise Aussagen für einen isolierten Einzelfall und kurzen Zeitrahmen erfordern eher aufwändige Modelle. Das Gauß-Modell ist hierfür weniger geeignet. Über längere Zeiträume (bei Pollen z.B. Blühzeitraum, Vegetationsperiode über Monate, Jahr) ergeben sich jedoch mittelnde und damit deutlich zuverlässigere Aussagen.
- Abhängigkeit des Resultats von numerischen Details. Je nach Modell kann das Resultat der Ausbreitungsrechnung von den Einzelheiten der Rechendurchführung abhängen. Das Resultat des Gauß-Modells hängt von der Dichte des verwendeten Gitters ab, ist aber bei einmal festgelegter Dichte immer dasselbe. Beim Partikelmodell hängt das Resultat von der Anzahl eingesetzter Partikel in Relation zum verwendeten Gitter ab, umso mehr, je weiter das Beurteilungsgebiet von der Quelle entfernt ist. Die Start-Anzahl eingesetzter Partikel muss also so hoch angelegt werden, dass keine Unterschreitung kritischer Anzahlen im Beurteilungsgebiet erfolgt.
- Modellvalidierung: Für die Pollenausbreitung gibt es nicht nur keine validierten Modelle, sondern auch keine hinreichenden Datensätze zur Validierung. Dies begründet, dass die meisten Arbeiten zur Pollenausbreitung Forschungscharakter haben und einen hohen Begleitaufwand implizieren. Für die Kalibrierung von Pollenausbreitungsmodellen benötigt man ausreichend Messpunkte, die die Variabilität im Raum abdecken. Es gibt zur Zeit kaum Datensätze, die hierfür genügen. Ein wesentlicher Grund lag auch darin, dass die reproduzierbare Erfassung von Pollen in der Luft über längere Zeiträume messtechnisch sehr

aufwändig war und für diesen Zweck Forschungsmittel nicht ausreichend bereit standen.

- Absolute und relative Angaben: Eine hohe Anforderung stellt die Berechnung absoluter Anzahlen bei der Pollenausbreitung dar, da die genaue Quellstärke über die freigesetzten Pollen unbekannt ist und nur grob geschätzt werden kann. Für die Gradientenprüfung in unserem Vorhaben spielt dies jedoch eine untergeordnete Rolle, da es nur auf die relativen Unterschiede ankam. Hier spielt vor allem die Sinkgeschwindigkeit der Pollen eine Rolle, die artspezifisch stark variiert. Wir haben in diesem Vorhaben deshalb die Ausbreitungsrechnungen mit spezifischen Sinkgeschwindigkeiten gerechnet und nicht, wie in den Standardprogrammen der TA Luft (1986 und 2002), in groben Klassen.

Die Untersuchung der oben genannten Kriterien in Bezug auf die Wahl eines Verfahrens zur Ausbreitungsrechnung im hier benötigten Rahmen führte zu den folgenden Erkenntnissen:

- Für den Raum Sickinge stand keine hinreichende Raumdifferenzierung (Topographie, Rauigkeit und ähnliche lokale Merkmale) und ebenfalls keine differenzierte Meteorologie (zeitlich-räumliche Differenzierung von Windrichtung und -geschwindigkeit) zur Verfügung. Die Anwendung eines Partikelmodells hätte die aufwändige Erhebung dieser Parameter erfordert, für die weder Zeit noch Mittel zur Verfügung standen. Bei Setzung der Eingabeparameter ohne Fundierung wären jedoch trotz einer formal aufwendigeren Modellierung keine tatsächlich besseren Erkenntnisse zu erwarten gewesen.
- Die notwendigen Eingabeparameter für die Verwendung des Gauß-Modells waren verfügbar. Die meisten der eingehenden Koeffizienten konnten auf Grund der langjährigen Erfahrung mit dem Modell gesetzt und /oder aus vorliegenden Regelwerken, namentlich der TA Luft (1986), übernommen werden. Der Unterschied zwischen den Resultaten des Gauß-Modells und des Partikelmodells

bei Verwendung der verfügbaren undifferenzierten Eingaben ist als vernachlässigbar anzusehen (Thehos et al. 1994, Zenger & Beerhalter 2003).

- Die Änderung der Eingabeparameter für das Gauß-Modell hätte keinen Einfluss auf die Reihenfolge der Standorte entlang des räumlichen Gradienten, solange das Maximum der Pollenkonzentration jeweils innerhalb der Ausbreitungsflächen bleiben würde. Eingabeparameter, die dieses Maximum nach außerhalb des Feldes verschieben, wären jedoch hochgradig unplausibel. Damit sind die wesentlichen Aussagen über den Zusammenhang zwischen erwarteter Konzentration (bzw. Fluss) und gemessenen Pollenzahlen robust.
- Eine Ausbreitungsrechnung für den unmittelbaren Nahbereich (wenige Meter von der Quelle, etwa Abstand = Quellhöhe) bzw. für große Entfernungen (>10-km-Bereich) war nicht notwendig. Für beides wäre das Gauß-Modell nicht geeignet gewesen.
- Das topographische Umfeld des Raums Sickinge ist eher einfach strukturiert und das Windfeld im Blühzeitraum des Rapses eher homogen, wie es der Grundannahme des Gauß-Modells entspricht.
- Eine weitere Grundannahme des Gauß-Modells ist die Annahme der zeitlich nicht begrenzten Nachlieferung von Pollen. Das entspricht nicht dem Vorgang der Pollenausbreitung, die tatsächlich nur in einem zeitlich begrenzten Rahmen und innerhalb dessen mit variierender Emissionsrate stattfindet. Dieser Aspekt ist aber vernachlässigbar, da die Messinstrumente nur summarische Angaben im wesentlichen über den gesamten Blühzeitraum liefern und nur diese mit den ebenfalls summarischen Angaben zum Fluss verglichen werden.

Gemessen an der Aufgabenstellung einer ersten Verfahrensprüfung und den zu Verfügung stehenden Ressourcen wurde das Gauß-Modell als eine akzeptable und praktikable Form der Ausbreitungsrechnung für das Vorhaben befunden, die den hier verfolgten Zielen genügt. Sie hat sicher in mehrfacher Hinsicht einen approximativen Charakter, der jedoch erst bei Verfügbarkeit von weiteren Informationen (Raumstruktur,

Meteorologie) und Verwendung komplexerer Modelle (Partikelmodell) überwunden werden kann. Bereiche, in denen Gauß-Resultate in jedem Fall problematisch sind (unmittelbare Nähe, große Entfernungen) waren nicht Gegenstand dieser Untersuchung. Die Berechnungen beschränkten sich auf den, unter ausbreitungstechnischen Gesichtspunkten definierten, Nahbereich, hier bis 4 km. Der Eintrag an den mehreren Hundertkilometer entfernten Fernstandorten wurde nicht berechnet und, über den langen Blühzeitraum gemittelt entsprechend, als vernachlässigbar eingestuft. Die Referenzstandorte dienten der Angabe der Variation abseits der Versuchsfelder.

Der hier erfolgte Einsatz des Gauß-Modells soll nicht als Präjudiz für künftige Untersuchungen verstanden werden, sondern ist eher als erster Schritt innerhalb einer Entscheidungshierarchie anzusehen, die vom Gauß-Modell als gängiges Einstiegs-Modell hin zu aufwändigeren, komplexeren Modellen in weiteren Verfahrensschritten führt. Diese Vorgehensweise gilt als effizient und wird z.B. auch für die Beurteilung von Bio-Aerosolen empfohlen (TÜV Sachsen 1998). Im Folgevorhaben der TU München (Beismann et al. 2003) wurde daher auch ein Lagrange-Partikel-Modell empfohlen, das zur Anwendung kam.

2.5.1 Beschreibung der durchgeführten Ausbreitungsrechnungen

Von der Ausbreitungsrechnung mussten keine absoluten Angaben verlangt werden, sondern lediglich hinreichend genaue Angaben über die relativen Unterschiede im Pollenfluss im Raum, d.h. über dessen relativen Gradienten. Die aus einem Feld heraus durch Luftbewegung entstehende Ausbreitung von Pollen wurde daher hier auf der Grundlage des Gauß-Fahnenmodells für Partikeldepositionen berechnet. Dessen zentrale Gleichung stellt die Gauß-Lösung der Transportgleichung dar und ist als Gleichung (1) unten angegeben. Dieser Ansatz ist weit verbreitet und fand ebenfalls in der TA Luft (1986) Verwendung, wobei jedoch darauf hinzuweisen ist, dass die Ausbreitung von Pollen nicht Gegenstand der TA Luft ist. Die unmittelbare Anwendung der TA Luft war daher nicht angemessen, da diese weder für Pollen noch für niedrige Quellhöhen vorgesehen ist und die in der TA Luft enthaltenen empirisch kalibrierten Koeffizienten

nicht zwangsläufig für die hier vorliegende Aufgaben gelten. Das Gauß-Modell wurde daher für die vorhabensspezifischen Aufgaben modifiziert und mit Hilfe von entsprechend hergestellter Software (SAS) angewendet.

Das Gauß-Ausbreitungsmodell berücksichtigt die Variabilität von Windrichtung und -geschwindigkeit, indem unter Berücksichtigung der Häufigkeitsverteilung beider Größen für jeden Windrichtungssektor eine separate Rechnung vollzogen wird und diese anschließend überlagert wird. Um den Rechenaufwand der erforderlichen Detailauflösung anzupassen, wurden die Rechnungen in einem geschachtelten Design mit drei Rasterauflösungen durchgeführt, die weiter unten beschrieben sind.

Die Berechnungen erfolgten für jeden 2°-Sektor der Windrichtung unter Mittelung der Windgeschwindigkeit in diesem Sektor. Bei der Zusammenführung der einzelnen Richtungen wurden diese gemäß der Dauer ihres Auftretens in Stunden gewichtet.

Die emittierende Flächenquelle der Freisetzungsfelder wurde durch eine Anordnung von Punktquellen angenähert. Dies geschah für das Raps-Testfeld in Sickte durch eine Anordnung von 6 Punktquellen und weiteren 6 Quellen für das Feld in Salzdahlum. Für das Mais-Testfeld in Sickte, das eine komplexere Geometrie aufwies, wurde eine Anordnung von 61 einzelnen Quellen vorgenommen. Die geographische Anordnung der fiktiven Punktquellen war in dem Fall so angelegt, dass das tatsächliche Feld durch Kreise mit Radien von 25 m überdeckt wurde, wobei diese an den fiktiven Quellen zentriert waren. Die von einer Fläche ausgehende Pollenzahl (dem Charakter nach entsprechend dem Emissions-Massenstrom Q) wurde als proportional zur Flächengröße auf der Grundlage einer Emission von 10^9 Pollen pro Hektar und Stunde angesetzt. Diese Setzung ist eine plausible, jedoch grobe Schätzung der Größenordnung (siehe Treu & Emberlin 2000). Sie ist hier ausreichend, weil die Ausbreitungsrechnung lediglich zum Auffinden von relativen Gradienten herangezogen wird. Für eine Ausbreitungsrechnung mit dem Ziel der Bestimmung von absoluten Einträgen wäre eine gesonderte, in diesem Projekt nicht notwendige und daher nicht vorgesehene quantitative Bestimmung der von einem Feld ausgehenden effektiven Quellstärke oder eine Kalibrierung der Ergebnisse erforderlich.

Die wesentliche Beziehung für die Berechnung der von einer Punktquelle an der Koordinate (0,0) verursachten Konzentration C an einem Punkt mit den Koordinaten (x,y,z) , wobei die x -Achse des Koordinatensystems in Richtung der Haupt-Fahnenachse zeigt, wird im Gauß-Modell der TA Luft (1986) durch die Formel (1) angegeben:

$$C_i(x,y,z) = \frac{10^6 Q_i}{3600 \cdot 2\pi u_h \sigma_y \sigma_z} \exp\left[-\frac{y^2}{2\sigma_y^2}\right] \left\{ \exp\left[-\frac{(z-h)^2}{2\sigma_z^2}\right] + \exp\left[-\frac{(z+h)^2}{2\sigma_z^2}\right] \right\} \cdot \exp\left\{-\sqrt{\frac{2}{\pi}} \frac{V_{di}}{u_h} \int_0^x \frac{1}{\sigma_z(\xi)} \exp\left[-\frac{h^2}{2\sigma_z^2(\xi)}\right] d\xi\right\}, \quad (1)$$

wobei

$$\sigma_y = Gx^f \quad (2)$$

$$\sigma_z = Gx^g \quad (3)$$

$$\sigma_z(\xi) = G\xi^g \quad (4)$$

$$u_h = u_R \left[\frac{h}{z_A} \right]^m \quad (5)$$

Der Index i steht für die Korngrößenklasse, hat hier jedoch keine Bedeutung, da die von i abhängige Sink- = Depositionsgeschwindigkeit V_{di} hier spezifisch gerechnet wurde (siehe Anmerkung dort).

Für die Diffusionskonstanten σ_y, σ_z wurde als Vereinfachung auf eine Fächerung der Ausbreitungsklassen verzichtet und mit der Ausbreitungsklasse III/1 gerechnet, die bei der mittelnden Betrachtung über den Blühzeitraum des Rapses als ausreichend repräsentierend angesehen wurde.

Die numerischen Werte der in (1) enthaltenen Koeffizienten wurden, soweit dieses als angemessen erachtet wurde, aus dem Anhang C zum Gauß-Ausbreitungsmodell der TA Luft (1986) übernommen. Damit wird auf die langjährigen Erfahrungen, die in die

Festlegungen der TA Luft eingeflossen sind, zurückgegriffen. Für die Pollenausbreitung, die nicht Gegenstand der TA Luft ist, waren Abweichungen bzw. eigene Setzungen für den Emissionsmassenstrom und die Depositionsgeschwindigkeit erforderlich. Die konkret in den durchgeführten Rechnungen benutzten Koeffizienten sind in der Tab. 2.5.1 aufgeführt. Auf Grund der niedrigen Quellhöhen liegen die Aufschlagpunkte (Positionen der Konzentrations-Maxima) noch im inneren Bereich der emittierenden Felder, so dass die Reihenfolge der Mess-Standorte im Sinne der Gradientenprüfung auch bei anderen plausiblen Parametersetzungen erhalten bliebe.

Bezeichnung	Wert	Bedeutung								
x		horizontale Aufpunkt-Entfernung von der Quelle in Windrichtung (Fahnenachse), in m								
y		horizontale Aufpunkt-Entfernung senkrecht zur Fahnenachse, in m								
f	0,784	Exponent in (2) für effektive Quellhöhen unter 50m, Ausbreitungsklasse III/1. Quelle: TA Luft 1986								
F	0,640	Faktor in (2) für effektive Quellhöhen unter 50m, Ausbreitungsklasse III/1 Quelle: TA Luft 1986, S. 100								
g	0,215	Exponent in (3) für effektive Quellhöhen unter 50m, Ausbreitungsklasse III/1 Quelle: TA Luft 1986								
G	0,885	Faktor in (3) für effektive Quellhöhen unter 50m, Ausbreitungsklasse III/1								
h	2 m	effektive Quellhöhe								
Q	$10^9/(\text{ha}\cdot\text{h})$	Emissionsmassenstrom, hier: Anzahl der dem Feld entströmenden Pollen pro ha und h								
u_R		Rechenwert für Windgeschwindigkeit, berechnet aus den am Standort gemessenen Geschwindigkeiten u_s , umgerechnet gemäß folgender Tabelle: <table border="1" data-bbox="683 1682 1278 1899"> <thead> <tr> <th>u_s in m/s</th> <th>Rechenwert u_R in m/s</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>< 1,4</td> <td>1,0</td> </tr> <tr> <td>1,4 – 1,8</td> <td>1,5</td> </tr> <tr> <td>1,9 – 2,3</td> <td>2,0</td> </tr> </tbody> </table>	u_s in m/s	Rechenwert u_R in m/s	< 1,4	1,0	1,4 – 1,8	1,5	1,9 – 2,3	2,0
u_s in m/s	Rechenwert u_R in m/s									
< 1,4	1,0									
1,4 – 1,8	1,5									
1,9 – 2,3	2,0									

Bezeichnung	Wert	Bedeutung												
		<table border="1"> <tr> <td>2,4 – 3,8</td> <td>3,0</td> </tr> <tr> <td>3,9 – 5,4</td> <td>4,5</td> </tr> <tr> <td>5,5 – 6,9</td> <td>6,0</td> </tr> <tr> <td>7,0 – 8,4</td> <td>7,5</td> </tr> <tr> <td>8,5 – 10,0</td> <td>9,0</td> </tr> <tr> <td>> 10,0</td> <td>12,0</td> </tr> </table>	2,4 – 3,8	3,0	3,9 – 5,4	4,5	5,5 – 6,9	6,0	7,0 – 8,4	7,5	8,5 – 10,0	9,0	> 10,0	12,0
2,4 – 3,8	3,0													
3,9 – 5,4	4,5													
5,5 – 6,9	6,0													
7,0 – 8,4	7,5													
8,5 – 10,0	9,0													
> 10,0	12,0													
		Quelle: TA Luft 1986												
V_{di}	Raps: 0,01 m/s Mais: 0,20 m/s (Treu & Emberlin 2000)	Pollen-Ablagerungsgeschwindigkeit, wird auch als Sinkgeschwindigkeit für die Ausbreitungsrechnung verwendet. Der Index i (steht hier für die Pollenart (TA Luft: Korngrößenklasse). Abweichend von der TA Luft. in der nur eine grobe Einteilung in Korngrößenklassen vorgesehen ist, wurde auf Grund der Bedeutung für den Gradienten, die Sink- und Depositionsgeschwindigkeit pollenartspezifisch genau gerechnet. Es wurden zudem vergleichende Berechnungen mit v_d -Werten von 0,001 bis 0,6 m/s durchgeführt.												
z	1,5 m	Höhe des Aufpunkts												
z_a	2 m	Anemometerhöhe über Flur												
σ_y	siehe (2)	horizontaler Ausbreitungsparameter für effektive Quellhöhe unter 50m, Ausbreitungsklasse III/1. Quelle: TA Luft 1986												
σ_z	siehe(3)	vertikaler Ausbreitungsparameter für effektive Quellhöhe unter 50m, Ausbreitungsklasse III/1. Quelle: TA Luft 1986, S. 100												

Tab. 2.5.1: Parameter der Ausbreitungsrechnungen

Für die Berechnung des in (1) enthaltenen Integrals wurde der Integrationsbereich in eine Anzahl von genügend kleinen disjunkten Teilintervallen zerlegt, jedes Teilintegral numerisch integriert (Gauß-Legendre-Verfahren) und die Summe aller Teilintegrale zum Gesamtintegral addiert.

Die gesamte Ausbreitungsrechnung wurde für drei Flächengrößen, jeweils mit dem Feld in Sichte als Zentrum, durchgeführt:

- 8000m x 8000m, Gitterweite: 25 m;
- 2000m x 2000m, Gitterweite: 5 m;
- 500m x 500m, Gitterweite: 1 m.

Für die über 100km entfernten Referenzstandorte wurden keine Berechnungen angestellt, da der Eintrag über den Blühzeitraum insgesamt als vernachlässigbar anzusehen ist. Dies gälte natürlich nicht, wenn einzelne Episoden betrachtet werden (Loos et al. 2003). Für die graphische Darstellung und die Berechnung von Konzentrationen für die Sammler-Standorte wurde die Ausbreitungsrechnung in der jeweils feinsten verfügbaren Auflösung verwendet. Soweit nötig, d.h. bei Standorten außerhalb des inneren 500m x 500m-Quadrats, wurde die Konzentration durch Triangulation aus den nächstgelegenen Gitterpunkten berechnet.

Aus der Konzentration C_i wurde der horizontale Pollenfluss F_i als die mit dem Wind über dem Messort (x,y,z) transportierte Pollenmenge berechnet. Er steht mit der Konzentration über das passierte Luftvolumen in Zusammenhang und wird durch Multiplikation mit der mittleren Windgeschwindigkeit \bar{v}_W in den SI-Einheiten [m, s] für einen Querschnitt von 1 m² Bezugsfläche berechnet. Aus der Flussrate pro Sekunde und m² ergibt sich durch Multiplikation mit der entsprechenden Zeitdauer der insgesamt über den Mess- oder Blühzeitraum erfolgte Pollenfluss.

$$F_i(x, y, z) = C_i(x, y, z) \cdot \bar{v}_W \quad (6)$$

Die auf einer ebenen Bezugsfläche von 1 m² erfolgende vertikale Deposition am Messort in Pollen/m³ Luft wurde aus der mittleren Konzentration unter Verwendung der partikelspezifischen, hier pollenspezifischen, Depositionsgeschwindigkeit V_{di} berechnet, wobei gilt [in SI-Einheiten]:

$$D_i(x, y, z) = \frac{C_i(x, y, z)}{V_{di}} \quad (7)$$

Es ergibt sich zunächst die Depositionsrates pro Sekunde und m^2 , woraus sich unter Berücksichtigung der Zeitdauer die deponierte Pollenmenge pro m^2 über einen Bezugszeitraum, z.B. die Messperiode über den Rapsblühzeitraum von 34 Tagen, ermitteln lässt.

Die Ausbreitungsrechnung wurde einmal für die Standortwahl und zum zweiten Mal für die Auswertung des eigentlichen Versuchs durchgeführt. Zur Standortwahl flossen in die Ausbreitungsrechnung die meteorologischen Zeitreihen (Stundenwerte) über einen 10jährigen Messzeitraum aus der benachbarten meteorologischen Station des DWD ein. Die Berechnungen wurden dann nach Versuchsdurchführung anhand der während des Versuchs gemessenen Wetterdaten über den Versuchszeitraum erneut getätigt und danach der Auswertung zu Grunde gelegt.⁸²

Das Modell lässt sich auf Grund der relativ einfach strukturierten topografischen Gegebenheiten im Untersuchungsgebiet erfolgreich für die Fragestellung anwenden, da es hier nicht auf eine präzise absolute Vorhersage für einen Einzelort, sondern um einen mittleren relativen Gradienten geht. Vorhersagen für den unmittelbaren Nahbereich, für die das Gaußmodell limitiert ist, waren für dieses Projekt nicht relevant. Topographische Einflüsse und Oberflächenrauigkeitsunterschiede, die über die Auswahl der Messstandorte per Design berücksichtigt wurden, bewirken eine erhöhte Variation (Streuung) der Messergebnisse, jedoch keine systematische Verzerrung. Letztere wären für Ergebnisse im unmittelbaren Nahbereich bzw. für große Entfernungen zu erwarten, die hier nicht betrachtet wurden. Die zu erwartende erhöhte Variation hat dagegen zur Konsequenz, dass vorhandene Zusammenhänge zwischen Messresultaten und berechneter Konzentration bzw. Fluss tendenziell schlechter erkannt werden als bei Verwendung eines elaborierten Ausbreitungsmodells, das intensiv auf die Meteorologie und Geländestruktur eingeht. Die aufgefundenen Zusammenhänge und die daraus abgeleiteten Aussagen sind daher eher als konservativ anzusehen in dem Sinne, dass die tatsächlichen Zusammenhänge eher stärker sein dürften als vorgefunden.

⁸² Wir danken dem DWD, der FAL und der BBA für die freundliche Bereitstellung der Daten.

2.5.2 Parameter für das GVO-Pollenmonitoring

Für das GVO-Monitoring ist zur Beschreibung des GVO-Einflusses die Menge an Pollen relevant, die am Wirkort über den Blühzeitraum ankommt und potenziell für Wirkungen zur Verfügung steht. Der entsprechende Parameter ist der (horizontale) Pollenfluss in Anzahl Pollen pro m² Bezugsfläche. Die mittlere Konzentration als Pollenanzahl/m³ Luft ist hingegen eher relevant für Allergiker oder Effekte, die z.B. vom Atemvolumen abhängen. Der Bezug der Größen erfolgt über die Windgeschwindigkeit, so dass sich je nach Windverhältnissen Unterschiede in der Beurteilung der Einflusstärke ergeben. Der Pollenfluss lässt sich ebenso wie die Konzentration über geeignete Ausbreitungsmodelle berechnen. Über den Pollenfluss ließen sich äquivalent zu Vorgehensweisen in anderen Regelbereichen entsprechende Sollwerte definieren, die vorab geschätzt und in der Landschaft konkret über Messungen geprüft werden können.

	Deposition	Deposition	Deposition	DepoRate	DepoRate	Konzentration	Flussrate	Flussrate	Fluss	Fluss
	Sigma-Zählfläche	Sigma-2			Sekunde		Sekunde	Tag		PMF
	n/120 mm ² 34d	n/Haftfolie 34d	n/m ² 34d	n/m ² d	n/m ² s	n/m ³	n/m ² s	n/m ² d	n/m ²	n/PMF
vd					0,01					
T			34	86.400				86.400	34	
Windgeschw m/s							1,93			
Luftvolumen m ³							1,93	166.752	5.669.568	4,54E+05
Fläche	0,000120	0,004225							1	0,08
	3,53E-07	1,24E-05	2,94E-03	8,64E-05	1,00E-09	0,0000001	1,93E-07	1,67E-02	5,67E-01	4,54E-02
	3,53E-06	1,24E-04	2,94E-02	8,64E-04	1,00E-08	0,000001	1,93E-06	1,67E-01	5,67E+00	4,54E-01
	3,53E-05	1,24E-03	2,94E-01	8,64E-03	1,00E-07	0,00001	1,93E-05	1,67E+00	5,67E+01	4,54E+00
	3,53E-04	1,24E-02	2,94E+00	8,64E-02	1,00E-06	0,0001	1,93E-04	1,67E+01	5,67E+02	4,54E+01
	3,53E-03	1,24E-01	2,94E+01	8,64E-01	1,00E-05	0,001	1,93E-03	1,67E+02	5,67E+03	4,54E+02
	3,53E-02	1,24E+00	2,94E+02	8,64E+00	1,00E-04	0,01	1,93E-02	1,67E+03	5,67E+04	4,54E+03
	3,53E-01	1,24E+01	2,94E+03	8,64E+01	1,00E-03	0,1	1,93E-01	1,67E+04	5,67E+05	4,54E+04
	3,53E+00	1,24E+02	2,94E+04	8,64E+02	1,00E-02	1	1,93E+00	1,67E+05	5,67E+06	4,54E+05
	3,53E+01	1,24E+03	2,94E+05	8,64E+03	1,00E-01	10	1,93E+01	1,67E+06	5,67E+07	4,54E+06
	3,53E+02	1,24E+04	2,94E+06	8,64E+04	1,00E+00	100	1,93E+02	1,67E+07	5,67E+08	4,54E+07
	3,53E+03	1,24E+05	2,94E+07	8,64E+05	1,00E+01	1.000	1,93E+03	1,67E+08	5,67E+09	4,54E+08

Tab. 2.5.2: Exemplarische Darstellung der Beziehung der Parameter Konzentration, Deposition und Fluss für Rapspollen über einen Dosisbereich von 10⁻⁷ bis 10³ Pollen/m³ unter den Sickter Versuchsbedingungen (Feldgröße: 0,5 ha; T=34d)

Pollenkonzentration mittlere Pollenanzahl pro m³ Luft über Expositionszeitraum 34Tage bei 1,93 m/s mittlere Windgeschwindigkeit
 Depositionsrate mittlere Pollendeposition pro m² und Tag (auf waagerechte Fläche) bei 1,93 m/s und vdi=0,01m/s

Deposition	Gesamte Pollendeposition pro m ² über Expositionszeitraum 34 Tage
Pollenfluss	Summe der mit dem Wind antransportierten Pollen pro m ² Querschnittsfläche zur Windrichtung (horizontaler Fluss)
Flussrate	Pollenfluss pro m ² und Tag
mittlere Windgeschwindigkeit	über Expositionszeitraum, hier v=1,93 m/s
Expositionszeitraum	34 Tage, dem Blühzeitraum von Raps entsprechend (25.4.-30.5.01)

Tab. 2.5.2 zeigt exemplarisch die Bezüge zwischen den Parametern Konzentration, Deposition und Fluss über einen Wertebereich für Rapspollen auf, wie sie sich anhand der konkreten meteorologischen Versuchsbedingungen während der Rapsperiode in Sichte darstellten. Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass selbst bei einem relativ gering erscheinenden mittleren Konzentrationswert über den Blühzeitraum (hier 34 Tage) von beispielsweise 1 Rapspollen/m³ in der Luft, das in etwa den Bereich der Nachweisgrenze für das übliche Standardverfahren Burkard-Falle angibt, ein Pollenfluss von 5,5 Mio. Pollen/m² verbunden ist. Der Pollenfluss gibt die Menge an Pollen an, die im Bezugszeitraum mit dem Luftstrom antransportiert werden und potentiell für Wirkungen wie Auskreuzung zur Verfügung stehen. Der Pollenfluss steht mit der Konzentration über die Windgeschwindigkeit in Beziehung (siehe (6) in Kap. 2.5.1). Den Eintrag von Pollen und damit Fremd-DNA in den Boden gibt die Deposition an. Die mittlere Konzentration von 1 Rapspollen pro m³ entspricht hier bei einem $V_{d,i}$ von 0,01 m/s einer Deposition von ca. 29.000 Rapspollen pro m² waagerechter Bezugsfläche. Der Bezug zur Konzentration ist über die Depositionsgeschwindigkeit in Formel (7) in Kap. 2.5.1 gegeben.

Die Konzentration dient als Zielvariable bei den Polleninformationsdiensten und ist wesentlich für z.B. Allergiker, die die Pollen über die Atemluft inhalieren. Für das GVO-Monitoring hingegen sind die Menge an Pollen, die im Bezugszeitraum mit dem Luftstrom antransportiert wurden und potentiell für Wirkungen wie Auskreuzung zur Verfügung stehen, – also der Pollenfluss –, sowie die in das Ökosystem eingetragene und im Boden verbleibende Deposition die wesentlichen Größen, wenn es um Wirkungsabschätzungen geht. Angaben zu einer Konzentration, wie vielfach in der

Literatur zu finden, sind nur bei gleichzeitiger Nennung der konkreten Windverhältnisse vor Ort aussagefähig. In den Auswertungen wurde soweit wie möglich zum Pollenfluss und zur Deposition auch die mittlere Konzentration angegeben, um den Vergleich mit Literaturangaben zu erleichtern.

2.6 Verfahrensprüfungen im Freiland: Methodischer Ansatz über Pollengradienten

Ziel der Freilanduntersuchungen war es, die Verfahren auf grundsätzliche Eignung für ein GVO-Umweltmonitoring zu prüfen. Als wesentliche Größen gelten: Standardisierbarkeit, Sensitivität, Nachweisgrenze, Reproduzierbarkeit und Repräsentanz.

Als Verfahrensansatz wurde eine Gradientenprüfung gewählt. Zur Auswahl der Standorte wurden vorab Ausbreitungsrechnungen gefahren und dementsprechend Pollensammler in unterschiedlichen Windrichtungen und Entfernungen von der Freisetzungsfäche dergestalt angeordnet, dass dabei ein Pollengradient über mehrere Größenordnungen hinweg gleichmäßig repräsentiert wird. Im Hinblick auf die Auswertung wurde die Einstufung der Standorte nach Versuchsdurchführung anhand der konkreten Windverhältnisse vorgenommen. An ausgewählten Standorten wurden zusätzlich Parallelmessungen durchgeführt. Aus Gründen der besseren Nachvollziehbarkeit wurden die Ergebnisse aus den Ausbreitungsrechnungen, die für die Standortwahl entscheidend waren, im folgenden Methodenteil berücksichtigt. Der Verfahrensansatz stammt aus der Immissionswirkungsüberwachung von Emittenten und gilt als sehr effizient (Matthis & Klein 1994, Hofmann et al. 2001).

2.7 Untersuchungsgebiete und GVO

Von den vier für GVO prioritären Pflanzen Raps, Mais, Zuckerrübe und Kartoffel (Umweltbundesamt 2001) standen verschiedene Freisetzungsfächen in Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen, Brandenburg, Sachsen-Anhalt und Bayern zur Wahl. Für HR-Winterraps, Bt- und HR-Mais und VR-Zuckerrübe konnten die in Abb. 2.7.1

dargestellten GVO-Freisetzungsflächen und Referenzbereiche als geeignete Untersuchungsgebiete in 2001 gewählt werden⁸³.

<p>Rapsperiode (April/Mai 2001)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sickte - HR-Raps BBA; NLÖ, Nds. - Raum Kelheim Referenz; LfU Bayern • Bayer. Wald Referenz; Integr. Umweltbeob. <p>Sommerperiode (Juni-Aug 2001)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sickte - HR-Mais BBA, Nds. • Aachen - VR-Zuckerrübe - Bt-Mais RWTH, NRW • Schwarzenau - Bt-Mais Versuchsgut <p>Ergänzungsstandorte Referenz:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bremen • Nörten-Hardenberg • Freiburg 	
---	--

Abb. 2.7.1: Untersuchungsgebiete und GVO

Als Hauptversuch wurden in Kopplung mit dem Bund/Länder-Vorhaben Niedersachsen⁸⁴ transgene Rapsversuchsfelder bei Sickte in Niedersachsen gewählt, in deren Umgebung während der Rapsblühperiode von Mitte April bis Ende Mai technische Sammler und Bienenstöcke nach Vorgaben aus Ausbreitungsmodellen aufgestellt wurden. Zusätzlich wurden als Referenz die Räume Kelheim aus dem

⁸³ Für die Unterstützung und Kooperation danken wir den beteiligten Ländern

⁸⁴ NLÖ, siehe Zwischenbericht bei Hofmann et al. (2002) und Umweltbundesamt (2001)

Bund/Länder-Vorhaben Bayern I⁸⁵ und dem Bayerischen Wald gewählt, für die kein GVO-Rapsanbau bekannt war. Insgesamt wurden im Zeitraum der Rapsblüte 50 Standorte mit technischen Pollensammlern und 36 Standorte mit Bienenstöcken bestückt. Nach ca. 4 Wochen Expositionszeit wurden die Sigma-2-Folien, sowie die Pollenmassenfilter eingesammelt und zur Auswertung im Labor präpariert. Aus den Bienenstöcken wurden Honigproben entnommen.

Während der Blüte von Mais und Zuckerrübe wurden im Zeitraum Juli/August in der Umgebung von Versuchsfeldern mit transgenen Sorten bei Sickte (HR-Mais) und Schwarzenau (Bt-Mais) und bei Aachen (VR-Zuckerrübe und Bt-Mais) erneut Sammler und Bienenstöcke installiert und nach Beendigung der Blühperiode wiederum entsprechende Pollenproben entnommen.

Insgesamt wurden in den Freilandversuchen 74 Standorte mit technischen Sammlern sowie 52 Bienenstandorte mit Probenmaterial berücksichtigt. Eine Aufstellung der Standortdaten wird im Anhang gegeben.

2.7.1 Untersuchungsstandorte im Raum Sickte [HR-Raps]

Am Standort Sickte bei Braunschweig in Niedersachsen befinden sich Versuchsflächen der BBA (Biologische Bundesanstalt), auf denen Freisetzungsversuche mit HR-Raps der Firma Aventis über mehrere Jahre durchgeführt wurden und die für unseren Versuchszweck mitgenutzt werden konnten⁸⁶. Der Standort wurde in Absprache mit dem Bund-Länder-Modellprojekt des Landes Niedersachsen gewählt (NLÖ, FKZ 200 89 412/03), das dort seine Versuche zum Auskreuzungsverhalten von Raps unternimmt. Informationen zu den Raps-Versuchen des NLÖ finden sich bei Feldmann et al. (1998) und Feldmann (2000) sowie aktuell im Zwischenbericht 2001 des niedersächsischen Modellprojektes (Hofmann et al. 2002).

⁸⁵ LfU Bayern, siehe Theenhaus et al. (2002) und Umweltbundesamt (2001)

⁸⁶ Unser Dank für die freundliche Unterstützung gilt der BBA Braunschweig (Prof. Dr. Bartels und Dr. Schiemann mit MitarbeiterInnen), dem NLÖ Niedersachsen (Dr. Wieland, Dr. Hofmann) sowie Aventis Crop Science, jetzt Bayer Crop Science (Dr. Bübl., Dr. Harms).

Die Lage der HR-Rapsfläche (Hauptfeld A) aus dem Versuch in 2001 ist in Abb. 2.7.2 skizziert, Abb. 2.7.3 zeigt die Fläche aus der Luft. Das Versuchsfeld der BBA in Sickinge wurde mit einer transgenen HR-Rapssorte (Brassica napus, Experimentalhybride der Sorte Lister LL [RAW Nr. 1528, Transformate L65]) der Firma Aventis auf einer Fläche von ca. 48 m x 66 m = 0,303 ha bestellt. Hierbei handelt es sich um einen Winterraps mit Herbizidresistenz mit folgenden transgenen Eigenschaften: die Experimentalhybride enthält das synthetische pat-Gen unter Kontrolle des 35S-Promotors und -Terminators aus Cauliflower Mosaik Virus (Vektor pHOE 6Ac). Die RKI Freisetzungszahl des Versuches lautet: RKI AZ 6786-01-0101. Weitere Informationen zu den Raps-Freisetzungsvorbereitungen der BBA finden sich aktuell im Internet unter <http://www.bba.de>, <http://www.biosicherheit.de/projekte/5.proj.html> sowie allgemein unter <http://www.biosicherheit.de/raps/>.

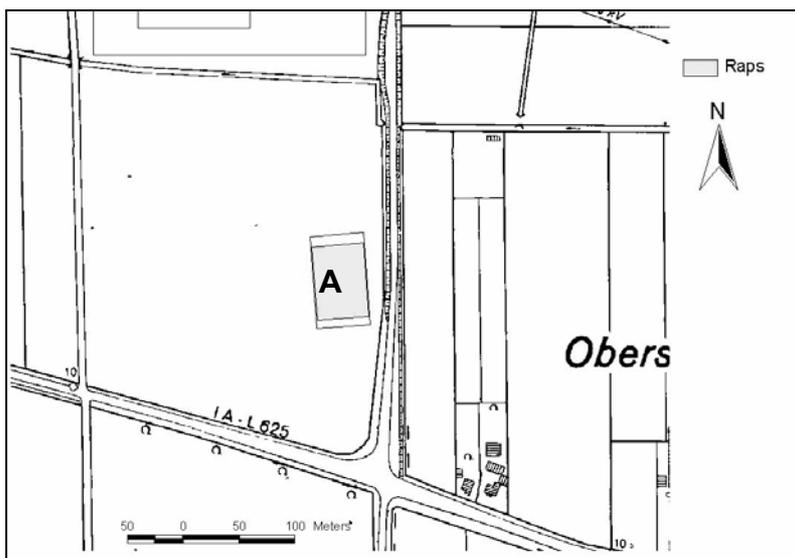


Abb. 2.7.2: Lageskizze des HR-Rapsversuchs (Hauptfeld A) bei Sickinge 2001



Abb. 2.7.3: Das HR-Rapsfeld (A) in Sichte aus der Luft (Aufnahme Brasse, BBA)



Abb. 2.7.4: Satellitenaufnahme der Umgebung des zentralen HR-Rapsfeldes A (Hauptfeld) sowie des Nebefeldes (B) bei Sichte zur Veranschaulichung der Landschaftsstruktur. Die Lage des Feldes ist markiert. (aus D-Sat5, Buhl/Euromap)

Der Untersuchungsraum mit seinen unterschiedlichen Freisetzungsversuchen liegt mit einer Gesamtausdehnung von ca. 65 km² im Bereich des Naturraumes „Ostbraunschweigisches Hügelland“. Diese Region ist gekennzeichnet durch eine stark wechselnde Durchmischung von pleistozänen und auch älteren Ablagerungen mit erdmittelalterlichen Resten aus Muschelkalk, Keuper- und Juraformationen.

Entstanden ist daraus eine flachwellige Landschaft in einer Höhenlage zwischen 80 und 130 m über NN. Es wechseln sich ackerbauliche Nutzungsformen (Schwerpunkt Raps, Hackfrüchte, Mais) mit Waldflächen ab, durchsetzt mit Siedlungen und einem Truppenübungsplatz.

Klimatisch macht sich eine spürbare Subkontinentalität des Klimas bemerkbar; die Jahresdurchschnittstemperatur liegt bei 8,6° C, in der Vegetationszeit (IV-IX) liegt die Temperatur bei 14,4 ° C. Die Niederschläge kommen im langjährigen Mittel auf 600 mm.

Als Untersuchungsgebiet wurde eine, der relativ geringen Größe des Versuchsfeldes angemessene, Raumzelle mit 8 x 8 km² definiert, mit dem Freisetzungsfeld A im Zentrum. Die Lage des Untersuchungsraumes mit dem HR-Rapsfeld A im Zentrum geht aus Abb. 2.7.5 hervor.

Am süd-westlichen Rande des Untersuchungsgebietes bei Salzdahlum befanden sich noch zwei weitere, kleinere Freisetzungsflächen für HR-Raps. Die Fläche B ist mit 0,2 ha (davon 0,1 ha HR-Raps) eine um 2/3 kleinere Fläche als das zentrale Hauptfeld A bei Sichte und wurde ebenfalls von der BBA bewirtschaftet (RKI-Freisetzungsnummer: AZ FB5 - 6786 - 01- 101). Die eingesetzte Rapssaat (Aventis, RAW 1365, Transformate GS 40/90) weist dieselben transgenen Eigenschaften auf wie das Zentralfeld. Der Einfluss auf den Polleneintrag wurde daher in der Auswertung berücksichtigt. Die andere HR-Rapsfläche C (Aventis/ Danisco, RKI-Freisetzungsnummer AZ FB5 - 6786 - 01- 90/101) befindet sich ebenfalls bei Salzdahlum. Diese wurde jedoch vor der Blüte geschlegelt (09.04.01), so dass hiervon keine Pollenfreisetzung erfolgte. Nach Auskunft

von Aventis tragen bei der eingesetzten GVO-Rapsorte alle Pollen aus einer transgenen Pflanze das Merkmal.

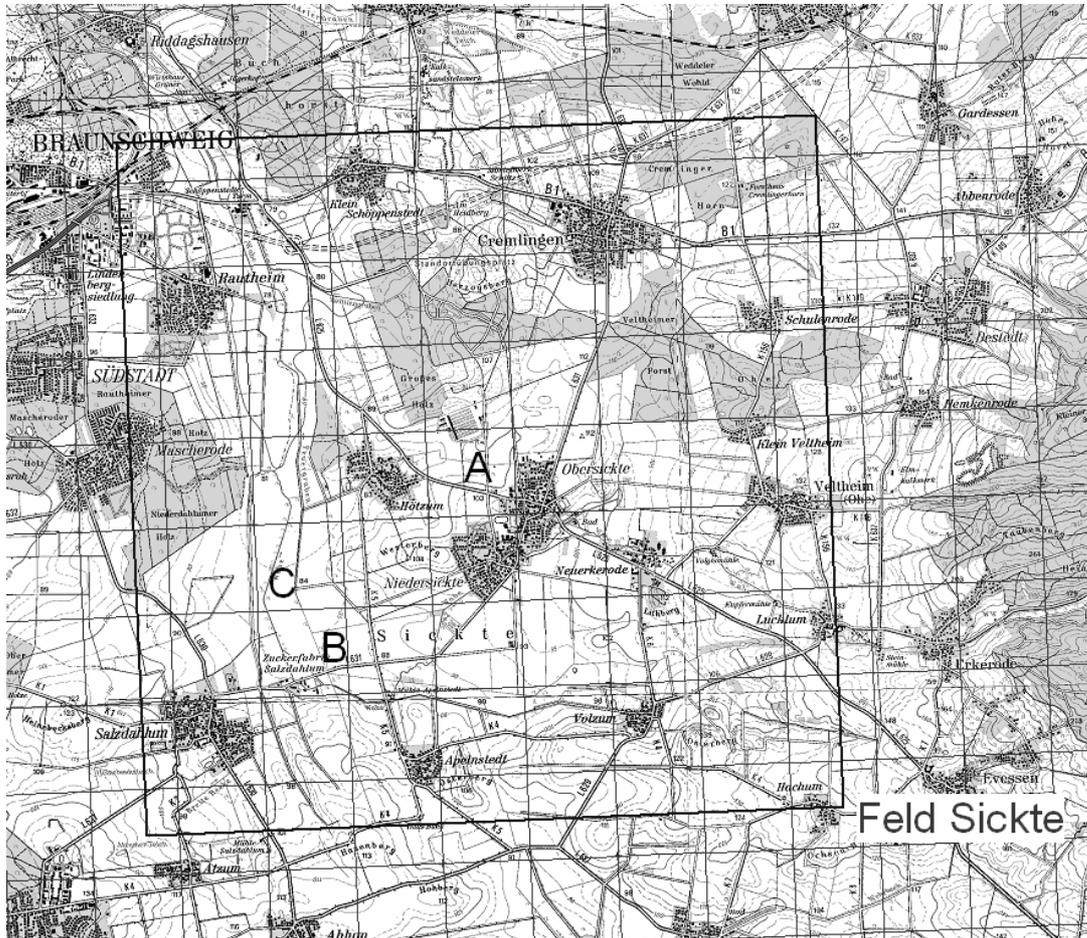


Abb. 2.7.5: Lage des Untersuchungsraumes von 8 x 8 km² mit der HR-Rapsfreisetzungsfäche Sickinge im Zentrum (Kartenausschnitt aus TOP50, TK 1:50.000 CD-ROM): Rahmen: Untersuchungsgebiet 8 x 8 km²

A: Lage des GVO-Haupttrapsfeldes (HR-Winterraps) bei Sickinge, 0,3 ha

B: Lage eines zweiten HR-Rapsfeldes, 0,2 ha (0,1 ha HR-Raps)

C: Lage eines dritten HR-Rapsfeldes ohne Pollenfreisetzung

Zur Standortwahl für die Gradientenprüfung wurden im Vorfeld von W. Wosniok, Institut für Statistik der Uni Bremen, die Windverhältnisse (Daten: DWD, FAL Braunschweig) der letzten 10 Jahre statistisch im Hinblick auf Windrichtung und -stärke

auf der Basis der Stundenwerte ausgewertet. Hierbei zeigte sich, dass der Bereich Sickte im Blühzeitraum des Rapses April-Mai eine homogene Windverteilung mit nur geringfügig häufigeren westlichen Richtungen aufweist. Dies erklärt sich aus der Lage in der Übergangszone zwischen maritimen und kontinentalen Klima. Unter Verwendung der langjährigen mittleren Windverhältnisse⁸⁷ wurden Ausbreitungsmodelle zur Abschätzung von Pollengradienten im Raum Sickte durchgerechnet.⁸⁸

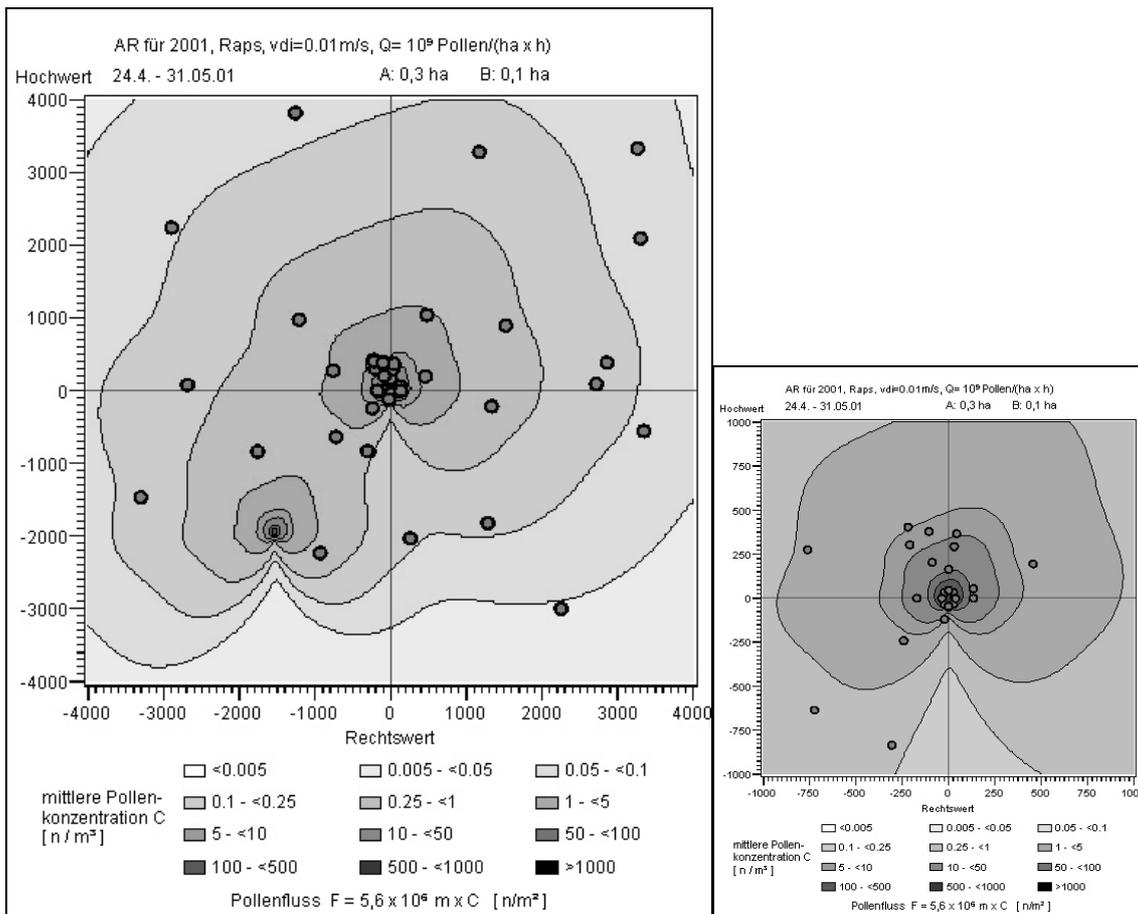
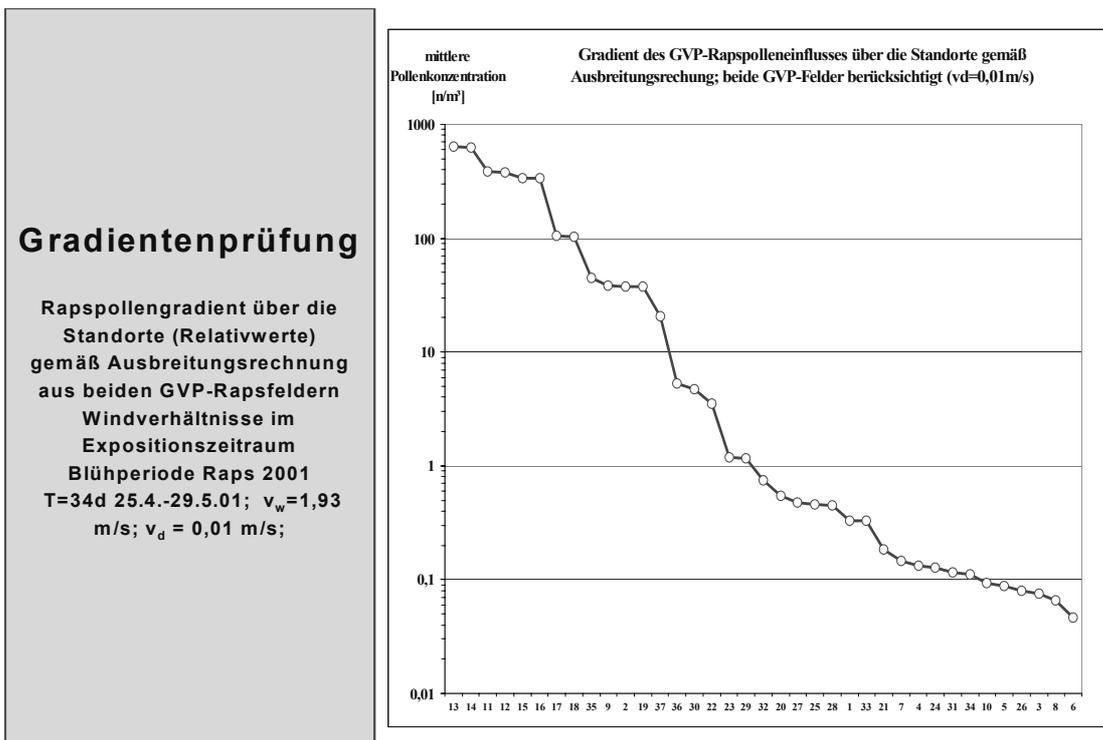


Abb. 2.7.6: Ergebnisse der Ausbreitungsrechnung für Rapspollen aus beiden GVO-Rapsfeldern (A, B) mit der Lage der Sammlerstandorte im 64 km² - Untersuchungsraum (links) und im zentralen 4 km² - Ausschnitt (rechts).

⁸⁷ Für die Überlassung der meteorologischen Grunddaten danken wir Dr. Vogt, Agrarmeteorologischer Dienst des DWD, Braunschweig

⁸⁸ Gauss-Modell für Partikeldepositionen, siehe Kap. 2.5

Hierbei wurde die Bandbreite an artspezifischen Unterschieden im Ausbreitungs- und Ablagerungsverhalten von Pollen über entsprechende Variationen der Depositionsgeschwindigkeit ($v_d = \{1; 5; 10; 20; 40; 60 \text{ [cm/s]}\}$) berücksichtigt. Die Standorte wurden dann im Abgleich mit den Ergebnissen aus den Ausbreitungsrechnungen für Rapspollen⁸⁹ und Begehungen im Frühjahr 2001 dergestalt festgelegt, dass geeignete Standorte in unterschiedlicher Entfernung und Windrichtung zum GVO-Rapsfeld gleichmäßig über einen Pollengradienten über mindestens vier Größenordnungen repräsentativ verteilt wurden. Von Relevanz sind dabei nur die relativen Unterschiede in der Pollenbelastung, nicht die Absolutwerte. Nach Vorliegen der Wetterdaten für 2001 wurden die Berechnungen über den Freisetzungszeitraum wiederholt, so dass die Standorteinstufung entsprechend den konkreten Windverhältnissen unter Einbeziehung beider Freisetzungsflächen erfolgen konnte. Die Ergebnisse sind in den Abb. 2.7.6 sowie Abb. 2.7.7 dokumentiert.



⁸⁹ als v_d für Rapspollen wurde der Wert 0,01 m/s angesetzt (siehe Kap. 2.1)

Abb. 2.7.7: Der Rapspollengradient der Standorte in Bezug auf den überlagerten Einfluss aus beiden GVO-Rapsfeldern (A, B). Die Standorte verteilen sich gleichmäßig über einen Gradienten von 5 Größenordnungen.



Abb. 2.7.8: Lage des Untersuchungsraumes bei Sickinge mit dem HR-Rapsversuchsfeld im Zentrum und den Standorten für die technischen und biologischen Pollensammler in der 8 x 8 km² Raumzelle. Für die Standorte im Nahbereich des Feldes siehe die Ausschnittskarten in den Abb. 2.7.9 und Abb. 2.7.10. (Kartenauschnitt aus TOP50, TK 1:50.000 CD-ROM; Raster = 1 km)

In Abb. 2.7.8 sind die Standorte für die technischen und biologischen Sammler im 8km x 8km = 64km²– Untersuchungsgebiet auf topographischer Kartengrundlage zu sehen. Abb. 2.7.9 zeigt den Ausschnitt der näheren Umgebung des Freisetzungsfeldes mit den

Standorten der technischen Pollensammler. Die Standorte direkt am Feld, sowie die Standorte 2/9 nord-östlich, wurden als Parallelmessungen konzipiert. Die entsprechende Lage der Bienenstandorte als biologische Pollensammler geht aus Abb. 2.7.10 hervor. Diese unterscheiden sich im Nahbereich der GVO-Fläche von den technischen Sammlern, da für die Bienenstöcke auf Grund des begrenzten Trachtangebotes im engeren Umfeld ein Mindestabstand zu wahren war. Der Standort direkt am Feld wurde als Parallelmessung mit zwei Stöcken belegt (B13/B14).

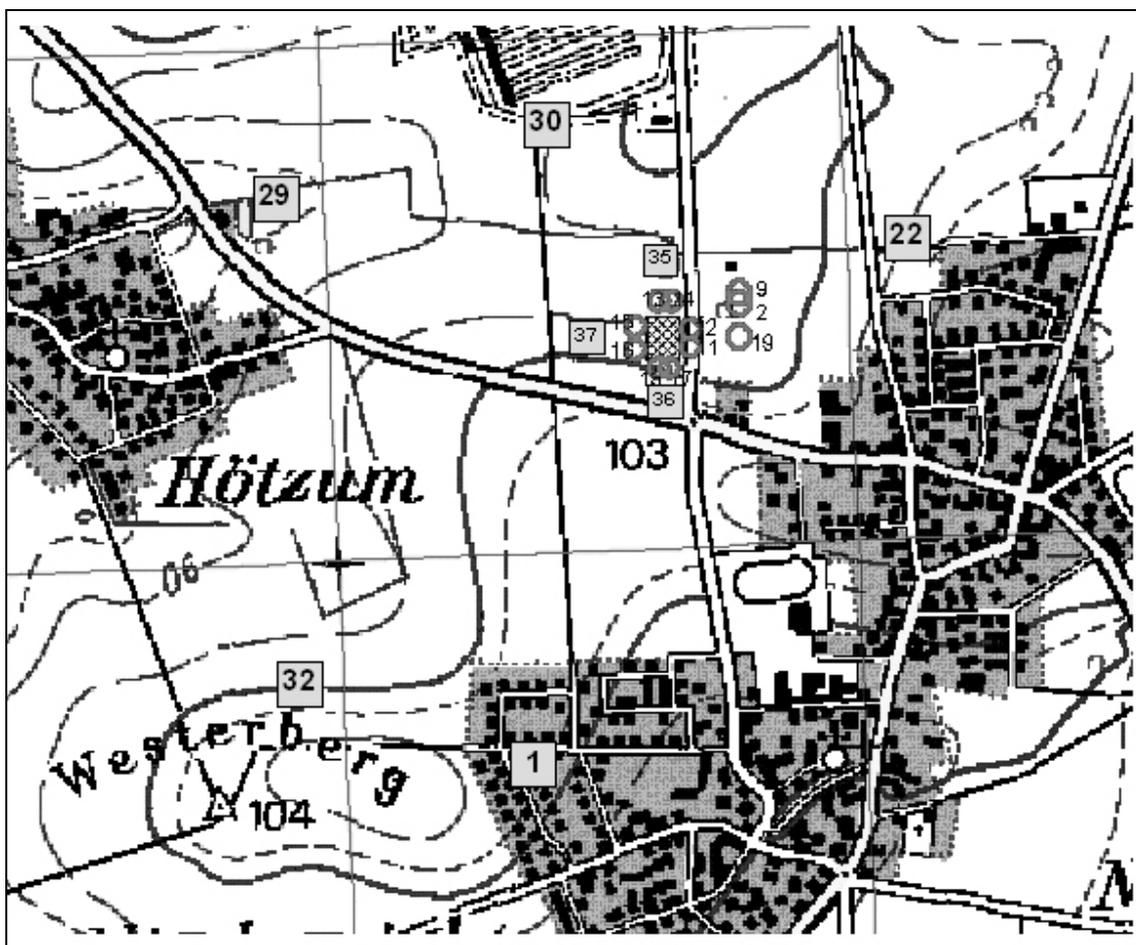


Abb. 2.7.9: Ausschnitt aus Abb. 2.7.8 zum Untersuchungsraum bei Sickinge mit dem HR-Rapsversuchsfeld und den Standorten für die technischen Pollensammler in der näheren Umgebung. (Kartenausschnitt aus TOP50, TK 1:50.000 CD-ROM; Raster: 1 km). Die Standorte unmittelbar um das HR-Rapsfeld tragen die Nummern 11-18; die drei östlich davon: 2, 9, 19)

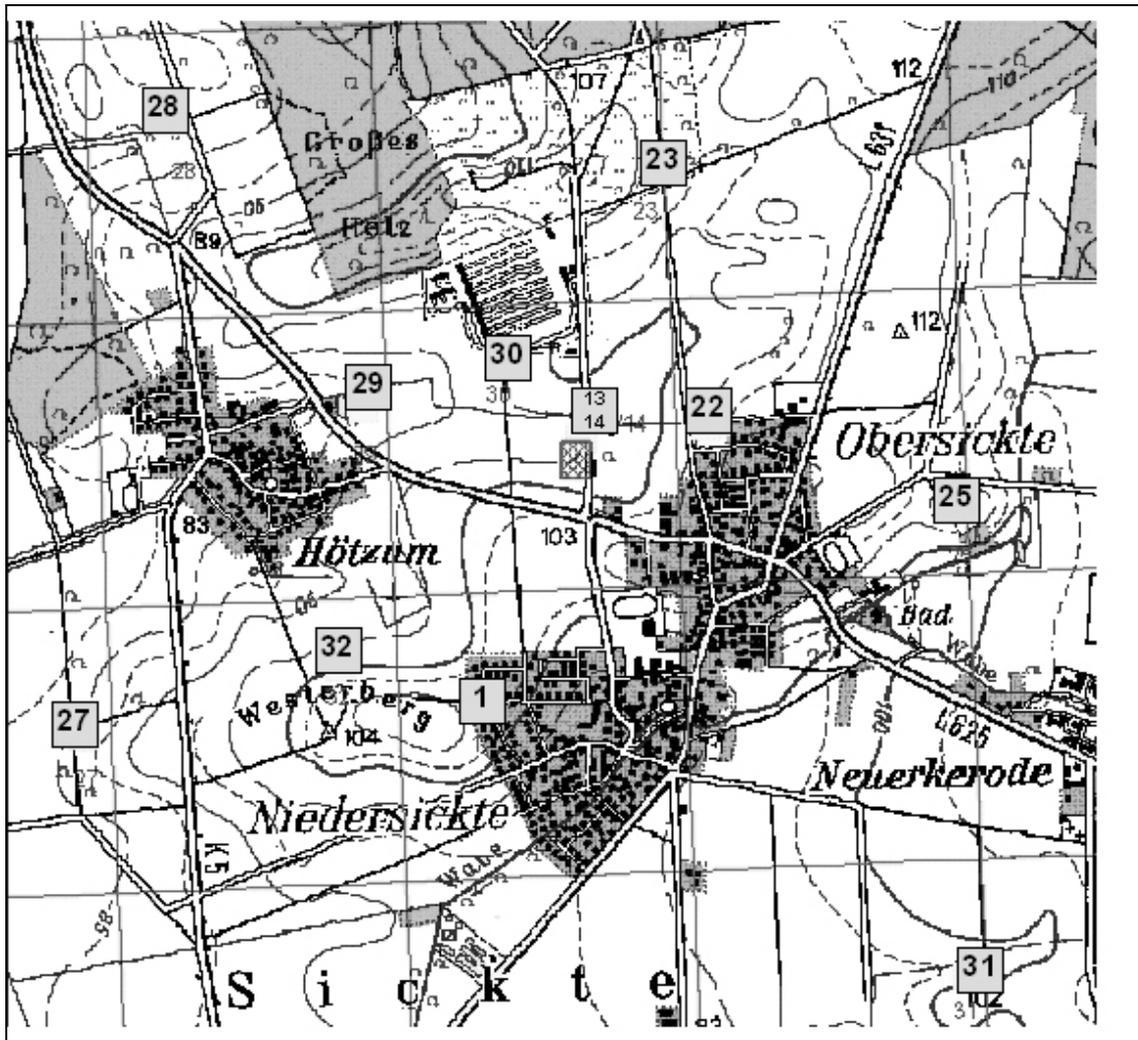


Abb. 2.7.10: Ausschnitt aus Abb. 2.7.8 zum Untersuchungsraum bei Sickinge mit dem HR-Rapsversuchsfeld und den Standorten für die Bienenstöcke der biologischen Pollensammlerin Honigbiene (*Apis mellifera*) in der näheren Umgebung. Im weiteren Umfeld ist die Lage der technischen und biologischen Sammler identisch. (Kartenausschnitt aus TOP50, TK 1:50.000 CD-ROM)

Die Exposition der Sammler erfolgte über den Blühzeitraum des Rapses (Beginn: 24.-30.4.01; Ende: 25.-28.5.01). Insgesamt wurden im Raum Sickinge während des Expositionszeitraumes 37 technische Pollensammler und 23 Bienenstöcke als biologische Sammler eingesetzt.

2.7.2 Referenzräume Kelheim und Bayerischer Wald [Raps]

In Kooperation mit dem Bund-Länder-Modellprojekt Bayern I und II (LfU Bayern, Dr. Theenhaus, Dr. Peichl) wurde der Referenzraum Kelheim berücksichtigt. Ziel der dortigen Versuche des LfU, die auf 57 1-km² großen Planquadraten über mehrere Jahre durchgeführt werden, ist die Entwicklung und Erprobung von Methoden für ein Langzeitmonitoring möglicher Auswirkungen des Anbaus gentechnisch veränderter Pflanzen (GVP) auf Pflanzengesellschaften am Beispiel der Rapsausbreitung. In den Rasterfeldern werden systematisch Pflanzenproben der Kreuzblütler entnommen und u.a. auch mit PCR-Methoden auf Transgene untersucht. Im Untersuchungsraum wird unter anderem Raps angebaut, jedoch ist für diesen Bereich keine GVO-Freisetzung bekannt, so dass die dortigen Untersuchungen zu Referenzzwecken dienen. In dem reichhaltig gegliederten Naturraum finden sich zahlreiche potentielle Kreuzungspartner des Rapses. Neben Raps werden dort auch Rüben unter Hopfen angebaut. Die Versuche sind bei Theenhaus et al. (2002) näher erläutert. Die Lage der Untersuchungsgebiete und -standorte geht aus Abb. 2.7.11 hervor.

Der Untersuchungsraum umfasst 5.700 ha und erstreckt sich zwischen Kehlheim und Neustadt/D innerhalb der Naturräume "Südliche Frankenalb" und "Donau-Isar-Hügelland". Aufgrund der geologischen Ausgangssituation herrschen im Norden stark kupierte Landschaften aus Jura-Kalken in einer Höhenlage von ca. 450 m vor, die nach Süden hin bis auf 350 m abfallen und durch alluviale Sedimente geprägt werden. Entsprechend dominieren im Norden waldreiche Areale mit Grünland, im Süden ackerbauliche Nutzungen mit Schwerpunkt Hopfen, Mais, Getreide, Raps u.a.m.. Die Jahresmitteltemperatur beträgt 8,9° C, innerhalb der Vegetationszeit 14,8° C; die jährlichen Niederschläge liegen bei 640 mm.

Entsprechend den vorliegenden Kenntnissen der LfU und einer gemeinsamen Begehung wurden innerhalb dieses Gebietes sieben Bereiche definiert, die unterschiedliche naturräumliche Gliederungen repräsentieren. In diesen Bereichen konnten unter Mitwirkung der Imker vor Ort geeignete Bienenstandorte ausgewählt werden, an denen Honigproben gewonnen und technische Sammler aufgestellt wurden. Zudem wurde die

im Raum befindliche Dauermessstation für Immissionen (LÜB-Station Eining) mit einem technischen Sammler berücksichtigt. Die Lage der Standorte ist in Abb. 2.7.11 verzeichnet.

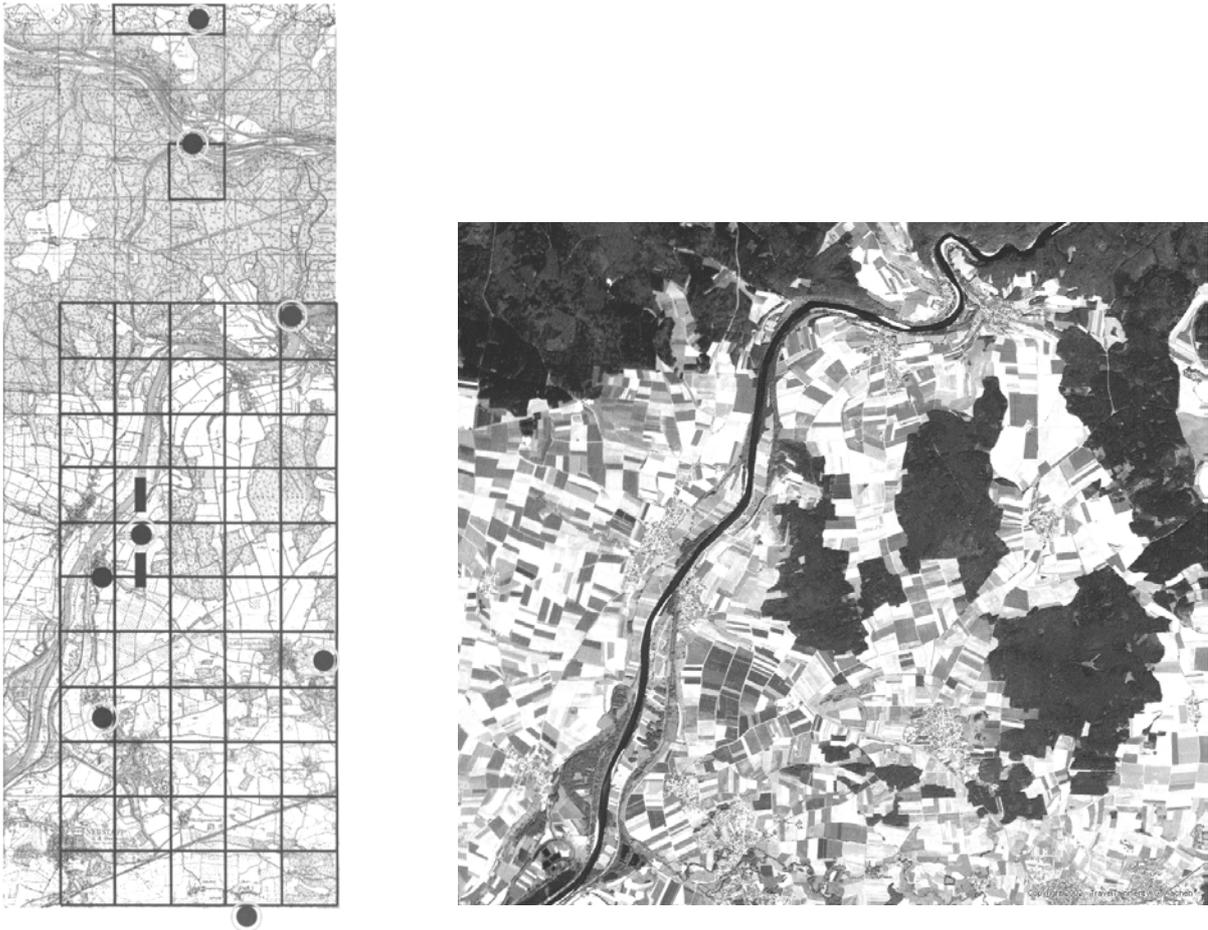


Abb. 2.7.11: Referenzraum Kelheim aus dem Bund-Länder-Modellprojekt Bayern I+II mit den 57 km²-Rasterfeldern des bayerischen Vorhabens der LfU sowie den Standorten für die Pollensammler (links, Kartenausschnitt aus TOP50, TK 1:200.000 CD-ROM). Rechterhand Satellitenaufnahme zur Landschaftsstruktur im Raum Kelheim (aus D-Sat5, Buhl / ©Euromap)

- Technische und biologische Pollensammler
- Technische Sammler
- Biotop mit 10 Dauerbeobachtungsparzellen der LfU

Des Weiteren wurde in Kooperation mit der Forschungsstelle zur Integrierten Umweltbeobachtung (Dr. B. Beudert, Nationalparkverwaltung Bayerischer Wald; Dr. Hoffmann, UBA Aussenstelle Langen) ein Referenzstandort im Umfeld des Forschungsstandortes „Forellenbach“ im Nationalpark Bayerischer Wald einbezogen (Abb. 2.7.12).⁹⁰ Dieser Standort ist auf einer ca. 1 km² große Rodungsinsel mit Grünlandnutzung inmitten der großräumigen Waldlandschaft des Bayerischen Waldes an der Grenze zu Tschechien angesiedelt. Die klimatischen Bedingungen werden durch die Höhenlage von 835 m geprägt. Die Jahresmitteltemperatur beträgt nur 5,9° C, in der Vegetationszeit (IV – IX) steigt sie auf 11,0° C; die Niederschläge liegen bei 1360 mm. Der Standort liegt weitab jeglichen Rapsanbaus. Die technischen Sammler wurden über den Zeitraum der Rapsblüte in der Region vom 19./20.4.-29.5.2001 exponiert. Die Honigernte fand ebenfalls nach Ende der Rapsblüte statt.



Abb. 2.7.12: Lage des Referenzstandortes (48) im Bayerischen Wald in der Nähe des Forschungsstandortes „Forellenbach“ zur Integrierten Umweltbeobachtung. (Kartenausschnitt aus TOP50, TK 1:50.000 CD-ROM)

⁹⁰ siehe Beudert et al. (1997)

2.7.3 HR-Mais in Sickte

In Kooperation mit der BBA in Braunschweig (Prof. Dr. G. Bartels, Dr. J. Schiemann, Dr. Meier-Bethke) konnte ein Freisetzungsfeld mit einer transgenen Maissorte genutzt werden, in dessen Umgebung 14 technische Sammler und Bienenstöcke platziert wurden. Die Expositionszeit der Sammler erfolgte vom 20.7.-16.8.01 im Hauptblühzeitraum von Mais.

Der Freisetzungsversuch der BBA wurde im Rahmen eines Projektes zum Monitoring gentechnisch veränderter Pflanzen des BMBF unternommen, mit dem Ziel, die Einkreuzung transgener Eigenschaften aus Mais in benachbarte nicht-transgene Felder zu untersuchen und Methoden zur Quantifizierung transgener Kontaminationen im Erntegut zu etablieren. Nähere Information zu den Maisversuchen der BBA finden sich bei <http://www.biosicherheit.de/projekte/106.proj.html>.

Die Feldgeometrie des Freisetzungsversuches geht zusammen mit den umliegenden Pollensammlern aus Abb. 2.7.13 hervor. Der Versuch besteht aus einer komplexen Anordnung von konventionellem und transgenen Mais-Flächen sowie einer Randkultur mit Klee. Die Maisfläche insgesamt beträgt 4,2 ha, davon sind 3 ha der konventionellen Sorte zuzusprechen und 1,2 ha dem GVO-Mais. Die Konfiguration der Sammlerstandorte in der weiteren Umgebung sind in Abb. 2.7.14 dargestellt.

Die verwendete transgene Maissaat stammt von der KWS Saat AG, Einbeck. Es handelt sich um HR-Mais der Sorte Artuis (T25). Sie enthält das pat-Gen aus dem Bakterium *Streptomyces viridochromogenes* für Herbizidtoleranz (Glufosinat, den 35S-Promotor sowie eine verkürztes Betalaktamasegen als Marker. Bei der Hybridsorte sind 50% der Maispollen, die von den GVO-Pflanzen stammen, als transgen zu erwarten.

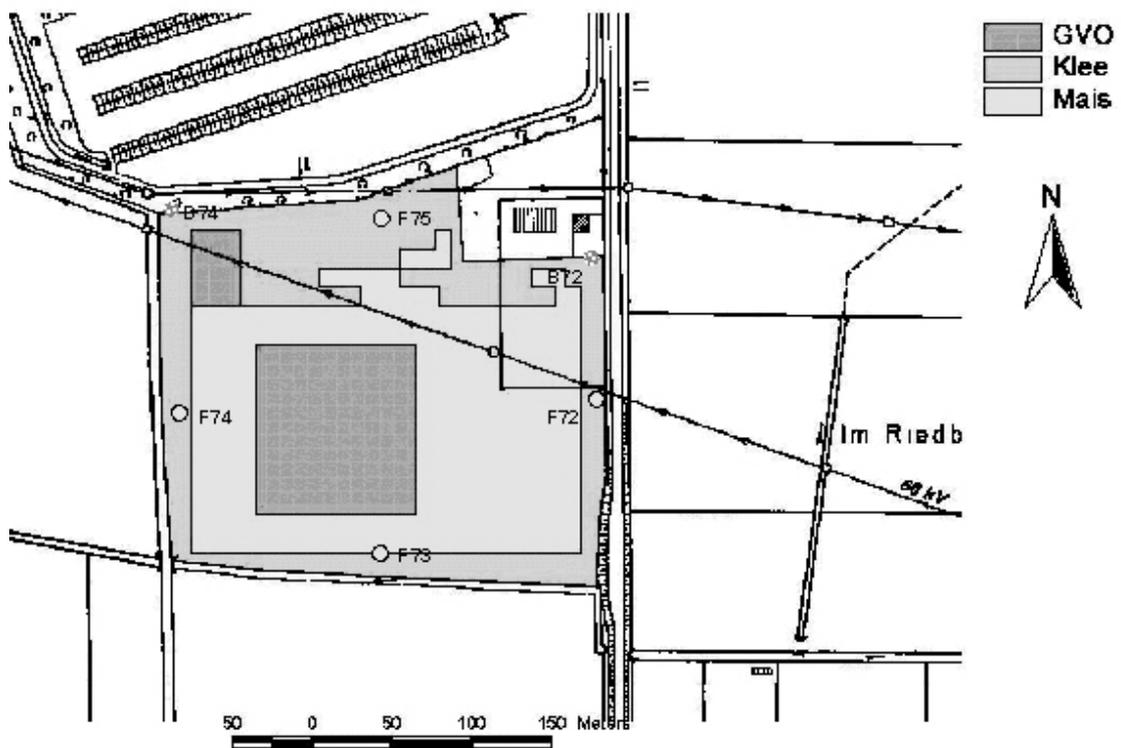


Abb. 2.7.13: GVO-Maisfeld der BBA in Sickte mit benachbarten Sammlerstandorten (Feldskizze BBA):

F Technische Sammler (Sigma-2/PMF)

B Biologischer Sammler (Bienenstock)

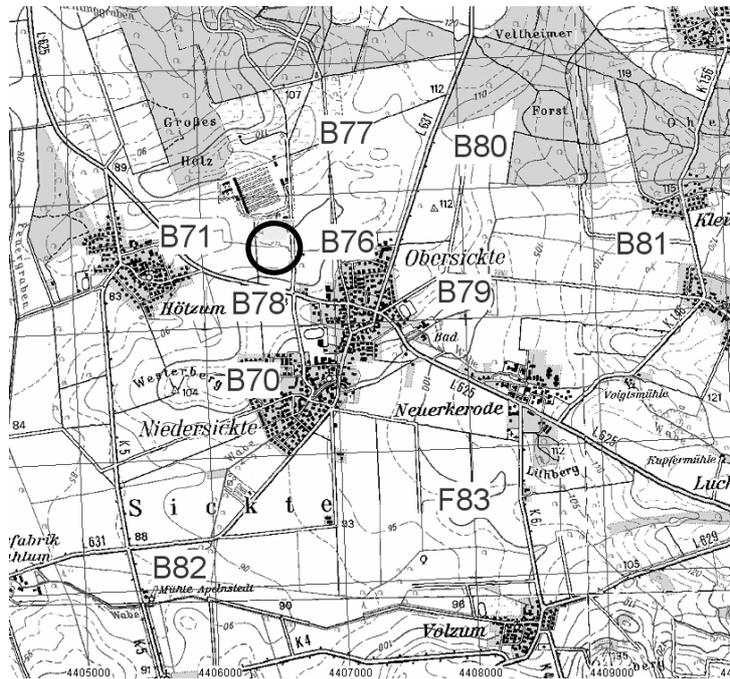


Abb. 2.7.14: Standorte für die technischen und biologischen Pollensammler im weiteren Umfeld des GVO-Maisfeldes in Sickinge. Die im Nahbereich des Feldes (Kreis) befindlichen Standorte gehen aus der vorherigen Abbildung hervor (Kartenausschnitt aus TOP 50, TK 1:50.000 CD-ROM)

Unter Berücksichtigung der konkreten Windverhältnisse (Daten: BBA) über den Freisetzungszeitraum sowie der Feldgeometrie wurde von W. Wosniok für das Maisfeld eine Pollenausbreitungsrechnung (Gauss-Modell nach TA Luft, Partikeldeposition. modifiziert für Pollenausbreitung von Mais mit $v_d = 20 \text{ cm/s}$ (siehe Kap. 2.5) durchgeführt, deren Ergebnisse mit Zuordnung der Standorte zum Pollengradienten in Abb. 2.7.15 ersichtlich ist.

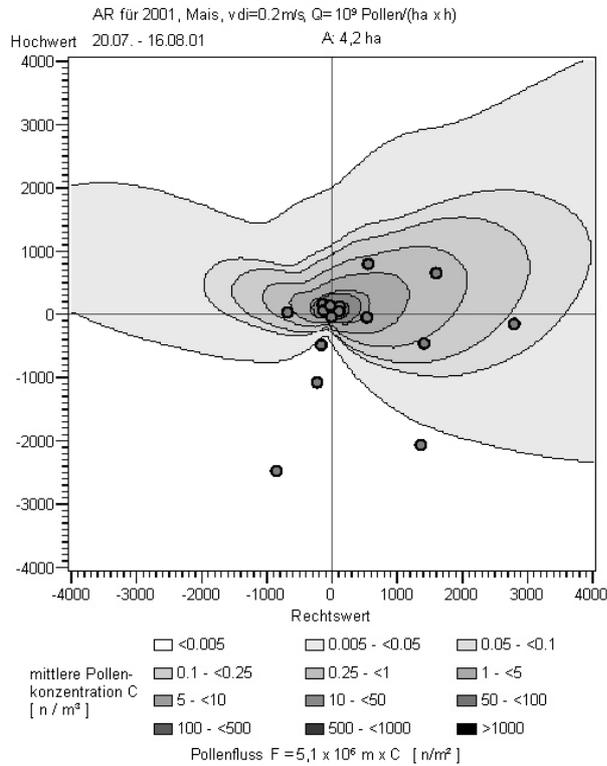


Abb. 2.7.15: Ergebnisse der Ausbreitungsrechnung für Maispollen im Umfeld des HR-Maisfeldes in Sickinge mit Zuordnung der Sammlerstandorte zum Mais-Pollengradienten gemäß der konkreten Windverhältnisse im Expositionszeitraum 20.7.-16.8.01.

2.7.4 VR-Zuckerrübe und Bt-Mais in Aachen

In Kooperation mit der RWTH Aachen in NRW (PD Dr. D. Bartsch, Prof. Dr. I. Schuphan) und dem dort tätigen Wanderimker Herrn Vossen konnte eine Freisetzungsfäche mit Virus-resistenter Zuckerrübe mit neun technischen Sammlern und fünf Bienenstandorten bedacht werden, in deren Nachbarschaft sich zudem eine Bt-Maisfläche befand. Die Konfiguration der Sammler geht aus Abb. 2.7.16 hervor. Die Größe der VR-Zuckerrübenfläche betrug 60 qm, die der Bt-Maisfläche 50 qm. Die Expositionszeit umfasste den Hauptblühzeitraum von Zuckerrübe und Mais (19.6.-9.8.01).

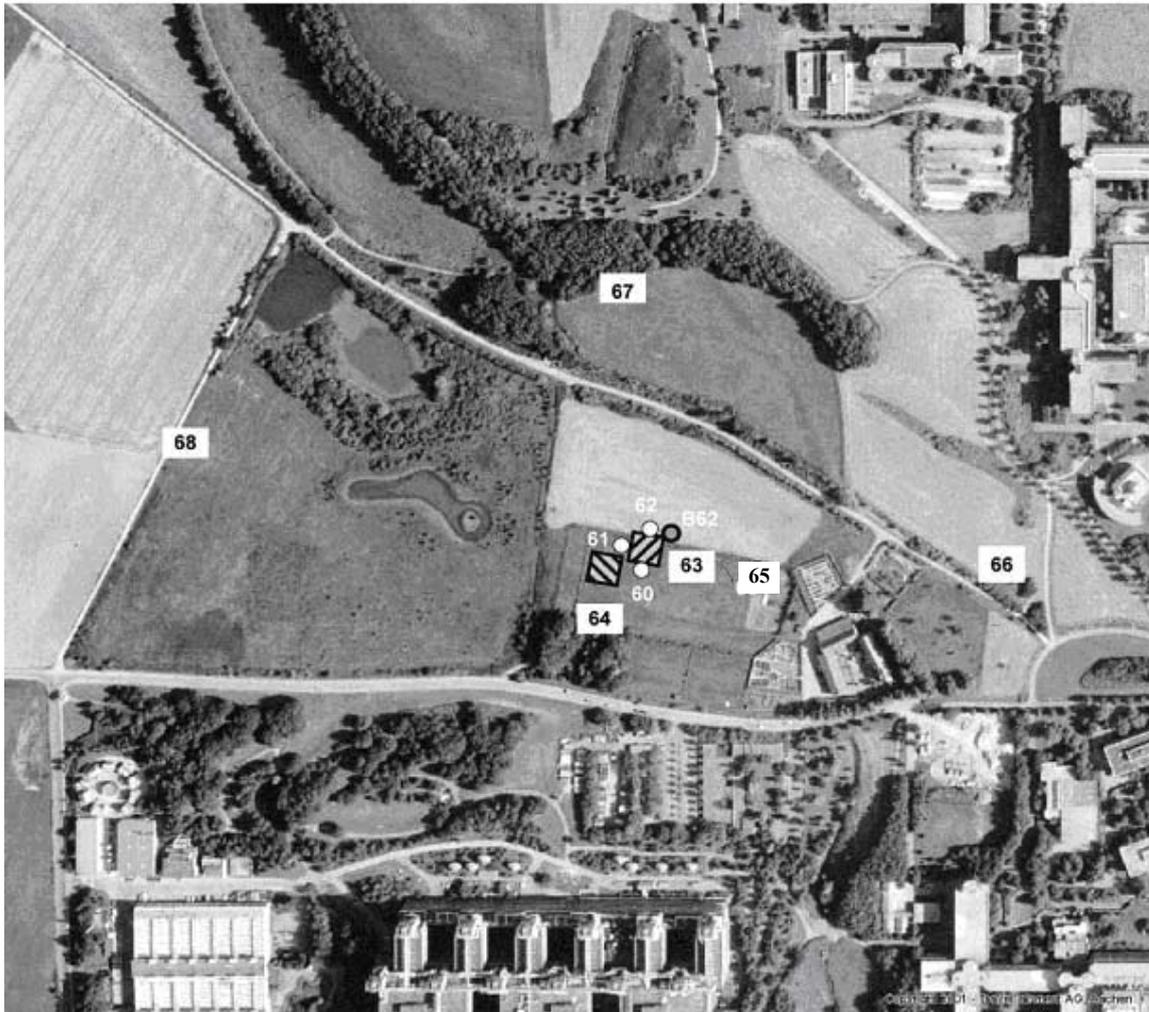


Abb. 2.7.16 Satellitenaufnahme mit Umgebung der Versuchsfelder der RWTH Aachen und den Standorten der Pollensammler (aus D-Sat5, Buhl/Euromap):

▧ VR-Zuckerrübe

▣ Bt-Mais

Nr Technischer Sammler (PMF/Sigma-2) und biologischer Sammler (Bienenvolk)

B Biologischer Sammler (Bienenvolk zeitweise)

Die Versuche fanden auf der Fläche des Gutes Melaten statt. Dieses liegt eingebettet in einer kleinen Mulde, umgeben von sehr heterogenen Strukturen (Klinikum, Technische

Hochschule, Landwirtschaft, Golfplatz, Waldinseln u.a.m.). Insgesamt ist die Umgebung flachwellig, entstanden aus Ablagerungen der Kreide mit diluvialen Deckschichten. Bei einer Höhenlage von ca. 200 m macht sich eine verstärkte Atlantizität, mit einer Jahresdurchschnittstemperatur von 10,1° C, 14,6° C während der Vegetationszeit und Niederschlägen vom 800 mm, bemerkbar.

Bei den Freisetzungsversuchen mit der VR-Zuckerrübe handelt es sich um Langzeitversuche zur ökologischen Sicherheitsforschung mit dem Ziel der Entwicklung und Erprobung von Handlungsanweisungen für das ökologische Langzeitmonitoring von Wild- und Unkrautpopulationen der Art *Beta vulgaris* [BMBF-Vorhaben]. Die Zuckerrübensaat stammt von der KWS Saat AG, Einbeck. Es handelt sich um den transgenen Genotyp Ac083 der Kreuzung Zuckerrübe und niederländischer Wildrübe mit dem KWS-Transformationsereignis T210-3. Es enthält als transgene Merkmale das cpBNYVV- Hüllprotein für die Resistenz gegenüber Rhizomania-Viren und das nptII-Gen als Marker gegen Kanamycin sowie den Promotor 35S. Die RKI Freisetzungsnummer des Versuches lautet 6786-01-67. Die Anordnung bestand hälftig aus transgenen und nicht-transgenen Pflanzen. Da die Transgenen heterozygot sind, tragen nur die Hälfte der Pollen aus den transgenen Pflanzen diese Eigenschaften, so dass im Endeffekt 25% der luftgetragenen Pollen aus dem Zuckerrüben-Versuchsfeld als transgen zu erwarten sind.

Ziel des BMBF-geförderten Vorhabens zum Bt-Mais ist die Dauerwirkung des Botulin-Toxins von Maispflanzen auf den Maiszünsler und andere Insekten in der Umwelt zu untersuchen. Es handelte sich hier um die Bt-Maissorten Bt176 Syngenta prelude mit gewebespezifischem Promotor und zusätzlicher HR-Resistenz (Liberty) sowie der Bt-Maissorte MON 810 Novelis (Monsanto) mit dem Transgen Bt cry1Ab sowie 35S als Promotor. Die Feldanordnung bestand auch hier zu 50% aus nicht-transgenen und 50% transgenen Pflanzen, letztere aufgeteilt auf die beiden Sorten. Aufgrund der Heterozygotie sind wiederum 25% der aerogenen Maispollen aus dem Feld als transgen anzunehmen, wobei für einzelne Eigenschaften, die nur in einer der beiden transgenen Sorten vorkommt, wie dem 35S-Promotor, die Hälfte, also 12,5% gilt. Der Versuch zum

Bt-Mais hat keine Freisetzungsnummer, da bereits eine Genehmigung zum Inverkehrbringen (Part C) bestand.

Weitere Informationen zu den Zuckerrüben- und Maisversuchen der Aachener Arbeitsgruppe finden sich bei: Saeglitz et al. (2000), Bartsch et al. (1999) und unter <http://www.biosicherheit.de/projekte/89.proj.html> und http://www.rwth-aachen.de/bio5/Ww/i_arbeitsgruppen/ba_homepage/ba_homepage.html.]

2.7.5 Bt-Mais in Schwarzenau

Im Bereich der Ortschaft Schwarzenau befinden sich die Versuchsflächen der Bayer. Staatlichen Lehr- und Versuchsanstalt⁹¹, an denen Versuche mit Bt-Mais durchgeführt wurden.

Das Untersuchungsgebiet liegt im Bereich des Main, der hier die „Fränkische Platte“ durchzieht. Das umgebende, leicht wellige Hügelland in einer Höhenlage von ca. 200 m bis 280 m über NN besteht aus Lößüberlagertem Muschelkalk, während im Bereich der Schwemmzone des Main alluviales Material vorliegt. Aufgrund der hohen Bodenfruchtbarkeit dieses Raumes herrschen ackerbauliche Nutzungsformen vor; lediglich auf topografisch ungünstigen Standorten stocken Wälder und extensive Grünlandformen. Bei günstiger Exposition wird Weinbau betrieben. Die Jahresmitteltemperatur liegt bei 9,5°C, in der Vegetationszeit (IV – IX) steigt sie auf 15,1 ° C an. Die Jahresdurchschnittswerte der Niederschläge liegen zwischen 600 und 650 mm.

Im Untersuchungsgebiet befanden sich süd-westlich von Schwarzenau zwei Maisversuchsflächen der bayerischen Versuchsanstalt (Abb. 2.7.17). Hierbei wurden auf einer Fläche von 2 ha transgener Mais (BT 176 der Fa. Monsanto – Mon 810) freigesetzt (südwestliche Fläche) und in der Zeit vom 25.07. bis 21.08.2001 acht technische

⁹¹ Wir danken Dr. Lindner, Staatl. Lehr – und Versuchsanstalt Schwarzenau sowie Frau Polzer, Bienenprüfhof Schwarzenau und Dr. Mautz, Bayer. Landesanstalt für Bienenzucht, Erlangen

Sammler sowie acht Bienenvölker des dortigen Bienenprüfhofes wie in der Abbildung skizziert aufgestellt.

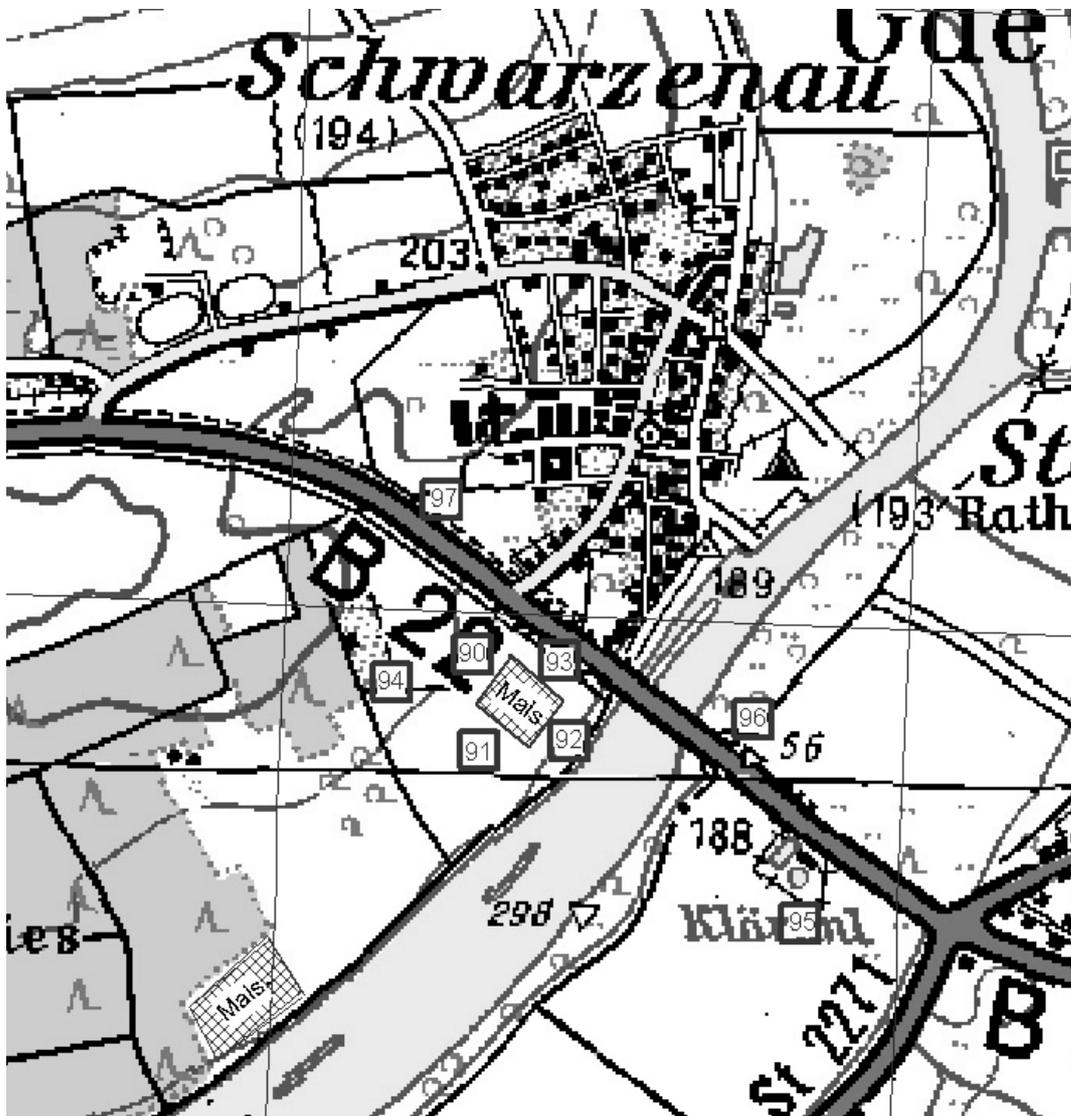


Abb. 2.7.17: Lage der Mais-Versuchsfelder und Untersuchungsstandorte bei Schwarzenau/Franken.

2.7.6 Ergänzungsstandorte: Bremen, Nörten-Hardenberg, Freiburg

Ergänzend wurden Standorte in Bremen (Ökologiebüro; 25.4.-21.5./26.5.01), bei TIEM in Nörten-Hardenberg (30.4.-27.5.01) sowie beim DWD (13.7.-27.7.01) in Freiburg untersucht.

2.8 Statistik

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgten mit den Programmen SAS Version 8.2 (SAS INSTITUTE INC. 2001) und Excel 2000.

2.8.1 Behandlung von Werten unter der Nachweisgrenze bei Pollenzählungen

Werte unter der Nachweisgrenze enthalten im Gegensatz zur Nicht-Messung eine Information, die bei der weiteren statistischen Auswertung berücksichtigt wurde. In allen Berechnungen aus den Pollenzählungen⁹² wurden Werte unter der jeweiligen Nachweisgrenze durch die 0,67-fache Nachweisgrenze ersetzt. Dies entspricht der Erfahrung, dass Werte unter der Nachweisgrenze in guter Näherung einer Dreiecksverteilung im Bereich zwischen Null und Nachweisgrenze folgen, deren Erwartungswert gerade das 0,67-fache der Nachweisgrenze beträgt.

2.8.2 Verteilung von Pollendaten und Dichteschätzung

Die Gesamtheit aller gemessenen Werte zur Pollenkonzentration, -deposition oder -fluss weist eine Streuung auf, die auf mehrere Ursachen zurückzuführen ist.

Ein Streuungsanteil ist auf zufällige Einflüsse zurückzuführen, die selbst bei wiederholten Messungen am selben Standort und identischem Ausbreitungsverhalten der Pollen auftreten würden. Wären sehr viele Wiederholungen solcher Messungen unter identischen Bedingungen möglich, so würde der Mittelwert dieser Messergebnisse dem Gesetz der großen Zahlen folgend gegen eine feste Zahl, den Erwartungswert, konvergieren. Die zufällige Abweichung eines Messwerts vom Erwartungswert wird üblicherweise als Stichprobenfehler bezeichnet. Seine Größe folgt einer diskreten Wahrscheinlichkeitsverteilung, da nur ganzzahlige Anzahlen gemessen werden können, die überdies nicht negativ sein können. Häufig weisen solche Anzahlen eine Poisson-

⁹² für PCR-Ergebnisse siehe Kapitel 2.4.6

Verteilung auf. Diese kann für sehr große Stichproben durch eine Normalverteilung, besser durch eine log-Normalverteilung angenähert werden. Deren Parameter (Mittelwert und Varianz) hängen im Allgemeinen vom Parameter der unterliegenden Poisson-Verteilung ab. Die Annahme einer Normalverteilung für beobachtete Pollenanzahlen ist schon deswegen fragwürdig, weil gemäß einer Normalverteilung auch negative Anzahlen mit einer Wahrscheinlichkeit über Null auftreten würden. Die Verteilung des zufälligen Fehlers ist für die unten beschriebenen Rechnungen zu Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Nachweisgrenze von Bedeutung.

Ein weiterer Streuungsanteil entsteht durch systematische Unterschiede zwischen Messwerten an verschiedenen Standorten, die allein wegen dieser verschiedenen Standorte, d.h. auch ohne jede zufällige Variation, unterschiedlich sind. Das Ausmaß dieser Streuung hängt vom Probenahmeplan ab. Verschiedene Probenahmepläne im selben Gebiet führen zu verschiedenem Ausmaß der systematischen Streuung und auch zu unterschiedlichen Verteilungen des systematischen Fehlers.

Weiterhin wird die Streuung von Messwerten von den Eigenschaften der beteiligten Messgeräte, u.a. deren Nachweisgrenzen und Sättigungsverhalten beeinflusst. Auch die verwendete Messvorschrift und subjektive Verhaltensweisen haben Einfluss.

Insgesamt wird also eine reale Stichprobe eine Überlagerung verschiedener Verteilungen darstellen, die bei der (realistischen) Annahme von großen Pollen-Anzahlen durch eine Überlagerung verschiedener log-Normal-Verteilungen angenähert werden kann, eventuell und etwas gröber sogar durch eine einzige log-Normalverteilung. Comtois (2000) zeigte, dass eine log-Normalverteilung eine brauchbare Näherung darstellt, wobei in einem ausgewählten Dosisbereich eine Gamma-Verteilung die Näherung verbessert.

Für die genauere Darstellung der beobachteten Häufigkeitsverteilungen wurden nichtparametrische Dichteschätzungen für die logarithmierten Pollenanzahlwerte berechnet (Silverman 1990). Dabei wurde ein Kernschätzer mit Gauss-Kern benutzt. Ausgehend von Messwerten x_1, x_2, \dots, x_n berechnet dieser die Dichteschätzung f an der Stelle x als eine gewichtete Summe in der Form

$$f(x) = \frac{1}{nh} \sum_i K\left(\frac{x - x_i}{h}\right),$$

wobei

$$K(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\left(\frac{x^2}{2}\right)}.$$

Als Glättungsparameter h dient der für eine Normalverteilung optimale Wert, berechnet auf Grund einer robusten (winsorisierten) Schätzung der eingehenden Varianz. Aus der Dichteschätzung werden Quantile, sowie die Lage des Modus (des Wertes mit der höchsten Dichte) abgeleitet.

Die Verteilung des systematischen Fehlers ist von Bedeutung, wenn zusätzliche Konzentrationen/Depositionen/ Flüsse zu identifizieren sind, die nicht schon durch die bereits berücksichtigten Expositionen erfasst wurden.

Für die Basis-Belastung, also die Belastung, die vorliegt, wenn keine spezifischen lokalen Pollenquellen vorhanden sind, wird eine näherungsweise logarithmische Normalverteilung angenommen. Diese muss an der linken Flanke der Gesamtverteilung liegen. Die Basisverteilung wird deswegen geschätzt durch Anpassung der linken Flanke einer Normalverteilung an die linke Flanke der zuvor als Dichteschätzung bestimmten Gesamtverteilung. Die Basisverteilung ist eindeutig charakterisiert durch Angabe ihres Mittelwerts und ihrer Standardabweichung. Hierbei ist das 10%-Quantil der Basisverteilung, abgekürzt durch P10, zur Charakterisierung der allgemeinen Grundbelastung geeignet. Der Mittelwert der Basisverteilung, der mit dem Median und dem 50%-Quantil (P50) zusammenfällt, dient als Maßzahl für die Normalbelastung, sofern die zu Grunde liegenden Daten raumrepräsentativ erhoben wurden.

2.8.3 Zusammenhang zwischen beobachtetem und erwarteten Pollenfluss/-deposition, statistische Ermittlung von Nachweisgrenze, Sensitivität und Reproduzierbarkeit

Es ist zu erwarten, dass die Messwerte der technischen Pollensammler mit steigender Entfernung von einer Pollenquelle eine fallende Tendenz aufweisen. Bei großer Entfernung von solchen Quellen ist dagegen zufällige Schwankung der Werte um eine horizontale Gerade zu erwarten. Das Niveau dieser Geraden liegt in der Regel nicht bei Null, da Sammler auch in größerer Entfernung von einer Quelle durch (Fern-) Transport aus verschiedenen Quellen erreicht werden. Vor dem Hintergrund dieser Überlegungen wurde die Beziehung zwischen beobachteter Pollenanzahl (Fluss/Deposition⁹³) und nach Ausbreitungsrechnung erwarteter Pollenkonzentration/-fluss/-deposition⁹⁴ durch einen „Hockey-Stick“-Ansatz modelliert, der fernab einer Quelle ein konstantes Hintergrundniveau annimmt, während bei Annäherung an eine Quelle von einem bestimmten Punkt an die erwartete Anzahl Pollen auf dem Sammler steigt. Mit den Bezeichnungen

- y beobachtete Anzahl Pollen auf dem Sammler
- x Pollenfluss am Sammlerstandort im Blühzeitraum nach Ausbreitungsrechnung, in Pollen/m²
- y_H erwartete Anzahl Pollen auf dem Sammler, wenn nur die Hintergrundbelastung vorliegt
- c Logarithmus des Pollenflusses, unterhalb dessen vom Sammler nur die Hintergrundbelastung angezeigt wird (horizontale Koordinate des „Hockey-Stick“-Knickpunkts)
- d Exponent des Anstiegs der erwarteten Pollenanzahl auf dem Sammler, wenn die mittlere Luftkonzentration den Wert c überschreitet (Steigung)

⁹³ Der Zusammenhang gilt sammlerspezifisch für Fluss (PMF) oder Deposition (Sigma-2), im Folgenden am Beispiel des Flusses ausgeführt.

⁹⁴ Die Berechnung erfolgte über die mittlere Konzentration, Deposition und Fluss sind dann für die konkrete Situation (Expositionszeitraum, Windgeschwindigkeit, v_d) über Konstanten verbunden.

des ansteigenden Teils des „Hockey-Sticks“, wenn y und x auf logarithmischen Skalen gemessen werden)

e Term für den zufälligen Fehler, näherungsweise normalverteilt, Mittelwert Null, Standardabweichung s

wurde der Zusammenhang zwischen gemessener Pollenanzahl und nach Ausbreitungsrechnung berechneten Luftkonzentration folgendermaßen modelliert:

$$\lg(y) = \lg(y_H) + e, \quad \text{falls } \lg(x) < c$$

$$\lg(y) = \lg(y_H) + d(\lg(x) - c) + e \quad \text{falls } \lg(x) \geq c$$

Dabei steht ‚lg‘ für den dekadischen Logarithmus (Basis 10). Die Größen y_H , c , d und die Standardabweichung s von e sind zunächst unbekannt. Sie wurden über eine nichtlineare Regression nach dem Prinzip der kleinsten Quadrate mit einem iterativen Verfahren geschätzt, wobei die beiden obigen Gleichungen zu einer einzigen zusammengeführt wurden:

$$\lg(y) = \lg(y_H) + d \max(0; \lg(x) - c) + e, \quad (1)$$

Wertepaare, deren y -Wert offensichtlich durch Fremdeinflüsse in die Höhe getrieben wurde, wurden aus der Berechnung ausgeschlossen. Die Fehler-Standardabweichung s wird nur aus den Daten berechnet, die zum ansteigenden Teil der Kurve beitragen. Die Anpassung einer Kurve vom Typ (1) setzt eine Probenpunkt-Anordnung voraus, bei der ein genügend großer Teil der Messpunkte weder im Sättigungsbereich des Sammlers noch im Bereich des konstanten Hintergrund-Flusses verläuft.

Die Präzision, mit der die Koeffizienten y_H , c , d bestimmt wurden, ergibt sich aus der Kleinsten-Quadrate-Schätzung. Aus der Kovarianzmatrix der geschätzten Koeffizienten lässt sich ein Konfidenzbereich angeben, der mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% den wahren Kurvenverlauf enthält (korrekte Modellannahmen vorausgesetzt). Das Bestimmungsmaß r^2 beschreibt, welcher Anteil der Variation von $\lg(y)$ durch $\lg(x)$ erklärt werden kann. Ein Wert von $r^2 = 1$ würde die fehlerfreie Vorhersage bedeuten, $r^2 = 0$ die völlige Unkorreliertheit beider Merkmale.

Die Hockey-Stick-Funktion musste in der Form (1) verwendet werden, um die Koeffizienten y_H , c , d für die vorliegenden Daten berechnen zu können. Für die Berechnung der absoluten Nachweisgrenze und von Fallzahlen (siehe unten) wird die Gleichung für allein den steigenden Teil der Kurve benötigt, die die Gestalt

$$\lg(y) = a + d \lg(x), \quad (2)$$

entsprechend

$$y = 10^a x^d \quad (3)$$

aufweist, wobei die Konstante a den Logarithmus von y bei einer Luftkonzentration von 1 Pollen/m³ angibt. Diese Konstante ergibt sich aus den zuvor berechneten Kurvenparametern:

$$a = \lg(y_H) - dc \quad (4)$$

Aus den Merkmalen der Hockey-Stick-Funktion ergeben sich Sensitivität, Reproduzierbarkeit, (absolute) Nachweisgrenze des untersuchten Geräts und der mittlere Hintergrund-Fluss.

Die Sensitivität eines Sammlers ist definiert als die Veränderung der gesammelten Anzahl Pollen bezogen auf die Veränderung im realen Pollenfluss. Sie wird durch die Steigung des ansteigenden Teils des Hockey-Sticks repräsentiert, entsprechend dem Koeffizienten d in Gleichung (2) bei logarithmischer Darstellung von Pollenfluss und Pollenanzahl.

Die Reproduzierbarkeit quantifiziert die Streuung der Messergebnisse eines Sammlers bei Wiederholung der Messung unter identischen Umständen. Sie ergibt sich aus der Kleinsten-Quadrate-Anpassung von (1) über die Schätzwerte für die Koeffizienten und die Standardabweichung s des Zufallsfehlers um die Hockey-Stick-Funktion. Unter idealen Bedingungen (keine Variation im realen Pollenfluss oder im Sammelverhalten des Geräts, keine zufälligen Effekte im Auswertungsprozess) würde optimale Reproduzierbarkeit erreicht, ausgedrückt durch eine Standardabweichung von $s = 0$.

Die (absolute) Nachweisgrenze eines Sammlers ergibt sich aus der Notwendigkeit, dass mindestens ein Pollen in der ausgewerteten Fläche des Sammlers vorhanden sein muss. Aus der Gleichung (2) ergibt sich der zu diesem einen Pollen gehörende reale Fluss x_{NWG} , der die absolute Nachweisgrenze darstellt, als

$$\lg(x_{NWG}) = \frac{\lg(y_{NWG}) - a}{d},$$

wobei x_{NWG} in Pollen/m², x_{WG} = Sammler-Fläche / ausgezählte Fläche und a, d die Koeffizienten der Hockey-Stick-Funktion beschreiben.

Der mittlere Hintergrund-Fluss x_H (baseline) ergibt sich aus der Umkehrung der Beziehung (2), mit der aus einer beobachteten Pollenanzahl y auf den vorhandenen Fluss geschlossen werden kann:

$$x = 10^{\frac{\lg(y) - a}{d}} \quad \text{bzw.} \quad (5a)$$

$$\lg(x) = \frac{\lg(y) - a}{d}. \quad (5b)$$

somit

$$x_H = 10^{\frac{\lg(y_H) - a}{d}} \quad \text{bzw.} \quad (6a)$$

$$\lg(x_H) = \frac{\lg(y_H) - a}{d}. \quad (6b)$$

2.8.4 Statistische Ermittlung von Nachweiswahrscheinlichkeit und Fallzahlen

Die Sicherheit, mit der eine Pollenkonzentration, -deposition (Sigma-2) oder fluss (PMF)⁹⁵ der Größe x vorliegt, hängt von x selbst, der Anzahl eingesetzter Sammler und den tolerierten Fehlerwahrscheinlichkeiten ab. Die Anwesenheit eines Pollenflusses in Höhe der Nachweisgrenze ist wegen der beteiligten zufälligen Fehler durch eine einzige

⁹⁵ Gilt gleichermaßen für Konzentration und Deposition, hier wieder am Beispiel Fluss ausgeführt.

Messung nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% nachzuweisen. Eine höhere Sicherheit des Nachweises ist entweder für höhere Flüsse und/oder bei mehr als einer Messung pro Ort zu erreichen. Der Zusammenhang zwischen der Größe x des nachzuweisenden Pollenflusses pro m^2 , der Sicherheit seines Nachweises β und der Anzahl von Messungen n wird durch die Gleichungen

$$y = 10^a x^d$$
$$p(x) = 1 - \Pr\left(t_{FG} < \frac{\lg(y_{NWG}) - \lg(y)}{s}\right)$$
$$\beta = 1 - (1 - p(x))^n \quad (7)$$

beschrieben. Dabei sind alle Wahrscheinlichkeiten als Werte zwischen 0 und 1 angegeben und $\Pr(t_{FG} < z)$ beschreibt die kumulative Wahrscheinlichkeitsverteilung der t -Verteilung mit FG Freiheitsgraden, wobei die Zahl der Freiheitsgrade gleich der Anzahl der Residuen-Freiheitsgrade in der Regression zur Bestimmung der Hockey-Stick-Koeffizienten in (1) ist. Aus Gleichung (7) ergibt sich umgekehrt auch die Fallzahl (Anzahl von Sammlern), die notwendig sind, um einen vorhandenen Pollenfluss x in der Luft mit einer Sicherheit β nachzuweisen:

$$n = \frac{\lg(1 - \beta)}{\lg(1 - p(x))} \quad (8)$$

2.8.5 Pollenspektrum

Um die Diversität der vorgefundenen Pollenarten zu beschreiben, wurde für jede Probe bestimmt, welche Arten vorhanden waren und als 0/1-Information registriert (0: nicht vorhanden, 1: vorhanden) (Diversität). Diese Information wurde für die Gesamtheit aller Proben addiert und das Pollenspektrum als Prozentzahlen zum Zweck des Vergleichs verschiedener Sammler und weiterer Merkmale graphisch dargestellt.

2.8.6 Statistische Ermittlung von Nachweiswahrscheinlichkeit, Fallzahl und Raumrepräsentativität bei der Honigbiene

Bei der Honigbiene als biologischem Sammler war zu berücksichtigen, dass diese das Sammelverhalten aktiv steuert, indem sie auf die Attraktivität und Abstand und Größe der Rapsfelder reagiert. Dabei war weiterhin zu berücksichtigen, dass zwei GVO-Rapsfelder unterschiedlicher Größe und Entfernung im Sammelgebiet lagen. Für die Abschätzung der Wahrscheinlichkeit eines positiven GVO-Nachweises wurde daher ein Ansatz verfolgt, der sowohl die Attraktivität eines Feldes, ausgedrückt durch seine Größe, als auch den Abstand zum Bienenstandort einschließt und das Konkurrieren der beiden Felder modelliert. Das mathematische Modell für den GVO-Nachweis bei Existenz eines einzigen Feldes hat die Form

$$P = \frac{1}{1 + \exp[-F(a - b \cdot d^2)]}, \quad (9)$$

beim Vorliegen von 2 Feldern gilt

$$P = \frac{1}{1 + \exp[-F_1(a - b \cdot d_1^2) - F_2(a - b \cdot d_2^2)]} \quad (10)$$

In diesen Gleichungen bezeichnet P die Wahrscheinlichkeit eines Nachweises mit Werten zwischen 0 und 1, F ist die Feldgröße und d ist der Abstand zwischen Feld und Standort des Bienenvolks. Die Indices in Gleichung (10) kennzeichnen die Felder, a und b sind Koeffizienten, die durch eine iterative Maximum-Likelihood-Schätzung bestimmt wurden. Aus der Beziehung (9) ergeben sich die Entfernungen d um ein Feld, innerhalb derer mit einer Wahrscheinlichkeit P der Nachweis von GVO erfolgt, aus

$$d = \frac{1}{bF} \sqrt{-bF \left(aF + \ln \frac{1-P}{P} \right)}. \quad (11)$$

sowie die Entfernung, innerhalb derer ein Nachweis mit $P \geq 50\%$ t erfolgt, als

$$d_{P=0.5} = \frac{1}{b} \sqrt{-ab}.$$

3 Ergebnisse mit Diskussion

3.1 Technische Pollensammler: Sigma-2 und PMF

3.1.1 Ergebnisse zur Praktikabilität der Sammler und zur Standortwahl

Die Erfahrungen aus den Freilandversuchen in 2001 zeigten, dass sowohl die Installation als auch der Betrieb der technischen Sammler ohne größere Probleme vonstatten gingen. Bei den 84 installierten Sammlern traten über den gesamten Versuchsverlauf weder Ausfälle noch Störungen auf. Die Passivsammler funktionierten über die bis zu fünfwöchigen Expositionszeiten über die Vegetationsperiode 2001 ohne besonderen Betreuungsaufwand. Der Betrieb stellt sich damit erheblich zuverlässiger und einfacher dar als mit den ansonsten üblichen Aktivgeräten. Ebenso waren weder Vandalismus noch Diebstahl zu beklagen, wie aus anderen Monitoringprogrammen mit Aktivgeräten her bekannt. Vorteilhaft dürfte sich hierbei ausgewirkt haben, dass die Geräte relativ unscheinbar und ohne erkennbaren Wert sind. Teure Installationen zur Sicherung erscheinen bei den Pollenpassivsammlern daher nicht unbedingt notwendig, eine Stromversorgung ist nicht erforderlich. Dennoch empfiehlt sich für die Monitoringpraxis, dem Problem unerwünschter Eingriffe vorbeugend zu begegnen, indem möglichst gesicherte und geschützte Standorte zu berücksichtigen sind.

Als wesentliche Voraussetzungen für eine erfolgreiche Durchführung ist eine entsprechend fachlich qualifizierte Standortwahl, technische Vorbereitung und Installationsarbeiten anzusprechen, deren Zeitaufwand nicht unterschätzt werden darf. Die Standortwahl und Probenahme stellt die Basis der Datengewinnung dar. Wenngleich technisch relativ einfach erscheinend, sind aus Qualitätssicherungsgründen im Monitoring sowohl Standortwahl, Installation sowie Probenahme und –wechsel im Gelände nur von wissenschaftlich qualifiziertem Fachpersonal vorzunehmen. Die Qualifizierung kann durch entsprechend vorgeschriebene Schulung und Zertifizierung

erfolgen, wie dies beispielsweise auch bei den Messnetzen der Polleninformationsdienste und anderen länderübergreifenden Programmen⁹⁶ der Fall ist.

Da beim Aufstellen von Geräten, sowie zur Betretung von Grundstücken Eigentumsaspekte zu beachten sind, sind entsprechende Vorlaufzeiten bei der Planung für Absprachen mit den Besitzern zu berücksichtigen. In der Regel zeigten diese Interesse und konnten durch entsprechende Informationen zur Mitarbeit gewonnen werden; die meisten übernahmen hierbei auch einfache Betreuungsdienste, indem sie regelmäßig nach den Geräten schauten. Günstig wirkte sich die Kombination mit dem biologischen Sammler Honigbiene aus, da die Sammler in der Nähe der Bienenstände aufgestellt werden konnten und die Imker eine Betreuungsfunktion übernahmen.

Für die Aufstellung der technischen Pollensammler sind bestimmte Standortbedingungen einzuhalten, die sich nach der konkreten Aufgabenstellung und dem Untersuchungsdesign im Monitoring zu richten hat. Allgemein gilt, dass eine freie Anströmbarkeit der Sammler erfüllt sein muss. Für weitere Kriterien wird auf die VDI-Richtlinie 4330 Bl. 3 verwiesen.

3.1.2 Passivsammler Sigma-2

3.1.2.1 Ergebnisse der Pollenzählungen für die Rapsperiode

Die Ergebnisse der Pollenzählungen aus den Versuchen in der Rapsperiode der Sigma-2 – Proben sind mit den statistischen Kenndaten in Tab. 3.1.1 zusammengefasst. Die Einzelergebnisse sind im Anhang dokumentiert. Mit in die Tabelle aufgenommen wurden die Schätzwerte zur log-Normal-Basisverteilung.

Die Daten in den beiden ersten Spalten zeigen, dass bei 4-5wöchiger Exposition über den Blühzeitraum von Raps die mittlere Belegung (Median) der Haftfolien in der Größenordnung von 390 für die Rapspollenanzahl und 44.000 für die Gesamtpollenanzahl lag. 90% der Proben wiesen über 110 Rapspollen und 37.000

⁹⁶ z.B. nationales und EU-weites Moosmonitoring (Sievers et al. 1999)

Gesamtpollen auf (10%-Percentil). Der 90%-Quantilwert betrug 2.500 für Raps- und respektive 77.000 für Gesamtpollen.

Erhebungen 2001	Haftfolie		Raps- anteil	Deposition		mittlere Konzentration		Einstufung
	Gesamt- pollen	Raps- Pollen		Gesamt- Pollen	Raps- Pollen	Gesamt- Pollen	Raps- Pollen	
Sammelzeitraum = Blühzeitraum = 30-34 d	Sigma-2	Sigma-2				vd=0,016	vd=0,01	
n=49	Pollen / 4225mm ²	Pollen / 4225mm ²	%	Pollen / m ² 30d	Pollen / m ² 30d	Pollen / m ³	Pollen / m ³	
NWG	35	35	0,1%	8.000	8.000	0,3	0,3	Nachweisgrenze
Minimum	23.000	<35	<0,1%	5.500.000	<8.000	170	<0,3	agrarferne Gebiete
10% Perc. Log-Normal- Basisverteilung	34.000	65	0,2%	8.100.000	15.000	160	0,5	Baseline im Agrarraum
10% Perc. Probenkollektiv	37.000	110	0,2%	8.600.000	25.000	270	0,8	
Median Log-Normal- Basisverteilung	40.000	331	1%	9.300.000	78.000	300	2,5	Mittel für Agrarraum
Median Probenkollektiv	44.000	390	1%	11.000.000	90.000	330	3	mittlere Erwartungswerte für Raps- Hauptanbau- gebiete
Mittelwert Probenkollektiv	51.000	910	2%	12.000.000	220.000	380	7	
90% Perc. Log-Normal- Basisverteilung	47.000	1.680	4%	11.500.000	395.000	340	12	90% Perc. Agrarraum
90% Perc. Probenkollektiv	77.000	2.500	5%	18.000.000	580.000	560	18	90%-Perc. Raps-Haupt- anbauggebiete
Maximum Probenkollektiv	110.000	4.300	8%	27.000.000	1.000.000	>800	>30	Rapsfelder angrenzend

Tab. 3.1.1: *Ergebnisstatistik der Pollenzählungen für die Proben aus dem Sigma-2 über die Rapsperiode [Exposition über Blühzeitraum 30-34 Tage] mit Schätzwerten der Log-Normal-Basisverteilung und Einstufung von Erwartungswerten zu Pollenanzahlen*

Das Minimum lag bei einer Gesamtpollenanzahl von 23.000. Bei den Rapspollenzahlen wurde im Minimum die absolute Nachweisgrenze von 35 Pollen (1 Pollen pro 120 mm² Zählfläche) an einem Standort im Referenzbereich unterschritten. Der Rapsanteil in den Sigma-2 - Proben bewegte sich hierbei mehrheitlich im Bereich zwischen 0,2% - 5%.

Als Konventionsverfahren beziehen sich diese und die folgenden Angaben auf das Messverfahren Sigma-2. In den nebenstehenden Spalten finden sich die aus den Sigma-2 – Messwerten ergebenden Pollendepositionen pro m². Die mit dem Sigma-2 über den Hauptblühzeitraum von Raps (30-34 Tage) ermittelte Pollendeposition ist im Bereich von $5,5 \cdot 10^6$ bis $27 \cdot 10^6$ Pollen/m² anzusiedeln. Das Mittel (Median) liegt bei $11 \cdot 10^6$ Pollen/m². Die entsprechenden Werte für die Rapspollendepositionen liegen im Median bei 90.000 Pollen/m² und reichen von unter der Nachweisgrenze [NWG] (8.000 Pollen/m²) bis zu 1.000.000 Pollen/m².

Aufgrund der Tatsache, dass es sich um relativ kleine Rapsversuchsfelder handelte (0,3 ha; 0,2 ha) und die Sammler nicht direkt am Feldrand aufgestellt wurden, ist unter praxisnahen Anbaubedingungen mit noch deutlich höheren Depositionen zu rechnen. Aus der Literatur sind für Rapspollendepositionen Angaben von über 10^8 Pollen/m² für den Nahbereich von Rapsfeldern bekannt (Feil & Schmid 2002).

Im Hinblick auf die computergestützte bildanalytische Auswertung zeigte sich eine ausreichende bis in Einzelfällen grenzgängig hohe Gesamtbelegungsdichte für die Proben aus dem Agrarraum bei vier-fünfwöchiger Exposition. Nach Aussagen des DWD empfehlen sich somit für die Frühlingsperiode Erfassungszeiten von optimal zwei Wochen für den Sigma-2, mit einer bis vier Wochen als untere und obere Grenzen.

Die Proben aus dem Agrarraum weisen hierbei eine deutlich höhere Belegungsdichte gegenüber den Proben aus dem Routinemessnetz des DWD an den Kurorten bzw. an den Standorten des Routinemessnetzes des Polleninformationsdienstes auf.⁹⁷ Dies entspricht den Erwartungen, da diese Standorte sich meist auf hohen Gebäuden inmitten der Städte und Siedlungen befinden.

⁹⁷ Angaben des DWD (Dietze)

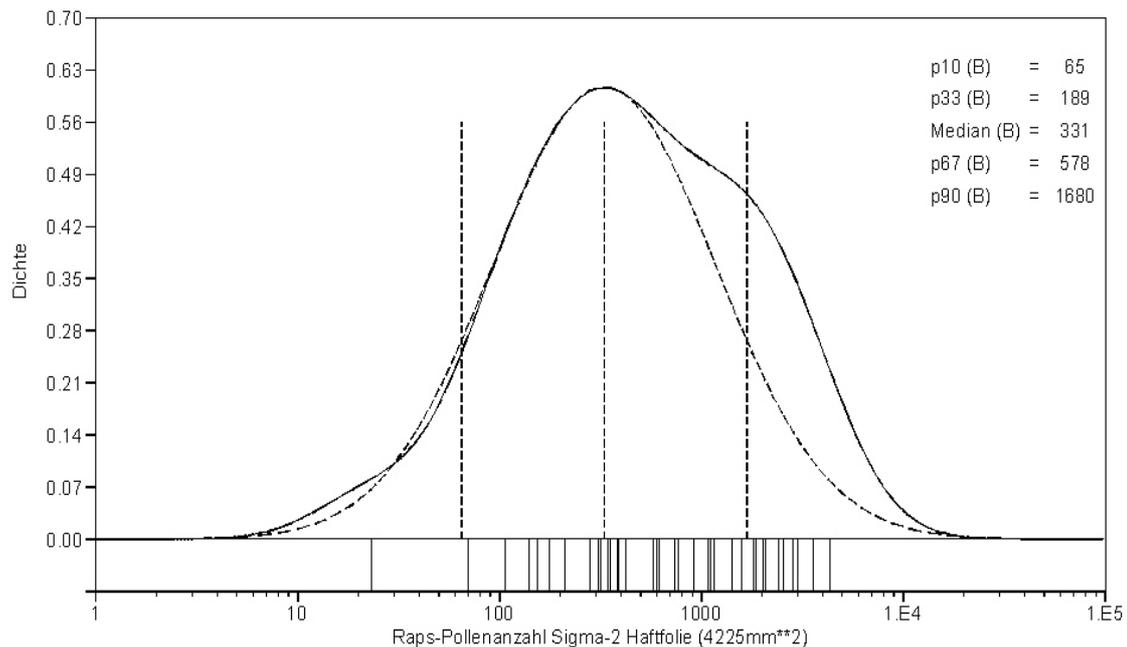


Abb. 3.1.1: Verteilung der Messwerte der Rapspollendeposition aus dem Sigma-2 und Dichteschätzung mit Log-Normal-Basisverteilung. Durchgezogene Linie: Dichteschätzung für die Gesamtheit der Messwerte ($n=53$ Standorte). Gestrichelte Linie: angepasste Log-Normal-Basisverteilung. Senkrechte Linien: 10%-Quantil (p_{10}), Median und 90%-Quantil (p_{90}) (Basisverteilung).

Abb. 3.1.1 zeigt die Dichteverteilung der Messwerte zur gemessenen Rapspollenkonzentration mit Dichteschätzung und log-normal-Basisverteilung. Die Kurven belegen, dass die Rapspollenanzahlwerte keinesfalls normalverteilt sind. Wie zahlreiche andere Umweltdaten auch, folgen sie einer Log-Normal-Basisverteilung (Goodness-of-fit-Tests statistisch mit $p < 0,001$ signifikant). Dies wird über die Übereinstimmung der linken Flanken beider Kurven in der Abbildung grafisch angezeigt. Die höheren Werte auf der rechten Flanke sind probenahmebedingt und reflektieren die gemäß Untersuchungsdesign erforderliche dichtere Beprobung im höheren Dosisbereich. In einem späteren Monitoring lassen sich aus derartigen Abweichungen von der Basisbelastung im Rückschluss außergewöhnliche Einflüsse detektieren. Wenngleich diese Untersuchung nicht auf bundesweit repräsentative

Aussagen ausgerichtet war, lassen die Ergebnisse erste Abschätzungen zu. Sie legen nahe, dass beim Sigma-2 in einem überregionalen Monitoring mit einer Basisbelegung von <110 Rapspollen (10%-Quantilswert) auf der Haftfolie zu rechnen ist, d.h. 90% einer zufälligen Stichprobe würden diesen Wert überschreiten. Im Mittel wird man eine Belegung von ca. 330 Rapspollen auf der Folie erzielen, 90% der Proben werden unter 1.680 Rapspollen aufweisen.

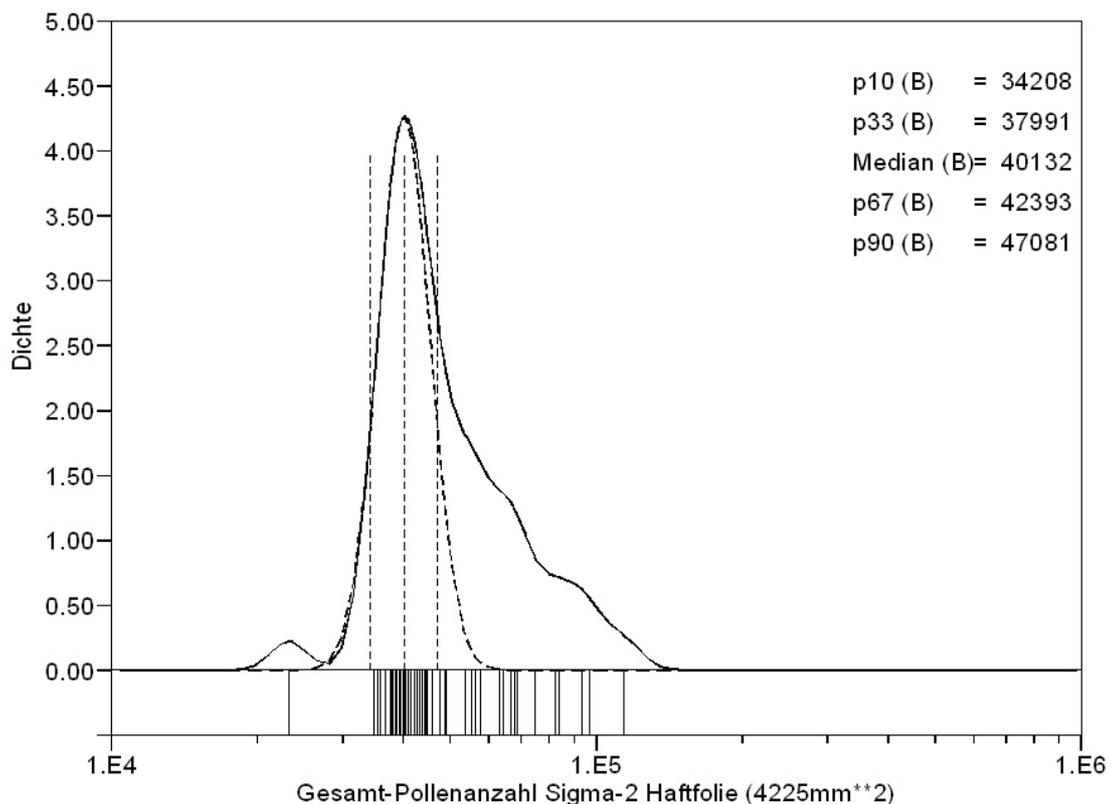


Abb. 3.1.2: Verteilung der Messwerte der Gesamtpollendeposition aus dem Sigma-2 und Dichteschätzung mit Log-Normal-Basisverteilung. Durchgezogene Linie: Dichteschätzung für die Gesamtheit der Messwerte (n=53 Standorte). Gestrichelte Linie: angepasste Log-Normal-Basisverteilung. Senkrechte Linien: 10%-Quantil (p10), Median und 90%-Quantil (p90) (Basisverteilung).

Abb. 3.1.2 enthält die entsprechenden Ergebnisse für die Gesamtpollendeposition auf der Sigma-2 Haftfolie. Die Verteilung ergibt hier ein wesentlich engeres Bild. Dies

reflektiert die Überlagerung zahlreicher einzelner Pollenarten zu einer Gesamtpollendeposition, deren räumliche Variation geringer ausfällt als bei einzelnen Pflanzen. Im Mittel würde man bei einem überregionalen Monitoring im Jahre 2001 mit einer Pollenbelegung um 44.000 Gesamtpollen auf der Haftfolie rechnen können. Die Basisbelastung wird auf den Wert 34.000 geschätzt, 90% der Proben werden eine Belegung von 47.000 nicht überschreiten.

Zu berücksichtigen hierbei ist allerdings noch die eine Variation von Jahr zu Jahr, die hier nicht berücksichtigt wurde.

3.1.2.2 Sensitivität, Nachweisgrenze und Reproduzierbarkeit

Die Validierung des Passivsammlers Sigma-2 erfolgte gemäß der unter 2.8.2 dargestellten Methode über den Vergleich mit dem Gradienten aus der Ausbreitungsrechnung. Die Ergebnisse aus den Versuchen während der Rapsperiode über 49 Standorte sind in Abb. 3.1.3 dargestellt. Die waagerechte Achse denotiert die Pollenkonzentration gemäß Ausbreitungsrechnung aus den beiden GVO-Rapsfeldern bei Sickte auf logarithmischer Skala. Der Umrechnungsfaktor für den Pollenfluss in Pollenanzahl/m² beträgt hier $5,6 \times 10^6$. Die senkrechte Achse gibt die gemessene Pollendeposition auf den Sigma-Haftfolien an. Die Skalierungen sind, der Verteilungscharakteristik von Pollendaten angenähert, logarithmisch gehalten. Die obere Kurve gibt die Gesamtpollenanzahl, die entsprechend gekennzeichnete mittlere Kurve die Rapspollenanzahl auf den Sigma-Haftfolien an den Standorten in der Umgebung der GVO-Felder bei Sickte wieder. Die rechterhand dargestellten, nicht gefüllten Punkte denotieren zum Vergleich die Rapspollenanzahl für die Referenzgebiete in der Bundesrepublik. Aus der Darstellung geht hervor, dass die Gesamtpollenanzahl auf einem gleich bleibenden Niveau pendelt. Dies zeigt sich erwartungsgemäß unabhängig von der relativen Lage der Standorte zu den beiden GVO-Rapsfeldern. Die Kurve der Rapspollenanzahl belegt hingegen einen deutlich abnehmenden Trend von links nach rechts, bis ein Basisniveau des Raumes erreicht wird und die Werte sich darauf einschwenken.

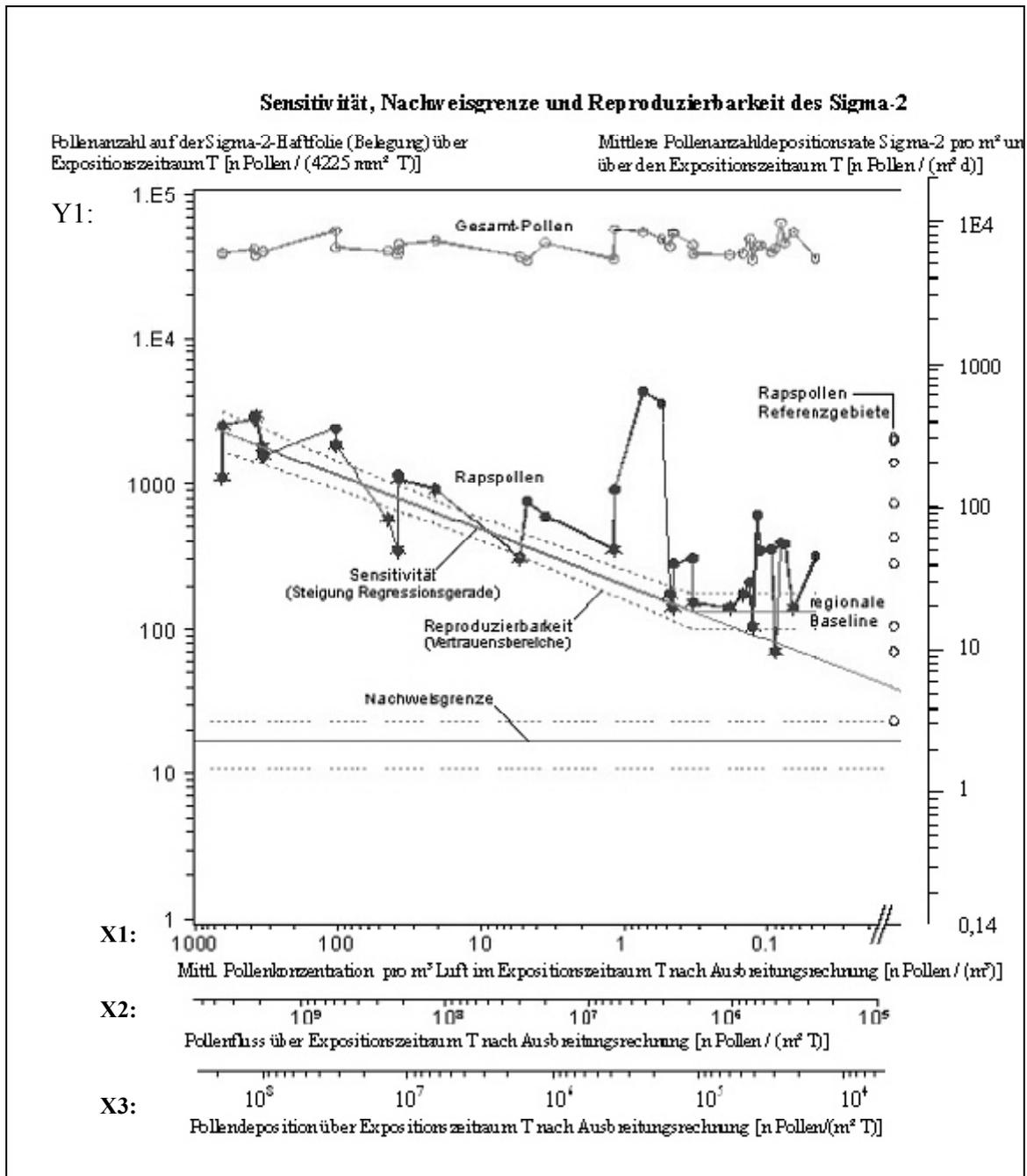


Abb. 3.1.3: Sensitivität, Nachweisgrenze und Reproduzierbarkeit für den Passivsammler Sigma-2. Die unteren Achsen geben die Vorhersagewerte aus der Ausbreitungsrechnung für die mittlere Rapspollenkonzentration über den Expositionszeitraum T = 34 Tagen an (X1) sowie den zugehörigen Pollenfluss (X2) und -deposition (X3) pro m² (bei v_d=0,01m/s). Die

senkrechten Achsen kennzeichnen die im Sigma-2 erfassten Pollendepositionen: die rechte Achse Y2 gibt die Deposition pro m² und T an, die Linke (Y1) die Pollenanzahl auf der Haftfolie (maximal auswertbare Probenmenge). Die zugrunde liegende Expositionsdauer T beträgt hier 34 Tage. Die Skalierungen sind logarithmisch gehalten. Folgende Beziehungen sind übertragbar: - mittlere Pollenkonzentration (X1) zu Sigma-Depositionsrate pro m² und Tag (Y2) - Pollendeposition (X3) zur Pollenbelegung der Sigma-Haftfolien [Y1]. Die Querbeziehungen sind von den Versuchsbedingungen und Expositionsdauer abhängig.

Die Sensitivität des Passivsammlers Sigma-2 ergibt sich aus den Ergebnissen der Regressionsanalyse in Tab. 3.1.2, die einen statistisch mit $p < 0,001$ signifikanten Zusammenhang der Rapspollendeposition auf den Sigma-2 Haftfolien mit dem Gradienten der Ausbreitungsrechnung belegen (fallende Regressionsgerade). Die signifikante Reproduzierbarkeit wird durch den Vertrauensbereich indiziert (gepunktete Linien).

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	2	156.8	78.3953	166.41	<.0001
Residual	19	0.5861	0.0308		
Uncorrected Total	21	157.4			
Corrected Total	20	5.7191			

Parameter	Estimated	Approx. Std Error	Approximate 95% Confidence Limits		Label
(im Text)					
a0 (lg(yH))	2.1249	0.0580	2.0034	2.2464	
a2 (d)	0.3775	0.0293	0.3162	0.4387	
c1 (c)	-0.4800	0	-0.4800	-0.4800	
Bound 0	0.0558	0.0953	-0.1286	0.2401	-0.48 <= c1

Tab. 3.1.2: Ergebnis der Regressionsanalysen der Rapspollenzählungen zum Sigma-2

Da die im Sigma gemessenen Rapspollenzahlen den Gesamteintrag an Rapspollen aus den beiden transgenen Versuchsfeldern als auch aus anderen konventionellen

Rapsfeldern im Raum widerspiegeln, weisen einzelne Standorte, die sich im näheren Einflussbereich anderer Rapsfelder befinden, entsprechend höhere Werte auf. Die Rapspollenwerte schwenken in den entfernteren Bereichen mit geringer Zusatzbelastung aus den GVO-Feldern nach Art eines Hockey-Sticks auf ein Niveau ein, das die Basisbelastung an Rapspollen im Raum entsprechend der jeweiligen Dichte des dortigen Rapsanbaus beschreibt (waagerechte Linie mit Vertrauensbereich). Die Rapspollenzahlen der Sammler aus den Referenzräumen mit dem fernab jeglichen Rapsanbaus gelegenen Standort im Bayerischen Wald beschreiben einen vergleichbaren Messbereich mit Erweiterung in den unteren Dosisbereich. Die Nachweisgrenze des Sigma-2 wird bei einer Zählfläche von 250 mm² als Standard in 2002 über die blaue waagerechte Linie mit Vertrauensbereich angezeigt und an einem Standort erreicht.

3.1.2.3 Sicherheit des Nachweises und erforderliche Fallzahlen

In Abb. 3.1.4 ist die Sicherheit des Nachweises in Abhängigkeit vom Pollenfluss für verschiedene Fallzahlen dargestellt. Die senkrechte Achse zeigt die Nachweissicherheit an. Die waagerechte Skala bezeichnet den Pollenfluss in Rapspollenanzahl/m², die zweite waagerechte Skala gibt die damit verbundene mittlere Rapspollen-Konzentration nach Ausbreitungsrechnung für die im Sicker Rapsversuch geltenden Randbedingungen an.

Bei einem Sigma-2 - Sammler liegt die 50%-Erfassungsgrenze bei einem Pollenfluss von ca. $7 \cdot 10^3$ Pollen/m². Diese Werte entsprechen einer mittleren Pollenkonzentration, bezogen auf die Sicker Verhältnisse, von ca. 0,0015 Pollen/m³ über 34d oder ca. 0,04 Pollen/m³ über 7d. Die Nachweissicherheit nimmt entsprechend der dargestellten Kurve mit Steigerung des Pollenflusses zu. Für eine 95%-Nachweiswahrscheinlichkeit mit einem Sigma-2 - Sammler genügt ein Pollenfluss von über $5 \cdot 10^4$ Pollen/m², entsprechend einer Konzentration von ca. 0,01 Pollen/m³ über 34d oder 0,2 Pollen/m³ über 7d. Die Nachweisgrenze und die Aussagekraft werden durch Erhöhung der Fallzahlen, wie dargestellt, weiter gesteigert. Damit ist bei einer Zählfläche von >250 mm² die Nachweisgrenze des Passivsammlers Sigma-2 mindestens mit der

Standardroutine der Polleninformationsdienste durch das Aktivgerät Burkard-Falle vergleichbar (0,2-2 Pollen/m³, je nach Auszählintensität)⁹⁸.

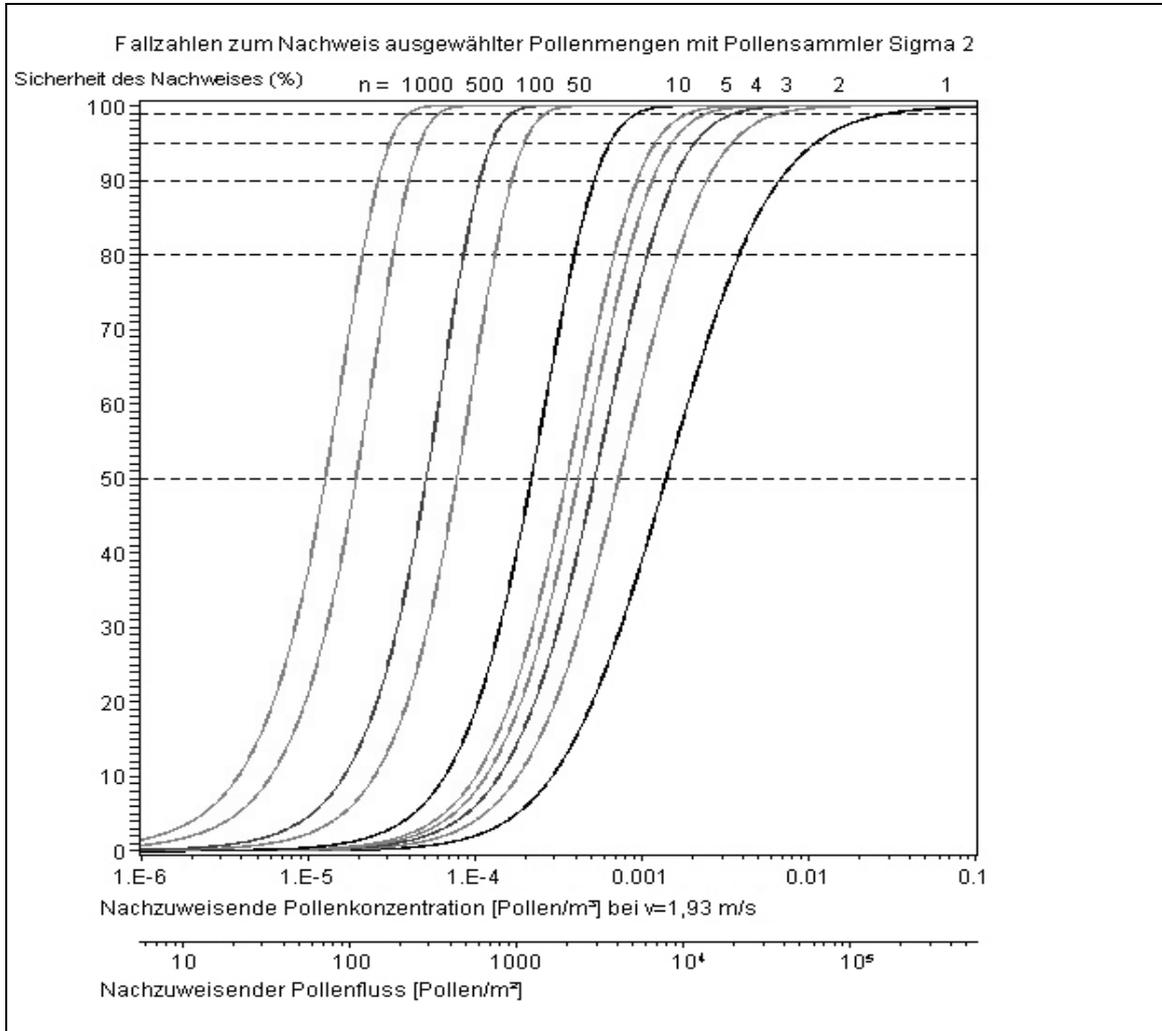


Abb. 3.1.4: Sicherheit des Nachweises von Rapspollen in Abhängigkeit von der Pollenkonzentration und unterschiedlichen Fallzahlen für den Passivsammler Sigma-2. Die Angaben zur entsprechenden Rapspollenkonzentration gelten unter den Bedingungen während des Sickter Feldversuches ($v = 1,93$ m/s mittlere Windgeschwindigkeit, $T=34d$ Expositionszeit, Quellstärke $Q=10^9$ Pollen / (ha h) = $\sim 10^{12}$ Pollen / (ha T))

⁹⁸ Je nach Standardisierung der Mess- und Auszählroutine der nationalen Polleninformationsdienste; Basis: Empfehlungen der International Association for Aerobiology (IAA)

Nachweisgrenzen, Fallzahlen und Nachweissicherheit beim Sigma-2 (n=Rapspollenanzahl, m=Fallzahl)						
Nachweisgrenze bei Auszählung von 250 mm²			Fallzahlen m für Nachweissicherheit			
Pollenfluss	Pollen- konzentration über 7 Tage	Pollen- konzentration über 34 Tage	50%	80%	90%	95%
n/m²	n/m³	n/m³	m	m	m	m
71	0,000060	0,000013	1.000			
120	0,00010	0,000021		1.000		
150	0,00013	0,000026			1.000	
180	0,00015	0,000031				1.000
290	0,00025	0,000051	100			
480	0,00041	0,000085		100		
610	0,00052	0,00011			100	
710	0,00061	0,00013				100
1.200	0,0011	0,00022	10			
2.300	0,0019	0,00040		10		
3.000	0,0025	0,00052			10	
3.700	0,0031	0,00065				10
7.800	0,0067	0,0014	1			
22.000	0,018	0,0038		1		
37.000	0,032	0,0066			1	
62.000	0,053	0,011				1

Tab. 3.1.3: Nachweisgrenzen, Fallzahlen und Nachweissicherheit beim Sigma-2 für Rapspollenanzahlbestimmung in Bezug zum Pollenfluss und mittlerer Pollenkonzentration über 7 und 34 Tage unter den meteorologischen Bedingungen des Sickter Feldversuchs ($v=1,93$ m/s).

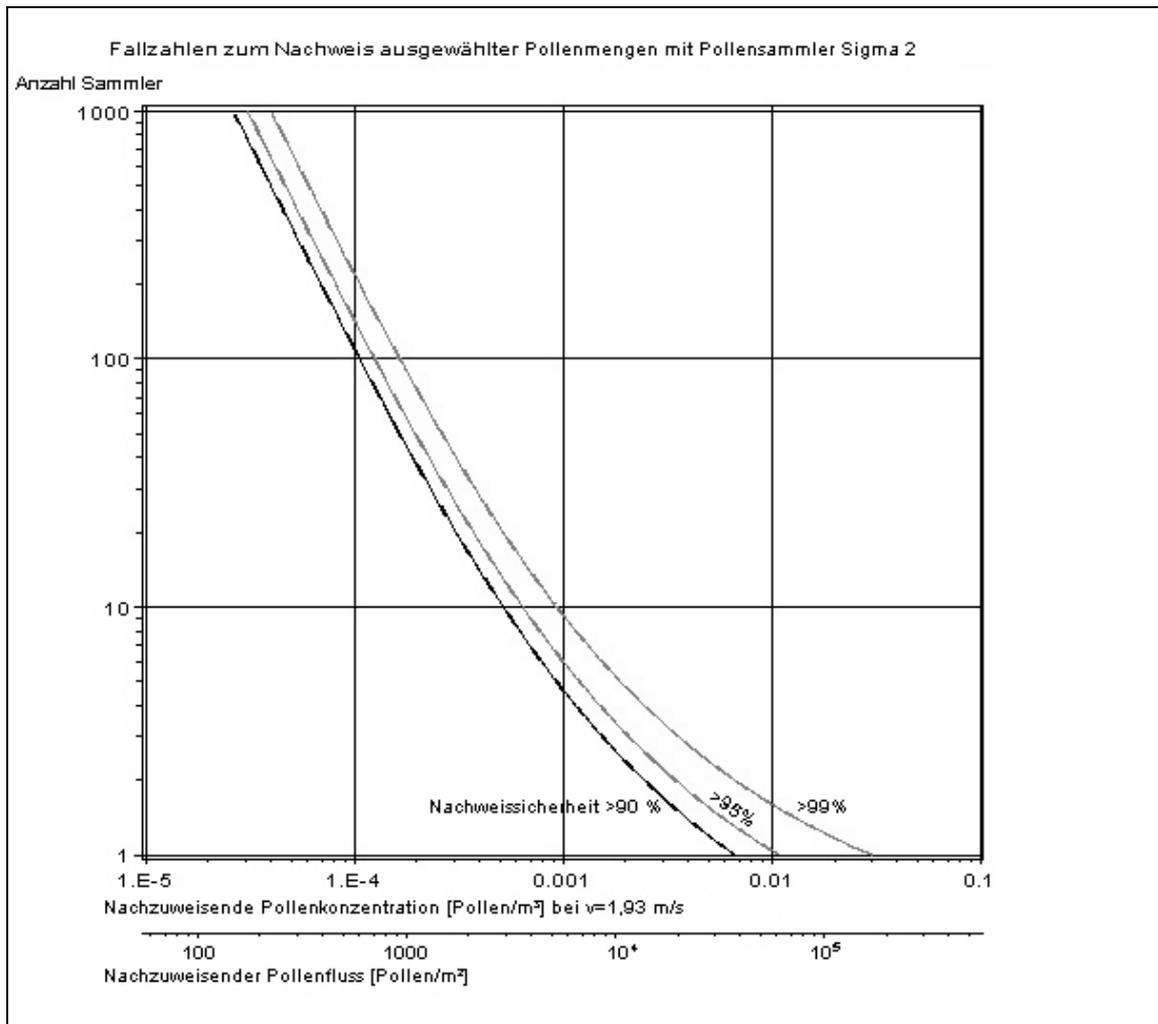


Abb. 3.1.5: Fallzahlen für den Passivsammler Sigma-2: Notwendige Anzahl von Sammlern in Abhängigkeit einer nachzuweisenden mittleren Rapspollenkonzentration für bestimmte Nachweissicherheiten. Die Angaben zum entsprechenden Pollenfluss gelten beim Sigma-2 unter den Bedingungen während des Sickter Feldversuches ($v = 1,93$ m/s mittlere Windgeschwindigkeit, 34d Expositionszeit, Quellstärke 10^9 Pollen / (ha h) = $\sim 10^{12}$ Pollen / (ha T))

Die Abhängigkeit von nachzuweisender Rapspollenmenge und Fallzahlen ist für vier Nachweiswahrscheinlichkeiten (50%, 80%, 90% und 95%) in Abb. 3.1.5 grafisch dargestellt, ausgewählte Werte finden sich in Tab. 3.1.3. Die Angaben gelten für eine

nach derzeitigem Stand praxisrelevante Zählfläche von ca. 250 mm². Der Pollenfluss gibt hierbei die erforderliche Menge an Rapspollen an, die unabhängig vom Sammelzeitraum im Luftstrom antransportiert werden. Die mittlere Pollenkonzentration hängt hingegen von der Dauer des Erfassungszeitraumes, über die sich diese Pollenmenge verteilt, und den konkreten meteorologischen Bedingungen ab und ist daher für die Beurteilung von Sammlereigenschaften für das GVO-Monitoring eine nur mäßig geeignete Größe. Sie wird nur deshalb hier berücksichtigt, da aus der Literatur vor allem Konzentrationsangaben für Vergleiche zu finden sind (s. Kap. 3.1).

Bei einer Fallzahl von einem Sammler und bei einer Sicherheit von 95% ist für den Nachweis von Rapspollen mit dem Sigma-2 ein Pollenfluss von 62.000 Pollen/m² erforderlich. Es entspricht einer mittleren Konzentration von 0,01 Pollen/m³ über den Blühzeitraum von 34 Tagen und 0,05 Pollen/m³ bei einem 7tägigen Erfassungszeitraum unter den Sickter Versuchsverhältnissen. Eine Verringerung der Nachweissicherheit auf 80% bringt in etwa eine Halbierung der nachweisbaren Pollenanzahlen. Die wesentliche Stellgröße für die Nachweissicherheit in einem großflächigen Monitoring wird durch die Fallzahlen gegeben, wie aus der Tabelle hervorgeht. Da die Verteilung der Rapspollenanzahlen im Agrarraum, wie auch anderer Pollen in Deutschland entweder gar nicht oder nur ungenügend bekannt ist, kann derzeit nur eine ungefähre Abschätzung der erforderlichen Fallzahlen für das GVO-Monitoring erfolgen (siehe Kap. 4 und 5).

3.1.3 Pollenmassenfilter PMF

3.1.3.1 Pollenanzahlen

Die Ergebnisse zu den mit dem PMF erfassten Pollenanzahlen aus der Rapsversuchsperiode über 49 Standorte sind in Tab. 3.1.4 über die statistischen Kenndaten des Probenkollektivs zusammenfassend dargestellt. Eine Dokumentation der Einzelergebnisse findet sich im Anhang. Mit in der Tabelle aufgeführt sind die Schätzwerte zur Log-Normal-Basisverteilung der Pollenanzahlen.

Die Ergebnisse der Pollenzählungen belegen, dass die PMF-Proben bei 4-5wöchiger Exposition über den Blühzeitraum von Raps im Mittel (Median, n=49) 6.100 Rapspollen und 620.000 Gesamtpollen enthielten. 90% der Proben wiesen über 810 Rapspollen und 110.000 Gesamtpollen auf (10%-Percentil). Der 90%-Quantilwert betrug 150.000 für Raps- und respektive 1,4 Mio für Gesamtpollen. Das Minimum lag bei 66.000 Gesamtpollenanzahl. Bei der Rapspollenanzahl wurde im Minimum die bei der Auszählung bestimmte Nachweisgrenze von 100 Pollen (Auszählung 1% der Probe) an einem Standort im Referenzbereich unterschritten. Der Rapsanteil in den Pollenproben des PMF bewegte sich hierbei in einem Bereich von <0,2% - 27,2%. Gemäß der verwendeten Filtrationstechnik sollte dies den Anteilen im Luftstrom in etwa entsprechen (Kowalski et al. 1999).

Die sich aus den PMF-Proben ergebenden Werte für den horizontalen Pollenfluss in Pollenanzahl pro m² finden sich in den nebenstehenden Spalten. Daraus zeigt sich, dass die mit dem PMF über den Blühzeitraum von Raps ermittelten Pollenflüsse im Bereich von $8 \cdot 10^6$ bis $2,6 \cdot 10^8$ Pollen/m² (Gesamtpollen) mit einem Median bei $7,7 \cdot 10^7$ Pollen/m² anzusiedeln sind. Die entsprechenden Werte für die Rapspollenflüsse lagen im Mittel (Median) bei 760.000 Pollen/m² und reichten von unter der NWG (9.000 Pollen/m²) bis $7,2 \cdot 10^7$ Pollen/m².

Erhebungen 2001	PMF-Probe		Raps- anteil	Pollenfluss PMF		Einstufung
	Gesamt- pollen	Raps- Pollen		Gesamt- Pollen	Raps- Pollen	
<small>Sammelzeitraum = Blühzeitraum = 30-34 d</small>						
n=49	M / PMF	N / PMF	%	M / m²	N / m²	
NWG	100	100	0,2%	9.000	9.000	Nachweisgrenze
Minimum	66.000	<100	<0,2%	8.000.000	<9.000	agrarferne Gebiete
10% Perc. Log-Normal- Basisverteilung	122.000	514	0,4%	15.000.000	64.000	Baseline im Agrarraum
10% Perc. Probenkollektiv	110.000	810	0,4%	14.000.000	102.000	
Median Log-Normal- Basisverteilung	500.000	3.580	0,7%	62.000.000	450.000	Mittel für Agrarraum
Median Probenkollektiv	620.000	6.100	1,5%	77.000.000	760.000	mittlere Erwartungswerte für Raps- Hauptanbau- gebiete
Mittelwert Probenkollektiv	720.000	48.000	5,3%	90.000.000	6.000.000	
90% Perc. Log-Normal- Basisverteilung	2.000.000	25.000	1,3%	250.000.000	3.000.000	90% Perc. Agrarraum
90% Perc. Probenkollektiv	1.400.000	150.000	16,1%	177.000.000	18.000.000	90%-Perc. Raps-Haupt- anbauggebiete
Maximum Probenkollektiv	2.100.000	580.000	27,2%	265.000.000	72.000.000	Rapsfelder angrenzend

Tab. 3.1.4: Ergebnisstatistik der Pollenzählungen für die Proben aus dem Pollenmassenfilter PMF über die Rapsperiode [Exposition über Hauptblühzeitraum 30–34 Tage] mit Schätzwerten der Log-Normal-Basisverteilung und Einstufung von Erwartungswerten zu Pollenanzahlen in einem überregionalen Monitoring in 2001.

Nach den Ergebnissen aus den PCR-Ringversuchen zum molekularbiologischen Nachweis von GVO-Rapspollen ergab sich eine Zielgröße von 100 Rapspollen/Probe, die mindestens in einer Probe enthalten sein sollten. Die Ergebnisse der Pollenzählungen belegten, dass dies mit dem PMF zu über 95% der Fall war, und im Durchschnitt Rapspollenanzahlen zwischen 5.000 (Median) und 48.000 (Mittelwert) pro Probe mit Gesamtpollenanzahlen von 620.000 bis 720.000 Pollen/Probe für den Agrarraum ausgewiesen wurden. Das gesetzte technische Ziel der Sammlung ausreichender Pollenmengen für die PCR wurde damit erreicht.⁹⁹

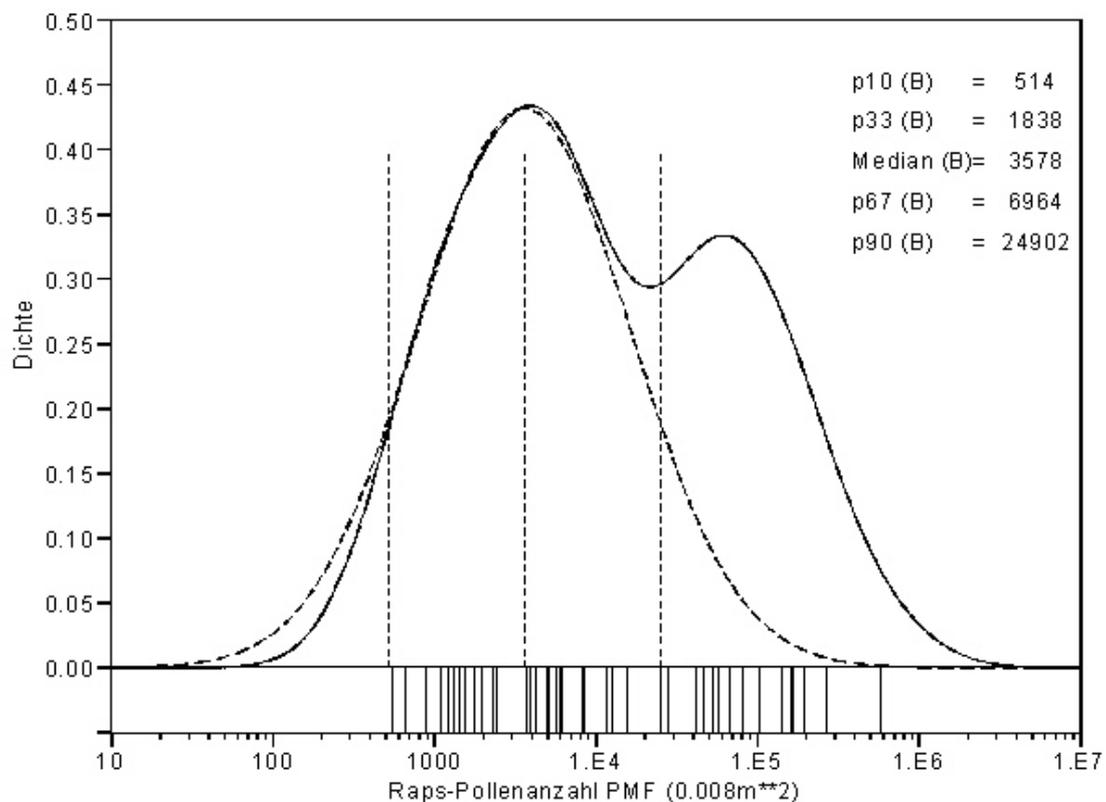


Abb. 3.1.6: Verteilung der Messwerte der Rapspollenanzahlen aus dem PMF und Dichteschätzung mit Log-Normal-Basisverteilung. Durchgezogene Linie: Dichteschätzung für die Gesamtheit der Messwerte (n=53 Standorte). Gestrichelte Linie: angepasste Log-Normal-Basisverteilung. Senkrechte

⁹⁹ Die Sammeleffizienz ist damit noch deutlich höher als vom Aktivgerät Burkard-Falle einzustufen und kommt in den Bereich von High-Volume-Sammlern

Linien: 10%-Quantil (p10), Median und 90%-Quantil (p90) (Basisverteilung). Für den Pollenfluß [n/m²] sind Werte mit dem Faktor 125 zu multiplizieren.

Wie bereits beim Passivsammler Sigma-2 (siehe Kap. 3.2) beschrieben, folgen die Rapspollenanzahlwerte auch beim PMF nicht einer Normalverteilung sondern einer Log-Normal-Basisverteilung. Die Schätzkurve zur Dichteverteilung der Messwerte zur Rapspollenanzahl aus den PMF-Proben in Abb. 3.1.2 folgt auf der linken Flanke einer Log-Normal-Basisverteilung. Im Hinblick auf ein überregionales Monitoring wird im Mittel eine Rapspollenanzahl von etwa 3.600 Rapspollen pro Probe für das Jahr 2001 geschätzt. Die Baseline wird bei etwa 500 Rapspollen angesiedelt, 90% der Proben werden im Bereich bis 25.000 Rapspollen erwartet. Hierbei ist eine Jahr-zu-Jahr-Variation zu berücksichtigen, die aus unseren Versuchen in 2001 allerdings alleine nicht abgeschätzt werden kann.¹⁰⁰

3.1.3.2 Ergebnisse der PCR-Analysen

Die Ergebnisse aus den in Kap. 2.4.4.1 und 2.4.5.1 beschriebenen PCR-Analysen der 52 PMF-Proben aus der Rapsperiode sind in Tab. 3.1.5 zusammengefasst.

Von 52 Proben wurde in 23 Proben qualitativ das Vorhandensein von Raps-spezifischer DNA nachgewiesen und in 11 Proben transgene DNA von HR-Raps. In 16 Proben gelang zwar die PCR (Spiking), jedoch wurden weder Raps- noch transgene DNA nachgewiesen (Nachweisgrenze). In 15 Proben gelang der DNA-Nachweis über die PCR nicht. Es traten über Spiking nachgewiesene Inhibitionsprobleme auf, die trotz mehrfacher Aufreinigung nicht zu beseitigen waren.

¹⁰⁰ Aus Versuchen bis einschließlich 2004 ergab sich eine Variation mit bis zu 10fach höheren Rapspollenflüssen im Maximum

Ergebnisse der PCR-Nachweise von Pollen-DNA in den PMF-Proben		
Rapsversuchsperiode (52 Proben)		
• Raps spez. +	(PEPC)	n= 23
• davon GVO +	(35S, PAT)	n= 11
• Raps/GVO negativ	(Spike +)	n= 16
• inhibiert	(Spike -)	n= 15

Tab. 3.1.5: Ergebnisse der PCR-Analysen von Pollen-DNA in den PMF-Proben aus der Rapsversuchsperiode. Qualitative PCR.

Die Ergebnisse belegen, dass das Verfahren nicht nur bei Rapspollenproben aus dem Labor, sondern auch bei Realproben aus dem Freiland funktioniert, jedoch bei letzteren noch keine ausreichende Nachweissicherheit erreicht werden konnte. Der Zeitrahmen des Vorhabens erlaubte hier keine zur Lösung ausreichenden Nacharbeiten, so dass entsprechende Verfahrensverbesserungen einem Folgeprojekt (Beismann et al. 2003) vorbehalten sind.

3.1.3.3 Sensitivität, Nachweisgrenze und Reproduzierbarkeit

Die Ergebnisse aus den Versuchen in der Rapsperiode für den Pollenmassenfiler PMF sind in Abb. 3.1.7 grafisch dargestellt und in Tab. 3.1.6 zusammengefasst. In Abb. 3.1.7 zeigt die waagerechte Achse den Pollenfluss gemäß der Ausbreitungsrechnung aus den beiden GVO-Rapsfeldern bei Sickte auf einer logarithmischen Skala. Zum Vergleich sind die entsprechend unter den Versuchsbedingungen zu erwartenden Konzentrationen aufgeführt. Die senkrechte Achse gibt die Pollenanzahl der PMF-Proben an. Der Verteilungscharakteristik der Pollendaten angenähert, sind die Skalierungen logarithmisch gehalten. Die obere Kurve gibt die Gesamtpollenanzahl an. Die Rapspollenanzahl in den PMF-Proben wird für die Standorte in der Umgebung der GVO-Felder bei Sickte über die mittlere Kurve dargestellt. Die nicht gefüllten Punkte rechterhand zeigen zum Vergleich die Rapspollenzahlen für die Referenzgebiete.

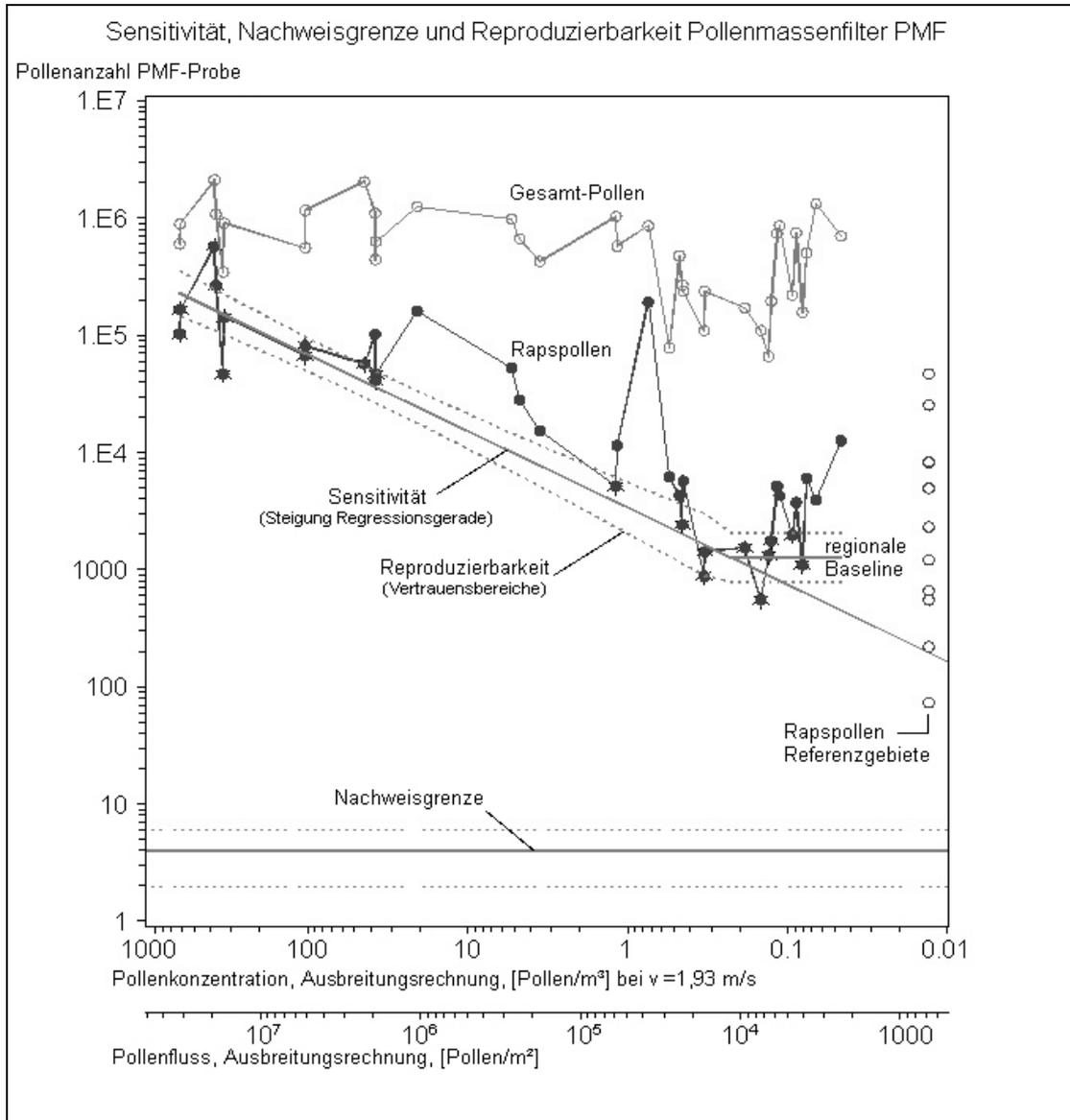


Abb. 3.1.7: Sensitivität, Nachweisgrenzen und Reproduzierbarkeit für den Pollenmassenfilter PMF. Ergebnisse aus dem Vergleich der gesammelten Rapspollenmenge im PMF und dem Rapspollenfluss aus den beiden GVO-Feldern bei Sichte gemäß Ausbreitungsrechnung mit Vergleichswerten aus den Referenzgebieten. Die Angaben zur Rapspollenkonzentration gelten unter den Versuchsbedingungen [T=34d Expositionszeit, mittlere Windgeschwindigkeit $v=1,93\text{m/s}$; Quellstärke $Q=10^9$ Rapspollen/(ha·h) = $\sim 10^{12}$ Pollen / (ha T)].

Die in den PMF-Proben erfassten Pollenanzahlen (Gesamtpollenanzahl) bewegten sich auf einem gleich bleibenden Niveau von etwa 100.000 bis 2 Millionen Pollen/Probe. Bei den Rapspollenmengen ist hingegen ein signifikanter, abnehmender Trend von hohen Werten links oben im Bereich von über 100.000 Rapspollen pro Probe, die Standorten im näheren Einflussbereich der GVO-Rapsfelder zuzuordnen sind, hin zu niedrigeren Werten rechts unten festzustellen, bis ein Basisniveau des Raumes um 1.000 Pollen pro Probe erreicht wird. Da sowohl der Eintrag an Rapspollen aus den beiden transgenen Versuchsfeldern, als auch aus anderen konventionellen Rapsfeldern im Raum bei den Zählungen erfasst werden, weisen einzelne Standorte, die sich im näheren Einflussbereich anderer Rapsfelder befinden, entsprechend höhere Werte auf. Dies wurde in der statistischen Auswertung der Ergebnisse methodisch entsprechend berücksichtigt (s. Kap. 2.8).

Die Ergebnisse der Regressionsanalyse in Tab. 3.1.6 weisen den Trend als statistisch mit $p < 0,001$ signifikantem Zusammenhang von Rapspollenanzahl aus den PMF-Proben mit dem Gradienten der Ausbreitungsrechnung aus. Dies ist ein Beleg für die signifikante Sensitivität des PMF. Der Vertrauensbereich (gepunktete Linien) gibt die Reproduzierbarkeit an. Die Nachweisgrenze des PMF wird über die unteren waagerechten Linien mit Vertrauensbereich angezeigt. Die Rapspollenanzahl schwenkt in den entfernteren Bereichen mit geringer Zusatzbelastung aus den GVO-Feldern nach Art eines Hockey-Sticks auf ein Niveau ein, das die Basisbelastung an Rapspollen im Raum entsprechend der jeweiligen Dichte des dortigen Rapsanbaus beschreibt (waagerechte Linie mit Vertrauensbereich). Dies belegt, dass mit dem Verfahren regionalspezifische Baselines ermittelbar sind: Eine solche ist im Raum Sickinge für 2001 bei 1.000 Rapspollen/Probe anzusiedeln. Die Rapspollenanzahlen der Sammler aus den Referenzgebieten beschreiben einen vergleichbaren oberen Messbereich. Er wird zudem nach unten durch Standorte verlängert, die von Rapsanbaugebieten weiter entfernt liegen, wie der Standort im Nationalpark Bayerischer Wald.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	3	377.3	125.8	150.13	<.0001
Residual	18	1.0882	0.0605		
Uncorrected Total	21	378.4			
Corrected Total	20	19.2415			

Parameter	Estimated	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits		Label
(im Text:)					
a0 (lg(yH))	3.1049	0.1004	2.8940	3.3158	
a2 (d)	0.6532	0.0529	0.5422	0.7642	
c1 (c)	0.6468	0.2549	-1.1823	-0.1112	

Tab. 3.1.6: Ergebnis der Regressionsanalyse für den PMF aus den Rapspollenzählungen

3.1.3.4 Sicherheit des Nachweises und erforderliche Fallzahlen

In Abb. 3.1.8 ist für den PMF, analog zum Sigma-2, die Nachweissicherheit von Rapspollen in Abhängigkeit vom Pollenfluss bei verschiedenen Fallzahlen dargestellt.

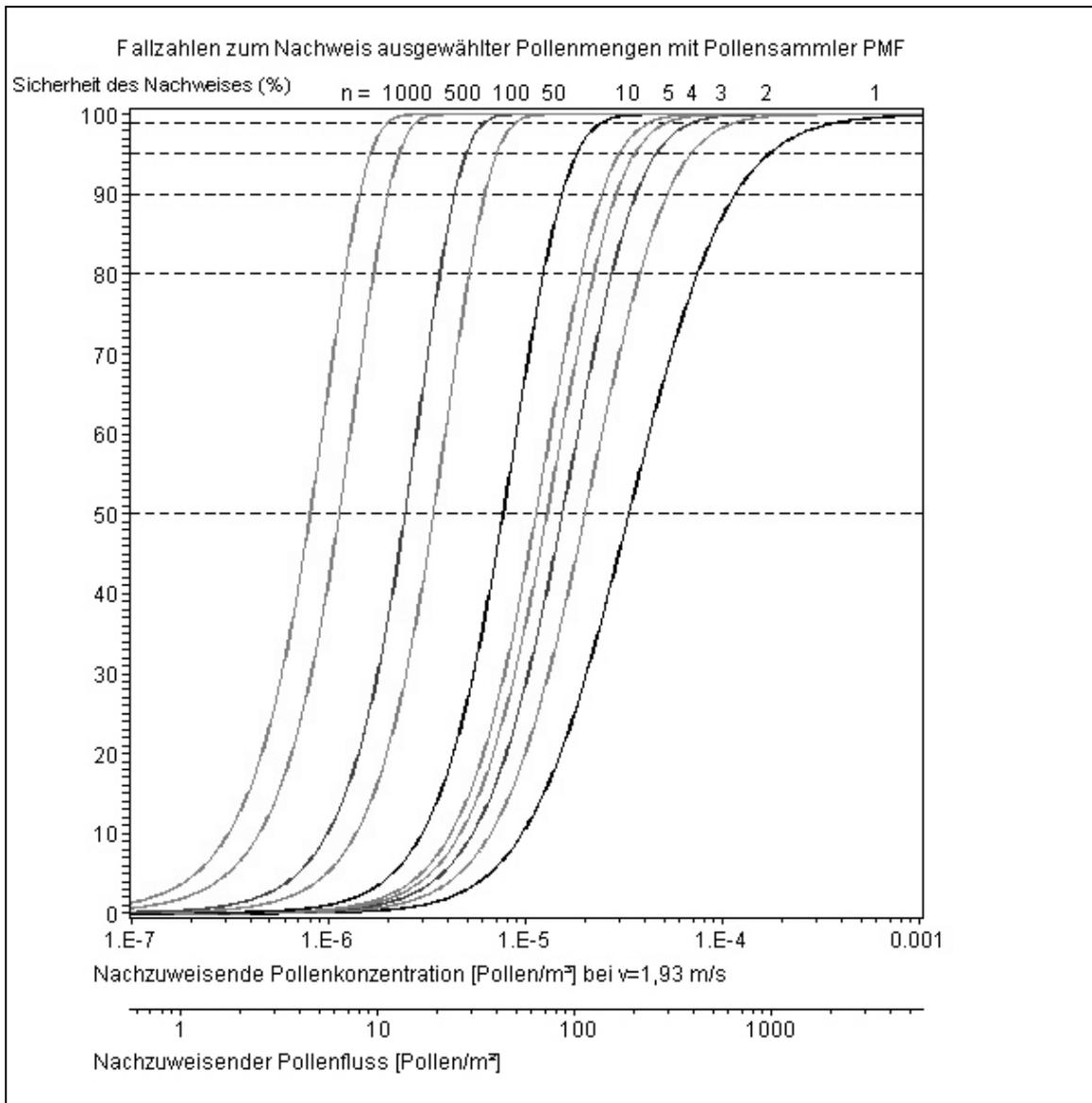


Abb. 3.1.8: Sicherheit des Nachweises von Rapspollen in Abhängigkeit vom Pollenfluss und unterschiedlichen Fallzahlen beim Pollensammler PMF. Die Angaben zur mittleren Pollenkonzentration über den Blühzeitraum gelten für die Sicker Versuchsbedingungen.

Die Nachweissicherheit wird von der senkrechten Achse angezeigt. Den Pollenfluss in Rapspollenanzahl/m² bezeichnet die untere waagerechte Skala, die zweite waagerechte Skala gibt die damit verbundene mittlere Rapspollenkonzentration nach

Ausbreitungsrechnung unter den im Sickter Rapsversuch in 2001 geltenden Randbedingungen an.

Fallzahlen PMF (n=Rapspollenanzahl, m=Fallzahl)						
Nachweisgrenzen			Fallzahlen m für Nachweissicherheit			
Pollenfluss	Pollenkonzentration über 7 Tage	Pollenkonzentration über 34 Tage	50%	80%	90%	95%
n/m ²	n/m ³	n/m ³	m	m	m	m
5	0,0000039	0,0000008	1.000			
7	0,0000058	0,0000012		1.000		
8	0,0000070	0,0000014			1.000	
9	0,0000079	0,0000016				1.000
14	0,000012	0,0000024	100			
21	0,000018	0,0000036		100		
25	0,000021	0,0000044			100	
28	0,000024	0,0000049				100
43	0,000037	0,0000076	10			
70	0,000060	0,000012		10		
86	0,000074	0,000015			10	
103	0,000088	0,000018				10
188	0,00016	0,000033	1			
420	0,00036	0,000074		1		
651	0,00056	0,000115			1	
963	0,00082	0,00017				1

Tab. 3.1.7: Fallzahlen, Nachweisgrenze und -sicherheit beim PMF für Rapspollenanzahl in Abhängigkeit von Pollenfluss und mittlerer Konzentration.

Für den Nachweis von Rapspollen mit einem PMF-Sammler und bei einer 95%-Nachweiswahrscheinlichkeit genügt ein Pollenfluss von ca. 1.000 Pollen/m². Dies stellt eine Verfahrenskenngröße des PMF-Sammlers dar, die sich auf die in der Luft transportierten Pollenmenge bezieht, unabhängig über welchen Zeitraum sie gewonnen wird. Unter den Sickter Versuchsverhältnissen entspräche dies bei einem Sammelzeitraum von 34d einer mittleren Konzentration von ca. 0,0002 Pollen/m³ oder

0,0008 Pollen/m³·bei 7d. Die Steigerung von Nachweisgrenze und Aussagekraft durch Erhöhung der Fallzahlen nimmt entsprechend der dargestellten Kurven zu.

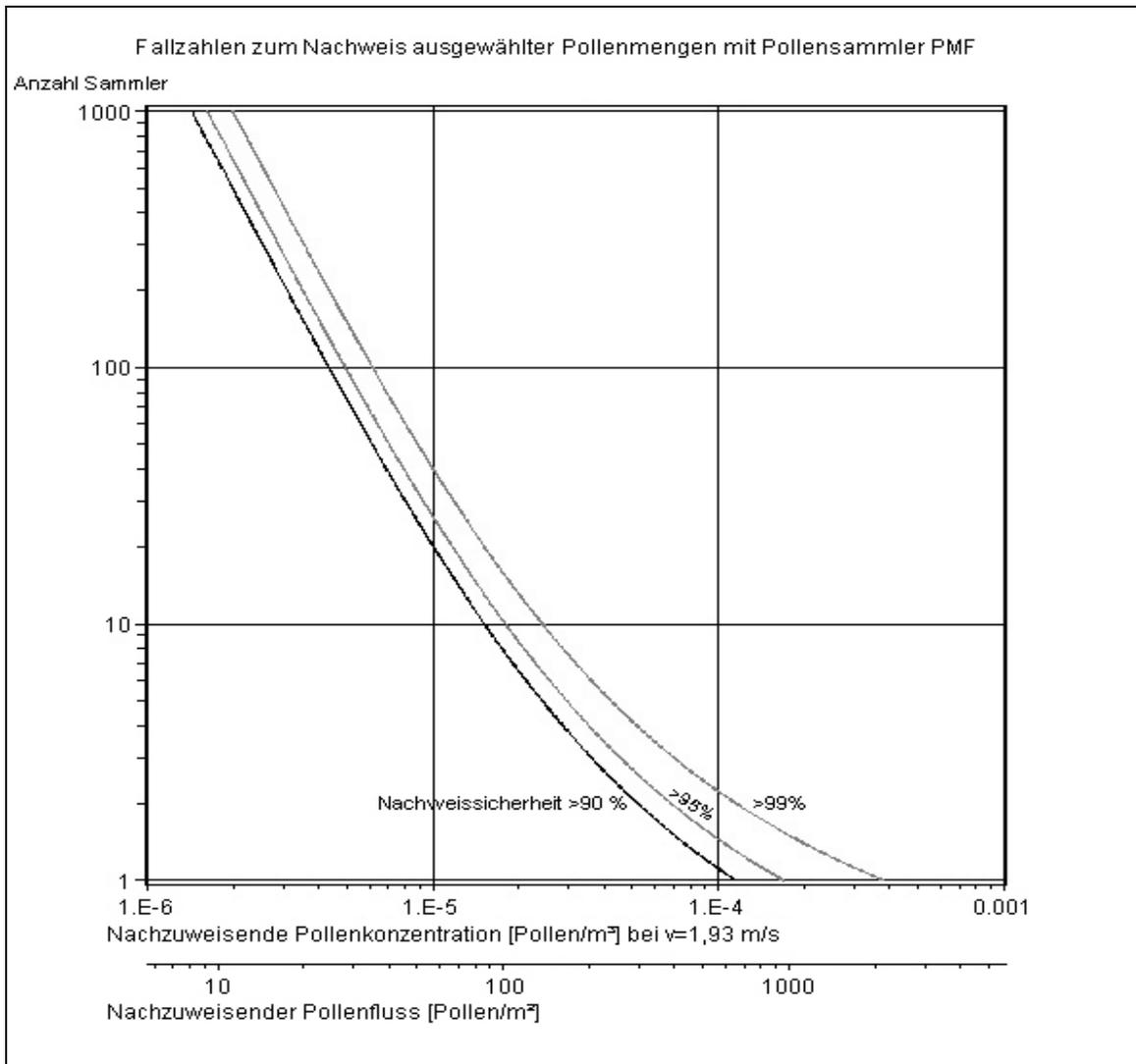


Abb. 3.1.9: Nachweisgrenzen und Fallzahlen für Rapspollen mit dem Pollensammler PMF in Abhängigkeit vom Pollenfluss. Die Angaben zur Konzentration gelten fallspezifisch, hier für die Sickter Verhältnisse.

Die Abhängigkeit von nachweisbarer Pollenmenge und Fallzahl beim PMF ist für vier Nachweiswahrscheinlichkeiten (50%, 80%, 90% und 95%) in Abb. 3.1.9 und Tab. 3.1.7 genauer dargestellt. Die bei einem PMF-Sammler mit 95%iger Sicherheit

nachzuweisende mittlere Pollenkonzentration von $1,7 \cdot 10^{-4}$ Pollen/m³ (mittlere Konzentration über 34d) bzw. 963 Pollen/m² (Pollenfluss) lässt sich durch den Einsatz von 10 Sammlern auf $1,8 \cdot 10^{-5}$ Pollen/m³ (103 Pollen/m²), bei 100 Sammlern auf $4,9 \cdot 10^{-6}$ Pollen/m³ (28 Pollen/m²) und bei 1.000 Sammlern auf ca. $1,6 \cdot 10^{-6}$ Pollen/m³ steigern, was einem Pollenfluss von 9 Pollen/m² entspricht.

Der PMF erreicht damit eine Nachweisgrenze, die deutlich unterhalb der Messroutine der Polleninformationsdienste mit der Burkard-Falle anzusiedeln ist.

Selbst unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus den PCR-Ringversuchen, dass für PCR-Nachweise mindestens 100 Pollen der Zielspezies erforderlich sind, belegen die Ergebnisse eine ausreichende Sammeleffizienz des PMF.

3.1.4 Ergebnisse aus der Sommerperiode für Mais und Zuckerrübe

Die erfassten Pollenanzahlen des PMF aus den ergänzend durchgeführten Maisversuchen in der Sommerperiode gehen aus Abb. 3.1.10 hervor. Dargestellt sind Maispollen- und Gesamtpollenanzahl an den Standorten in der Umgebung der Maisversuchsflächen aus Nordrhein-Westfalen, Niedersachsen und Bayern. Die Standorte sind gebietsweise und entsprechend der Einflussstärke aus den Versuchsfeldern von links nach rechts abnehmend nach der Maispollenanzahl sortiert. Am Standort 68 bei Gut Melaten steigt die Maispollenanzahl auf Grund der Annäherung an ein weiteres Maisfeld wieder an. Die mit dem PMF gesammelten Pollenanzahlen bewegen sich in einem Bereich von 5.000 bis 1 Million Pollen. Die Maispollenanzahlen zeigen sich von der relativen Lage der Standorte zu den Maispollenfeldern und deren Größe abhängig. Sie erreichen Werte über 20.000 Maispollen pro Probe und gehen im Minimum bis unter die für die Zählung geltende Nachweisgrenze von 60 Pollen.

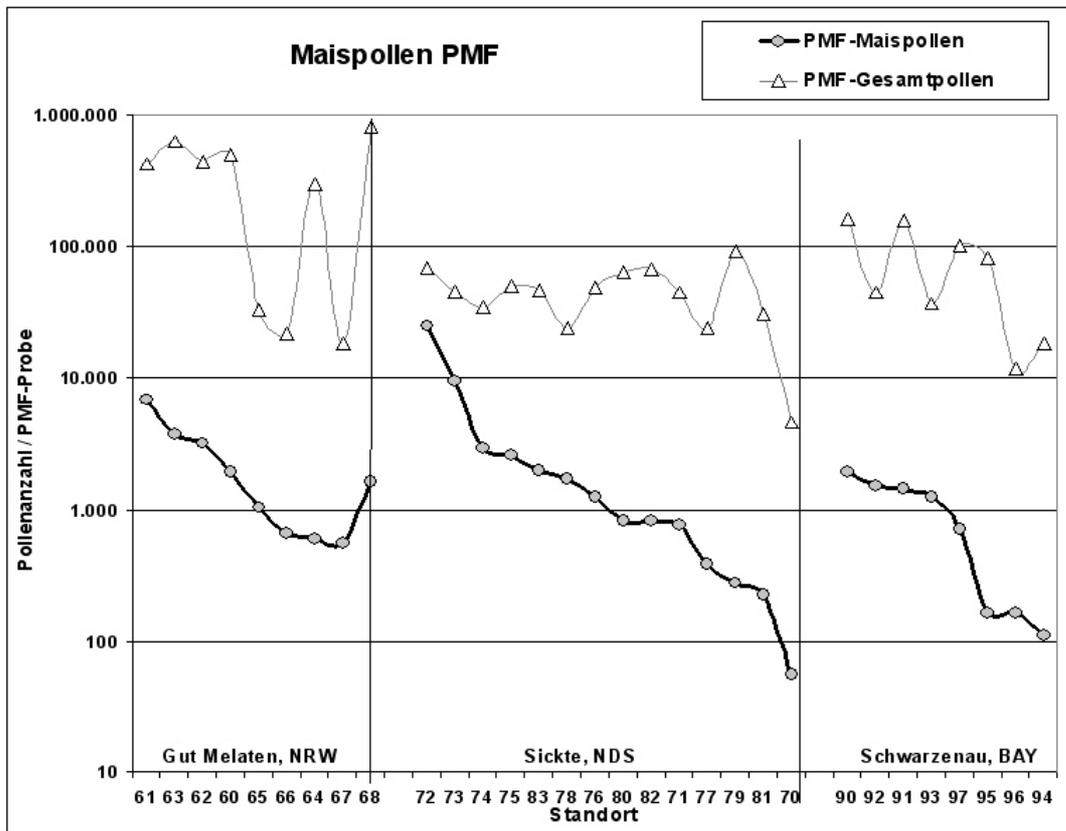


Abb. 3.1.10: Ergebnisse der Mais- und Gesamtpollenanzahl in den PMF-Proben der Sommerperiode. Feldeinfluss jeweils von links nach rechts abnehmend. Standort 68: Annäherung an weiteres Maisfeld.

In Abb. 3.1.11 werden die gemessenen Maispollenanzahlen aus dem PMF mit dem Gradienten gemäß der Ausbreitungsrechnung für das Maisversuchsfeld in Sickte verglichen. Die Ergebnisse aus der Regressionsanalyse zeigen einen signifikanten Zusammenhang, wobei drei Standorte deutlich höhere Anzahlen auf Grund des Einflusses anderer Maisfelder aufweisen.

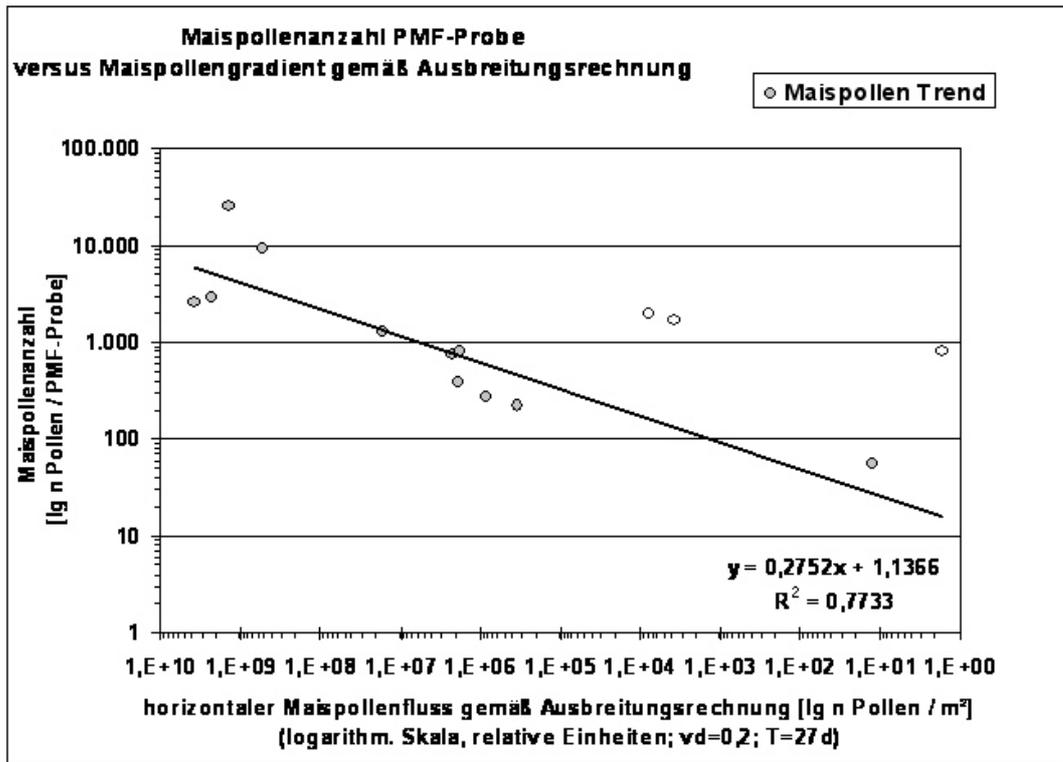


Abb. 3.1.11: Zusammenhang von gemessener Maispollenanzahl im PMF mit Vorhersagewerten für den horizontalen Maispollenfluss aus der Ausbreitungsrechnung für das Maisversuchsfeld in Sickinge. Für die Umrechnung von Pollenfluss in mittlere Pollenkonzentration pro m³ über den Blühzeitraum vom 20.7.-16.8.01 gilt unter den Sickinge Versuchsbedingungen bei der mittleren Windgeschwindigkeit von 1,73 m/s ein Faktor von $4,04 \cdot 10^{-6}/m$.

Für die Versuchsflächen in NRW und Bayern konnten auf Grund unzureichender Sekundärdaten zur Meteorologie keine Ausbreitungsrechnungen durchgeführt werden.

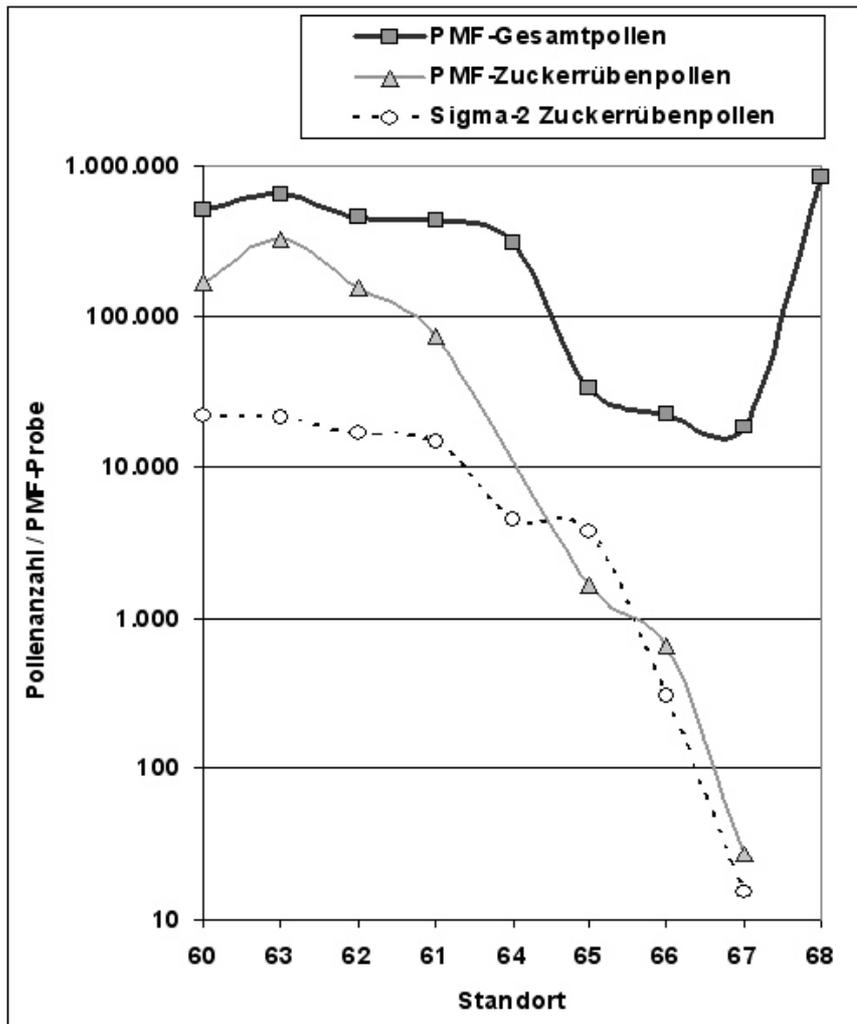


Abb. 3.1.12: Mit den technischen Sammlern Sigma-2 und PMF erfasste Pollenanzahlen in der Umgebung der Zuckerrüben-Versuchsfelder der RWTH in Aachen (NRW). [Pollenanzahl pro Probe]

Die Ergebnisse aus den Versuchen in der Umgebung der Freisetzungsfelder der VR-Zuckerrübe in NRW sind für die technischen Sammler in Abb. 3.1.12 zusammenfassend dargestellt. Die Grafik enthält die Anzahl an Zuckerrüben- und Gesamtpollen in den PMF-Proben und die Anzahl der mit dem Sigma-2 erfassten Zuckerrübenpollen. Mangels geeigneter Ausbreitungsrechnungen wurden die Standorte nach der Zuckerrübenpollenanzahl aus dem Sigma-2 angeordnet. Die mit dem Sigma-2 gut erfassbaren Zuckerrübenpollen reichen von Anzahlwerte in der Größenordnung von

20.000 im Nahbereich der Felder¹⁰¹ bis unter 30 Pollen am abseits liegenden Standort 67 und beschreiben damit einen Gradienten über 3 Größenordnungen. Die Sigma-2 - Haftfolie am weiter entfernten Standort 68 konnte auf Grund einer massiven Insektenbelegung nicht ausgezählt werden.

Der sich darstellende Trend wird durch die im PMF erfassten Pollenanzahlen an Zuckerrübenpollen bestätigt. Die Pollenanzahlen erreichten hier Werte bis über 300.000 Zuckerrübenpollen/Probe.

Der Vergleich der Zuckerrübenpollenanzahl mit der jeweiligen Lage der Standorte in Relation zu den Versuchsfeldern in Abb. 2.7.19 aus Kap. 2.7 erscheint plausibel. Die weiter entfernt und abseits befindlichen Standorte zeigen deutlich geringere Anzahlen.

Die Pollenanzahlen sind ausreichend, so dass sich die Eignung der technischen Sammler nach den Ergebnissen für Rapspollen auch für die Erfassung von Zuckerrübenpollen im Freiland ableiten lässt. Beim PMF gilt dies auch für Maispollen.

Beim Sigma-2 hingegen zeigte sich die Identifikation und Auszählung von Maispollen mittels der Bildanalyse noch unklar. In 9 Proben konnten Maispollen eindeutig identifiziert werden, wobei die Belegung relativ geringe Werte von im Mittel 28 bis maximal 509 Maispollen aufwies. Die Gesamtpollenanzahl bewegte sich hierbei im Bereich von 1.570 bis 10.500, im Mittel bei 4.500. Eine systematische Auswertung der Maispollenanzahl war hier allerdings nicht möglich.

Da die Versuchsfeldgrößen sehr klein waren, ist im Umfeld von den im Anbau normalerweise erheblich größeren Feldern mit entsprechend höheren Belegungen zu rechnen.

¹⁰¹ Wobei es sich um relativ kleine Versuchsfelder handelte (siehe Kap. 2.7).

3.1.5 Pollenspektrum des technischen Sammlers

Die Ergebnisse aus der qualitatitiven Auswertung des erfassten Pollenspektrums aus den technischen Sammlern (PMF-Proben) findet sich zusammengefasst in Tab. 3.1.8. Insgesamt wurden in 84 Proben Pollen von insgesamt 83 Pflanzenarten bzw. Gattungen mit einem Anteil von über 0,2% identifiziert. Die Verteilung der Funde auf die Frühlings- und Sommerperiode geht aus der Tabelle hervor. Die Ergebnisse belegen, dass mit dem technischen Sammler ein breites Pollenspektrum erfasst wird, das weit über Mais, Raps und Zuckerrübe hinausgeht.

Pollenarten/Gattungen	Funde in	Funde in	Funde in
	Frühlings- proben	Sommer- proben	Proben gesamt
Probenanzahl	n = 51	n = 33	
Acer / Ahorn / maple (Acer.)	18	0	18
Achillea-T. / Schafgarben-T. / yarrow (Comp.)	4	16	20
Aesculus / Roskastanie / horse chestnut (Hip.)	7	1	8
Ailanthus / Götterbaum / tree of heaven (Sim.)	0	7	7
Alismataceae / Froschlöffelgewächse / Water Plantain Family	5	0	5
Allium / Lauch (Lil.)	0	0	0
Alnus* / Erle / alder (Bet.)	13	4	17
Ambrosia* / Taubenkraut / ragweed (Comp.)	0	2	2
Anemone / Windröschen / wind rose (Ran.)	0	0	0
Anthriscus-T. / Wiesen-Kerbel-T. / cow parsley-T. (Apiac.)	9	7	16
Arctium / Klette / burdock (Ast.)	0	5	5
Artemisia* / Beifuß / mugwort (Ast.)	0	32	32
Asparagus / Spargel / asparagus (Lil.)	0	0	0
Begonia / Begonie (Beg.)	0	0	0
Beta-T./ Rüben-T. / beet-T. (Chen.)	0	7	7
Betula* / Birke / birch (Bet.)	44	4	48
Bistorta officinalis / Wiesenknöterich / meadow bistort (Polyg.)	0	0	0
Borago / Borretsch / borage (Bor.)	0	1	1
Brassica / Raps / rape (Brass.)	48	17	65
Brassicaceae / Kreuzblütler / Mustard Family	1	3	4
Bryonia / Zaunrübe / bryony (Cuc.)	0	1	1
Buddleja / Schmetterlingsstrauch / butterfly bush (Bud.)	0	0	0
Calluna vulgaris / Besenheide / ling (Eric.)	0	0	0
Calystegia / Zaunwinde / great bindweed (Conv.)	0	2	2
Campanulaceae / Glockenblumengewächse / Bellflower Family	0	0	0
Carpinus* / Hainbuche / hornbeam (Bet.)	31	0	31
Caryophyllaceae / Nelkengewächse / Pink Family	2	1	3
Castanea sativa / Edelkastanie / sweet chestnut (Fag.)	0	3	3
Catalpa / Trompetenbaum / catalpa (Big.)	0	0	0
Centaurea cyanus / Kornblume / cornflower (Ast.)	0	1	1
Centaurea jacea-T. / Flockenblume / knapweed (Ast.)	2	3	5

3. Ergebnisse

Pollenarten/Gattungen	Funde in	Funde in	Funde in
	Frühlings- proben n = 51	Sommer- proben n = 33	Proben gesamt
Probenanzahl			
Centaurea montana / Bergflockenblume / perennial cornflower (Ast.)	0	1	1
Cerastium / Hornkraut / chickweed (Car.)	3	0	3
Chelidonium* / Schöllkraut / greater celandine (Pap.)	0	0	0
Chenopodiaceae* / Meldegewächse / Goosefoot Family	0	32	32
Cichorium-T. / Wegwarten-T. / chicory-t. (Ast.)	0	1	1
Cistus / Zistrose / rock rose (Cist.)	0	0	0
Convolvulus / Ackerwinde / bindweed (Conv.)	0	2	2
Cornus sanguineum / Hartriegel / dogwood (Corn.)	3	6	9
Corydalis cava / Hohler Lerchensporn / hollowroot (Fum.)	0	0	0
Corylus / Hasel / hazel (Bet.)	35	0	35
Cucumis / Gurke / cucumber (Cuc.)	0	0	0
Datura inoxia / Stechapfel / thornapple (Sol.)	0	0	0
Dipsacaceae / Kardengewächse / Scabious Family	0	0	0
Echinops / Kugeldistel / globe thistle	0	1	1
Echium / Natterkopf / bugloss (Bor.)	0	0	0
Eleagnus / Ölweide / oleaster (Eleag.)	0	0	0
Epilobium / Weidenröschen / fire weed (Onag.)	0	1	1
Erica-T. (Eric.)	2	0	2
Erodium / Reiherschnabel / heron's bill (Ger.)	0	0	0
Eupatorium-T. / Wasserdost-T. / hemp agrimony-T. (Ast.)	4	3	7
Fagopyrum esculentum / Buchweizen / buckwheat (Polyg.)	0	0	0
Fagus* / Buche / beech (Fag.)	43	2	45
Filipendula* / Mädesüß / dropwort (Ros.)	0	1	1
Fragaria / Erdbeere / strawberry (Ros.)	0	0	0
Frangula / Faulbaum / buckthorn (Rham.)	1	2	3
Fraxinus excelsior* / Esche / ash (Oleac.)	35	0	35
Galium / Labkraut / bedstraw (Rub.)	0	0	0
Genista-T. / Ginster-T. / broom-T. (Fab.)	0	0	0
Geranium / Storchschnabel / cranesbill (Ger.)	0	1	1
Gleditsia / Gleditschie / honey locust (Fab.)	0	0	0
Helianthemum* / Sonnenröschen / sun rose (Cist.)	0	0	0
Helianthus annuus / Sonnenblume / sunflower (Ast.)	0	6	6
Helianthus-T. / Sonnenblumen-T. / sunflower-T. (Ast.)	0	2	2
Heracleum / Bärenklau / hogweed (Apiac.)	0	14	14
Heracleum mantegazzianum / Riesenbärenklau (Apiac.)	1	1	2
Hypericum* / Johanniskraut / St. John's Wort (Gutt.)	0	0	0
Ilex aquifolium / Stechpalme / common holly (Aquif.)	0	0	0
Impatiens / Springkraut / balsam (Bal.)	0	1	1
Juglandaceae* / Walnussgewächse / Walnut Family	42	1	43
Juncaceae* / Binsengewächse / Rush Family	0	0	0
Lavandula / Lavendel / lavender (Lam.)	0	0	0
Ligustrum / Rainweide / privet (Oleac.)	2	7	9
Liliaceae / Liliengewächse / Lily Family	1	1	2
Liriodendron / Tulpenbaum / tulip tree (Mag.)	0	0	0
Lonicera / Heckenkirsche / honeysuckle (Capr.)	0	2	2
Lotus / Hornklee / bird's foot trefoil (Fab.)	0	0	0
Lotus uliginosus / Sumpf-Hornklee / greater bird's foot trefoil (Fab.)	0	0	0
Lychnis / Lichtnelke / pink-T. (Car.)	0	0	0
Lythraceae / Weiderichgewächse / Loosestrife Family	0	1	1
Malvaceae / Malvengewächse / Mallow Family	0	2	2
Melilotus / Steinklee / melilot (Fab.)	0	0	0
Moraceae* / Maulbeergewächse / Mulberry Family	3	1	4
Morus* / Maulbeere / mulberry (Mor.)	0	7	7

3. Ergebnisse

Pollenarten/Gattungen	Funde in	Funde in	Funde in
	Frühlings- proben n = 51	Sommer- proben n = 33	Proben gesamt
Probenanzahl			
Myosotis / Vergissmeinnicht / forget-me-not (Bor.)	0	0	0
Nymphaea* / Seerose / water lily (Nym.)	0	1	1
Oenothera / Nachtkerze / evening primrose (Onagr.)	0	0	0
Onagraceae / Nachtkerzengewächse / Evening Primrose Family	0	0	0
Ononis / Hauhechel / restharrow (Fab.)	0	0	0
Origanum-T. / Majoran-T. / marjoram-T. (Lam.)	0	1	1
Pachysandra terminalis / Ysander / Spurge (Bux.)	0	0	0
Papaver-T.* / Mohn / poppy (Pap.)	0	0	0
Parthenocissus / Wilder Wein / woodbine (Vit.)	0	3	3
Pastinaca sativa / Pastinak / parsnip (Apiac.)	0	3	3
Persicaria maculosa / Flohknöterich (Polyg.)	0	4	4
Phacelia tanacetifolia / Büschelschön / fiddle neck (Hyd.)	1	1	2
Picea* / Fichte / spruce (Pin.)	50	24	75
Pinus* / Kiefer / pine (Pin.)	51	32	84
Pisum-T. / Erbsen-T. / pea-T. (Fab.)	0	0	0
Plantaginaceae* / Wegerichgewächse / Plantain Family	7	18	25
Poaceae* / Süßgräser / Grass Family	28	32	60
Populus* / Pappel / poplar (Sal.)	2	1	3
Potentilla* / Fingerkraut / cinquefoil (Ros.)	0	0	0
Prunus-T. / Steinobst-T. / stone fruits (Ros.)	19	0	19
Pyrus-T. / Kernobst-T. / pomaceous fruits (Ros.)	0	1	1
Quercus* / Eiche / oak (Fag.)	49	9	59
Ranunculaceae* / Hahnenfußgewächse / Buttercup Family	4	1	5
Ranunculus-T.* / Hahnenfuß-T. / buttercup-T. (Ran.)	0	0	0
Rhamnaceae / Kreuzdorngewächse / Buckthorn Family	0	0	0
Rhus typhina / Essigbaum / sumac (Anac.)	0	0	0
Robinia pseudoacacia / Scheinakazie / locust (Fab.)	0	0	0
Rosaceae / Rosengewächse / Rose Family	0	0	0
Rubus / Himbeere, Brombeere / raspberry (Ros.)	0	0	0
Rumex* / Ampfer / sorrel (Polyg.)	6	4	10
Ruta graveolens / Weinraute / rue (Rut.)	0	0	0
Salix / Weide / willow (Sal.)	41	8	49
Sambucus* / Holunder / elder (Capr.)	1	0	1
Sanguisorba minor* / Kleiner Wiesenknopf / small burnet (Ros.)	0	0	0
Sedum-T. / Fetthennen-T. / stonecrop (Crass.)	0	0	0
Senecio / Greiskraut / groundsel (Ast.)	0	1	1
Serratula-T. / Scharten-T. / saw wort-T. (Ast.)	0	23	23
Sinapis-T. / Senf-T. / mustard-T. (Brass.)	1	9	10
Solanum-T. / Nachtschatten-T. / nightshade-T. (Sol.)	0	0	0
Sorbus-T. / Ebereschen-T. / mountain ash (Ros.)	0	0	0
Symphoricarpos / Schneebeere / snowberry (Capr.)	1	0	1
Symphytum / Beinwell / comfrey (Bor.)	0	0	0
Taraxacum-T. / Löwenzahn-T. / dandelion-T. (Ast.)	18	11	29
Taxaceae* / Eibengewächse / Yew Family	8	3	11
Tilia / Linde / lime (Til.)	2	22	24
Trifolium incarnatum / Inkernatklée / crimson clover (Fab.)	0	0	0
Trifolium pratense / Rotklée / red clover (Fab.)	0	4	4
Trifolium repens / Weißklée / white clover (Fab.)	0	5	5
Trifolium-T. / Klée-T. / clover-T. (Fab.)	0	0	0
Tussilago / Huflattich / coltsfoot (Ast.)	2	0	2
Typhaceae* / Rohrkolbengewächse / Cattail Family	0	6	6
Ulmaceae* / Ulmengewächse / Elm Family	0	0	0
Urticaceae* / Nesselgewächse / Nettle Family	0	0	0

Pollenarten/Gattungen	Funde in	Funde in	Funde in
	Frühlings- proben	Sommer- proben	Proben gesamt
Probenanzahl	n = 51	n = 33	
Vaccinium-T. / Heidelbeer-T. / blueberry-T. (Eric.)	0	0	0
Veronica / Ehrenpreis / speedwell (Capr.)	0	0	0
Viburnum / Schneeball / viburnum (Capr.)	1	1	2
Vicia cracca / Vogelwicke / tufted vetch (Fab.)	0	0	0
Violaceae / Veilchengewächse / Violet Family	0	1	1
Viscum / Mistel / mistletoe (Lor.)	0	0	0
Zea mays* / Mais / corn (Poac.)	0	33	33
Anzahl Pollenarten	44	72	83

Tab. 3.1.8: Spektrum der Pollenarten und Gattungen in den Proben aus dem technischen Sammler (PMF). Tabellarische Auswertung der qualitativen Pollenanalyse der Frühlingsproben (Rapsperiode, 51 Proben) und Sommerproben (Mais und Zuckerrübe, 33 Proben).

Systematik der Pflanzennahmen nach Zander (1994); T=Typus;
* =nektarlos (vornehmlich windblütig).

3.2 Biologische Pollensammlerin Honigbiene

3.2.1 Entwicklung der Bienenvölker

Nach den ungünstigen Flug- und Entwicklungsbedingungen für die Bienenvölker im Frühjahr 2001 verbesserte sich die Situation nach Beginn der Rapsblüte. Die beteiligten Imker berichteten von durchschnittlichen bis guten Entwicklungsbedingungen, insbesondere bei der Nektar- und Pollenversorgung. Lediglich die für den Maisversuch in Sickte angewanderten Völker des Landesinstitutes für Bienenkunde mussten Anfang August wegen ungenügender Nektarversorgung zugefüttert werden. Bis auf den Standort B81 erhielten alle Völker 4 kg Honig. Dieser Umstand ist aber nicht ungewöhnlich, da im Spätsommer regional sehr unterschiedlich die Trachtangebote stark schwanken können. Eine Fütterung mit Honig ist aber immer dann angezeigt, wenn anschließend noch eine Honigernte durchgeführt werden soll.

Während der ersten Versuchsperiode wurden am Standort B21 in Sickte die sechs aufgestellten Völker gestohlen; dieser Verlust konnte durch Substituierung mit dem Standort B21a aufgefangen werden. Bei der zweiten Periode war durch Verschluss des Flugloches das Volk B79 abgestorben.

3.2.2 Ergebnisse der Pollenanalysen im Honig und Bienenbrot

Im Rahmen des Modellprojektes wurden insgesamt 52 Honigproben, davon 31 Frühjahrshonige aus den Rapsversuchen und 21 Sommerhonige aus den Mais- und Zuckerrübenversuchen, genommen. Des Weiteren wurden 13 Wabenproben mit eingelagertem Bienenbrot, die in der Sommerperiode anfielen, untersucht.

3.2.2.1 Mikroskopische Pollenanalyse im Honig

3.2.2.1.1 Pollenspektrum im Honig

Die Auswertung der mikroskopischen Pollenanalysen nach DIN 10760 ergab eine Identifizierung der in den Honigproben vorhandenen und bestimmbaren Pollenarten und -gattungen. Exemplarisch ist ein Ergebnisbeispiel einer Befundsliste der Frühjahrshonige zum Rapsversuch im Raum Sickte in Tab. 3.2.1 aufgeführt. Die Auswertung der vorgefundenen Pollenarten/-gattungen aller Befunde der Honigproben ist in Tab. 3.2.2: zusammengefasst.

Pollenarten im Honig	
Anlage zu Befund / enclosure to finding: 2306/01 B 4	
<ul style="list-style-type: none"> Acer / Ahorn / maple (Acer.) Aesculus / Roskastanie / horse chestnut (Hip.) Allium / Lauch (Lil.) Anemone / Windröschen / wind rose (Ran.) Anthriscus-T. / Wiesen-Kerbel-T. / cow parsley-T. (Apiac.) Betula* / Birke / birch (Bet.) Brassica / Raps / rape (Brass.) Cornus sanguineum / Hartriegel / dogwood (Corn.) Liliaceae / Liliengewächse / Lily Family Lonicera / Heckenkirsche / honeysuckle (Capr.) Phacelia tanacetifolia / Büschelschön / fiddle neck (Hyd.) Picea* / Fichte / spruce (Pin.) Pinus* / Kiefer / pine (Pin.) Poaceae* / Süßgräser / Grass Family Prunus-T. / Steinobst-T. / stone fruits (Ros.) Pyrus-T. / Kernobst-T. / pomaceous fruits (Ros.) Salix / Weide / willow (Sal.) Sambucus* / Holunder / elder (Capr.) Sedum-T. / Fetthennen-T. / stonecrop (Crass.) Sinapis-T. / Senf-T. / mustard-T. (Brass.) Sorbus-T. / Ebereschen-T. / mountain ash (Ros.) Taraxacum-T. / Löwenzahn-T. / dandelion-T. (Comp.) Trifolium pratense / Rotklee / red clover (Fab.) 	
*Windblütler	

Tab. 3.2.1: Pollen im Honig, exemplarischer Befund der Probe B4. Außer Raps finden sich zahlreiche weitere Pollenarten bzw. Gattungen von Blütenpflanzen, die zu den Trachtquellen der Honigbiene gehören und von dieser regelmäßig angefliegen werden, im Honig wieder. Darüber hinaus sind auch Windblütler mit Pollen im Honig vertreten, die nicht direkt angefliegen werden. (Nachweisgrenze 0,2%)

3. Ergebnisse

Pollenart/Gattung	Funde im	Funde im	Funde
	Frühjahrs-	Sommer-	Honige
Anzahl Honigproben	honig	honig	gesamt
	n = 31	n = 21	n = 52
Acer / Ahorn / maple (Acer.)	31	8	39
Achillea-T. / Schafgarben-T. / yarrow (Comp.)	8	14	22
Aesculus / Rosskastanie / horse chestnut (Hip.)	25	5	30
Ailanthus / Götterbaum / tree of heaven (Sim.)	0	4	4
Alismataceae / Froschlöffelgewächse / Water Plantain Family	4	0	4
Allium / Lauch (Lil.)	1	0	1
Alnus* / Erle / alder (Bet.)	10	2	12
Anemone / Windröschen / wind rose (Ran.)	0	1	1
Anthriscus-T. / Wiesen-Kerbel-T. / cow parsley-T. (Apiac.)	4	7	11
Arctium / Klette / burdock (Ast.)	0	9	9
Artemisia* / Beifuß / mugwort (Ast.)	0	2	2
Asparagus / Spargel / asparagus (Lil.)	3	9	12
Begonia / Begonie (Beg.)	1	2	3
Berberidaceae / Sauerdorngewächse / Barberry Family	4	0	4
Betula* / Birke / birch (Bet.)	15	5	20
Bistorta officinalis / Wiesenknöterich / meadow bistort (Polyg.)	2	3	5
Borago / Borretsch / borage (Bor.)	28	15	43
Brassica / Raps / rape (Brass.)	7	4	11
Brassicaceae / Kreuzblütler / Mustard Family	0	1	1
Bryonia / Zaunrübe / bryony (Cuc.)	0	6	6
Buddleja / Schmetterlingsstrauch / butterfly bush (Bud.)	0	2	2
Calluna vulgaris / Besenheide / ling (Eric.)	0	5	5
Calystegia / Zaunwinde / great bindweed (Conv.)	0	4	4
Campanulaceae / Glockenblumengewächse / Bellflower Family	3	3	6
Carpinus* / Hainbuche / hornbeam (Bet.)	0	1	1
Caryophyllaceae / Nelkengewächse / Pink Family	4	3	7
Castanea sativa / Edelkastanie / sweet chestnut (Fag.)	2	8	10
Catalpa / Trompetenbaum / catalpa (Big.)	0	2	2
Centaurea cyanus / Kornblume / cornflower (Ast.)	2	7	9
Centaurea jacea-T. / Flockenblume / knapweed (Ast.)	1	0	1
Centaurea montana / Bergflockenblume / perennial cornflower (Ast.)	1	8	9
Chelidonium* / Schöllkraut / greater celandine (Pap.)	3	0	3
Chenopodiaceae* / Meldegewächse / Goosefoot Family	0	8	8
Cichorium-T. / Wegwarten-T. / chicory-t. (Ast.)	0	1	1
Cistus / Zistrose / rock rose (Cist.)	0	3	3
Convolvulus / Ackerwinde / bindweed (Conv.)	1	13	14
Cornaceae / Hartregielgewächse / Dodwodd Family	1	0	1
Cornus sanguineum / Hartriegel / dogwood (Corn.)	12	2	14
Corydalis cava / Hohler Lerchensporn / hollowroot (Fum.)	0	1	1
Corylus / Hasel / hazel (Bet.)	2	0	2
Cucumis / Gurke / cucumber (Cuc.)	0	2	2
Cynoglossum / Hundszunge / hound`s tong (Bor.)	2	0	2
Cyperaceae* / Sauergräser / Sedge Family	2	0	2
Datura innoxia / Stechapfel / thornapple (Sol.)	2	0	2
Deutzia / Deutzie / snow flower (Sax.)	2	0	2
Dipsacaceae / Kardengewächse / Scabious Family	0	5	5
Echium / Natterkopf / bugloss (Bor.)	1	7	8
Eleagnus / Ölweide / oleaster (Eleag.)	0	1	1
Epilobium / Weidenröschen / fire weed (Onag.)	0	6	6
Erica-T. (Eric.)	2	2	4
Erodium / Reiherschnabel / heron's bill (Ger.)	0	1	1
Eupatorium-T. / Wasserdost-T. / hemp agrimony-T. (Ast.)	2	3	5
Euphorbia-T. / Wolfsmilch-T / spurge-T. (Euph.)	1	0	1

3. Ergebnisse

Pollenart/Gattung	Funde im	Funde im	Funde
	Frühjahrs- honig	Sommer- honig	Honige gesamt
Anzahl Honigproben	n = 31	n = 21	n = 52
Fagopyrum esculentum / Buchweizen / buckwheat (Polyg.)	1	0	1
Fagus* / Buche / beech (Fag.)	4	0	4
Filipendula* / Mädesüß / dropwort (Ros.)	10	4	14
Fragaria / Erdbeere / strawberry (Ros.)	2	7	9
Frangula / Faulbaum / buckthorn (Rham.)	14	9	23
Fraxinus excelsior* / Esche / ash (Oleac.)	2	0	2
Galium / Labkraut / bedstraw (Rub.)	0	1	1
Genista-T. / Ginster-T. / broom-T. (Fab.)	0	3	3
Gleditsia / Gleditschie / honey locust (Fab.)	0	3	3
Helianthemum* / Sonnenröschen (Cist.)	1	2	3
Helianthus annuus / Sonnenblume (Ast.)	0	10	10
Heracleum mantegazzianum / Riesenbärenklau (Apiac.)	1	10	11
Hypericum* / Johanniskraut / St. John's Wort (Gutt.)	3	6	9
Ilex aquifolium / Stechpalme / common holly (Aquif.)	1	0	1
Impatiens / Springkraut / balsam (Bal.)	1	2	3
Juglandaceae* / Walnussgewächse / Walnut Family	2	0	2
Juncaceae* / Binsengewächse / Rush Family	0	1	1
Lavandula / Lavendel / lavender (Lam.)	0	2	2
Ligustrum / Rainweide / privet (Oleac.)	5	6	11
Liliaceae / Liliengewächse / Lily Family	2	10	12
Liriodendron / Tulpenbaum / tulip tree (Mag.)	0	1	1
Lonicera / Heckenkirsche / honeysuckle (Capr.)	13	3	16
Lotus / Hornklee / bird's foot trefoil (Fab.)	4	6	10
Lotus uliginosus / Sumpf-Hornklee (Fab.)	1	4	5
Lychnis / Lichtnelke / pink-T. (Car.)	2	1	3
Malvaceae / Malvengewächse	0	8	8
Melilotus / Steinklee / melilot (Fab.)	2	0	2
Morus* / Maulbeere / mulberry (Mor.)	1	2	3
Myosotis / Vergissmeinnicht / forget-me-not (Bor.)	20	0	20
Nymphaea* / Seerose / water lily (Nym.)	0	1	1
Oenothera / Nachtkerze / evening primrose (Onagr.)	0	1	1
Onagraceae / Nachtkerzengewächse	1	0	1
Ononis / Hauhechel / restharrow (Fab.)	2	3	5
Origanum-T. / Majoran-T. / marjoram-T. (Lam.)	0	2	2
Pachysandra terminalis / Ysander / Spurge (Bux.)	0	1	1
Papaver-T.* / Mohn / poppy (Pap.)	8	7	15
Parthenocissus / Wilder Wein / woodbine (Vit.)	0	11	11
Pastinaca sativa / Pastinak / parsnip (Apiac.)	0	1	1
Persicaria maculosa / Flohknöterich (Polyg.)	9	18	27
Phacelia tanacetifolia / Büschelschön / fiddle neck (Hyd.)	0	6	6
Picea* / Fichte / spruce (Pin.)	14	9	23
Pinus* / Kiefer / pine (Pin.)	22	15	37
Pisum-T. / Erbsen-T. / pea-T. (Fab.)	1	1	2
Plantaginaceae* / Wegerichgewächse / Plantain Family	6	7	13
Poaceae* / Süßgräser / Grass Family	27	20	47
Potentilla* / Fingerkraut / cinquefoil (Ros.)	2	2	4
Prunus-T. / Steinobst-T. / stone fruits (Ros.)	29	8	37
Pyrus-T. / Kernobst-T. / pomaceous fruits (Ros.)	29	18	47
Quercus* / Eiche / oak (Fag.)	22	7	29
Ranunculaceae* / Hahnenfußgewächse / Buttercup Family	1	4	5
Ranunculus-T.* / Hahnenfuß-T. / buttercup-T. (Ran.)	1	3	4
Rhamnaceae / Kreuzdorngewächse / Buckthorn Family	4	2	6
Rhus typhina / Essigbaum / sumac (Anac.)	6	5	11

Pollenart/Gattung	Funde im	Funde im	Funde
	Frühjahrs-	Sommer-	Honige
Anzahl Honigproben	honig	honig	gesamt
	n = 31	n = 21	n = 52
Robinia pseudoacacia / Scheinakazie / locust (Fab.)	3	2	5
Rosaceae / Rosengewächse / Rose Family	2	4	6
Rubus / Himbeere, Brombeere / raspberry (Ros.)	2	4	6
Rumex* / Ampfer / sorrel (Polyg.)	6	5	11
Ruta graveolens / Weinraute / rue (Rut.)	0	1	1
Salix / Weide / willow (Sal.)	29	5	34
Sambucus* / Holunder / elder (Capr.)	19	5	24
Sanguisorba minor* / Kleiner Wiesenknopf (Ros.)	4	1	5
Sedum-T. / Fetthennen-T. (Crass.)	2	3	5
Senecio / Greiskraut (Ast.)	3	6	9
Serratula-T. / Scharten-T. (Ast.)	2	14	16
Sinapis-T. / Senf-T. (Brass.)	7	20	27
Solanum-T. / Nachtschatten-T. / nightshade-T. (Sol.)	0	4	4
Sorbus-T. / Ebereschen-T. / mountain ash (Ros.)	7	0	7
Symphoricarpos / Schneebeere / snowberry (Capr.)	4	11	15
Symphytum / Beinwell / comfrey (Bor.)	1	0	1
Syringa / Flieder/ lilac (Oleac.)	1	0	1
Taraxacum-T. / Löwenzahn-T. / dandelion-T. (Ast.)	18	16	34
Taxaceae* / Eibengewächse / Yew Family	0	1	1
Tilia / Linde / lime (Til.)	4	18	22
Trifolium incarnatum / Inkernatklée / crimson clover (Fab.)	2	6	8
Trifolium pratense / Rotklée / red clover (Fab.)	6	5	11
Trifolium repens / Weißklée / white clover (Fab.)	11	20	31
Trifolium-T. / Klée-T. / clover-T. (Fab.)	2	0	2
Tussilago / Huflattich / coltsfoot (Ast.)	0	1	1
Typhaceae* / Rohrkolbengewächse / Cattail Family	0	1	1
Ulmaceae* / Ulmengewächse / Elm Family	1	0	1
Urticaceae* / Nesselgewächse / Nettle Family	0	3	3
Vaccinium-T. / Heidelbeer-T. / blueberry-T. (Eric.)	2	4	6
Veronica / Ehrenpreis / speedwell (Capr.)	0	5	5
Viburnum / Schneeball / viburnum (Capr.)	8	0	8
Vicia cracca / Vogelwicke / tufted vetch (Fab.)	3	5	8
Violaceae / Veilchengewächse / Violet Family	1	6	7
Viscum / Mistel / mistletoe (Lor.)	1	0	1
Zea mays* / Mais / corn (Poac.)	3	15	18
Anzahl Pollenarten	99	114	141

Tab. 3.2.2: *Spektrum der Pollenarten/-gattung im Honig. Tabellarische Auswertung der qualitativen Pollenanalyse der 52 Frühjahrs- und Sommerhonige. Systematik der Pflanzennahmen nach Zander (1993); T=Typus; * =nektarlos (vornehmlich windblütig).*

Bei der Auswertung sowohl der Frühjahrshonige (Raps), als auch der Sommerhonige (Mais) fanden sich in den Honigen Pollen von 141 Pflanzenarten bzw. Gattungen, die mit über 0,2% Anteil vertreten waren. Hierbei zeigte sich, dass nicht nur Pollen von Blütenpflanzen, sondern auch solcher von nektarlosen, windblütigen (anemogamen)

Pflanzen vorhanden waren, wie z.B. *Betula*, *Pinus*, *Picea*, *Quercus*, u.a. sowie Gräserpollen (*Poaceae*). Dies erklärt die Tatsache, dass im Rahmen der Sammeltätigkeit der Biene nicht nur der spezifische Pollen von nektarspendenden Blütenpflanzen, die die Biene aktiv anfliegt, eingetragen wird, sondern auch Fremdpollen, der sich in den besuchten Blüten abgelagert hat (Gesamtheit = *primäre Einstäubung*). Eine weitere Einstäubung geschieht über sich frei im Stock bewegende Pollenteilchen aus verlorenen Pollenhöschen und Pollen, der sich trotz der ausgesprochenen Reinlichkeit der Biene im Haarkleid befindet (= *sekundäre Einstäubung* < 1%). Die dritte Möglichkeit einer Beteiligung von Fremdpollen bieten die Aktivitäten des Imkers bei der Pflege und Ernte des Honigs (= *tertiäre Einstäubung* < 5%) (Louveau et al. 1978). Aufgrund dieser Umstände ist es möglich und auch plausibel, dass in Frühjahrshonigen u.a. auch Maispollen zu finden sind, wie z.B. in den Honigen des Referenzraumes Kelheim mit einem hohen Flächenanteil an Maisanbau (B40, B42, B45). Als Hauptursache kann die Verwendung von Altwaben aus dem Vorjahr angenommen werden.

Eine regionale Typisierung über die Pollenzusammensetzung im Honig ist innerhalb des Gebietes der Bundesrepublik nur bedingt möglich. Das Vorkommen der üblichen Trachtpflanzen ist weitgehend einheitlich und verteilt. Floristisch einseitig, bzw. individuell geprägte Räume können dagegen durch ein spezifisches Pollenspektrum charakterisiert werden (Vorwohl 1990). So ist auch zu erklären, dass an dem Referenzstandort B48 in der weitläufigen Waldlandschaft des Bayerischen Waldes im Frühjahrshonig kein Rapspollen gefunden wurde, während an den restlichen Standorten Rapspollen überwiegend den Schwerpunkt bildete.

3.2.2.1.2 Relative Pollenhäufigkeit von Raps, Mais und Zuckerrübe

Die Bestimmung der prozentualen Anteile der für das GVO-Monitoring prioritären Pflanzen an der Gesamtpollenzahl pro g Honig erfolgte in einem Pollenkollektiv von n=500 beim Raps und mit einem Kollektiv von n=300 – 500 bei Mais und Rübe.

Die Ergebnisse in Tab. 3.2.3 zeigen, dass Raps in den Frühlingshonigen mit einem Mittel von 80% einen charakterisierend hohen Anteil einnimmt. Beim Mais war oft eine

exakte prozentuale Auszählung nicht möglich, da nur wenig Maispollen, bzw. eine hohe Anzahl anderer Pollen vorhanden war, so dass hier von ungefähren Schätzwerten auszugehen ist. Zuckerrübenpollen wurde nicht gefunden.

Frühlingshonige n=31	Minimum	Maximum	Mittelwert	Median
Raps	<0,2%	95,4%	80,5%	87,5%
Sommerhonige (n=21)	Minimum	Maximum	Mittelwert	Median
Mais	<0,2%	10,2%	0,6%	0,01%
Zuckerrübe	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%

Tab. 3.2.3: *Relative Pollenhäufigkeit im Honig für Raps, Mais und Zuckerrübe*

3.2.2.1.3 *Absolute Pollenanzahlen im Honig für Raps, Mais und Zuckerrübe sowie Gesamtpollenanzahl*

Die Bestimmung der absoluten Anzahl an Pollen der prioritären Arten Raps, Mais und Zuckerrübe erbrachte die in Tab. 3.2.4 zusammengefassten Ergebnisse:

Frühlingshonige (n=31)	Minimum	Maximum	Mittelwert	Median
Gesamtpollenzahl	1.100	26.000	6.010	4.380
davon Raps	<0,2%	11.230	3.990	3.270
Sommerhonige (n=21)	Minimum	Maximum	Mittelwert	Median
Gesamtpollenzahl	330	10.000	2.640	2.000
davon Mais	<0,01%	197	12	0,3
Zuckerrübe	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%

Tab. 3.2.4: *Absolute Pollenanzahl pro g Honig für Raps, Mais und Zuckerrübe sowie Gesamtpollenanzahl. Die Nachweisgrenze ist hierbei der Bestimmungsmethode entsprechend prozentual angegeben. Die Angaben beziehen sich auf das jeweilige Probenkollektiv.*

In Abb. 3.2.1 finden sich die Ergebnisse aus den statistischen Analysen zur Dichteverteilung der Rapspollenanzahl in den Frühjahrshonigen. Die Dichteschätzung erlaubte auch hier eine Abschätzung der Log-Normal-Basisverteilung für Rapspollen in Frühjahrshonigen. Sie legen nahe, dass die Baseline für Frühjahrshonige bei etwa 1.800 Rapspollen/g Honig anzunehmen ist. Im Mittel werden die Honige etwa 2.700 Rapspollen/g enthalten. 90% der Honige werden unterhalb von 4.100 Rapspollen/g erwartet.

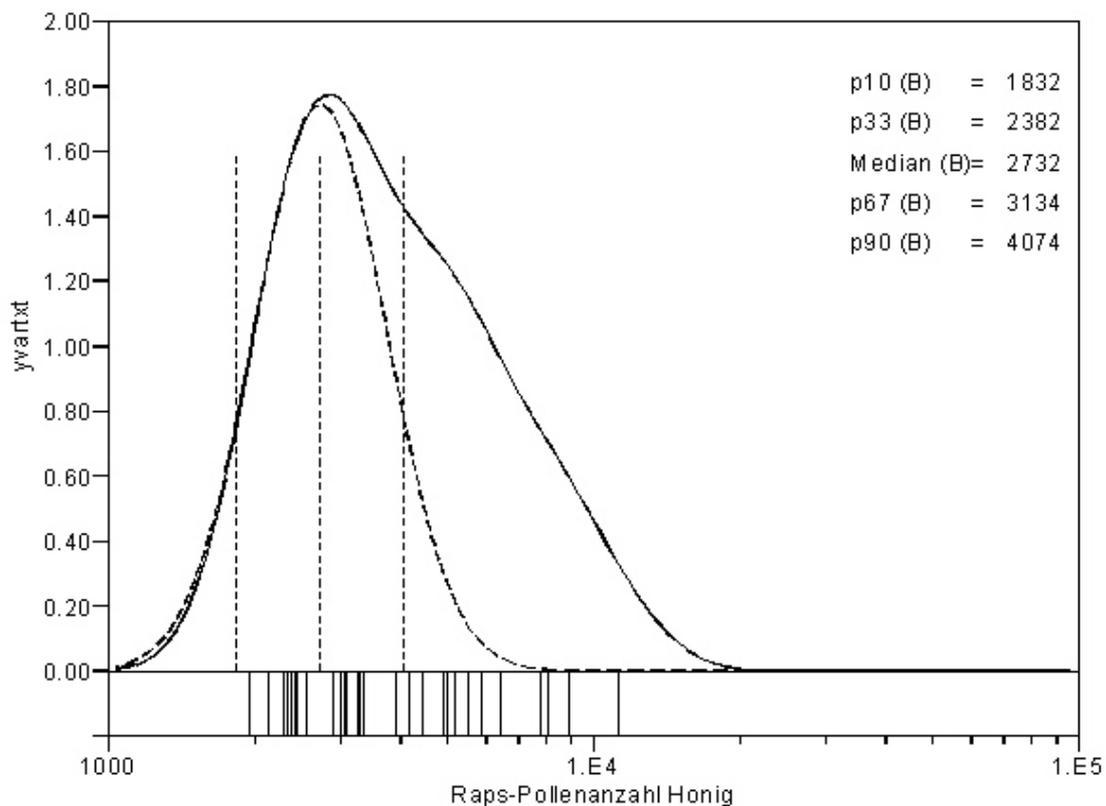


Abb. 3.2.1: Verteilung der Messwerte der Rapspollenanzahl im Bienenhonig und Dichteschätzung mit Log-Normal-Basisverteilung. Die Werte gelten für die Frühjahrshonige. Angaben bezogen auf 1 g Honig. Durchgezogene Linie: Dichteschätzung für die Gesamtheit der Messwerte (n=53 Standorte). Gestrichelte Linie: angepasste Log-Normal-Basisverteilung. Senkrechte Linien: 10%-Quantil (p10), Median und 90%-Quantil (p90).

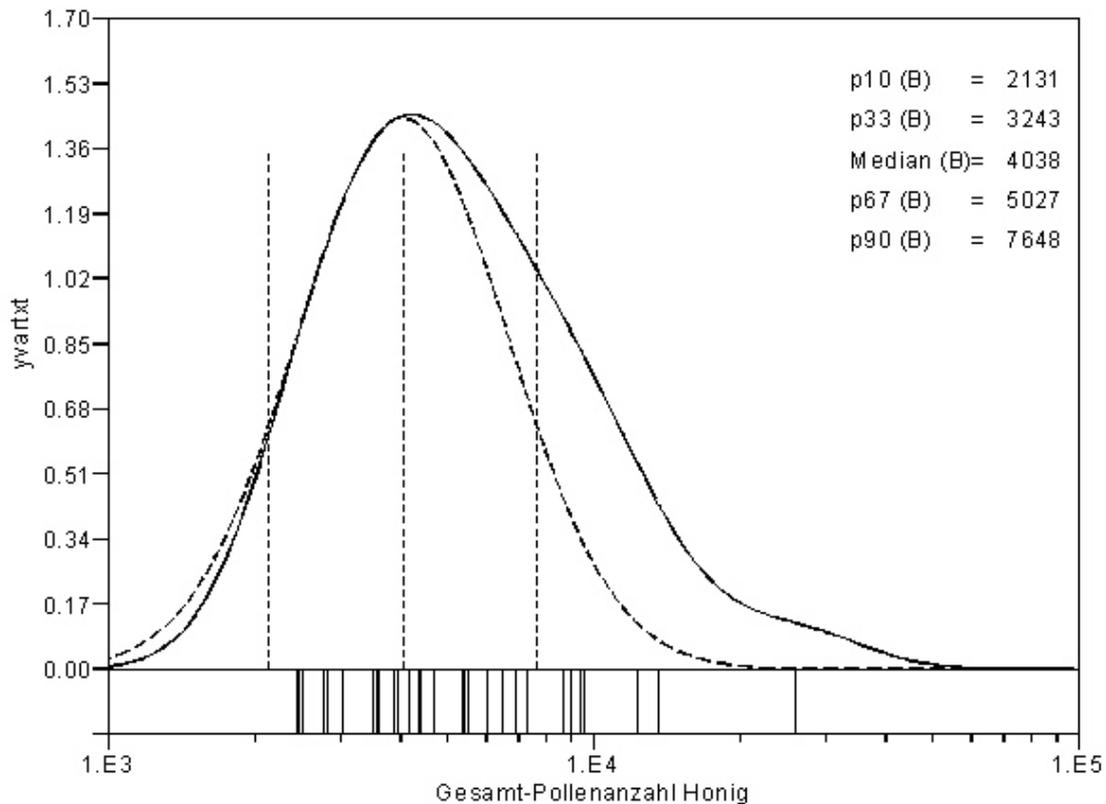


Abb. 3.2.2: Verteilung der Messwerte der Gesamtpollenanzahl im Bienenhonig und Dichteschätzung mit Log-Normal-Basisverteilung. Die Werte gelten für die Frühjahrshonige. Angaben bezogen auf 1 g Honig. Durchgezogene Linie: Dichteschätzung für die Gesamtheit der Messwerte ($n=53$ Standorte). Gestrichelte Linie: angepasste Log-Normal-Basisverteilung. Senkrechte Linien: 10%-Quantil (p_{10}), Median und 90%-Quantil (p_{90}).

Die Auswertung in Abb. 3.2.2 für die Gesamtpollenanzahl in den Frühjahrshonigen ergibt folgendes Bild: 10% der Honige werden unter 2.100 Gesamtpollen pro g Honig erwartet. Im Mittel werden die Werte bei ca. 4.000 liegen. 90% der Honige sollten unter 7.600 Pollen pro g aufweisen.

Die Ergebnisse belegen, dass aufgrund der hohen Trachtattraktivität des Rapses in den Frühlingshonigen stets hohe Pollenanzahlen vorhanden sind; Ausnahmen bilden nur Honige aus Landschaften, in denen großräumig kein Rapsanbau stattfindet. Dagegen

treten Maispollen in den Sommerhonigen nur in geringen Mengen im Honig auf. Zuckerrübenpollen konnten in den Honigproben nicht nachgewiesen werden.

Über die statistischen Analysen der Dichteverteilung in den Frühjahrshonigen lassen sich erste Abschätzungen zu den zu erwartenden Pollengehalten im Hinblick auf ein späteres GVO-Monitoring machen.

3.2.2.2 Mikroskopische Pollenanalyse im Bienenbrot

Aufgrund der unterschiedlichen Arbeitsteilung suchen die Pollensammlerinnen unter den Bienen alle verwertbare Pollentrachten der Umgebung auf. Je nach Zeitpunkt der Entnahme und Brutentwicklung des Bienenvolkes findet man eine breite Streuung der Pollenflora (Tab. 3.2.5). Bei den untersuchten Proben waren allerdings die klassischen Pollenlieferanten des Frühjahres (*Erle, Hasel, Weide* u.a.m.) nicht mehr zu finden. Die Erklärung liegt darin, dass das Bienenbrot je nach Trachtangebot und Entwicklungsstand der Völker eingelagert und an die Larven verfüttert wird, dementsprechend sehr variabel in der Pollenzusammensetzung ist.

Nr	Pollenflora	Funde in Proben	%
	Probenanzahl	n=14	
2	Acer / Ahorn / maple (Acer.)	2	14%
26	Achillea-T. / Schafgarben-T. / yarrow (Comp.)	9	64%
72	Ailanthus / Götterbaum / tree of heaven (Sim.)	1	7%
94	Alismataceae / Froschlöffelgewächse / Water Plantain Family	1	7%
47	Anthriscus-T. / Wiesen-Kerbel-T. / cow parsley-T. (Apiac.)	1	7%
146	Araliaceae / Efeugewächse / Ginseng Family	1	7%
39	Arctium / Klette / burdock (Ast.)	7	50%
6	Artemisia* / Beifuß / mugwort (Ast.)	2	14%
38	Asparagus / Spargel / asparagus (Lil.)	8	57%
102	Begonia / Begonie (Beg.)	2	14%
15	Borago / Borretsch / borage (Bor.)	2	14%
11	Brassica / Raps / rape (Brass.)	6	43%
109	Brassicaceae / Kreuzblütler / Mustard Family	2	14%
59	Bryonia / Zaunrübe / bryony (Cuc.)	4	29%
104	Buddleja / Schmetterlingsstrauch / butterfly bush (Bud.)	1	7%
78	Calystegia / Zaunwinde / great bindweed (Conv.)	7	50%
84	Campanulaceae / Glockenblumengewächse / Bellflower Family	1	7%

3. Ergebnisse

Nr	Pollenflora	Funde in Proben	%
83	Caryophyllaceae / Nelkengewächse / Pink Family	1	7%
42	Castanea sativa / Edelkastanie / sweet chestnut (Fag.)	6	43%
48	Centaurea cyanus / Kornblume / cornflower (Ast.)	5	36%
108	Centaurea jacea-T. / Flockenblume / knapweed (Ast.)	11	79%
147	Cerastium / Hornkraut / chickweed (Car.)	2	14%
97	Chelidonium* / Schöllkraut / greater celandine (Pap.)	1	7%
45	Chenopodiaceae* / Meldegewächse / Goosefoot Family	10	71%
7	Cichorium-T. / Wegwarten-T. / chicory-t. (Ast.)	3	21%
89	Cistaceae / Zistrosengewächse / Rockrose Family	1	7%
28	Convolvulus / Ackerwinde / bindweed (Conv.)	10	71%
119	Cornaceae / Hartregielgewächse / Dodwood Family	1	7%
41	Cornus sanguineum / Hartriegel / dogwood (Corn.)	5	36%
106	Cucumis / Gurke / cucumber (Cuc.)	1	7%
148	Cucurbita / Kürbis / pumpkin (Cuc.)	1	7%
112	Datura inoxia / Stechapfel / thornapple (Sol.)	1	7%
67	Dipsacaceae / Kardengewächse / Scabious Family	1	7%
149	Echinops / Kugeldistel /globe thistle	2	14%
50	Echium / Natterkopf / bugloss (Bor.)	3	21%
60	Epilobium / Weidenröschen / fire weed (Onag.)	5	36%
150	Eryngium / Edeldistel / holly (Apiac.)	1	7%
19	Eupatorium-T. / Wasserdost-T. / hemp agrimony-T. (Ast.)	2	14%
136	Euphorbia-T. / Wolfsmilch-T / spurge-T. (Euph.)	1	7%
24	Filipendula* / Mädesüß / dropwort (Ros.)	7	50%
49	Fragaria / Erdbeere / strawberry (Ros.)	4	29%
37	Frangula / Faulbaum / buckthorn (Rham.)	4	29%
151	Geranium / Storchschnabel / cranesbill (Ger.)	5	36%
36	Helianthus annuus / Sonnenblume / sunflower (Ast.)	10	71%
35	Heracleum / Bärenklau / hogweed (Apiac.)	6	43%
55	Hypericum* / Johanniskraut / St. John's Wort (Gutt.)	2	14%
101	Impatiens / Springkraut / balsam (Bal.)	3	21%
130	Juncaceae* / Binsengewächse / Rush Family	2	14%
52	Ligustrum / Rainweide / privet (Oleac.)	4	29%
34	Liliaceae / Liliengewächse / Lily Family	2	14%
131	Liriodendron / Tilpenbaum / tulip tree (Mag.)	2	14%
40	Lonicera / Heckenkirsche / honeysuckle (Capr.)	4	29%
53	Lotus / Hornklee / bird's foot trefoil (Fab.)	2	14%
145	Lythrum / Weiderich / Loosestrife (Lythr.)	2	14%
44	Malvaceae / Malvengewächse / Mallow Family	8	57%
117	Melilotus / Steinklee / melilot (Fab.)	1	7%
103	Origanum-T. / Majoran-T. / marjoram-T. (Lam.)	3	21%
46	Papaver-T.* / Mohn / poppy (Pap.)	7	50%
33	Parthenocissus / Wilder Wein / woodbine (Vit.)	11	79%
110	Pastinaca sativa / Pastinak / parsnip (Apiac.)	1	7%

3. Ergebnisse

Nr	Pollenflora	Funde in Proben	%
17	Persicaria maculosa / Flohknöterich (Polyg.)	1	7%
58	Phacelia tanacetifolia / Büschelschön / fiddle neck (Hyd.)	4	29%
4	Picea* / Fichte / spruce (Pin.)	2	14%
1	Pinus* / Kiefer / pine (Pin.)	4	29%
122	Pisum-T. / Erbsen-T. / pea-T. (Fab.)	3	21%
31	Plantaginaceae* / Wegerichgewächse / Plantain Family	9	64%
5	Poaceae* / Süßgräser / Grass Family	2	14%
135	Potentilla* / Fingerkraut / cinquefoil (Ros.)	1	7%
13	Prunus-T. / Steinobst-T. / stone fruits (Ros.)	1	7%
12	Pyrus-T. / Kernobst-T. / pomaceous fruits (Ros.)	9	64%
8	Quercus* / Eiche / oak (Fag.)	3	21%
76	Ranunculaceae* / Hahnenfußgewächse / Buttercup Family	1	7%
88	Ranunculus-T.* / Hahnenfuß-T. / buttercup-T. (Ran.)	1	7%
64	Rhus typhina / Essigbaum / sumac (Anac.)	3	21%
74	Rubus / Himbeere, Brombeere / raspberry (Ros.)	1	7%
62	Rumex* / Ampfer / sorrel (Polyg.)	4	29%
152	Salvia-T. / Salbei-T. / sage-T. (Lam.)	1	7%
93	Sanguisorba off.* / Gr. Wiesenknopf / great burnet (Ros.)	1	7%
87	Sedum-T. / Fetthennen-T. / stonecrop (Crass.)	2	14%
54	Senecio / Greiskraut / groundsel (Ast.)	2	14%
23	Serratula-T. / Scharten-T. / saw wort-T. (Ast.)	11	79%
10	Sinapis-T. / Senf-T. / mustard-T. (Brass.)	10	71%
79	Solanum-T. / Nachtschatten-T. / nightshade-T. (Sol.)	2	14%
69	Sorbus-T. / Ebereschen-T. / mountain ash (Ros.)	2	14%
22	Taraxacum-T. / Löwenzahn-T. / dandelion-T. (Ast.)	8	57%
18	Tilia / Linde / lime (Til.)	5	36%
63	Trifolium pratense / Rotklee / red clover (Fab.)	1	7%
9	Trifolium repens / Weißklee / white clover (Fab.)	13	93%
118	Trifolium-T. / Klee-T. / clover-T. (Fab.)	1	7%
68	Veronica / Ehrenpreis / speedwell (Capr.)	2	14%
65	Vicia cracca / Vogelwicke / tufted vetch (Fab.)	4	29%
153	Vicia faba / Ackerbohne / broad bean (Fab.)	1	7%
57	Violaceae / Veilchengewächse / Violet Family	2	14%
3	Zea mays* / Mais / corn (Poac.)	9	64%
Anzahl Funde gesamt		94	

Tab. 3.2.5: Pollenspektrum im Bienenbrot. Tabellarische Auswertung der qualitativen Pollenanalyse. Numerierung nach Tab. 3.3.1. Systematik der Pflanzennahmen nach Zander (1993); T=Typus; * =nektarlos (vornehmlich windblütig)..

Die Mengen des aus den Wabenkörpern herauspräparierten Bienenbrotes schwankten zwischen 5,86 g und 34,79 g Pollenmaterial. Ein g dieser Matrix enthält in der Größenordnung von ca. 20 – 30 Mio. Pollen. Daraus wurde auf der Grundlage der beschriebenen Probenpräparation nach eingehender Homogenisierung ein möglichst repräsentativer Anteil von 0,01 g für die quantitative Pollenbestimmung genutzt. Eine größere Menge ist praktisch nicht zählbar.

Die Ergebnisse der quantitativen Pollenanalyse der Bienenbrotproben befinden sich zusammengefasst in Tab. 3.2.6.

Im Bienenbrot wurden Maispollen in nennenswerten Mengen gefunden. In Relation zur geschätzten Pollengesamtzahl nahmen diese jedoch nur einen geringen prozentualen Anteil ein, der im Mittel unter 1% und im Maximum ~4% betrug. Hier zeigt sich, dass Maispollen von den Bienen gesammelt und eingelagert wird, allerdings keine Haupttracht darstellt..

Im Bienenbrot konnten keine Zuckerrübenpollen nachgewiesen werden. Hingegen fanden sich in einzelnen Proben noch Brassicapollen. Dies kann von Einlagerungen, die noch nicht verfüttert waren, oder von Rapstrachten im Sommer stammen: Von Sommerrapsfeldern, Durchwuchs oder aus (verwilderten) Rapspflanzen, für die Blühzeiten über die gesamte Vegetationsperiode belegt sind¹⁰²

Pollenanzahl pro 0,01 g Bienenbrot	Minimum	Maximum	Mittelwert
Gesamtpollenzahl	112.500	250.000	131.000
Maispollen	<0,2%	5.400	1.200
Zuckerrübenpollen	<0,2%	<0,2%	<0,2%

Tab. 3.2.6: Ergebnisse der Pollenanzahlen im Bienenbrot (n=13)

¹⁰² Zwischenergebnisse des Modellprojektes NRW (Häupler et al. 2002)

Obwohl im Bienenbrot im Gegensatz zum Honig der Pollen hochkonzentriert vorliegt, erwies sich diese Matrix für ein repräsentatives GVO-Monitoring aus mehreren Gründen als ungeeignet:

- Inhomogener Eintrag und Einlagerung innerhalb des Wabenkörpers;
- Ungleichmäßige Verteilung im Jahresgang;
- Pollenspektrum abhängig von der Stärke eines Volkes und dessen Bruterfolg;
- Biochemische Veränderungen durch Fermentationsprozesse;
- Keine Entnahmemöglichkeit ohne Wabenzerstörung;
- Gegenüber Honig sehr aufwendige Entnahme- und Aufbereitungsprozedur, die für ein GVO-Monitoring nicht praktikabel ist;
- Repräsentative und reproduzierbare Probenahme praktisch unmöglich.

3.2.3 Auswertung in Bezug auf Nachweis des GVO-Einflusses, repräsentative Sammelbereiche und Fallzahlen für das GVO-Monitoring

Die beteiligten Bienenvölker haben nach Art und Umfang ein breites Spektrum an Pollen gesammelt, sowohl in der Matrix Honig, als auch in der des Bienenbrotes.

In Abb. 3.2.3 werden die Ergebnisse für die biologische Sammlerin Honigbiene zu den Rapspollenzählungen im Honig aus den Frühjahrsversuchen in Sickte und aus den Referenzgebieten zunächst auf vergleichbare Weise wie bei den technischen Sammlern dargestellt. Die Standorte sind nach der Intensität des windbürtigen Rapspolleneintrages aus den GVO-Rapsfeldern in Sickte, gemäß den Vorhersagewerten aus der Ausbreitungsrechnung angeordnet.

Ein mit den technischen Sammlern vergleichbarer Gradient des Rapseinflusses aus den GVO-Feldern gemäß der Ausbreitungsrechnung ist bei der Rapspollenanzahl im Honig nicht zu erkennen. Der Anteil an Brassica-Pollen als wichtige Frühtracht bewegt sich

mit den Gesamtpollen unabhängig von der Nähe der Freisetzungsfelder im Gesamtgebiet auf gleicher Größenordnung. Hier dokumentiert sich zum einen das Vorhandensein weiterer Rapstrachtquellen im Untersuchungsraum, zum anderen das gegenüber dem technischen Sammler unterschiedliche Sammelverhalten der Honigbiene, die zur Aufrechterhaltung eines gleichmäßig zusammengesetzten Nahrungsangebotes für attraktive Trachten, wie Raps, auch größere Distanzen zurücklegt.

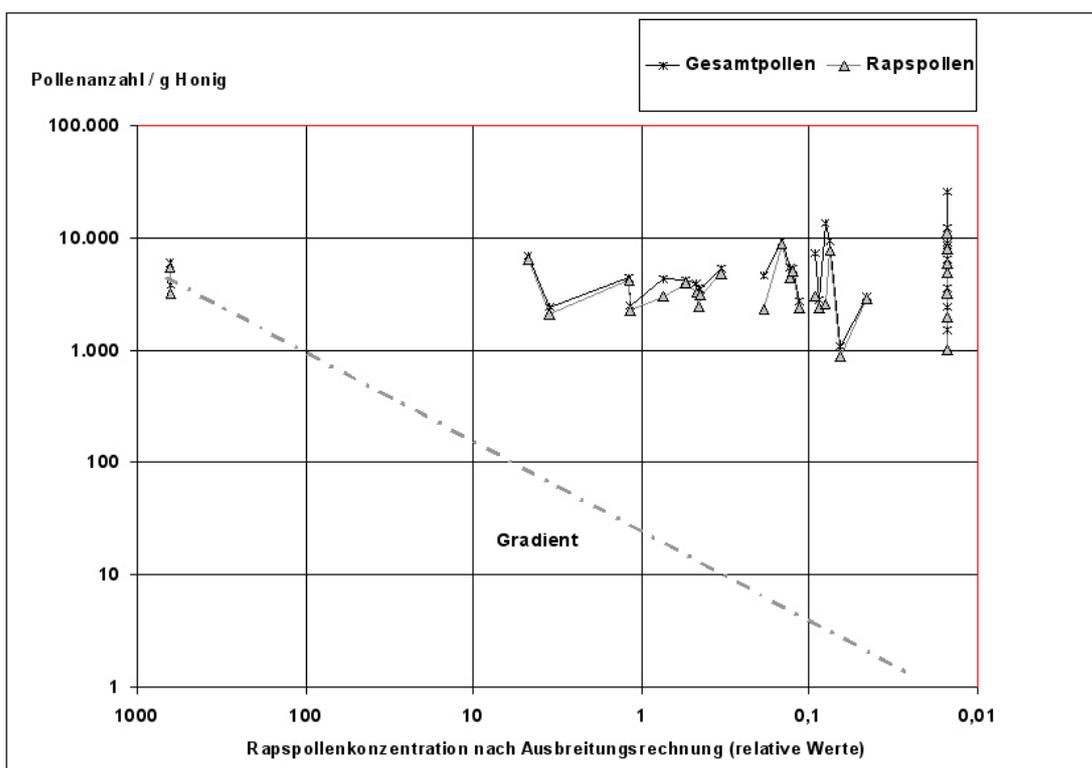


Abb. 3.2.3: Ergebnisse der quantitativen Pollenanalyse für die Rapspollen und Gesamtpollen in den Honigproben aus der Rapsversuchsperiode. Die Anordnung der Standorte aus dem Sicker Versuch erfolgte analog zur Vorgehensweise beim technischen Sammler entsprechend den Vorhersagewerten aus der Rapspollenausbreitungsrechnung für die beiden GVO-Rapsfelder. Rechterhand sind die Werte für die Referenzbereiche gegenübergestellt. Der Rapspollengradient nach Ausbreitungsrechnung ist durch die gestrichelte rote Linie skizziert.

Dieses Bild ändert sich, wenn man den Anteil der GVO-Rapspollen im Honig betrachtet, wie dies über die Ergebnisse der quantitativen PCR-Analysen festgestellt wurde. Aus Abb. 3.2.4 zeigt sich, dass die positiven Nachweise von GVO-Rapspollen im Nahbereich der Felder einen hohen Anteil von bis zu 90% aufweisen. Der GVO-Anteil nimmt nach rechts mit der Entfernung ab, ebenso wie die Nachweiswahrscheinlichkeit, angezeigt durch die zunehmende Anzahl negativer Nachweise. Hierbei zeigte sich, dass sich die positiven GVO-Nachweise in der Matrix Honig über das gesamte Untersuchungsgebiet erstreckten.

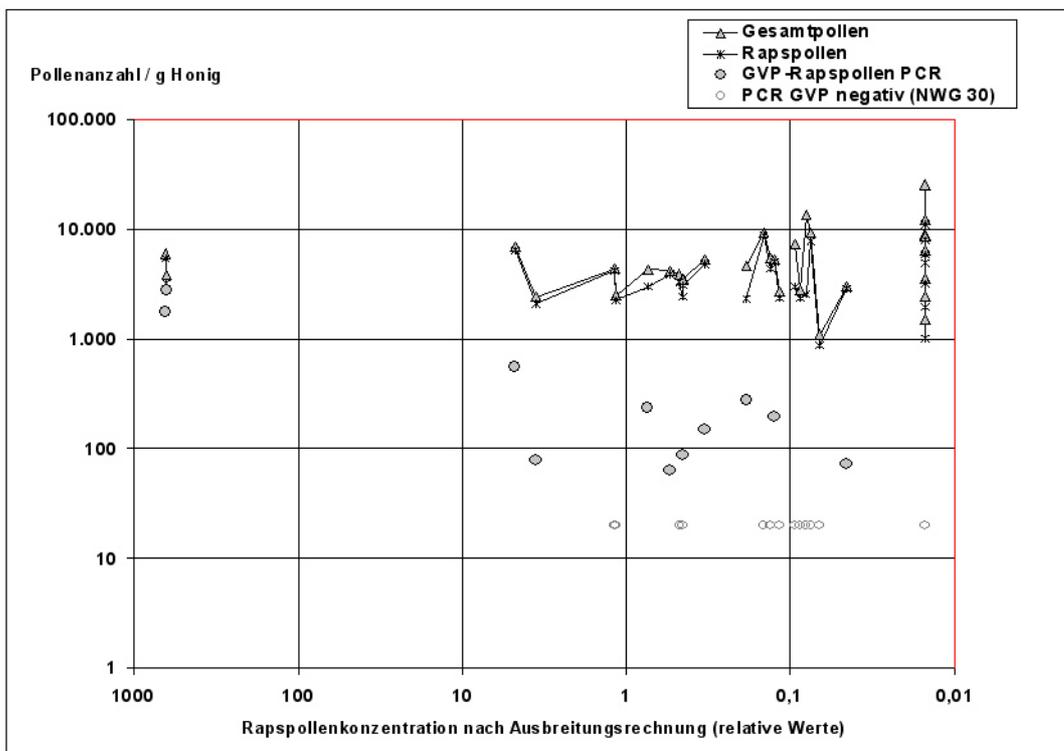


Abb. 3.2.4: Ergebnis der quantitativen PCR-Analysen zum GVO-Anteil der Rapspollen im Honig. Positive GVO-Nachweise erstrecken sich über den gesamten Gradienten, wobei die GVO-Anteile und die Nachweiswahrscheinlichkeit mit Entfernung zum GVO-Feld abnehmen. In den Referenzbereichen waren keine GVO-Anteile feststellbar.

3.2.3.1 Statistische Ermittlung von Nachweiswahrscheinlichkeit und Fallzahlen zur Raumüberwachung unter Einbeziehung der quantitativen PCR-Ergebnisse

Die Ergebnisse aus den statistischen Analysen (siehe Kap. 2.8) zur Nachweiswahrscheinlichkeit eines GVO-Einflusses über PCR-Analysen von Rapspollen-DNA im Honig in Abhängigkeit der Entfernung zu einer Quelle gehen aus Abb. 3.2.5 hervor. Die Wahrscheinlichkeit, ein positives Signal zu erkennen lag in einer Entfernung von 2,7 km bei 50%; d.h. innerhalb dieser Distanz ist die Wahrscheinlichkeit, ein Ergebnis zu erhalten höher, als keines zu erhalten. Außerhalb dieses Radius sinkt die Wahrscheinlichkeit.

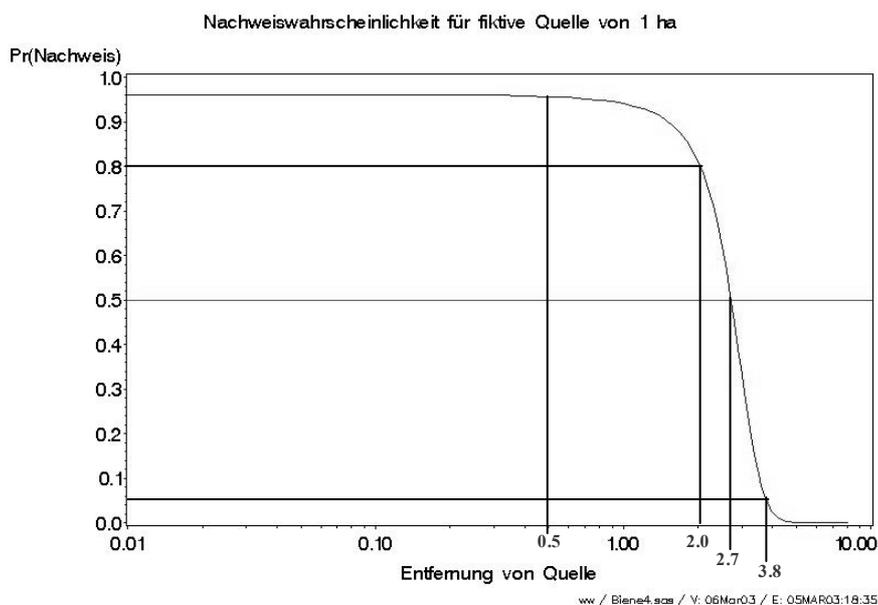


Abb. 3.2.5: Wahrscheinlichkeit eines positiven PCR-Nachweises (TaqMan) von GVO-Rapspollen in Bienenhonig in Abhängigkeit von der Entfernung des Bienenstockes zu einem 1 ha großen GVO-Feld.

Entsprechend dem Kurvenverlauf ließen sich Sammelbereiche mit bestimmten Nachweiswahrscheinlichkeiten definieren. Die in der Abbildung mit rot gekennzeichneten Zahlen geben die Radien für 95%, 80%, 50% und 5% Nachweiswahrscheinlichkeit bei einer Honigprobe an. Die daraus resultierenden

Kreisflächen wurden zur Verdeutlichung in Abb. 3.2.6 auf das Untersuchungsgebiet der Rapsversuche bei Sickte projiziert.

Die Auswertung ergab drei Sammelbereiche:

1. Primärer Sammelbereich: Hauptsammelgebiet bis ca. 500 m (ca. 0,8 km²), Grenze im Allgemeinen gut definiert; GVO-Nachweis mit über 95%iger Sicherheit mit einer Honigprobe.
2. Sekundärer oder wirtschaftlicher Sammelbereich: bis ca. 2-4 km (13-50 km²), Grenze variabler durch Umgebungsbedingungen; GVO-Nachweis möglich.
3. Ein dritter, noch weiter ausgedehnter Sammelbereich reicht bis etwa 6 – 8 km; GVO-Nachweise mit einer Probe weniger wahrscheinlich ($p < 5\%$).
4. Jenseits dieser Grenze ist nur in Ausnahmefällen mit Bienenflug und Nachweisen zu rechnen.

Diese Ergebnisse korrelieren sehr gut mit dem aus der Literatur bekannten typischen Verhalten der honigsammelnden Biene (Seeley 1985). Aktuelle Ergebnisse aus Feldversuchen in Schottland erbrachten Nachweise für Gentransfer bis zu 26 km Entfernung, der auf Bienenflug zurückgeführt wurde.

Für die Optimierung von Aufwand und Aussagesicherheit lassen sich für einen zu überwachenden Untersuchungsraum die erforderlichen Fallzahlen in Abhängigkeit der erzielbaren Nachweiswahrscheinlichkeit abschätzen, indem die Raumgröße durch die Flächengrößen geteilt wird. Teilte man z.B. den Untersuchungsraum in Sickte mit einer Größe von 64 km² in Sammelbereiche mit 80%-Nachweissicherheit, so würden hierzu fünf Honigproben ausreichen, wenn die Bienenvölker entsprechend geschickt im Raum verteilt würden. Dieser Ansatz liefert allerdings einen rein statischen Wert, da er ausschließlich von einer flächigen Gesamtabdeckung ausgeht. Für die grobe Abschätzung einer notwendigen Größenordnung von Bienenvölkern für das bundesweit bzw. naturraumrepräsentativ operierende Monitoring dürfte allerdings ein statisches Auszählen von Raumzellen mit den unterstellten Prüfflächen ausreichen.



Abb. 3.2.6: Sammelbereiche der Honigbiene für das GVO-Monitoring mit Nachweiswahrscheinlichkeit von GVO-Raps per PCR, projiziert auf das Untersuchungsgebiet in Sickinge (Quadrat von 64 km²).

3.3 Vergleich der Pollenspektren aus biologischem und technischem Sammler

Die zusammenfassende Auswertung der mit den technischen und biologischen Sammlern erfassten Pollenspektren geht aus den folgenden Abbildungen hervor:

Abb. 3.3.1 zeigt die Häufigkeit der Funde in den Pollenproben aus der Frühlings- und Sommerperiode. Die Anordnung der Pollen auf der X-Achse erfolgte nach der prozentualen Häufigkeit der Funde an den Standorten über beide Blühzeiträume und geht aus der nachfolgenden Tab. 3.3.1 hervor. Insgesamt repräsentieren die Pollensammler ein Spektrum von etwa 145 Pflanzenarten/Gattungen, wobei Florenelemente mit Anteilen unter 0,2% nicht erfasst wurden. Aus der Abbildung geht deutlich hervor, dass sich die technischen und biologischen Sammler gut ergänzen.

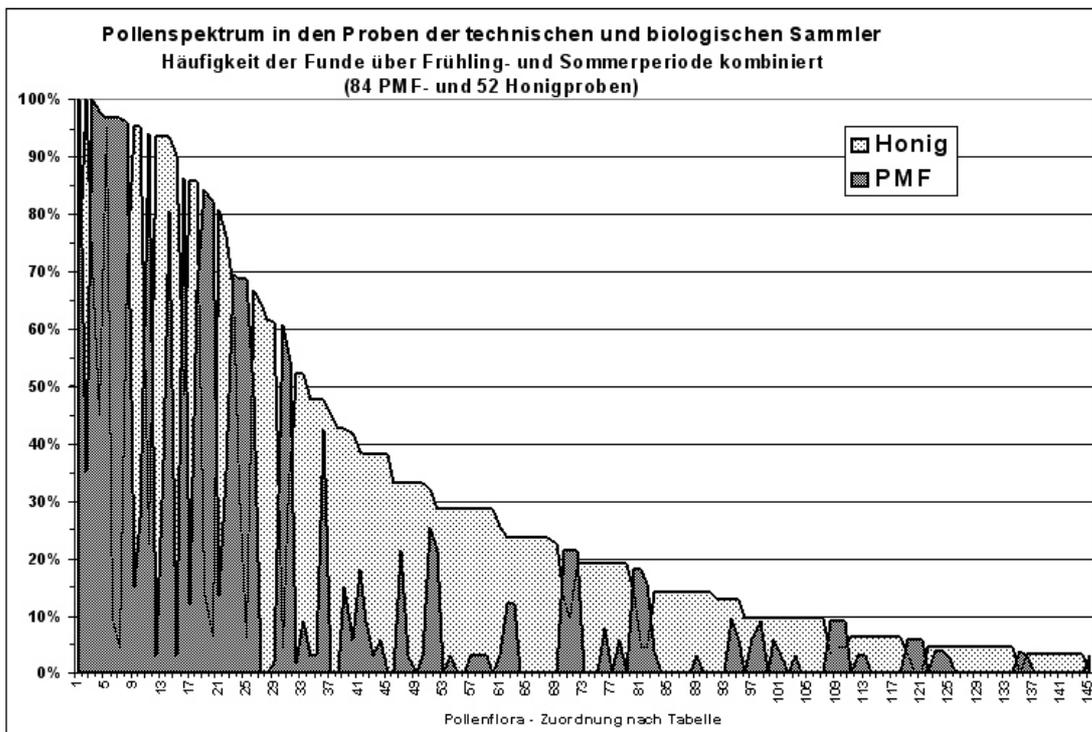


Abb. 3.3.1: Pollenspektren der technischen und biologischen Sammler – Frühling- und Sommerperiode. Zuordnung nach Tab. 3.3.1

In den folgenden beiden Abbildungen sind die Funde in die beiden Erfassungsperioden Frühling (Abb. 3.3.2) und Sommer (Abb. 3.3.3) aufgeteilt. Die Anordnung der Arten auf der X-Achse ist die gleiche wie in der vorherigen Abb. 3.3.1.

Der Vergleich der Spektren zeigt deutlich die Unterschiede von Frühling- und Sommerperiode und auch hier die Ergänzung von technischen und biologischen Sammlern. Die Abbildungen belegen die sich ergänzende Kombination beider Verfahren zur differenzierten Darstellung eines breiten Pollenspektrums.

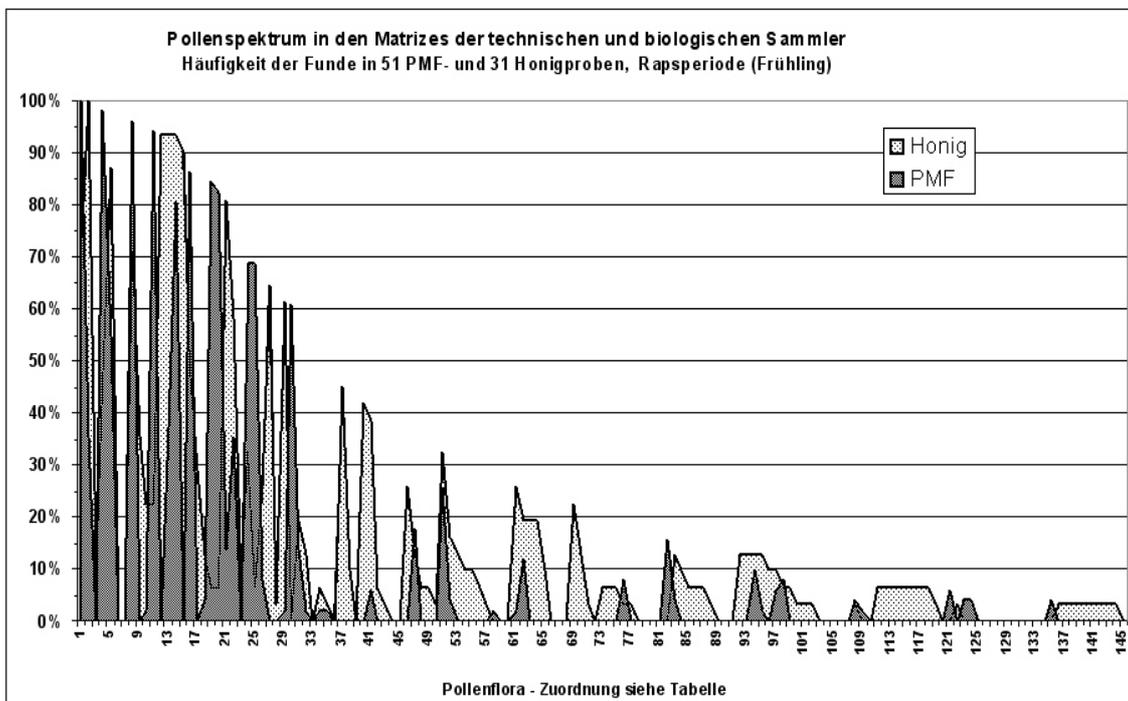


Abb. 3.3.2: Pollenspektrum in den Matrizes der technischen und biologischen Sammler – Frühling (Rapsperiode). Zuordnung nach Tab. 3.3.1.

3. Ergebnisse

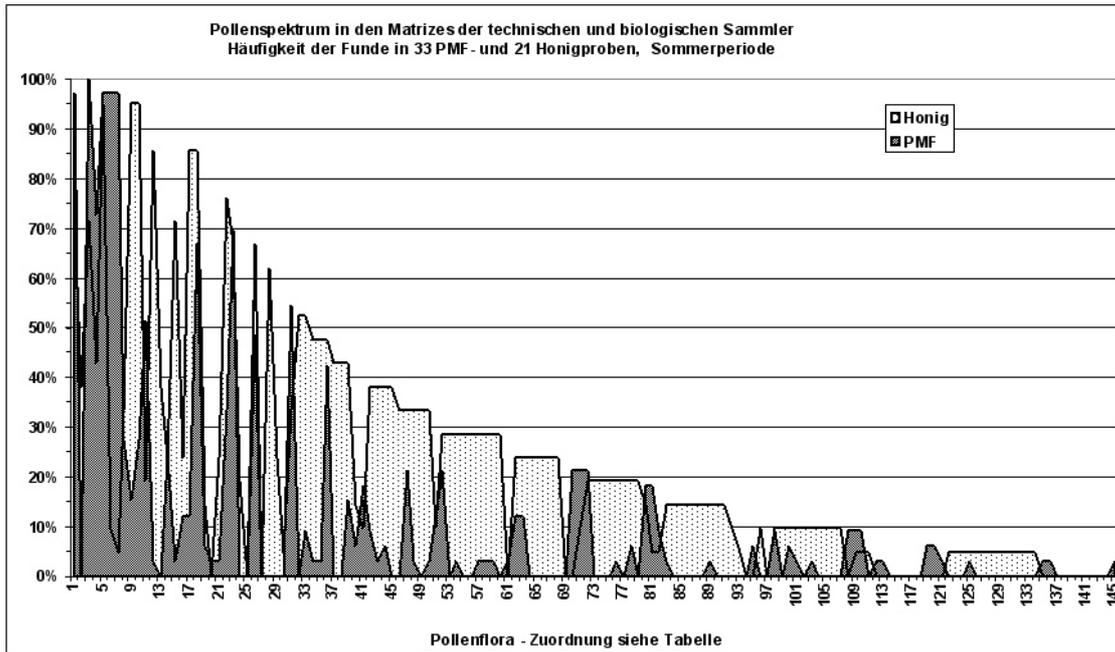


Abb. 3.3.3: Pollenspektrum in den Matrices der technischen und biologischen Sammler – Sommerperiode. Zuordnung nach Tab. 3.3.1.

Rang	Pollenflora	Frühling/Sommer kombiniert						
		Angaben in Prozent		Anzahl der Standortproben				
		Honig	PMF	Honig	PMF	Honig	PMF	
				31	51	21	33	
1	Pinus* / Kiefer (Pin.)	71	100	100	71	100	71	97
2	Acer / Ahorn(Acer.)	100	35	100	100	35	38	0
3	Zea mays* / Mais (Poac.)	71	100	100	10	0	71	100
4	Picea* / Fichte (Pin.)	45	98	98	45	98	43	73
5	Poaceae* / Süßgräser	95	97	97	87	55	95	97
6	Artemisia* / Beifuß (Ast.)	10	97	97	0	0	10	97
7	Cichorium-T. / Wegwarten-T. (Ast.)	5	97	97	0	0	5	97
8	Quercus* / Eiche (Fag.)	71	96	96	71	96	33	27
9	Trifolium repens / Weißklee (Fab.)	95	15	95	35	0	95	15
10	Sinapis-T. / Senf-T. (Brass.)	95	27	95	23	2	95	27
11	Brassica / Raps(Brass.)	23	94	94	23	94	19	52
12	Pyrus-T. / Kernobst-T. (Ros.)	94	3	94	94	0	86	3
13	Prunus-T. / Steinobst-T. / stone fruits (Ros.)	94	37	94	94	37	38	0
14	Salix / Weide (Sal.)	94	80	94	94	80	24	24
15	Borago / Borretsch(Bor.)	90	3	90	90	0	71	3
16	Betula* / Birke (Bet.)	48	86	86	48	86	24	12
17	Persicaria maculosa (Polyg.)	86	12	86	29	0	86	12
18	Tilia / Linde (Til.)	86	67	86	13	4	86	67

3. Ergebnisse

Rang	Pollenflora	Frühling/Sommer kombiniert		Frühling		Sommer		
		Honig	PMF	Honig	PMF	Honig	PMF	
		Angaben in Prozent						
		Honig PMF		komb.		Honig PMF		
19	Eupatorium-T. / Wasserdost-T.(Ast.)	14	84	84	6	84	14	6
20	Juglandaceae* / Walnussgewächse	6	82	82	6	82	0	3
21	Aesculus / Rosskastanie (Hip.)	81	14	81	81	14	24	3
22	Taraxacum-T. / Löwenzahn-T.(Ast.)	76	35	76	58	35	76	33
23	Serratula-T. / Scharten-T. (Ast.)	67	70	70	6	0	67	70
24	Filipendula* / Mädesüß (Ros.)	32	69	69	32	69	19	0
25	Corylus / Hasel (Bet.)	6	69	69	6	69	0	0
26	Achillea-T. / Schafgarben-T. (Comp.)	67	48	67	26	8	67	48
27	Myosotis / Vergissmeinnicht (Bor.)	65	0	65	65	0	0	0
28	Convolvulus / Ackerwinde (Conv.)	62	0	62	3	0	62	0
29	Sambucus* / Holunder (Capr.)	61	2	61	61	2	24	0
30	Carpinus* / Hainbuche (Bet.)	5	61	61	0	61	5	0
31	Plantaginaceae* / Wegerichgewächse	33	55	55	19	14	33	55
32	Symphoricarpos / Schneebeere (Capr.)	52	2	52	13	2	52	0
33	Parthenocissus / Wilder Wein (Vit.)	52	9	52	0	0	52	9
34	Liliaceae / Liliengewächse Family	48	3	48	6	2	48	3
35	Heracleum mantegazzianum / Riesenbärenklau (Apiac.)	48	3	48	3	2	48	3
36	Helianthus annuus / Sonnenblume (Ast.)	48	42	48	0	0	48	42
37	Frangula / Faulbaum / buckthorn (Rham.)	45	0	45	45	0	43	0
38	Asparagus / Spargel (Lil.)	43	0	43	10	0	43	0
39	Arctium / Klette (Ast.)	43	15	43	0	0	43	15
40	Lonicera / Heckenkirsche (Capr.)	42	6	42	42	0	14	6
41	Cornus sanguineum / Hartriegel (Corn.)	39	18	39	39	6	10	18
42	Castanea sativa / Edelkastanie (Fag.)	38	9	38	6	0	38	9
43	Centaurea montana / Bergflockenblume (Ast.)	38	3	38	3	0	38	3
44	Malvaceae / Malvengewächse Family	38	6	38	0	0	38	6
45	Chenopodiaceae* / Meldegewächse	38	0	38	0	0	38	0
46	Papaver-T.* / Mohn (Pap.)	33	0	33	26	0	33	0
47	Anthriscus-T. / Wiesen-Kerbel-T. (Apiac.)	33	21	33	13	18	33	21
48	Centaurea cyanus / Kornblume (Ast.)	33	3	33	6	0	33	3
49	Fragaria / Erdbeere (Ros.)	33	0	33	6	0	33	0
50	Echium / Natterkopf (Bor.)	33	3	33	3	0	33	3
51	Alnus* / Erle (Bet.)	32	25	32	32	25	10	12
52	Ligustrum / Rainweide (Oleac.)	29	21	29	16	4	29	21
53	Lotus / Hornklee (Fab.)	29	0	29	13	0	29	0
54	Senecio / Greiskraut (Ast.)	29	3	29	10	0	29	3
55	Hypericum* / Johanniskraut (Gutt.)	29	0	29	10	0	29	0
56	Trifolium incarnatum / Inkernatklee (Fab.)	29	0	29	6	0	29	0
57	Violaceae / Veilchengewächse	29	3	29	3	0	29	3
58	Phacelia tanacetifolia / Büschelschön (Hyd.)	29	3	29	0	2	29	3
59	Bryonia / Zaunrübe (Cuc.)	29	3	29	0	0	29	3
60	Epilobium / Weidenröschen (Onag.)	29	0	29	0	0	29	0
61	Viburnum / Schneeball (Capr.)	26	3	26	26	2	0	3
62	Rumex* / Ampfer (Polyg.)	24	12	24	19	12	24	12
63	Trifolium pratense / Rotklee (Fab.)	24	12	24	19	0	24	12

3. Ergebnisse

Rang	Pollenflora	Frühling/Sommer kombiniert		Frühling		Sommer		
		Honig	PMF	Honig	PMF	Honig	PMF	
		Angaben in Prozent						
		Honig PMF		komb. Honig PMF		Honig PMF		
64	Rhus typhina / Essigbaum (Anac.)	24	0	24	19	0	24	0
65	Vicia cracca / Vogelwicke (Fab.)	24	0	24	10	0	24	0
66	Calluna vulgaris / Besenheide (Eric.)	24	0	24	0	0	24	0
67	Dipsacaceae / Kardengewächse	24	0	24	0	0	24	0
68	Veronica / Ehrenpreis (Capr.)	24	0	24	0	0	24	0
69	Sorbus-T. / Ebereschen-T. (Ros.)	23	0	23	23	0	0	0
70	Berberidaceae /Sauerdorngewächse	13	21	21	13	0	0	21
71	Morus* / Maulbeere (Mor.)	10	21	21	3	0	10	21
72	Ailanthus / Götterbaum(Sim.)	19	21	21	0	0	19	21
73	Rosaceae / Rosengewächse	19	0	19	6	0	19	0
74	Rubus / Himbeere, Brombeere (Ros.)	19	0	19	6	0	19	0
75	Vaccinium-T. / Heidelbeer-T. (Eric.)	19	0	19	6	0	19	0
76	Ranunculaceae* / Hahnenfußgewächse	19	8	19	3	8	19	3
77	Lotus uliginosus / Sumpf-Hornklee (Fab.)	19	0	19	3	0	19	0
78	Calystegia / Zaunwinde (Conv.)	19	6	19	0	0	19	6
79	Solanum-T. / Nachtschatten-T. (Sol.)	19	0	19	0	0	19	0
80	Gleditsia / Gleditschie (Fab.)	14	18	18	0	0	14	18
81	Typhaceae* / Rohrkolbengewächse	5	18	18	0	0	5	18
82	Taxaceae* / Eibengewächse	5	16	16	0	16	5	9
83	Caryophyllaceae / Nelkengewächse	14	4	14	13	4	14	3
84	Campanulaceae / Glockenblumengewächse	14	0	14	10	0	14	0
85	Bistorta officinalis / Wiesenknöterich (Polyg.)	14	0	14	6	0	14	0
86	Ononis / Hauhechel (Fab.)	14	0	14	6	0	14	0
87	Sedum-T. / Fetthennen-T. (Crass.)	14	0	14	6	0	14	0
88	Ranunculus-T.* / Hahnenfuß-T. (Ran.)	14	0	14	3	0	14	0
89	Cistus / Zistrose (Cist.)	14	3	14	0	0	14	3
90	Genista-T. / Ginster-T. (Fab.)	14	0	14	0	0	14	0
91	Urticaceae* / Nesselgewächse	14	0	14	0	0	14	0
92	Rhamnaceae / Kreuzdorngewächse	13	0	13	13	0	10	0
93	Sanguisorba minor* / Kleiner Wiesenknopf (Ros.)	13	0	13	13	0	5	0
94	Alismataceae / Froschlöffelgewächse	13	10	13	13	10	0	0
95	Fagus* / Buche (Fag.)	13	6	13	13	2	0	6
96	Robinia pseudoacacia / Scheinakazie (Fab.)	10	0	10	10	0	10	0
97	Chelidonium* / Schöllkraut (Pap.)	10	6	10	10	6	0	0
98	Erica-T. (Eric.)	10	9	10	6	8	10	9
99	Potentilla* / Fingerkraut (Ros.)	10	0	10	6	0	10	0
100	Helianthemum* / Sonnenröschen (Cist.)	10	6	10	3	0	10	6
101	Impatiens / Springkraut (Bal.)	10	3	10	3	0	10	3
102	Begonia / Begonie (Beg.)	10	0	10	3	0	10	0
103	Origanum-T. / Majoran-T. (Lam.)	10	3	10	0	0	10	3
104	Buddleja / Schmetterlingsstrauch (Bud.)	10	0	10	0	0	10	0
105	Catalpa / Trompetenbaum (Big.)	10	0	10	0	0	10	0
106	Cucumis / Gurke (Cuc.)	10	0	10	0	0	10	0
107	Lavandula / Lavendel (Lam.)	10	0	10	0	0	10	0
108	Centaurea jacea-T. / Flockenblume (Ast.)	3	9	9	3	4	0	9

3. Ergebnisse

Rang	Pollenflora	Frühling/Sommer kombiniert		Frühling		Sommer		
		Honig	PMF	Honig	PMF	Honig	PMF	
		Angaben in Prozent						
109	Brassicaceae / Kreuzblütler	5	9	9	0	2	5	9
110	Pastinaca sativa / Pastinak (Apiac.)	5	9	9	0	0	5	9
111	Lychnis / Lichtnelke . (Car.)	6	0	6	6	0	5	0
112	Datura inoxia / Stechapfel (Sol.)	6	3	6	6	0	0	3
113	Fraxinus excelsior* / Esche (Oleac.)	6	3	6	6	0	0	3
114	Cynoglossum / Hundszunge (Bor.)	6	0	6	6	0	0	0
115	Cyperaceae* / Sauergräser	6	0	6	6	0	0	0
116	Deutzia / Deutzie (Sax.)	6	0	6	6	0	0	0
117	Melilotus / Steinklee (Fab.)	6	0	6	6	0	0	0
118	Trifolium-T. / Klee-T. (Fab.)	6	0	6	6	0	0	0
119	Cornaceae / Hartregielgewächse	3	6	6	3	0	0	6
120	Ambrosia* / Taubenkraut (Comp.)	0	6	6	0	0	0	6
121	Moraceae* / Maulbeergewächse	0	6	6	0	6	0	3
122	Pisum-T. / Erbsen-T. (Fab.)	5	0	5	3	0	5	0
123	Eleagnus / Ölweide (Eleag.)	5	4	5	0	4	5	0
124	Tussilago / Huflattich (Ast.)	5	4	5	0	4	5	0
125	Nymphaea* / Seerose (Nym.)	5	3	5	0	0	5	3
126	Anemone / Windröschen (Ran.)	5	0	5	0	0	5	0
127	Corydalis cava / Hohler Lerchensporn (Fum.)	5	0	5	0	0	5	0
128	Erodium / Reiherschnabel (Ger.)	5	0	5	0	0	5	0
129	Galium / Labkraut (Rub.)	5	0	5	0	0	5	0
130	Juncaceae* / Binsengewächse	5	0	5	0	0	5	0
131	Liriodendron / Tulpenbaum (Mag.)	5	0	5	0	0	5	0
132	Oenothera / Nachtkerze (Onagr.)	5	0	5	0	0	5	0
133	Pachysandra terminalis / Ysander (Bux.)	5	0	5	0	0	5	0
134	Ruta graveolens / Weinraute (Rut.)	5	0	5	0	0	5	0
135	Populus* / Pappel (Sal.)	0	4	4	0	4	0	3
136	Euphorbia-T. / Wolfsmilch-T (Euph.)	3	3	3	3	0	0	3
137	Allium / Lauch (Lil.)	3	0	3	3	0	0	0
138	Fagopyrum esculentum / Buchweizen (Polyg.)	3	0	3	3	0	0	0
139	Ilex aquifolium / Stechpalme (Aquif.)	3	0	3	3	0	0	0
140	Onagraceae / Nachtkerzengewächse	3	0	3	3	0	0	0
141	Symphytum / Beinwell(Bor.)	3	0	3	3	0	0	0
142	Syringa / Flieder (Oleac.)	3	0	3	3	0	0	0
143	Ulmaceae* / Ulmengewächse	3	0	3	3	0	0	0
144	Viscum / Mistel (Lor.)	3	0	3	3	0	0	0
145	Lythraceae / Weiderichgewächse	0	3	3	0	0	0	3

Tab. 3.3.1: Pollenspektrum der technischen und biologischen Sammler –Häufigkeit der Funde aus der Frühjahrs- und Sommerbeprobung sowie kombiniert über die Blühzeiträume. Systematik der Pflanzennahmen nach Zander (1993); T=Typus; * =nektarlos (vornehmlich windblütig).

3.4 PCR

3.4.1 Ergebnisse der Vorversuche

In Vorversuchen wurde über CTAB-DNA-Extraktion und qualitativer PCR mit anschließender Gelelektrophorese auf das Vorhandensein von Raps-DNA (PEP-Gen) und gentechnisch-veränderte DNA untersucht (s. 2.4.3). Dabei wurden Nachweisgrenzen für dieses System von ca. 50 Pollen bestimmt. Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden in einem Parallel-Versuch aus GVO-Rapssamen der Firma Aventis Crop Science DNA isoliert und über entsprechende DNA Verdünnungsreihen konnten im Mittel 3 Pollen nachgewiesen werden.

3.4.2 Pollenproben aus den technischen Sammlern

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die ersten 53 Proben aus den Pollensammlern (PMF) analysiert. Mit der CTAB-Methode (2.4.4.1) wurde aus diesen Proben die DNA extrahiert und einer qualitativen PCR-Analyse (2.5.1) unterzogen. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.4.1 zusammengefasst.

Probe	Runde 1(Screening)				Runde 2 (Spezifisch)				
	Spike	Raps	35S	NOS	SL-Raps	LL-Raps	RR-Raps	CaMV	HMG
1	+	+	-	-					
2a	+	+	-	-					
2b	+	+	-	-					
3	+	-	-	-					
4	+	+	-	-					
6	+	-	-	-					
5	+	-	-	-					
7	+	+	-	-					
8	+	-	-	-					
9	+	+	+	-	-	+	-	-	-
10	+	-	-	-					
11	+	+	+	-	-	+	-	-	-
12	+	-	+	-	-	+	-	-	-
13a	+	+	-	-					

Probe	Runde 1(Screening)				Runde 2 (Spezifisch)				
	Spike	Raps	35S	NOS	SL-Raps	LL-Raps	RR-Raps	CaMV	HMG
13b	+	+	+	-	-	+	-	-	-
14	+	+	+	-	-	+	-	-	-
15a	+	+	+	-	-	+	-	-	-
15b	+	+	+	-	-	+	-	-	-
16	+	+	+	-	-	+	-	-	-
17a	+	+	-	-					
17b	+	-	-	-					
18	+	+	-	-					
19a	-	-	-	-					
19b	-	-	-	-					
20	-	-	-	-					
21	-	-	-	-					
22	-	-	-	-					
23	+	n.d.	-	-					

3. Ergebnisse

Probe	Runde 1(Screening)				Runde 2 (Spezifisch)				
	Spike	Raps	35S	NOS	SL-Raps	LL-Raps	RR-Raps	CaMV	HMG
24	+	n.d.	-	-					
25	-	-	-	-					
26	+	-	-	-					
27	-	-	-	-					
28	-	-	-	-					
29	-	-	-	-					
30	-	-	-	-					
31a	-	-	-	-					
31b	-	-	-	-					
32	-	-	-	-					
33	-	-	-	-					
34	-	-	-	-					
35	+	+	+	-	-	+	-	-	-
36	+	+	+	-	-	+	-	-	-
37	+	+	+	-	-	-	-	-	-
38	+	+	-	-					
39	+	+	-	-					
40	+	-	-	-					
41	+	-	-	-					

Probe	Runde 1(Screening)				Runde 2 (Spezifisch)				
	Spike	Raps	35S	NOS	SL-Raps	LL-Raps	RR-Raps	CaMV	HMG
42	+	+	-	-					
43a	+	+	+	-	-	+	-	-	-
43b	+	+	-	-					
43c	+	+	-	-					
43d	+	+	-	-					
43e	+	+	-	-					
44a	+	-	+	-	-	+	-	-	-
44b	+	-	+	-	-	+	-	-	-
45a	+	+	-	-					
45b	+	+	-	-					
46	+	+	-	-					
47	+	+	-	-					
48	+	+	-	-					
49	+	+	-	-					
50	+	-	-	-					
51	+	-	-	-					
52	+	-	-	-					
53	+	-	-	-					

+: nachgewiesen, -: nicht nachgewiesen, Inhibiert: Analyse war nicht möglich, aufgrund von Stoffen, die bei der DNA-Extraktion mit extrahiert wurden, die die Polymerase hemmen, n.d.: nicht detektiert

Tab. 3.4.1: Ergebnisse der PCR-Analysen der Pollensammlerprobe aus der Rapsperiode: In der 1. Runde wurden die Proben auf das Vorhandensein von Inhibitionen, Raps-, 35S-Promotor und NOS-Terminator-DNA untersucht. Zum Test auf Inhibitionen wurden in allen Analysen den extrahierten Proben-DNAs 10 Moleküle gentechnisch-veränderter DNA zugesetzt. Fällt der Test negativ aus, sind in der Proben-DNA Stoffe vorhanden, die die Analyse inhibieren. In der 2. Runde wurden alle positiven Proben der 1. Runde auf das Vorhandensein von LL-Raps (Pat-Gen (LibertyLink-Raps), Seedlink-Raps (SL-Raps), RoundupReady-Raps (RR-Raps), Mais-DNA (HMG) und auf den CauliflowerMosaic-Virus (CaMV) untersucht.

Die Ergebnisse belegen, dass die PCR-Analysen in den PMF-Proben aus den Freilandversuchen in der Rapsperiode prinzipiell und mehrheitlich funktionierten. Ein Teil der Analysen war jedoch aufgrund von beobachteten Inhibitionen nicht auswertbar (15 von 53).

Trotz diverser Aufreinigungen der extrahierten DNA und Wiederholungen der PCR-Analyse konnten diese Inhibitionen nicht entfernt werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das beim LFU Augsburg entwickelte Protokoll zur DNA-Extraktion von Pollen mit dem DNeasy Tissue Kit von Qiagen in unserem Labor etabliert und die DNA per quantitativer TaqMan-PCR analysiert (s. 2.5.) Die Ergebnisse der Ringversuche sind in Kap. 2.4.6 ausführlich beschrieben.

Es wurde dann aus Rückstellmustern der Sigma-Pollensammlerproben mit dem Qiagen-Tissue-Kit erneut DNA nach dem unter 2.4.4.1 beschriebenen Verfahren extrahiert und mittels quantitativer TaqMan-PCR (2.5.2) analysiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.4.2 zusammengefasst. Auch hier wurden bei einigen Proben Inhibitionen festgestellt, die bereits bei den PMF-Proben aus der ersten Runde inhibiert waren (Tab. 3.4.1).

Probe	Spike	Raps	Pat	35S	Probe	Spike	Raps	Pat	35S	Probe	Spike	Raps	Pat	35S
1 pur	26,2	50,00	50,00	50,00	12 1:5	26,08	40,31	38,21	38,11	24 pur	33,54	46,51	50,00	50,00
1 1:5	26,08	40,02	50,00	50,00	13 pur	26,2	42,60	38,02	38,21	24 1:5	32,84	50,00	50,00	50,00
2 pur	26,32	40,32	50,00	50,00	13 1:5	26,15	42,53	50,00	50,00	25 pur	33,21	42,24	50,00	50,00
2 1:5	26,34	50,00	50,00	50,00	14 pur	26,22	39,03	37,56	37,66	25 1:5	33,45	50,00	50,00	50,00
3 pur	26,1	50,00	50,00	50,00	14 1:5	26,34	44,21	50,00	50,00	26 pur	26,15	38,27	50,00	50,00
3 1:5	26,24	50,00	50,00	50,00	15 pur	26,31	38,26	50,00	50,00	26 1:5	26,19	39,67	50,00	50,00
4 pur	26,23	42,58	50,00	50,00	15 1:5	26,18	42,46	50,00	50,00	27 pur	33,01	40,09	50,00	50,00
4 1:5	26,2	50,00	50,00	50,00	16 pur	26,29	38,40	38,09	38,05	27 1:5	32,08	50,00	50,00	50,00
5 pur	26	50,00	50,00	50,00	16 1:5	26,24	46,48	50,00	50,00	28 pur	33,12	39,21	50,00	50,00
5 1:5	26,12	50,00	50,00	50,00	17 pur	26,21	40,73	38,82	38,99	28 1:5	33,41	50,00	50,00	50,00
6 pur	26,1	38,51	50,00	50,00	17 1:5	26,33	39,76	50,00	50,00	29 pur	33,12	42,78	50,00	50,00
6 1:5	26,11	50,00	50,00	50,00	18 pur	26,05	38,16	50,00	50,00	29 1:5	33,2	42,15	50,00	50,00
7 pur	26,35	38,75	50,00	50,00	18 1:5	26,11	39,74	50,00	50,00	30 pur	33,01	50,00	50,00	50,00
7 1:5	26,42	50,00	50,00	50,00	19 pur	50	50,00	50,00	50,00	30 1:5	33,04	50,00	50,00	50,00
8 pur	26,5	37,30	50,00	50,00	19 1:5	50	50,00	50,00	50,00	31 pur	33,23	39,20	50,00	50,00
8 1:5	26,22	40,41	50,00	50,00	20 pur	26,41	33,39	50,00	50,00	31 1:5	33,18	50,00	50,00	50,00
9 pur	26,11	37,56	39,24	39,00	20 1:5	26,37	35,49	50,00	50,00	32 pur	26,09	34,37	50,00	50,00
9 1:5	26,21	39,17	50,00	50,00	21 pur	26,44	39,58	50,00	50,00	32 1:5	26,16	38,21	50,00	50,00
10 pur	26	50,00	50,00	50,00	21 1:5	26,27	50,00	50,00	50,00	33 pur	33,2	38,44	50,00	50,00
10 1:5	26,21	50,00	50,00	50,00	22 pur	50	50,00	50,00	50,00	33 1:5	33,33	46,77	50,00	50,00
11 pur	26,2	39,54	37,34	37,20	22 1:5	50	50,00	50,00	50,00	34 pur	33,12	42,24	50,00	50,00
11 1:5	26,26	42,42	50,00	50,00	23 pur	33,32	42,45	50,00	50,00	34 1:5	33,04	50,00	50,00	50,00
12 pur	26,1	37,99	35,21	35,30	23 1:5	33,21	42,21	50,00	50,00	35 pur	33,24	43,47	50,00	50,00

Probe	Spike	Raps	Pat	35S	Probe	Spike	Raps	Pat	35S	Probe	Spike	Raps	Pat	35S
35 1:5	33,12	50,00	50,00	50,00	40 1:5	26,04	36,58	50,00	50,00	45 1:5	26,04	50,00	50,00	50,00
36 pur	33,26	37,27	50,00	50,00	41 pur	26,12	50,00	50,00	50,00	46 pur	25,95	38,36	50,00	50,00
36 1:5	33,37	50,00	50,00	50,00	41 1:5	26,04	50,00	50,00	50,00	46 1:5	26,07	42,78	50,00	50,00
37 pur	31,24	40,00	50,00	50,00	42 pur	26,2	50,00	50,00	50,00	47 pur	26,21	35,74	50,00	50,00
37 1:5	29,12	38,52	50,00	50,00	42 1:5	26,29	50,00	50,00	50,00	47 1:5	26,4	38,81	50,00	50,00
38 pur	26,02	37,93	50,00	50,00	43 pur	25,94	50,00	50,00	50,00	48 pur	26,28	50,00	50,00	50,00
38 1:5	25,98	39,57	50,00	50,00	43 1:5	26,05	50,00	50,00	50,00	48 1:5	26,25	50,00	50,00	50,00
39 pur	26,2	50,00	50,00	50,00	44 pur	26,11	50,00	50,00	50,00	49 pur	25,98	50,00	50,00	50,00
39 1:5	25,99	50,00	50,00	50,00	44 1:5	26,18	50,00	50,00	50,00	49 1:5	25,98	50,00	50,00	50,00
40 pur	25,89	32,98	50,00	50,00	45 1:5	26,07	50,00	50,00	50,00					

Tab. 3.4.2: Ergebnisse der PCR-Analysen von Rückstellmustern der Sigma-2 Folien. Die Proben wurden mit dem Qiagen-Tissue-Kit entsprechend dem Extraktionsprotokoll vom LFU Augsburg extrahiert und auf das Vorhandensein von Inhibitionen (Spike), Raps-, 35S-Promotor- und Pat-DNA analysiert. Beim Spiken werden in allen Analysen der extrahierten Proben-DNAs 40 Moleküle gentechnisch-veränderter DNA zugesetzt. Die Menge an Spike-DNA ist so eingestellt, dass bei der RealTime-PCR Werte von 26 – 27 ein inhibitionsfreies System anzeigen. Werte größer als 27 zeigen Inhibitionen der entsprechenden Proben-DNA an. DNA-Lösung gesamt: 60 µl, eingesetzte DNA-Lösung in PCR: 5 µl unverdünnt und 5 µl einer 1:5 Verdünnung, Zyklen: 50.

Da es sich hierbei um die Sigma-2 – Folien handelte, war die Sensitivität gegenüber den PMF-Proben auf Grund der geringeren Pollenzahlen deutlich vermindert. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die festgestellten Inhibitionsprobleme nicht spezifisch auf den PMF bezogen sind, sondern vermutlich auf Verunreinigungen in der komplexen Matrix Luftstaubprobe zusammenhängen.

In Tab. 3.4.3 sind die Ergebnisse der PCR für die Pollensammlerproben des PMF aus der Sommerperiode dargestellt, die nur auf Mais- und 35S- DNA analysiert wurden. Die DNA-Extraktion erfolgte auch hier mit dem Qiagen-Tissue-Kit entsprechend dem Extraktionsprotokoll vom LFU Augsburg mit anschließender TaqMan-Analyse.

3. Ergebnisse

Probe	Spike	Mais	35S
58 pur	26,09	50,00	37,45
58 1:5	26,21	50,00	50,00
59 pur	26,41	50,00	50,00
59 1:5	26,22	50,00	40,38
60 pur	26,47	50,00	50,00
60 1:5	26,48	50,00	50,00
61 pur	26,38	50,00	50,00
61 1:5	26,25	50,00	50,00
62 pur	26,54	50,00	50,00
62 1:5	26,34	50,00	50,00
63 pur	26,39	50,00	50,00
63 1:5	26,48	50,00	50,00
64 pur	26,41	50,00	50,00
64 1:5	26,38	50,00	50,00
65 pur	26,27	50,00	50,00
65 1:5	26,37	50,00	50,00
66 pur	26,55	50,00	50,00
66 1:5	26,49	50,00	50,00
67 pur	26,48	50,00	50,00
67 1:5	26,29	50,00	50,00
68 pur	26,12	50,00	50,00
68 1:5	26,18	50,00	50,00
70 1:10	26,24	50,00	38,19
70 1:10	26,14	50,00	50,00
71 1:10	26,20	50,00	50,00
71 1:10	26,34	50,00	50,00
72 1:10	26,39	50,00	50,00
72 1:10	26,35	50,00	42,05
73 1:10	26,24	50,00	50,00
73 1:10	26,50	50,00	50,00
74 1:10	26,38	50,00	50,00
74 1:10	26,44	50,00	50,00
75 1:10	26,54	50,00	50,00
75 1:10	26,60	50,00	50,00

Probe	Spike	Mais	35S
76 1:10	26,37	50,00	50,00
76 1:10	26,34	50,00	50,00
77 1:10	26,43	50,00	50,00
77 pur	26,26	50,00	50,00
78 1:10	26,30	50,00	50,00
78 1:10	26,32	50,00	50,00
79 1:10	26,21	50,00	50,00
79 1:10	26,29	50,00	50,00
80 1:10	26,32	50,00	47,12
80 1:10	26,25	50,00	50,00
81 1:10	26,41	50,00	50,00
81 1:10	26,36	50,00	50,00
82 1:10	26,21	50,00	50,00
82 1:10	26,20	50,00	50,00
83 1:10	26,27	50,00	50,00
83 1:10	26,29	50,00	50,00
90 1:10	26,51	41,28	50,00
90 1:10	26,47	50,00	50,00
91 1:10	26,46	50,00	50,00
91 1:10	26,46	50,00	50,00
92 1:10	26,34	50,00	50,00
92 1:10	26,38	50,00	50,00
93 1:10	26,32	50,00	50,00
93 1:10	26,22	50,00	50,00
94 1:10	26,33	50,00	50,00
94 1:10	26,44	50,00	50,00
95 1:10	26,51	50,00	50,00
95 1:10	26,57	50,00	50,00
96 1:10	26,18	50,00	50,00
96 1:10	26,22	50,00	50,00
97 1:10	26,34	50,00	50,00
97 1:10	26,30	50,00	50,00

Tab. 3.4.3: Ergebnisse der PCR-Analysen der PMF-Pollensammlerproben aus der Sommerperiode. Die Proben wurden mit dem Qiagen-Tissue-Kit entsprechend dem Extraktionsprotokoll vom LFU Augsburg extrahiert und auf das Vorhandensein von Inhibitionen (Spike), Mais- und 35S-Promotor-DNA analysiert. Beim Spiken werden in allen Analysen der extrahierten Proben-DNAs 40 Moleküle gentechnisch-veränderter DNA zugesetzt. Die

Menge an Spike-DNA ist so eingestellt, dass bei der RealTime-PCR Werte von 26 – 27 ein inhibitionsfreies System anzeigen. Werte größer als 27 zeigen Inhibitionen der entsprechenden Proben-DNA an. DNA-Lösung gesamt: 60 µl, eingesetzte DNA-Lösung in PCR: 5 µl unverdünnt und 5 µl einer 1:5 Verdünnung, Zyklen: 50.

3.4.3 Bienenhonig

Die Ergebnisse aus den PCR-Analysen der Pollen-DNA in den Honigproben sind in den Tab 3.4.4 und 3.4.5 zusammengefasst. In der Tab. 3.4.4 sieht man die Ergebnisse der Honigproben aus der Rapsperiode, die nach dem unter 2.4.6.5 beschriebenen Verfahren auf Raps-(ACCcase) und Pat-DNA (LL-Raps) analysiert wurden. In Tab. 3.4.5 sind die Ergebnisse der Honigproben aus der Sommerperiode, die zusätzlich noch auf Mais-DNA untersucht wurden, dargestellt.

	ACCcase	LL-Raps
B 01 1:5	31,25	50,00
B 01 1:5	31,66	50,00
B 01 pur	50,00	36,83
B 01 pur	27,85	50,00
B 03 1:5	31,37	50,00
B 03 1:5	31,39	50,00
B 03 pur	29,11	50,00
B 03 pur	29,06	50,00
B 04 1:5	31,13	50,00
B 04 1:5	31,12	50,00
B 04 pur	28,16	50,00
B 04 pur	28,45	50,00
B 05 1:5	34,80	50,00
B 05 1:5	34,16	50,00
B 05 pur	31,50	50,00
B 05 pur	31,42	50,00
B 06 pur	28,96	38,89
B 06 pur	28,36	37,88
B 07 1:5	31,29	50,00
B 07 1:5	31,28	50,00

	ACCcase	LL-Raps
B 07 pur	29,10	50,00
B 07 pur	29,15	50,00
B 08 1:5	33,37	50,00
B 08 1:5	33,51	50,00
B 08 pur	31,03	50,00
B 08 pur	31,11	50,00
B 10 1:5	32,47	50,00
B 10 1:5	32,40	50,00
B 10 pur	29,92	50,00
B 10 pur	29,69	50,00
B 13/1 pur	28,01	33,14
B 13/1 pur	28,19	32,97
B 14 pur	27,77	32,39
B 14 pur	27,68	32,61
B 14 1:2	28,76	33,58
B 14 1:2	28,73	33,65
B 14 1:10	30,90	35,83
B 14 1:10	30,91	35,24
B 20 pur	28,44	38,58
B 20 pur	29,01	39,17

	ACCcase	LL-Raps
B 21 a pur	30,11	50,00
B 21 a pur	29,73	50,00
B 21a 1:5	32,75	38,89
B 21a 1:5	32,64	50,00
B 22 pur	28,40	37,50
B 22 pur	28,41	39,15
B 23 1:5	32,26	50,00
B 23 1:5	32,16	50,00
B 23 pur	29,21	50,00
B 23 pur	29,49	50,00
B 24 pur	28,02	37,56
B 24 pur	28,29	35,72
B 25 1:5	30,45	50,00
B 25 1:5	30,34	50,00
B 25 pur	28,34	50,00
B 25 pur	28,21	37,91
B 26 pur	32,02	50,00
B 26 pur	32,48	50,00
B 27 1:5	30,51	50,00
B 27 1:5	30,48	50,00

	ACCCase	LL-Raps		ACCCase	LL-Raps		ACCCase	LL-Raps
B 27 pur	28,04	50,00	B 32 1:5	30,92	50,00	B 43 pur	33,01	50,00
B 27 pur	28,09	50,00	B 32 pur	28,41	38,66	B 43 pur	32,92	50,00
B 28 1:5	30,96	50,00	B 32 pur	28,48	50,00	B 45 1:5	33,55	50,00
B 28 1:5	31,04	50,00	B 40 1:5	33,47	50,00	B 45 1:5	33,50	50,00
B 28 pur	28,23	50,00	B 40 1:5	33,65	50,00	B 45 pur	30,96	50,00
B 28 pur	27,27	50,00	B 40 pur	31,47	50,00	B 45 pur	31,00	50,00
B 29 1:5	31,43	50,00	B 40 pur	31,37	50,00	B 46 1:5	37,25	50,00
B 29 1:5	31,24	50,00	B 41 1:5	36,18	50,00	B 46 1:5	50,00	50,00
B 29 pur	28,90	50,00	B 41 1:5	36,42	50,00	B 46 pur	35,10	50,00
B 29 pur	28,79	50,00	B 41 pur	34,15	50,00	B 46 pur	34,15	50,00
B 30 1:5	30,52	37,63	B 41 pur	33,67	50,00	B 47 pur	31,59	50,00
B 30 1:5	30,39	37,22	B 42 1:5	34,46	50,00	B 47 pur	31,51	50,00
B 31 1:5	31,86	50,00	B 42 1:5	34,11	50,00	B 48 1:5	50,00	50,00
B 31 1:5	31,76	50,00	B 42 pur	32,31	50,00	B 48 1:5	50,00	50,00
B 31 pur	30,35	50,00	B 42 pur	32,31	50,00	B 48 pur	42,79	50,00
B 31 pur	30,39	50,00	B 43 1:5	34,89	50,00	B 48 pur	50,00	50,00
B 32 1:5	30,97	38,08	B 43 1:5	35,09	50,00			

Tab. 3.4.4: Ergebnisse der PCR-Analysen der Honigproben aus der Rapsperiode. Die DNA der Proben wurden mit dem Qiagen-Tissue-Kit extrahiert und auf das Vorhandensein von Inhibitionen (Spike), Raps-, 35S-Promotor- und Pat-DNA analysiert. Inhibitionen wurden hierbei nicht festgestellt. DNA-Lösung gesamt: 60 µl, eingesetzte DNA-Lösung in PCR: 5 µl, Zyklen: 50.

Die Ergebnisse belegen, dass mit dem ausgearbeiteten PCR-Verfahren Rapspollen-DNA in 29 von 30 untersuchten Honigproben aus der Rapsperiode erfolgreich nachzuweisen war. Diese Proben enthielten nach den melissopalynologischen Untersuchungen nachweislich Rapspollen. Die einzige Honigprobe, die in der PCR kein Signal für Raps-DNA zeigte, stammt von dem vom Rapsanbau weit entfernten Standort 48 im Bayer. Wald, die auch nach der mikroskopischen Pollenanalyse keine Rapspollen enthielt.

3. Ergebnisse

Sample	Spike	Raps	LL	35S	Mais
B62 pur	26,41	41,79	50,00	50,00	50,00
B62 pur	26,12	42,03	50,00	50,00	50,00
B64 pur	26,48	50,00	50,00	50,00	50,00
B64 pur	26,29	50,00	50,00	50,00	50,00
B66 pur	26,42	35,28	50,00	50,00	50,00
B66 pur	26,38	33,34	50,00	50,00	50,00
B67 pur	26,6	37,24	50,00	50,00	50,00
B67 pur	26,52	37,19	50,00	50,00	50,00
B68 pur	26,41	50,00	50,00	50,00	50,00
B68 pur	26,37	50,00	50,00	50,00	50,00
B70 pur	26,52	38,47	50,00	50,00	36,99
B70 pur	26,60	39,25	50,00	50,00	36,54
B71 pur	26,71	34,73	50,00	50,00	37,65
B71 pur	26,64	34,38	50,00	50,00	37,81
B72 pur	26,58	36,86	50,00	50,00	50,00
B72 pur	26,69	36,58	50,00	50,00	50,00
B74 pur	26,49	37,20	50,00	50,00	50,00
B74 pur	26,44	36,88	50,00	50,00	50,00
B76 pur	26,38	33,38	50,00	50,00	35,00
B76 pur	26,54	33,74	50,00	50,00	35,62
B77 pur	26,64	37,29	50,00	50,00	37,03

Sample	Spike	Raps	LL	35S	Mais
B77 pur	26,42	38,51	50,00	50,00	37,25
B78 pur	26,80	35,07	50,00	50,00	38,54
B78 pur	26,65	34,73	50,00	50,00	38,43
B90.1 pur	26,57	35,77	50,00	50,00	50,00
B90.1 pur	26,39	36,42	50,00	50,00	50,00
B81 pur	26,49	42,91	50,00	50,00	50,00
B81 pur	26,55	39,84	50,00	50,00	50,00
B82 pur	26,66	35,96	50,00	50,00	50,00
B82 pur	26,60	35,72	50,00	50,00	50,00
B92 pur	26,51	31,34	50,00	50,00	50,00
B92 pur	26,43	31,01	50,00	50,00	50,00
B94 pur	26,47	38,40	50,00	50,00	50,00
B94 pur	26,54	38,00	50,00	50,00	50,00
B95 pur	26,32	30,86	50,00	50,00	50,00
B95 pur	26,81	30,77	50,00	50,00	50,00
B96 pur	26,72	29,82	50,00	50,00	35,74
B96 pur	26,66	30,42	50,00	50,00	35,55
B97 pur	26,54	31,31	50,00	50,00	50,00
B97 pur	26,69	30,11	50,00	50,00	50,00

Tab. 3.4.5.: Ergebnisse der PCR-Analysen der Honigproben aus der Sommerperiode. Die DNA der Proben wurden mit dem Qiagen-Tissue-Kit extrahiert und auf das Vorhandensein von Inhibitionen (Spike), Raps-, Mais-, 35S-Promotor- und Pat-DNA analysiert. Beim Spiken werden in allen Analysen der extrahierten Proben-DNAs 40 Moleküle gentechnisch-veränderter DNA zugesetzt. Die Menge an Spike-DNA ist so eingestellt, dass bei der RealTime-PCR Werte von 26 – 27 ein inhibitionsfreies System anzeigen. Werte grösser als 27 zeigen Inhibitionen der entsprechenden Proben-DNA an. DNA-Lösung gesamt: 60 µl, eingesetzte DNA-Lösung in PCR: 5 µl, Zyklen: 50.

Die in der Tab. 3.4.5 enthaltenen Ergebnisse aus den PCR-Analysen der Honigproben aus der Sommerperiode zeigen, dass in diesen Proben der PCR-Nachweis von Pollen-DNA erfolgreich geführt werden konnte. Hierbei wurde sowohl Raps- als auch Mais-

DNA festgestellt sowie der 35S-Promoter nachgewiesen. Probleme mit Totalinhibitionen, wie die Ergebnisse zum Spiking belegen, traten hier nicht auf.

4 Bewertung

4.1 Technische Pollensammler

4.1.1 Sigma-2

Die Verfahrensprüfungen belegten für den Sigma-2 eine signifikante Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Nachweisgrenze. Damit liegen wesentliche Kenndaten zur Standardisierung des Sigma-2 vor. Die Resultate belegen die Eignung des Sigma-2 zur Erfassung des Eintrages luftbürtiger Pollen für das GVO-Monitoring.

Der Sigma-2-Sammler zeigte sich mit hohen Depositionswerten sowohl zum Monitoring von Raps wie auch von Zuckerrübenpollen geeignet. Bei den ebenfalls untersuchten Maispollen ergaben sich zwar Nachweise, hingegen noch keine statistisch auswertbaren Befunde, so dass dies noch genauer abzuklären wäre. Weitere Erkenntnisse werden sich dazu aus dem zur Zeit stattfindenden Folgeprojekt in Bayern (Beismann et al. 2003) ergeben. Nachgewiesen ist die Eignung für zahlreiche Pollenarten, wie Gräser, Beifuss, Hasel, Erle, Birke, Pinus.¹⁰³ Eine systematische Erfassung des mit dem Sigma-2 erfassbaren Pollenspektrums steht allerdings noch aus.

Für molekularbiologische Analysen bestätigte sich, dass die Pollenanzahlen beim Sigma-2 selbst bei vierwöchiger Exposition zu gering ausfallen, um als geeignet gelten zu können.

Für die Feststellung eines Polleneintrages im GVO-Monitoring reichte jedoch die Ermittlung der direkt erfassbaren Pollendeposition im Sigma-2 als Konventionsverfahren aus.

Im Hinblick auf die Einhaltung einer optimalen Belegungsdichte für die rechnergestützte Bildanalyse einerseits und andererseits auch um eine möglichst

¹⁰³ Befunde des DWD Freiburg aus den Routinemessungen an den Kurorten

niedrige Probenfrequenz in einem GVO-Monitoring zu ermöglichen, empfiehlt sich aus den Ergebnissen eine Erfassungszeit beim Sigma-2 von zwei bis vier Wochen. Noch kürzere Zeiten wären auf Grund der dann zu geringen Pollenanzahlen (Nachweisgrenze) und des hohen Aufwandes für Probenwechsel und Analyse ungünstig, da die Proben nicht zusammengefasst, sondern einzeln betrachtet und ausgewertet werden müssen. Bei größeren Zeiträumen kann es hingegen zur Überbelegung der Haftträger kommen, insbesondere wenn die Standorte im intensiv bewirtschafteten Agrarraum mit hoher Einflussdichte und/oder im näheren Einflussbereich stark windblütiger Kulturpflanzen, wie z.B. Getreide, Mais, oder pollenreiche Baumarten (Koniferen, Birke etc.) liegen.

Insgesamt erwies sich der Passivsammler Sigma-2 in der Praxis als gut zu handhabendes und kostengünstiges¹⁰⁴ Verfahren, mit dem zuverlässig aussagefähige Resultate zu erzielen sind.

4.1.2 PMF

Die Ergebnisse aus den Freilandprüfungen belegten auch für die Rapspollenanzahl des PMF signifikante Bezüge zu den Gradienten der Ausbreitungsrechnungen. Sensitivität, Nachweisgrenze und Reproduzierbarkeit wurden als wesentliche Kenngrößen zur Standardisierung des PMF auf statistisch hohem Signifikanzniveau ermittelt.

Von den für das GVO-Monitoring prioritären Pflanzenarten wurden eindeutig Pollen für Raps, Mais und Zuckerrübe im PMF nachgewiesen. Die Rapspollen fanden sich in allen Proben aus dem Agrar- und Siedlungsraum, selbst inmitten der Städte Bremen und Freiburg. Dasselbe galt für Maispollen. Lediglich der weit vom Agrarraum entfernte Standort im Nationalpark Bayerischer Wald lag unter der relativen Nachweisgrenze von 0,2% Anteil an den Gesamtpollen.

Die vom PMF erfassten Pollenanzahlen pro Probe lagen bei gleicher Expositionszeit um den Faktor 10-100 höher als beim Sigma-2. Mit Gesamtpollenanzahlen von 500.000 bis 600.000 pro Probe im Mittel und bei Raps von 5.000 (Median), 50.000 (Mittelwert) und

¹⁰⁴ siehe Kap. 4.3 Kosten des Pollenmonitorings

560.000 im Maximum ist die Pollenmenge als ausreichend für molekularbiologische Analysen zu bewerten¹⁰⁵.

Die Ergebnisse zur PCR belegten, dass DNA- und GVO-Nachweise in den Pollenproben des PMF aus dem Freiland möglich sind. Von insgesamt 52 PMF-Proben gelang bei 37 der DNA-Nachweis. Raps-DNA konnte in 23 Proben festgestellt werden, DNA von GVO (PAT, 35S) in 11 Fällen. Bei einem Teil der Proben (15) traten jedoch Inhibitionsprobleme bei der PCR auf, die DNA – Nachweise verhinderten. Dies bedeutet, dass noch weitere Verbesserungen der PCR-Methodik im Hinblick auf ein ausreichend reproduzierbares Verfahren für das GVO-Monitoring erforderlich sind. Entsprechende Arbeiten hierzu wurden in Folgevorhaben begonnen.¹⁰⁶

Nach den Ergebnissen aus den Freilandversuchen sind für den PMF Erfassungszeiten von einer Woche bis zu sechs Wochen möglich, als optimal für das GVO-Monitoring werden zwei bis vier Wochen empfohlen. Beim PMF ist ein Zusammenlegen von Einzelproben möglich. Dies eröffnet einen breiten Spielraum im Hinblick auf die effiziente Gestaltung von Probenahme und Analytik im Monitoring.

In den PMF-Proben wurden zusätzlich systematisch alle bestimmbar Pollenarten analysiert. Die Ergebnisse belegten ein Spektrum von ca. 100 weiteren windblütigen Pollenarten, wie z.B. Gräser, Beifuss, Hasel, Erle, Birke, Pinus etc.. Damit eignen sich die technischen Sammler im GVO-Monitoring weit über Raps, Mais und Zuckerrübe hinausgehend.

Bei einem regelmäßig durchgeführten Monitoring lassen sich daher mit dem Pollenmonitoring retrospektiv Entwicklungen für bestimmte, erst später in den Fokus kommende GVO nachzeichnen. Das Pollenmonitoring weist damit wichtige Vorteile für eine modulartige Monitoringstrategie bei GVO auf.

¹⁰⁵ gefordert waren für die PCR 100 Pollen der Zielart pro Probe

¹⁰⁶ s. Kap. 4.3

Der Passivsammler PMF erwies sich als ein in der Praxis einfach zu handhabendes Verfahren, mit dem hohe Pollenausbeuten und reproduzierbare Resultate gewonnen werden konnten.

4.2 Biologische Pollensammler: Matrix Bienenhonig

Die Ergebnisse für den biologischen Pollensammler weisen Bienenhonig als geeignete Matrix für das Umweltmonitoring von GVO aus. Bienenbrot und Abstreifer hingegen empfehlen sich nicht, da sich diese für das Monitoring wenig praktikabel zeigten und keine ausreichend repräsentativen Aussagen zuließen.

Die Ergebnisse der Pollenanalysen im Honig belegten, dass der Rapsanteil im Honig auf einem vergleichsweise gleichbleibend hohen Niveau gehalten wurde. Der Rapsanteil im Honig (Gesamt = GVO + konventionell) ergab keinen mit der Entfernung vom Versuchsfeld abfallenden Gradienten und keinen, mit den technischen Sammlern vergleichbaren Zusammenhang zur Ausbreitungsrechnung. Dies ist Ausdruck der hohen Trachtattraktivität dieser Pflanze im Frühjahr. Die Biene überbrückt dafür gegebenenfalls auch Distanzen zu umliegenden Rapsfeldern.

Der über PCR quantitativ ausweisbare GVO-Anteil der Rapspollen im Honig zeigte hingegen den Einfluss der beiden untersuchten transgenen HR-Rapsfelder als deutlichen Gradienten. Der Anteil war im Nahbereich des Feldes am größten und nahm mit weiterer Distanz ab. Hierbei konnten GVO-Rapspollen in Honigproben bis an den Rand des Untersuchungsgebietes in 4 km Entfernung nachgewiesen werden, obschon zahlreiche andere und weitaus größere Rapsfelder in der Umgebung vorhanden waren. Von 23 Honigproben wiesen insgesamt 11 die transgenen Rapspollen auf. Bis 500 m Entfernung zu den HR-Rapsfeldern waren alle Honigproben GVO-positiv; mit zunehmender Entfernung nahm die Wahrscheinlichkeit einer Identifizierung im Honig ab. Die statistische Analyse ließ hierbei einen signifikanten Zusammenhang der Nachweiswahrscheinlichkeit von GVO im Honig zur Entfernung und Größe der transgenen Rapsfelder erkennen.

Die Ergebnisse aus diesem Vorhaben belegten, dass sich GVO-Einflüsse mit der biologischen Sammlerin Honigbiene über die Matrix Honig in einer bestimmten Entfernung zwischen Freisetzung und Bienenstandort detektieren lassen. Mit Hilfe eines mathematischen Modells wurden Aussagen zur Nachweiswahrscheinlichkeit von pollenfreisetzenden gentechnisch veränderten Pflanzen erzielt. Daraus wurden Fallzahlen abgeleitet, mit denen die Anzahl der nötigen Bienenstandorte für die Überwachung eines Raumes mit einer bestimmten Größe bei einer angestrebten Aussagesicherheit ermittelt werden kann.

Die Ergebnisse belegen eine hohe Raumrepräsentativität im Sammelverhalten der Biene gegenüber den technischen Punktsammlern. Durch die aktive Sammeltätigkeit der Biene lässt sich ein relativ großer Raum flächendeckend im Hinblick auf GVO-Quellen und Einflüsse überwachen. Als Einschränkung gilt: Die Honigbiene konzentriert sich auf attraktive Trachtpflanzen. Solange diese vorhanden und für ein GVO-Monitoring notwendig sind, lassen sich gut identifizierbare Signale entsprechend leicht bis in einen Radius von ca. 4 km Entfernung wiederfinden.

Die Überwachung anderer GVO hängt entscheidend von der Häufigkeit der Pollenart im Honig sowie dem erzielbaren Detektionslimit der eingesetzten Analysesysteme ab. Für häufige Arten dürften die Ergebnisse vom Raps als Anhaltspunkt dienen. Für Beimischungen wie Mais, die im Honig durchaus bis ca. 5% vorhanden sein können, gilt folgendes: Zur visuellen Bestimmung der Pollenart reicht standardmäßig ein Anteil von über 0,2% aus, wobei dies leicht auf 0,1% und darunter durch höhere Auszählraten¹⁰⁷ verbesserbar ist. Die derzeitigen Grenzen der molekularbiologischen Identifizierung dürften absolut bei ca. 30-40 Pollen pro g Honig liegen. Als relative Angaben bedeutet dies ca. 0,5-1% GVO-Anteil an den Gesamtpollen.

Daraus folgt, dass sich die Biene mit ihrer Sammelmatrix Honig in Verbindung mit der mikroskopischen Honiganalyse und PCR für ein GVO-Monitoring sehr gut eignet. Beim derzeitigen Stand der Analysetechniken kann rechnerisch durch repräsentativ

¹⁰⁷ siehe Kap. 2.3.5

verteilte Bienenstandorte im Durchschnitt ein Raum von 13 km² pro Standort überwacht werden.¹⁰⁸ Hierbei lassen sich sowohl Repräsentanz und Raumgröße mit Weiterentwicklung der molekularbiologischen Nachweissysteme noch steigern. In Deutschland sind ca. 90.000 Imker mit ca. 1 Mio. Bienenvölkern tätig¹⁰⁹, so dass durchschnittlich 2 Völker/km² vorhanden sind. Legt man die Raumrepräsentanz von 13 km²/Volk zugrunde, so würden 5% der vorhandenen Bienenvölker ausreichen, um ein bundesweites GVO-Monitoring größtenteils basierend auf den bereits tätigen Imkern zu realisieren. Durch Anwendung geeigneter statistisch begründeter Probenahmestrategien, die Kenntnisse über Anbaugebiete von GVO, Ausbreitungsmodelle und weitere Informationen miteinbeziehen, ließe sich die notwendige Anzahl für ein repräsentatives Monitoring noch deutlich reduzieren. Als Proben genügen 1 Glas Honig pro Standort und Ernte, die zum normalen Preis erworben werden können. Erkennbare Lücken in der Raumrepräsentativität und Sonderstandorte, die in geringem Umfang anzunehmen sind, können erfahrungsgemäß durch Wanderimker und / oder durch die Landes-Bieneninstitute gut ergänzt werden.

Die Ergebnisse belegten den Nachweis von über 140 Pollenarten in der Matrix Bienenhonig. Das Pollenspektrum ergänzte sich hierbei gut zu den technischen Sammlern, da von der blütenbesuchenden Honigbiene vor allem die insektengetragenen Pollen erfasst wurden. Die Matrix Bienenhonig eignet sich für ein GVO-Monitoring, das ebenfalls weit über Raps, Mais und Zuckerrübe hinausgeht und zukünftig relevant werdende Arten mit einschließen kann. Retrospektive Aussagen sind in einem regelmäßig durchgeführten Monitoring im Bedarfsfall jederzeit machbar, wobei die gute Lagerfähigkeit von Honig zukünftige PCR-Analysen erleichtert.¹¹⁰

Ein GVO-Monitoring mit der biologischen Sammlerin Honigbiene ist durch die technischen und logistischen Voraussetzungen als direkt umsetzbar zu werten. Eine

¹⁰⁸ Bei einer anzustrebenden Nachweissicherheit von ca. 80% pro Einzelprobe.

¹⁰⁹ Angabe von der Ohe

¹¹⁰ Eady et al 1995

entsprechende Standardisierung der Vorgehensweise für das GVO-Monitoring wird derzeit als VDI-Richtlinie 4330 Bl. 5 unternommen.

4.3 PCR

Die Ergebnisse zeigten, dass mit den entwickelten PCR-Verfahren (s. Kap 2.5) der Nachweis von Pollen-DNA und GVO in den Freilandproben der technischen Sammler und im Bienenhonig vollzogen werden konnte. Die Ringversuche ergaben eine Nachweisgrenze von ungefähr 100 Pollen der zu bestimmenden Art in der Probe. Die Analyse der Freilandproben belegte, dass der Nachweis von Pollen-DNA und GVO bei einem Großteil der Proben beider Matrices gelang, jedoch noch Schwierigkeiten mit der Zuverlässigkeit und Empfindlichkeit des PCR-Nachweises auftraten, die z.T. auf Inhibition der PCR zurückzuführen waren. Für die Matrix Bienenhonig konnte noch im Verlaufe des Vorhabens eine Verfahrenslösung gefunden werden, so dass am Ende alle Bienenhonigproben erfolgreich analysiert wurden. Für die Proben aus den technischen Sammlern gelang dies bei 16 Proben nicht. Als Gründe wurden vor allem hemmende Substanzen aus den beteiligten Luftstäuben vermutet. Einer entsprechenden Lösung wird derzeit in Folgevorhaben nachgegangen.¹¹¹

Die relativ neuen PCR-Verfahren zum Nachweis von GVO in Pollen und allgemein Pflanzenmaterial stellen für absehbare Zeit das Mittel der Wahl dar (Bonfini et al. 2001). Beim derzeitigen Stand ist die PCR als das limitierende Glied in der Verfahrenskette zu bewerten. Die PCR-Verfahren befinden sich jedoch stark in Entwicklung, so dass hier weitere Fortschritte zu erwarten sind. Zur Qualitätssicherung und Standardisierung der PCR-Verfahren für das GVO-Monitoring wurde jüngst ein Fachausschuss beim VDI eingerichtet.

¹¹¹ Beismann et al. (2002); Impetus, Bremen; GeneScan, Freiburg

5 Schlussfolgerungen

5.1 Monitoring der Umweltwirkungen von GVO

Die Ergebnisse aus diesem Projekt brachten Belege für die Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Repräsentanz des Pollenmonitorings, in dem technische und biologische Sammler kombiniert wurden. Wenngleich das Verfahren für vielfältige Aufgaben in Frage kommt, steht primär die Anwendung für das Umweltmonitoring von GVO im Vordergrund. Nachdem die Grundvoraussetzungen durch dieses Vorhaben geprüft wurden, sollen hier die Schlussfolgerungen zur Umsetzung des Pollenmonitorings für das Monitoring der Umweltwirkungen von GVO gezogen werden. Dies beinhaltet die Skizzierung einer effizienten Gesamtstrategie und der Rolle, die das Pollenmonitoring darin einnehmen kann.

Hierbei ist zunächst das Ziel zu vergegenwärtigen:¹¹² In der EU-Richtlinie 2001/18/EG wird für GVO, die die vorgeschalteten Risikoprüfungen bestanden haben und in Verkehr gebracht werden sollen, als Maßnahme zum „risk assessment & risk management“ das Langzeitmonitoring der Umweltwirkungen vorgeschrieben. Dies erfolgt vor allem im Bewusstsein der begrenzten Prüfmöglichkeiten und den Erkenntnis- und Sicherheitslücken, die trotz der vorgeschalteten, raum-zeitlich begrenzten Risikoforschung verbleiben. Da wegen dieser Lücken dem gesetzlichen Vorsorgeprinzip nicht ausreichend Rechnung getragen werden kann, ist bei Inverkehrbringen von GVO verpflichtend eine begleitende Umweltüberwachung vorgeschrieben. Die Hoffnung ist, potenzielle Umweltveränderungen von GVO frühzeitig genug zu identifizieren, um gegensteuern zu können. Die Überwachung soll möglichst umfassend im Hinblick auf gesetzlich definierte Schutzgüter erfolgen: Zu berücksichtigen sind die Merkmale des eingebrachten Genmaterials, des entstandenen Organismus, des Aufnahmehabitats sowie die Wechselwirkung zwischen dem GVO und

¹¹² Siehe Kapitel 1

der Umwelt. Bewertet werden direkte oder indirekte, unmittelbare oder spätere Wirkungen, wobei alle kumulativen und langfristigen Auswirkungen der absichtlichen Freisetzung oder der Vermarktung der GVO auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt zu berücksichtigen sind.¹¹³ Diese Vorgaben verlangen die Dokumentation der gegenwärtigen GVO-Exposition als Grundlage für die Untersuchung auch solcher Risikofragestellungen, die zur Zeit noch gar nicht absehbar sind, sondern erst in der Zukunft deutlich werden.

Da die Umwelt natürlicherweise einem Wandel unterliegt, der sich in komplexen Zusammenhängen mit verschiedensten Ursachen vollzieht, besteht eine Hauptschwierigkeit im GVO-Monitoring darin, plausibel festzustellen, ob gegebenenfalls eintretende Umweltveränderungen mit dem eingebrachten Genmaterial und GVO in Zusammenhang stehen, oder ob es sich um Umweltveränderungen handelt, die auch ohne das GVO ablaufen würden. Aus Erfahrung in anderen Umweltbereichen sind derartige Aufgabenstellungen mit einzelnen Parametern oder Parametergefügen nicht zu lösen. Vielmehr ist eine integrierende Monitoringstrategie notwendig, in der ausgewählte Parameter über die verschiedenen erforderlichen Erkenntnisbereiche mit einander verknüpft werden. Hier ist es von Vorteil, wenn die Parameter einen hohen systemischen Indikationswert aufweisen.

Der Beitrag einzelner Verfahren, wie des Pollenmonitorings, hängt letztlich von einer Gesamt-Strategie für das Monitoring der Umweltwirkungen von GVO ab. Um ein solches Konzept wird derzeit jedoch sowohl wissenschaftlich als auch politisch noch gerungen, ein praxistauglicher Konsens scheint hier noch fern.

Aus unserer Sicht der Monitoring-Praxis können wir uns als erfolgversprechend die in Abb. 5.1.1 skizzierte Strategie vorstellen, die bereits in Kap. 1 angesprochen wurde. Der Ansatz basiert auf einer iterativen, auf Optimierung der Beobachtungsmöglichkeiten ausgerichteten stufigen Vorgehensweise, die aus dem Integrierten Monitoring und Risk

¹¹³ Siehe D. Byrne, EU-Commissioner in Consumers Voice 5/03 und den dortigen Erläuterungen zu den anstehenden Novellierungen der EU-Rechtvorschriften sowie Nöh (2003)

Assessment von Umweltwirkungen stammt¹¹⁴. Für die Plausibilitätsprüfung von Zusammenhängen werden hierbei die verschiedenen Ebenen des Wirkungspfades von der Quelle bis in die biologisch-ökologische Wirkungsebene hinein exemplarisch über geeignete Indikatoren abgedeckt und miteinander verknüpft. Als wesentliche Elemente sind die Eintrittswahrscheinlichkeiten von Exposition und potentiellen Wirkungen unter Nutzung der Kenntnisse über die Quellen abzuschätzen und im Freiland über geeignete Größen zu prüfen. Die Plausibilität von beobachteten Umweltveränderungen mit dem Einbringen von GVO lässt sich dann nachvollziehbar über raum-zeitliche Zusammenhänge prüfen. Die Aussagesicherheit ergibt sich aus der Stimmigkeit der Ergebnisse. Gegebenenfalls lässt sich evaluieren, inwieweit sich Stellgrößen zur Regulierung des GVO-Einflusses in Bezug auf Intensität oder räumliche Zonierung (Stichwort: Koexistenz) anbieten. Im Unterschied zu reinen Beobachtungsinstrumenten ist das Monitoring der Wortbedeutung¹¹⁵ und gesetzlichen Definition in der Freisetzungsrichtlinie entsprechend ein Überwachungsinstrument, das den Vergleich von Ist- mit Sollwerten (z.B. Baselines, Richt-, Grenzwerte) anstrebt, somit bewertende Elemente beinhaltet und auf Handlungskonsequenzen ausgerichtet ist.

Der nachfolgend beschriebene konzeptionelle Rahmen verdeutlicht exemplarisch die Voraussetzungen für die Ziel- und Aufgabenbestimmung und macht den Beitrag, den das Pollenmonitoring hierzu leisten kann, transparent:

- a) Als primär wird die Kenntnis über Art, Lage und Größe der GVO- Quellen angesehen (Anbauregister; Stichproben im Freiland für GVO- und konventionellen Anbau); ein Anbauregister wird als Voraussetzung für ein effizientes Monitoring angesehen.
- b) Die nächste Ebene betrifft die Verbreitung des Genmaterials (Exposition). Über Ausbreitungsmodelle lässt sich aus Kenntnis der Quellen eine flächige Abschätzungen der Exposition vornehmen, die dann stichprobenartig im

¹¹⁴ Matthis & Klein 1994, US EPA 1998, Hofmann et al. 1998, Mauriello & Park 2002

¹¹⁵ monitor (lat.): Warner, Ermahner, Erinnerer; technisch: Überwachung mit Vergleich von Soll und Istwerten.

Freiland über geeignete Akkumulationsindikatoren geprüft und korrigiert werden kann. An dieser Stelle setzt das Pollenmonitoring ein.

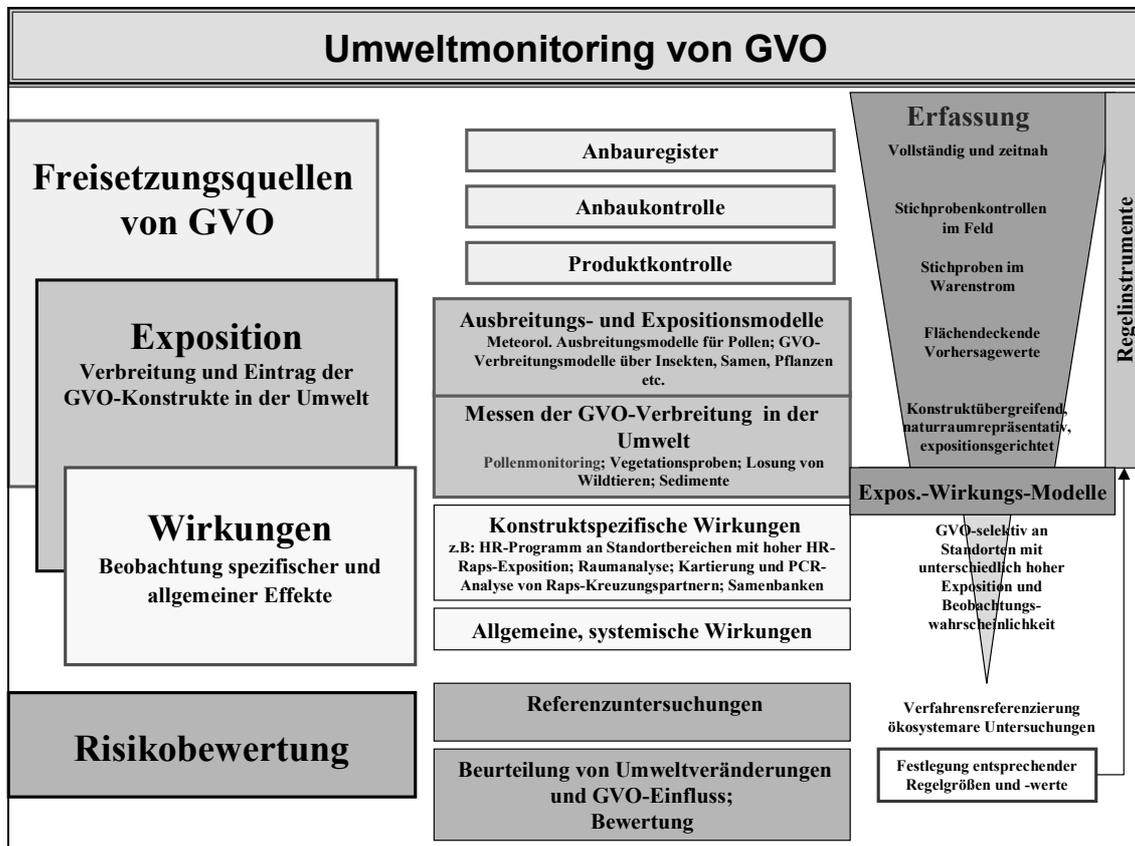


Abb. 5.1.1: Vorschlag für eine Strategie zum Monitoring der Umweltwirkungen von GVO: Die Umweltüberwachung von GVO verknüpft die Ebenen des Wirkungspfades von der Freisetzungsquelle über Exposition und Wirkung hin zur Risikobewertung. Den relativ gut erfassbaren Ebenen der Quellen und Exposition kommen hierbei Lenkungsfunktion für Wirkungsuntersuchungen zu, die schwieriger zu beobachten sind. Zur Risikoabschätzungen von Effekten, die sich einer direkten Beobachtung entziehen, stellen Expositionsdaten darüber hinaus die wesentliche Basis dar. Aus der Risikobewertung erfolgen die Ableitung konkreter Handlungsempfehlungen, wie die Festlegung einzuhaltender Sollwerte, die im Monitoring kontrolliert werden.

- c) Aus den Erkenntnissen des Pollenmonitorings lassen sich direkt Rückschlüsse zu Eintrag und Verbreitung von GVO über Pollen in Deutschland gewinnen. Diese Daten, die für die Risikoabschätzungen von GVO von erheblicher Bedeutung sind, liegen bis dato nicht vor und können aus anderen Messprogrammen nicht abgeleitet werden.
- d) Weiter erfolgt aus den Expositionsdaten dann die Abschätzung von potentiellen Wirkungen und deren Eintritts- und Beobachtungswahrscheinlichkeiten. Hierbei können Kenntnisse zur Verteilung sensitiver oder besonders schützenswerter Ökosysteme oder bestimmte, als kritisch bekannte Aufnahmestellen (z.B.: Biotop mit Kreuzungspartnern etc.) optimierend einfließen. Die aus entsprechenden Modellen gewonnenen Aussagen bedürfen wiederum im Gelände einer stichprobenartigen und gezielten Überprüfung. Die Kenntnis zur Expositionsverteilung erleichtert hierbei die Festlegung eines geeigneten, effizienten Probenahmedesigns, in dem eine Lenkung GVO-spezifischer Wirkungsuntersuchungen an Orte mit möglichst guter Beobachtungswahrscheinlichkeit erfolgt. Dadurch wird die Umsetzung des Monitorings von GVO trotz einer Vielfalt an Konstrukten und potentiellen Wirkungen und einem entsprechenden Methodenfächer¹¹⁶ erst praktikabel.
- e) Die Risikobewertung integriert die Erkenntnisse der verschiedenen Ebenen, wobei die Stimmigkeit der Resultate ein wichtiges Kriterium darstellt.
- f) Schließlich lassen sich Handlungsempfehlungen ableiten sowie gegebenenfalls geeignete Regelgrößen festlegen.
- g) Darüber hinaus können Erkenntnisse über die Exposition auch zur Zonierung von Anbaugebieten und GVO-freien/armen Gebieten sowie zu deren Kontrolle dienen. Die Möglichkeit einer Koexistenz von GVO und konventionellem Anbau sowie Ökolandbau hängt entscheidend von Reichweite und Ausmaß der Transgenverbreitung sowie der Dynamik im Landbau (Fruchtwechsel) ab. Daher

¹¹⁶ siehe Methodendarstellung bei Züghardt & Breckling 2003

sind entsprechend weiträumig gefasste Zonierungen unerlässlich, für manche GVO ist Koexistenz gar nur unter striktem Containment vorstellbar.¹¹⁷ Da sowohl der Anbau einem Wandel unterliegt, als auch Modelle zu Verbreitung von GVO mit großen Unsicherheiten behaftet sind, wird es notwendig sein, die Exposition von GVO über Freilandmessungen zu kontrollieren. Andernfalls wird es nicht möglich sein, das politisch definierte Ziel der Wahlfreiheit von EU-Bürgern in Bezug auf GVO-freie Lebensmittel für nachfolgende Generationen zu gewährleisten.¹¹⁸

- h) Die Vorgehensweise führt zu nachvollziehbaren, räumlichen Zonierungen mit GVO-spezifischen Schwerpunkt- und Referenzbereichen. Beobachtete Umweltveränderungen können dann auf raum-zeitliche Zusammenhänge mit der Freisetzung und Einflussintensität der GVO geprüft werden. Auffällige Bereiche oder solche mit besonders unklaren oder widersprüchlichen Ergebnissen werden hierbei identifiziert und empfehlen sich gezielt für weitergehende, vertiefende Untersuchungen. Damit lässt sich auch im Einzelfall besonderen Konstellationen von eingebrachtem Genmaterial und Aufnahmemilieu (regionale, ökologische oder sonstige Besonderheiten) gerecht werden.¹¹⁹
- i) Für das GVO-Monitoring sind hohe Qualitätsanforderungen an die Verfahren zu stellen. Die Verfahren müssen zu wissenschaftlich nachvollziehbaren und über Ländergrenzen hinweg vergleichbaren Ergebnissen führen. Es muss möglich sein, Sollwerte (Baselines, Richt-, Leit-, Schwellen-, Grenzwerte) zu definieren, so dass bei Abweichungen der Ist-Werte Handlungskonsequenzen abzuleiten sind. Dies erfordert hinreichend standardisierte Verfahren.
- j) Das Monitoring weist hier bei effizienter Umsetzung zahlreiche Schnittstellen zu anderen Überwachungsbereichen im Bereich GVO auf, die als Synergien

¹¹⁷ siehe Feil & Schmid (2002), Treu & Emberlin (2000)

¹¹⁸ siehe Byrne, Consumer Voice (2003)

¹¹⁹ das Instrument der Sonderfallprüfung hat sich in anderen Regelbereichen sehr bewährt (TA Luft, siehe Kloke et al. 1987)

genutzt werden können. Es kann z.B. Hinweise für die Überwachung im Hinblick auf Verstöße bei der Freisetzung oder illegalen Anbau geben.

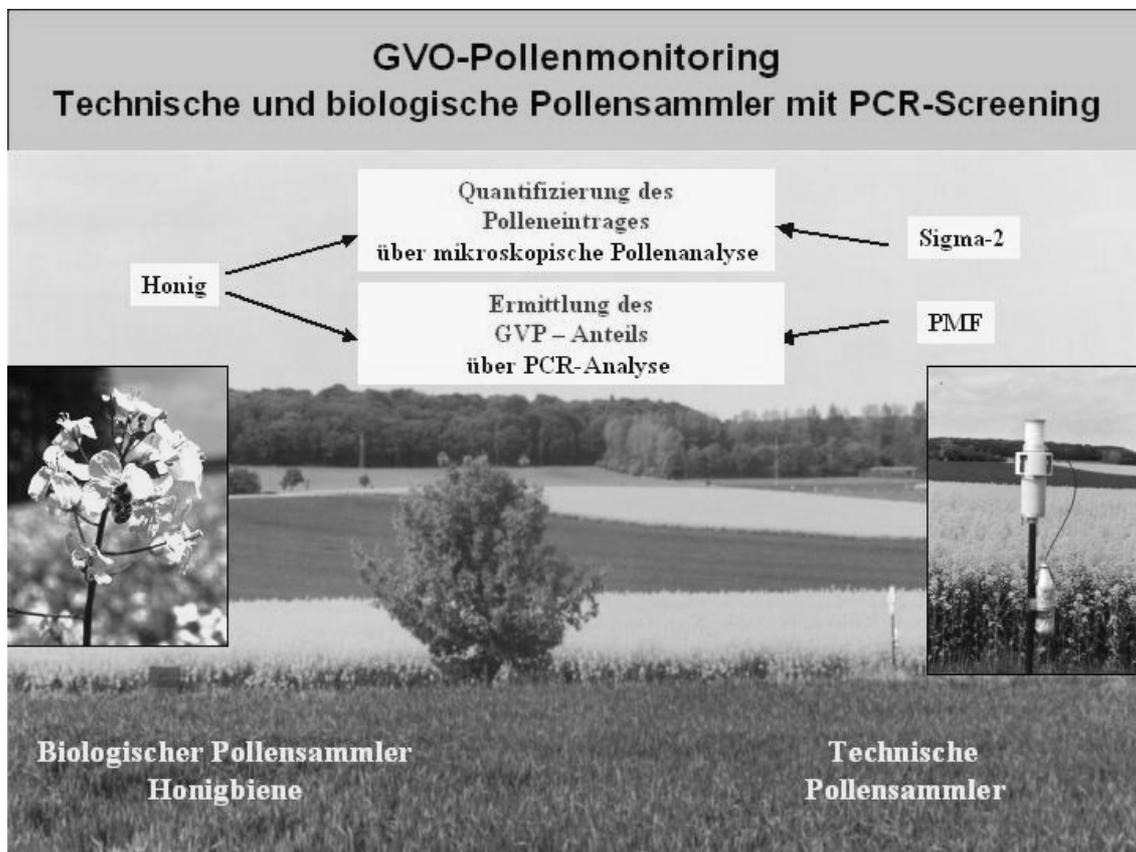


Abb. 5.1.2: Technische und biologische Pollensammler zur Erfassung der Exposition für das Monitoring der Umweltwirkungen von GVO

5.2 Die Rolle des Pollenmonitorings

Beim gegenwärtigen Stand der Technik bietet sich das Pollenmonitoring über technische und biologische Pollensammler als Indikator für die Expositionsebene des GVO-Monitorings an. Beide Verfahren ergänzen sich und sind im Zusammenhang zu sehen.

Über die technischen Pollenpassivsammler, die über längere Zeiträume Pollen integrativ sammeln und standortbezogene Aussagen erlauben, lassen sich Eintrag und Verbreitung

von GVO über den Luftpfad via Pollen ermitteln. Erfasst wird hierbei der Pollenfluss an einem Standort (Punktsammler, aerogener Eintrag).

Dies wird ergänzt durch biologische Pollensammler, wie die Honigbiene, die blühende Pflanzen anfliegen und deren Pollen sammeln. Über die Pollenanalyse im Honig lassen sich dann flächenrepräsentative Aussagen zur Verbreitung blühender, pollenfreisetzender Pflanzen im Raum und damit der Verbreitung von GVO gewinnen.

Diese Parameter dienen dann, wie in der Monitoringstrategie allgemein dargelegt, als Indikator für die Exposition von GVO. Modellaussagen zur Verbreitung von GVO können so im Freiland überprüft und korrigiert werden. Unter dem Aspekt eines anzunehmenden stetigen Wandels von Anbauflächen, sprich der raum-zeitlichen Dynamik im Anbau, sind für entsprechend sichere Aussagen Expositionsprüfungen im Freiland unerlässlich.

Es konnte gezeigt werden, dass mit dem Pollenmonitoring ein Spektrum von ca. 150 Pollenarten nachgewiesen wurde. Das Pollenmonitoring bietet damit die Möglichkeit, bereits jetzt, über Raps, Mais und Zuckerrübe hinausgehend, ohne besonderen Zusatzaufwand Informationen über zahlreiche weitere Arten zu gewinnen, die als Langzeitarchive retrospektiv über Entwicklungen bestimmter GVO Auskunft geben können. Darüber lassen sich beispielsweise die Entwicklung der Verbreitung nachzeichnen, die Variation in Raum und Zeit feststellen und daraus Baselines und Schwellenwerte ableiten. Diese Erkenntnisse sind besonders wertvoll, damit zukünftigen Entwicklungen von GVO und deren Freisetzungen Rechnung getragen werden kann.

5.3 Die Umsetzung des Pollenmonitorings in der Praxis - Probenahmedesign

Das in diesem Projekt angewandte Untersuchungsdesign diente der Methodenprüfung. Für die Umsetzung des Pollenmonitoring im GVO-Monitoring auf regionaler, bundesweiter oder gar EU-Ebene sind andere Probenahmestrategien zu verwenden. Das

Ziel besteht darin, möglichst effizient, d.h. mit möglichst wenigen Standorten, die Verteilung des GVO-Einflusses über Pollen hinreichend genau zu erfassen.

Die Anzahl notwendiger Standorte hängt von den Genauigkeitsforderungen, den verwendeten Sammeltechniken und dem Probenahmedesign, also der Strategie der Sammler-Standortwahl ab.

Die Präzisierung der Genauigkeitsforderungen hängt von politischen Entscheidungen ab, die noch nicht vorliegen. Von Bedeutung wird beispielsweise die Einhaltung bestimmter Grenz- bzw. Schwellenwerte für unbeabsichtigte Kontamination im Saatgut sein, über deren Höhe in Kürze auf EU-Ebene entschieden werden soll.

Als Sammeltechnik kommen wie unter 4.2 dargelegt als biologische Sammler die Honigbiene mit der Matrix Honig und als technische Sammler die Sigma-2 / PMF – Kombination in Frage.

Für die Standortwahl sind grundsätzlich mehrere Verfahren möglich, die sich hinsichtlich des damit verbundenen technischen und planerischen Aufwands unterscheiden. Reine Zufallsbeprobungen oder regelmäßige Kataster erfordern geringen Planungsaufwand, jedoch eine hohe Anzahl von Sammlern sowie einen hohen technischen Aufwand bei der Aufstellung der Sammler. Die Beschränkung bei der Standortwahl auf einzelne Modellregionen und zufällige Anordnung bzw. regelmäßiges Kataster reduziert zwar die Sammler-Anzahl, lässt jedoch keine hinreichend repräsentativen Aussagen für die übrigen Gebiete zu. Insgesamt sind rein zufällige oder auf vollständigen regelmäßigen Gittern angeordnete Sammleraufstellungen als ineffizient anzusehen.

Effizienter sind solche Probenahmedesigns, bei denen die Positionen der Sammler unter Verwendung von bereits vorhandener Information über erwartete Pollenexposition festgelegt werden. Auch das Wissen über schützenswerte Bereiche oder sensitive Wirkorte sollte die Sammler-Positionierung (mit-) steuern. Die zur Planung notwendige Basis-Information ist in Form von Kartenmaterial, Anbauregistern, Feldstichproben, Fernerkundung und GIS-Daten entweder ohnehin schon vorhanden oder beschaffbar.

Ausbreitungsmodelle verknüpfen diese Basis-Information zu Vorhersagewerten für die Pollenexposition über große Flächen bis hin zur gesamten Bundesrepublik. Aus den Vorhersagewerten ergeben sich sowohl Hinweise auf Verdichtungsgebiete („areas of concern“), die genauer untersucht werden sollten, wie auch ganz generell Empfehlungen für die Sammler-Positionierung: Für die Herstellung eines kartenähnlichen Gesamtbildes der Pollenexposition sollten Sammler so positioniert werden, dass Gebiete mit einem ausgeprägten Gradienten in der erwarteten Pollenexposition bevorzugt beprobt werden, ebenso besonders schützenswerte Gebiete oder andere „areas of concern“. Diese grundsätzliche Strategie der geschichteten Stichprobe (stratified sampling) sollte ergänzt werden durch eine Überprüfung der in die Planung eingegangenen Grundlagen, insbesondere der Angaben des Anbauregisters, aber auch der Ausbreitungsrechnung. Für eine solche Überprüfung ist der Einsatz von technischen Sammlern (Sigma-2 kombiniert mit PMF) vorzuschlagen. Deren Anzahl kann relativ gering gehalten werden, da sie nur der Überprüfung der Annahmen dienen, nicht der Herstellung eines flächigen Gesamtbildes.

Die geographische Anordnung der Probenahmeorte im Rahmen einer geschichteten Stichprobe sollte zunächst auf Grund der oben genannten Grundlagen entworfen werden. Die Zweckmäßigkeit dieses Entwurfs sollte in einer rechnergestützten Simulationsstudie überprüft werden, in der die erwarteten Expositionen mit zufälligen Störungen überlagert werden. Auch Variationen in den Grundannahmen (z.B. andere klimatische Verhältnisse, Verschiebungen der Anbaugebiete) können im Sinne einer Sensitivitätsanalyse in die Simulation eingehen. Innerhalb eines Simulationslaufs wird dann festgestellt, welches Expositionsbild die Sammleraufstellung des Entwurfs erwarten lässt, wobei die in diesem Projekt ermittelten Sammlereigenschaften eingehen. Ein Vergleich den in der Studie als „wahr“ angesetzten Verhältnissen und dem sich ergebenden Expositionsbild erlaubt eine Beurteilung des anfänglichen Entwurfs der Sammler-Anordnung und gibt Empfehlungen für eventuelle Korrekturen. Auf diese Weise wird aufwendiges Experimentieren im Freiland für Planungszwecke weitgehend durch preisgünstige und flexible Rechnersimulation ersetzt.

Zur Steigerung der Effizienz des Monitorings durch die Einbeziehung von Informationen zu Anbauflächen und Fernerkundung sowie Ausbreitungsmodelle liegen bereits Erfahrungen vor¹²⁰. Der oben beschriebene Ansatz eines effizienten geschichteten Probenahmedesigns unter Ausnutzung der verfügbaren Vorinformationen mit simulationsgestützter Planung ist darüber hinaus in Richtung auf die Einbeziehung von Wirkungsdaten ausbaubar. Die Kopplung und der Abgleich der Quellen- und Expositionsdaten mit der raum-zeitlichen Verteilung von Wirkungsbeobachtungen lässt die Prüfung zu, inwieweit bestimmte Wirkungen mit der Freisetzung von GVO verbunden sein können und mit welchen Eintrittswahrscheinlichkeiten zu rechnen ist. Für Langzeitwirkungen, die sich einer zeitnahen Beobachtung entziehen, können Risikoabschätzungen praktisch nur aus Kenntnis der Verteilung der Exposition und entsprechend anzunehmender Dosis-Wirkungszusammenhänge vorgenommen werden.

5.4 Kosten des Pollenmonitoring

Das Pollenmonitoring wurde nicht zuletzt unter dem Aspekt entwickelt, ein kostengünstiges Verfahren für das GVO-Monitoring zur Verfügung zu stellen.

Die technischen Pollensammler Sigma-2 und PMF fallen als Passivsammler deutlich kostengünstiger als Aktivgeräte aus. Abhängig von der Stückzahl können die Gerätekosten um 1.000 € pro Standort realisiert werden, gegenüber Aktivgeräten, die ab 5.000 € aufwärts beginnen für die Pollenzählung (z.B. Burkard-Falle) und ab 20.000 € für High-Volume-Sammler zur Erzielung der notwendigen Pollenmengen. Besondere Installationen (Strom, Gebäude) und Standortsicherungen wie bei Aktivgeräten sind nicht erforderlich. Die Geräte können praktisch überall an geeigneten Standorten aufgestellt werden.

Die Kosten für die Durchführung, wie Probenanalysen, PCR und Bildanalysen, hängen stark vom Probenahmedesign und der Stückzahl ab. Insbesondere bei der PCR und der Bildanalyse ist die Methodenentwicklung stark im Fluss. Bei ausreichendem

¹²⁰ Hidalgo et al. 2002

Probendurchsatz (>1000/Jahr) sind Kostenreduzierungen pro Probe und Standort durch apparative Automatisierungen und spezielle Routinen erheblich (je nach Verfahren Drittel bis Zehntel), was unter Effizienz Gesichtspunkten zu beachten wäre.

Die Kosten für den biologischen Pollensammler Honigbiene sind denkbar günstig. In der Regel genügt die Einbindung von ortsansässigen Imkern und der Erwerb eines 500g-Honigglases. Der Preis pro Probe dürfte mit Begleitkosten unter 100 € / Probe bei ausreichender Stückzahl zu realisieren sein. Nur im Ausnahmefall müssen zusätzliche Standorte von den Bieneninstituten bestückt werden. Für die Kosten der Probenanalyse gilt ebenfalls die Abhängigkeit von den Stückzahlen. Die melissopalynologischen Untersuchungen sind als Standardverfahren eingeführt und nur geringfügig zu ergänzen, die Kosten liegen bei ausreichender Stückzahl unter 100 € pro Probe. Für die PCR gilt oben Gesagtes.

Das kombinierte Pollenmonitoring stellt sich damit als sehr kostengünstiges Verfahren dar, mit dem sich notwendige und wertvolle Aussagen erzielen lassen und mit dem auch in die Fläche gehende Umsetzungen mit hohen Standortzahlen möglich sind.

5.5 Bedeutung der Ergebnisse für Abstandsregelungen und Koexistenz von GVO und konventionellem/Biolandbau

In Abb. 5.5.1 werden die Ergebnisse der Ausbreitungsrechnungen von Raps und Mais für den Sicker Versuch vergleichend gezeigt. Die Ergebnisse weisen deutlich auf die Abhängigkeit der Polleneinwirkung an einem Standort von der Pollenart und den jeweilig herrschenden Windverhältnissen hin. Das Ausmaß des Polleneintrages variiert bei gleicher Distanz zum Feld um Größenordnungen abhängig von der Pollenart, der Windrichtung und –geschwindigkeit.

In 10m Abstand vom 0,3ha großen Rapsfeld schwankte der an 8 Stellen per PMF gemessene Rapspollenfluss während der Rapsbüte im Frühling zwischen 5.800.000 und 72.000.000, die rechnerisch ermittelten Minima lagen hierbei unter 1.000.000 und die Maxima über 100.000.000. Der Unterschied zwischen Minima und Maxima beim

Maispollenfluss in 500m Abstand vom Feld ergab nach der Ausbreitungsrechnung für die Sommersituation während der Maisblüte (rechte Abbildung) einen Faktor von über 1.000. Bei gleichem Pollenfluss (250.000 Maispollen/m² entsprechend 0,05 Pollen/m³) variiert die Entfernung von 150m bis 4 km.

Für die Kennzeichnung und Regelung der Einflussstärke von Pollenflug ist daher die Entfernung von der Quelle in Meter oder Kilometer, (wie es bei derzeitig intendierten Abstandsregelungen im Hinblick auf Vermeidung möglicher Effekte bei GVO oder zur Erzielung von Koexistenz von GVO-Anbau, konventionellem und Biolandbau diskutiert wird) ein ungeeigneter Parameter, wenn nicht hohe Sicherheitsfaktoren bei den Feldabständen angelegt werden, die ungünstige meteorologische und topografische Situationen einschliessen.

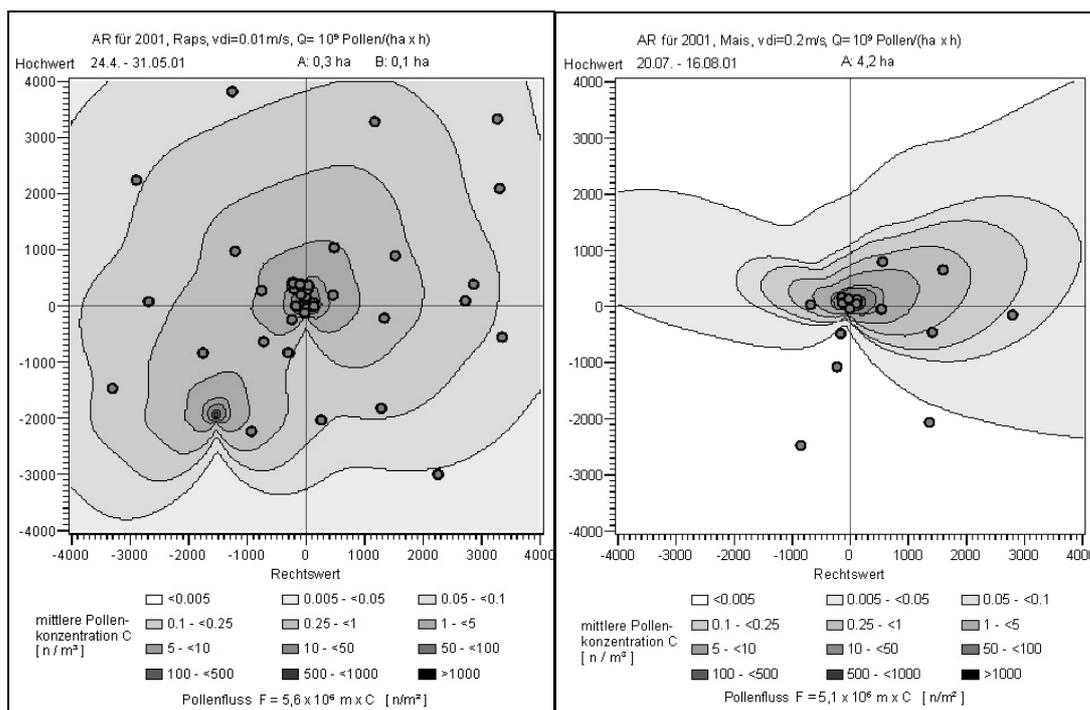


Abb. 5.5.1: Ergebnisse der Pollen-Ausbreitungsrechnungen für Raps und Mais: Die Abbildungen zeigen die unterschiedliche Ausbreitungscharakteristik der beiden Pollenarten und die Abhängigkeit von Windrichtung und – verteilung an. Bei gleicher Distanz um das Feld variiert der Polleneinfluss mit der Windrichtung um Größenordnungen.

Die Ergebnisse von Lavigne et al. (2002), Eastham & Sweet (2002) sowie Befunde aus den großangelegten „Field Trials“ in Großbritannien¹²¹ weisen darauf hin, dass für Raps und Zuckerrübe Abstände von 1.000m nicht ausreichend sind und großräumige Zonierungen auf Landschaftsniveau erforderlich sein werden. Zu vergleichbaren Ergebnissen kommen auch Feil & Schmid (2002) nach Auswertung von (weltweiten) Erkenntnissen aus der Pflanzenzüchtung. Erfahrungen aus Kanada und den USA, wo transgener Raps und Mais seit geraumer Zeit frei angebaut wird, zeigen, dass unter liberaler Handhabung Koexistenz für diese GVO nicht möglich ist.¹²² In diese Richtung zeigen auch unsere Ergebnisse: Der Eintrag von Raps- und Maispollen wurde für alle Standorte aus dem Agrar- und Siedlungsraum belegt, d.h. auch an Standorten, die km-weit von Anbauflächen entfernt lagen. Dies ist leicht erklärbar, da Pollenwolken bei kräftigeren, turbulenten Windlagen oder bei thermischen Aufwinden in höhere Luftschichten gelangen und mit diesen in hoher Dichte über kilometerweite Distanzen verfrachtet werden können (Helbig et al. 2004).

Für GVO empfehlen sich daher Regelungen, die direkt an der Einflussstärke, hier vom Pollenflug als Indikator für potenzielle Wirkungen, ansetzen (DiGiovanni & Larsen 2002). Das kann unter Einbeziehung von Ausbreitungsmodellen und Expositionsmessungen im Freiland erfolgen, wie es auch in anderen Bereichen der Umweltüberwachung längst üblich ist (TA Luft 2002). Für N-Immissionen aus Stallanlagen beispielsweise wurde ein Weg gefunden, der für die Anwendung im Allgemeinen Sicherheitsabstände festlegt, die so weit sind, dass auch unter ungünstigen Situationen keine unerwünschten Wirkungen zu erwarten sind. Will jemand diese unterschreiten, ist eine spezifische Begutachtung unter Einbeziehung von u.a. Ausbreitungsrechnungen, relative Lage zu den Schutzgütern und Immissionsmessungen gefordert. Entsprechende Ansätze liessen sich auf GVO übertragen (Lavigne et al. 1996; Lavigne et al. 2002; Richter & Seppelt 2002; Laredo 2003).

¹²¹ The Royal Society (2003)

¹²² Friesen et al. (2003); Marvier (2002)

Wir erachten derartige Ansätze für notwendig, um zu wissenschaftlich nachvollziehbaren, GVO-spezifischen Zonierungen zu gelangen, die die Eigenschaften der GVO und die regionalen Gegebenheiten berücksichtigen, damit die gesetzlich vorgegebenen Grenzen für unbeabsichtigte Kontamination¹²³ in der Praxis eingehalten werden können. Hidalgo et al. (2002) zeigten am Beispiel von *Olea* in Spanien, dass mit geeigneten Modellansätzen entsprechend großräumige Aussagen zur Polleneinflussstärke zeitnah zu gewinnen sind. Ausbreitungsrechnungen liefern hierzu ein mathematisch definiertes, damit allgemein und überall nachvollziehbares Bezugssystem. Vergleichbares ist mit technischen Messverfahren derzeit alleine nicht zu erzielen. Da sowohl der Anbau einem Wandel unterliegt als auch Modelle zur Aus- und Verbreitung von GVO mit großen Unsicherheiten behaftet sind, wird es allerdings stets notwendig sein, die Exposition von GVO über Freilandmessungen zu kontrollieren. Andernfalls wird es kaum möglich sein, die EU-weit politisch definierten Ziele der Koexistenz von GVO-Anbau und konventionellem/ökologischem Anbau sowie der Wahlfreiheit der EU-Bürger in Bezug auf GVO-freie Lebensmittel auch für nachfolgende Generationen zu gewährleisten.¹²⁴

Welche Langzeitwirkungen eine Gesellschaft auf sich nehmen will, ist Gegenstand eines gesellschafts-politischen Entscheidungsprozesses. Aufgabe des Monitoring ist es, entsprechende Überwachungsinstrumente bereitzuhalten, damit das Ausmaß von Wirkungen frühzeitig eingeschätzt und bewertet werden kann und gegebenenfalls korrigierende Eingriffe möglich sind. Das Pollenmonitoring bietet auf der Expositionsebene die Möglichkeit, entsprechend aussagefähige Daten zu erheben, die als Entscheidungsgrundlagen genutzt werden können.

¹²³ Bei der Novellierung der EU-Rechtsvorschriften mit nationaler Umsetzung (siehe Novellierung des Gentechnik-Gesetzes in 2004) werden für die unbeabsichtigte Kontamination mit GVO Grenzen im Bereich von 0,1-1% diskutiert..

¹²⁴ siehe Byrne, Consumers Voice (2003)

6 Weitere Schritte zur Umsetzung des GVO-Pollenmonitorings

Aus den hier dargestellten Ergebnissen lassen sich folgende Handlungsempfehlungen für die Realisierung eines Pollenmonitorings als Teil des GVO-Monitorings ableiten:

1. Prüfung der verbleibenden offenen Fragen zur PCR und zur Raumrepräsentativität bei den technischen Sammlern.
2. Systematische Ermittlung des erfassbaren Pollenspektrums beim Sigma-2 mit Erweiterung der Referenzdatenbank für die Bildanalyse.
3. Erstellung von Richtlinien zur Standardisierung für das Pollenmonitoring sowie sukzessive für alle Verfahren im Monitoring.
4. Anpassung/Weiterentwicklung geeigneter Ausbreitungsmodelle (z.B. LASAT, KAMM/DRAIS) für die Anwendung im GVO-Monitoring: Dies beinhaltet die Ermittlung von Sink- und Depositionsgeschwindigkeit für die relevanten Pollenarten, die stufenskalige und modulartige Vorgehensweise für überregionale Anwendungen mit zahlreichen Flächenquellen, entsprechende Schnittstellen zu GIS mit Verteilung der Anbauflächen und sensitiven Bereiche (Anbauregister, Fernerkundung, Zonierungsvorgaben etc), Festlegung empirische prüfbarer Vorhersageparameter, Sensitivitätsstudien im Hinblick auf empirisch nicht prüfbare Parameter und Annahmen.
5. Durchführung einer Machbarkeitsstudie für das kombinierte Pollenmonitoring mit technischen und biologischen Sammlern unter größerem Raumbezug und statistischem Probenahmekonzept (Testlauf auf regionaler Ebene).
6. Ermittlung und Auswertung des erfassbaren Pollenspektrums mit statistischen Auswertungen im Hinblick auf artspezifische Beobachtungswahrscheinlichkeiten für ein bundesweites Monitoring aus naturraumrepräsentativer Sicht, Ermittlung regionaler raum-zeitlicher Variation, Baselines und Schwellenwerte im Hinblick auf Sollwerte für die Bewertung, Ausarbeitung eines effizienten statistischen Probenahmedesigns für das Pollenmonitoring im GVO-Monitoring (bundesweiter Testlauf).

7 Literatur

- Alessandro, M.; Schultz, E.; Endlicher, W. (1999): VIII. A two years air pollution survey in Gran Mendoza, Argentina: a) sampling, composition and sources of a coarse particle load. In: Endlicher, W.; Mikkan, R. (Eds.): *Mendoclima. Clima Urbano y Contaminación Atmosférica del Gran Mendoza*. Meridiano. Revista de Geografía, Centro de Estudios Alexander von Humboldt, Buenos Aires, Argentina, 7 Mayo de 1999, S. 86-101.
- Ammann, D.; Vogel, B. (1999): *Langzeitmonitoring gentechnisch veränderter Organismen: Bestandsaufnahme, Fallbeispiele und Empfehlungen*. Kantonales Laboratorium Basel-Stadt (Hrsg.).
- Ammann, K.; Rufener Al Mazyad; Jacot, Y. (1999): *Konzept und praktische Lösungsansätze zur ökologischen Begleitforschung*. Botanischer Garten Bern, 26.
- Anklam, E.; Gadani, F.; Heinze, P.; Pijnenburg, H.; Van Den Eede, G. (2002): Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *European-Food-Research-and-Technology* 2002; 214(1): 3-26.
- Arndt, U.; Nobel, W.; Schweizer, B. (1987): *Bioindikatoren. Möglichkeiten, Grenzen und neue Erkenntnisse*. Ulmer, Stuttgart.
- AUSTAL86: *Das Ausbreitungsmodell nach TA Luft 1986 (Gauß-Modell)*. Siehe TA Luft (1986).
- AUSTAL2000: *Das Ausbreitungsmodell der neuen TA Luft 2002 (Lagrange-Partikel-Modell)*. Siehe TA Luft (2002); Modell: Janicke 2003, <http://www.austal2000.de>.
- Aylor, D.E. (2002): Settling speed of corn (*Zea mays*) pollen. *Aerosol science* 33: 1601-1607.
- Bartsch, D.; Lehnen, M.; Clegg, J.; Pohl-Orf, M.; Schuphan, I.; Ellstrand, N.C. (1999): Impact of gene flow from cultivated beet on genetic diversity of wild sea beet populations. *Molecular Ecology* 8, 1733-1741.
- Behm, F.; von der Ohe, K.; Henrich, W. (1996): Zuverlässigkeit der Pollenanalyse von Honig. Bestimmung der Pollenhäufigkeit. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 92, 183-188.
- Beismann, H.; Kuhlmann, M.; Pfadenhauer, J. (2003): Methodenentwicklung für ein Monitoring transgener Pollen, „Prüfung der Raumrepräsentativität von Pollensammlern für ein Langzeitmonitoring von gentechnisch veränderten Pflanzen“. UBA Text 53/03, 57-70
- Berdal, K.G.; Holst-Jensen, A. (2001): Roundup Ready® soybean event-specific real-time PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses. *Eur Food Res Technol* 213, 432-438.

- Beudert, B.; Breit, W., Diepolder, U.; Kaiser, M. (1997): Integrated Monitoring im Nationalpark Bayerischer Wald. Umweltbundesamt (Hrsg.), Berlin, UBA-FB 104 02 700, 265
- Bonfini, L.; Heinze, P.; Simon, K.; Van den Eede, G. (2001): Review of GMO Detection and Quantification Techniques. European Commission, Joint Research Centre, Institut for Health and Consumer Protection, Food Products and Consumer Goods Unit, Ispra, Italy, 2001, <http://biotech.jrc.it/doc/EUR20384Review.pdf>
- Brauner, R.; Tappeser, B (2001): Entwicklung von Umweltindikatoren beim Monitoring in Zusammenhang mit gentechnisch veränderten Pflanzen. UBA-Texte 63/01. Berlin.
- Brinker, M.; Piechulla, B. (1999): Untersuchungen zur Spezifität von pflanzlichen Promotoren. Umweltbundesamt (Hrsg.) Berlin, UBA-Texte 80/99.
- Brown, R. C. (1993): Air Filtration. Pergamon Press, Oxford.
- Bund-Länder-AG (2001): Eckpunkte für ein Monitoring der Umweltwirkungen von gentechnisch veränderten Pflanzen (GVP. Arbeitsergebnis der Bund/Länder-AG „Monitoring der Umweltwirkungen von GVP“ (Sept. 2000). In: UBA (2001): Kap. 2.1.2, S. 17-32.
- Chamberlain, A.C. (1967): Deposition of particles to natural surfaces. In: Airborne microbes. 17th Symposium of the Society for General Microbiology held at the Imperial College, London. University Press, Cambridge. 138-164.
- Clark, A. (1997): Risks of genetic engineering in agriculture. Annual meeting of the National Farmers Union, Nov. 1997, Saskatoon, Canada.
- Clark, A. (2001): On the implications of the Schmeiser decision. Genetics Soc. of Canada Bulletin (6).
- Comtois, P. (2000): The gamma distribution as the true aerobiological probability density function (PDF). Aerobia 16 (2): S. 171-176, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 2000.
- Consumer Voice (2001): Newsletter für Lebensmittelsicherheit, Gesundheit und Verbraucherpolitik der Generaldirektion für Gesundheit und Verbraucherschutz. Sonderausgabe zu GVO, Sept. 2001.
- Consumer Voice (2003): Newsletter für Lebensmittelsicherheit, Gesundheit und Verbraucherpolitik der Generaldirektion für Gesundheit und Verbraucherschutz. Ausgabe April 2003.
- DiGiovanni, F.; Larsen, J. (2003): Airborne Pollen Dispersal Modeling: An Effective Tool For Regulating Gene-flow. <http://www.biosafety.net/abstract/13.doc>, 21.03.2003.
- DIN Deutsches Institut für Normung e.V. (2002): Untersuchung von Honig - Bestimmung der relativer Pollenhäufigkeit. Berlin.
- Eady, C.; Twell, D.; Lindsay, K. (1995): Pollen viability and transgene expression following storage in honey. Transgenic Research 4, 226-231.

- Eastham, K.; Sweet, J. (2002): Genetically modified organisms (GMOs): The significance of gene flow through pollen transfer. Environmental issue report 28, European Environmental Agency (EEA), Copenhagen.
- Edmonds, R. L. (ed) (1979): Aerobiology: The Ecological systems approach. US/IBP Synthesis Series 10, Dowden, Hutchinson & Ross, Stroudsburg, Pennsylvania, 386.
- Edmonds, R. L.; Benninghoff, W. S. (1979): The challenges of aerobiology. In: Edmonds, R. L. (ed): Aerobiology: The Ecological systems approach. US/IBP Synthesis Series 10, Dowden, Hutchinson & Ross, Stroudsburg, Pennsylvania, 273-380.
- Eltschka, R.; Kühr, J.; Schultz, E. (1994): Luftverunreinigungen und Atemwegserkrankungen. Lufthygienische Messungen und epidemiologische Erkrankungen im Raum Freiburg. Ecomed, Landsberg.
- Emberlin, J. (1999): A report on the dispersal of Maize pollen. Research paper. National Pollen Research Unit, University College Worcester, 21 pp. <http://www.soilassociation.org> → Research Papers.
- Endlicher, W.; Schultz, E. (1996): Immissionsökologische Untersuchungen in Tucumán/Nordargentinien. Erdkunde, Archiv für wissenschaftliche Geographie, Sonderdruck, Bd. 50/1996, S. 100-111.
- EU-Freisetzungsrichtlinie (2001): Richtlinie 2001/18/EG des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 12. März 2001 über die absichtliche Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen in die Umwelt. <http://europa.eu.int/eur-lex/de>
- Feil, B.; Schmid, E. J. (2002): Dispersal of maize, wheat and rye pollen – A contribution to determining the necessary isolation distances for the cultivation of transgenic crops. Shaker, Aachen.
- Feldmann, S.D. (2000): Begleitforschung zur Freisetzung herbizidresistenter, transgener Rapspflanzen 1995-1999. Endbericht. Schriftenreihe des NLO "Nachhaltiges Niedersachsen" Heft 13.
- Feldmann, S.D.; Brandes, S.; Matzk, A.; Pfeilstetter, E.; Schiemann, J. (1998): Ökologische Begleituntersuchungen zur Freisetzung gentechnisch veränderter, herbizidresistenter Rapspflanzen. In: Umweltbundesamt (Hrsg.) (1998): Monitoring von Umweltwirkungen gentechnisch veränderter Pflanzen (GVP). Dokumentation eines Fachgespräches des Umweltbundesamtes am 4. und 5. Juni 1998. UBA-Texte 77/98, 85-94, Berlin.
- Ferreira, S.; Lopes, M.; Brandão, R. (2001): Sampling efficiency of Hirst and Cour Methods regarding pollinosis therapy in Évora (South of Portugal). European Pollen Symposium, 14.-19.9.2001, Wien.
- Frenz, D. A.; Elander, J. C. (1996): A calibration program for Rotorod samplers. Annals of Allergy, Asthma & Immunology 76, 245-246.
- Friesen, L.F.; Nelson, A.G.; Van Acker, R.C. (2003): Evidence of contamination of pedigreed canola (*Brassica napus*) seedlots in Western Canada with genetically engineered herbicide resistance traits. Agron. J. 95:1342-1347.

- Garland, J.A.; Nicholson, K.W. (1991): A review of methods for sampling large airborne particles and associated radioactivity. *J.Aerosol Sci.* (22) 4, 479-499.
- Gaskell, G. J.; Britton, W. J.; Carter, D. A. T.; Tovey, E. R.; Benyon, F. H. L.; Løvborg, U. (1996): Oligonucleotide probes for the identification of common airborne allergenic genera and species of fungi. Poster presented at 4th International DNA Fingerprinting Conference, 2-7. Dec., 1996, Melbourne, Victoria, Australien, 1.
- GENEERA (2003): GenEERA III – Modellrechnungen zur Ausbreitung von Raps-Transgenen auf Landschaftsebene - Regionalstudie Schleswig-Holstein. <http://www.biosicherheit.de/projekte/146.proj.html>.
- Goossens, D.; Offer, Z.Y. (1999): Wind tunnel and field calibration of six aeolian dust samplers. *Atmospheric Environment* 34, 1043-1057.
- Gregory, P.H. (1973): *The microbiology of the atmosphere. A plant science monograph.* 2nd edition. Hill Books, Aylesbury.
- Grinshpun, S.A.; Chang, Ch.-W.; Nevalainen, A.; Willeke, K. (1994): Inlet characteristics of bioaerosol samplers. *J.Aerosol Sci.* (25) 8, 1503-1522.
- Häupler, H.; Loos, G.H.; Surkus, B. (2003): Monitoring von herbizidresistentem Raps in NRW. In: UBA (2003), 71-90.
- Helbig, N.; Vogel, B.; Vogel, H.; Fiedler, F. (2004): Numerical modelling of pollen dispersion on the regional scale. *Aerobiologia* 3, 3-19.
- Heissenberger, A.; Unger, G.; Wottawa, A.; Schmidt, J. (1999): Möglichkeiten zum Monitoring des Einflusses transgener Pflanzen auf Bodenmikroorganismen. Umweltbundesamt Wien. R-160.
- Hellebrand, M.; Nagy, M.; Mörsel, T. (1998): Determination of DNA traces in rapeseed oil. *Eur Food Res Technol* 206: 237-242.
- Hemmer, W. (1997): Foods derived from genetically modified organisms and detection methods. BATS-Report 2/1997, Basel.
- Henningson, E.W.; Ahlberg, M.S. (1994): Evaluation of microbiological aerosol samplers: A review. *J.Aerosol Sci.* (25) 8, 1459-1492.
- Henry, C.; Wright, A.; Weekes, R.; Weller, S.; Oehlschlager, S. (2002): *Genetically Modified Organisms.* <http://www.csl.gov.uk/prodserv/cons/GMO/Overview.cfm>
- Hidalgo, J.; Mangin, A.; Galán, C.; Hembise, O.; Vázquez, L.M.; Sanchez, O. (2002): An automated System for surveying and forecasting *Olea* pollen dispersion, *Aerobia* 18: S. 23-31, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 2002.

Hinds (1982): Aerosol Technology.

Hirst, J. M. (1958): The automatic volumetric spore trap and examples of its use in plant pathology. Proc. Linn. Soc. London, 169, No. 1-2, 66-73.

Hirst, J.M.; Hurst, G.W. (1967): Long-distance spore transport. In: Airborne microbes. 17th Symposium of the Society for General Microbiology held at the Imperial College, London. University Press, Cambridge. 138-164.

Hofmann, F. (2002): Technische und biologische Pollensammler und PCR-Screening für eine erste Stufe eines GVO-Umweltmonitorings. Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie 32, 420.

Hofmann, F., Schlechtriemen, U., Wosniok, W., Reckel, S. (1998): Integrated monitoring for identifying the specific air pollution impacts of industrial emission sources. In: Stravinskiene, V., Juknys, R. (Ed.) Dendrochronology and Environmental Trends. Proceedings of the International Conference EuroDendro 1998, Vytautas Magnus Univ., Kaunas, Litauen.

Hofmann, F.; Breitfuß, G. (2002): Der Pollenmasenfilter PMF – ein neuartiger Passivsammler für das Umweltmonitoring von GVO. Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie 32, 426.

Hofmann, F.; Schlechtriemen, U.; Wosniok, W.; Foth, M.; Seiffert, B.; Breitfuß, G.; von der Ohe, W.; von der Ohe, K.; Dietze, V.; Schultz, E.; Tappeser, B. (2003): Technische und biologische Pollenakkumulatoren und PCR-Screening für eine erste Stufe eines GVO-Umweltmonitorings. Modellprojekt zum Langzeitmonitoring von GVP. In: UBA (2003), 33-55.

Hofmann, F.; Wosniok, W.; Siemers, U.; Giesemann, A.; Duve, M.; Bracke, G. (2001): Luftgüterindenmonitoring mit Immissions-Fingerprinting - Ein neues Probenahmegerät und Verfahren zum Biomonitoring von Luftschadstoffen für akkumulierbare Substanzen mit der Möglichkeit des Fingerprintings von Immissionsquellen. Ecomed, Landsberg, 156 S; Gate to EHS, <http://www.scientificjournals.com/ehs>; DOI:<http://dx.doi.org/10.1065/ehs2001.05.009>.

Hofmann, N.; Wieland, G.; Thienel, T. (2002): Untersuchungen zur Verbreitung und Anreicherung von Transgensequenzen in der Umwelt über Auskreuzung und Bodeneintrag am Beispiel von HR-Raps: Pilotprojekt zur Entwicklung und Erprobung von Monitoringmethoden an definierten Freisetzungstandorten. Zwischenbericht 2001 des niedersächsischen Modellprojektes (FKZ: 200 89 412/03)

Hübner, P.; Waiblinger, H.U.; Pietsch, K.; Brodmann, P. (2001): Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. Journal-of-Aoac-International 2001; 84(6):1855-64.

Hudson, L. C.; Chamberlain, D.; Stewart Jr, C . N. (2001): GFP-tagged pollen to monitor pollen flow of transgenic plants Molecular Ecology Notes. 1, 321-324.

- Hunt, J.C.R.; Higson, H.L.; Walklate, P.J.; Sweet, J.B. (2001): Modelling the dispersion and cross-fertilisation of pollen from GM-crops. Final report to the Dept. for Environment, Food and Rural Affairs, Cambridge.
- IMPEL (2003): The European Union Network for the Implementation and Enforcement of Environmental Law. <http://europa.eu.int/comm/environment/impel/index.htm>, 05.03.2003.
- Ingram, J. (2000): Report on the separation distances required to ensure cross-pollination in below specified limits in non-seed crops of sugar beet, maize and oilseed rape. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (eds.), Cambridge, UK.
- Janicke (2003): Entwicklung eines modellgestützten Beurteilungssystems für den anlagenbezogenen Immissionsschutz (LaGrange-Partikelausbreitungsmodell). Ingenieurbüro Jänicke, Dunum. Umweltbundesamt Berlin, UFOPLAN Forschungskennzahl 200 43 256. Stand 2003-02-09
- Kappert, H.; Rudolf, W. (Hrsg.) (1958): Handbuch der Pflanzenzüchtung. Dritter Band: Züchtung der Knollen- und Wurzelfruchtarten. Paul Parey, Berlin.
- Kay, S.; Van den Eede, G. (2001): The limits of GMO detection. *Nat. Biotechn.* 19 (5), 405-406.
- Kloke, A., Schulze, E., Jäger, H.-J. & Müller, S. (1987): Entscheidungshilfen für die Prüfung in Sonderfällen nach TA Luft (Nr. 2.2.1.3.). Teil 1. Beurteilung der Wirkung von Schwefeldioxid und Fluorwasserstoff auf die Vegetation. Umweltbundesamt, Berichte 8/87, Erich Schmidt Verlag, Berlin
- Korell, M.; Schittenhelm, S.; Weigel, H.-J. (1999): Formulation of criteria for a sustainable and environmentally compatible use of genetically engineered crop cultivars. UBA-Texte 56/99, Berlin.
- Kowallik, K.V. (1999): Endosymbiose – ein Motor der Evolution. *Biologen heute*, 1/99, 1-5.
- Kowalski, W. J.; Bahnfleth, T. S.; Whittam, T. S. (1999): Filtration of airborne microorganisms: modeling and prediction. <http://www.arche.psu.edu/iec/abe/fom.html>
- Laredo, C. (2003): Mechanistic models and field experiments for studying pollen dispersal in homogeneous and inhomogeneous environments, <http://www.math.ku.dk/~michael/dynbio/abstracts.html>, 20.03.2003.
- LASAT (2003): Programmsystem zur Berechnung von Schadstoffausbreitung in der Atmosphäre, Lagrangesches Ausbreitungsmodell nach VDI 3945 Blatt 3. (Lagrange-Simulation von Aerosol-Transport). Version 2.12. Ing.-Büro Janicke, Dunum. <http://www.janicke.de>
- Lavigne, C.; Godelle, B.; Reboud, X.; Gouyon, P.H. (1996): A method to determine the mean pollen dispersal of individual plants growing within a large pollen source. *Theor. Appl. Genet.* 93, 1319-1326.
- Lavigne, C.; Klein, E.K.; Couvert, D. (2002): Using seed purity data to estimate an average pollen mediated gene flow from crops to wild relatives. *Theor. Appl. Genet* 104: 139-145

- Lavigne, C.; Klein, E.K.; Vallee, P.; Pierre, J.; Godelle, B.; Renard, M. (1998): A pollen-dispersal experiment with transgenic oilseed rape. Estimation of the average pollen dispersal of an individual plant within a field. *Theor. Appl. Genet.* 96:886-96.
- Lheureux, K.; Libeau-Dulos, M.; Nilsagard, H.; Cerezo, E.R.; Menrad, K.; Vorgrimler, D. (2003): Review of GMOs under development and in the pipeline in Europe. Joint Research Center, European Commission.
- Loos, C.; Seppelt, R.; Meier-Bethke, S.; Schiemann, J.; Richter, O. (2003): Spatially explicit modelling of transgenic maize pollen dispersal and cross pollination. Eingereicht.
- Louveaux, J.; Maurizio, A.; Vorwohl, G. (1978): International Commission for Bee Botany of IUBS: Methods of Melissopalynology. *Bee World*, 59, 139-157.
- Marvier, M. 2002. Improving risk assessment for nontarget safety of transgenic crops. *Ecological Applications*. 12:1119-1124.
- Marvier, M.; Meir, E.; Kareiva, P. (1999) How do the design of monitoring and control strategies affect the chance of detecting and containing transgenic weeds? In: Ammann, K.; Jacot, Y.; Simonsen, V.; Kjellsson, G. (eds): *Methods for risk assessment of transgenic plants III: Ecological risks and prospects of transgenic plants. Where do we go from here?* Birkhaeuser Verlag, 109-122.
- Matthies, M.; Klein, M. (1994): Modellierung von Stoffausbreitungen. *UWSF-Z.Umweltchem.Ökotox.* 6(6), 359-366.
- Mauriello, D.A.; Park, R.A. (2002): An adaptive framework for ecological assessment and management.
- May, K.R. (1967): Physical aspects of sampling airborne particles. In: *Airborne microbes*. 17th Symposium of the Society for General Microbiology held at the Imperial College, London. University Press, Cambridge. 60-80.
- McCartney, H.A.; Lacey, M.L. (1991): Wind dispersal of pollen from crops of oilseed rape (*B. napus* L.) J. *Aerosol Sci.* Vol 22, no. 4 p. 467-477.
- Miklau, M.; Gaugitsch, H.; Heissenberger, A. (2001): EU-Workshop: Monitoring of Environmental Impacts of Genetically Modified Plants. UBA-Texte 45/01. Berlin.
- Neemann, G.; Scherwaß, R. (1998): Vorstellung des Monitoring-Konzeptes zu Umweltauswirkungen von gentechnisch veränderten Pflanzen. In: Umweltbundesamt (Hrsg.) (1998): *Monitoring von Umweltwirkungen gentechnisch veränderter Pflanzen (GVP)*. Dokumentation eines Fachgespräches des Umweltbundesamtes am 4. und 5. Juni 1998. UBA-Texte 77/98, 140-164, Berlin.
- Neemann, G.; Scherwaß, R. (1999): Materialien für ein Konzept zum Monitoring von Umweltwirkungen gentechnisch veränderter Pflanzen. UBA-Texte 52/99, Berlin.

- Niedersächsisches Landesamt für Ökologie (2000): Begleitforschung zur Freisetzung herbizidresistenter, transgener Pappspflanzen 1995 - 1999. Ein Beitrag zur biologischen Sicherheitsforschung - Endbericht - = Nachhaltiges Niedersachsen - Dauerhaft umweltgerechte Entwicklung 13.
- Niessner, R. (1993): Sampling techniques for air pollutants. In: Barcelo, D. (Ed.): Environmental Analysis: techniques, applications and quality assurance. Elsevier Science Publishers.
- Nöh, I. (1998): Konzeption für ein Umweltmonitoring von GVP. Zusammenfassung der Ergebnisse des Vortrages. In: Umweltbundesamt (Hrsg.): Monitoring von Umweltwirkungen gentechnisch veränderter Pflanzen (GVP). Dokumentation eines Fachgespräches des Umweltbundesamtes am 4. und 5. Juni 1998. Berlin, UBA-Texte 77/98, 128-129.
- Okubo, A.; Levin, S.A. (1989): A theoretical framework for data analysis of wind dispersal of seed and pollen. *Ecology* 70, 329-338.
- Osborne, J. L.; Clark, S. J.; Morris, R. J.; Williams, I. H.; Riley, J. R.; Smith, A. D.; Reynolds, D. R.; Edwards, A.S. (1999): A landscape-scale study of bumble bee foraging range and constancy, using harmonic radar. *Journal of Applied Ecology*, 36, 519-533.
- Park, S.J.; Taton T.A.; Mirkin, C.A. (2002): Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes. *Science* 2002; 295(5559):1503-6.
- Petersen, G.; Johansen, B.; Seberg, O. (1996): PCR and sequencing from a single pollen grain. *Plant Molecular Biology* 31, 189-191.
- Pfanzagl, B. (1999): Begleituntersuchungen bei gentechnisch veränderten Pflanzen: Sicherheitsforschung, Ökologische Begleitforschung und Monitoring. Umweltbundesamt (Hrsg.) Wien. Monographien 114, 3-4.
- Quist, D. Chapela, I. (2001): Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. *Nature* Vol. 414, 541 – 543.
- Ramsay, G.; Thompson, C.E.; Neilson, S.; Mackay, G.R. (1999): Honeybees as vectors of GM oilseed rape pollen. In: Lutmann, P. J. W. (1999): Gene Flow and Agriculture: Relevance for Transgenic Crops. BCPC Symposium Proceedings No. 72, 209-216.
- Raubuch, M.; Schieferstein, B. (2002): Ökologische und ökosystemanalytische Ansätze für das Monitoring von gentechnisch veränderten Organismen. UBA-Texte 44/02, Berlin.
- Raynor, G. S. (1979): Sampling techniques in aerobiology. In: Edmonds, R. L. (ed): Aerobiology: The Ecological systems approach. US/IBP Synthesis Series 10, Dowden, Hutchinson & Ross, Stroudsburg, Pennsylvania, 151-172.

- Richter, O.; Seppelt, R. (2002): Modelling spatial spread of genetic information via pollen dispersal: coupling of population dynamics and genetics. The International Environmental Modelling and Software Society, IEMS-Proceedings: 468-472.
- Ronneberger, O.; Schultz, E.; Burkhardt, H. (2002): Automated pollen recognition using 3D volume images from fluorescence microscopy. *Aerobia* 18 (2): S. 107-115.
- Rufener, A.; Mazyad, P.; Ammann, K. (1998): Monitoring in der Kommerzialisierungsphase transgener Nutzpflanzen-Ein Bericht zur internationalen Konferenz in Bern vom Januar 1998. In: Umweltbundesamt (Hrsg.) (1998): Monitoring von Umweltwirkungen gentechnisch veränderter Pflanzen (GVP). Dokumentation eines Fachgespräches des Umweltbundesamtes am 4. und 5. Juni 1998. UBA-Texte 77/98, 18-28, Berlin.
- Saeglitz, C.; Pohl, M.; Bartsch, D. (2000): Monitoring gene escape from transgenic sugar beet using cytoplasmic male sterile bait plants. *Molecular Ecology* 9, 2035-2040.
- Saure, C.; Kühne, S.; Hommel, B. (1998): Auswirkung von gentechnisch verändertem Raps auf blütenbesuchende Bienen (Apidae) und Schwebfliegen (Syrphidae). Jahresbericht der BBA 1998, Berlin und Braunschweig.
- Saure, C.; Kühne, S.; Hommel, B. (1999): Auswirkung des Anbaus gentechnisch veränderter Rapspflanzen auf blütenbesuchende Bienen (Apidae) und Schwebfliegen (Syrphidae). Jahresbericht der BBA 1999, Berlin und Braunschweig.
- Scheffler, J.A.; Parkinson, R.; Dale, P.J. (1993) Frequency and distance of pollen dispersal from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*). *Transgenic Research* 2, 356-364.
- Schmidt, K. (1997): Biometrical Exactness of studies related to the risk assessment of the release of genetically modified organisms. BIORAT GmbH. Umweltbundesamt, Ref. IV 2.5. Berlin (unveröff. Bericht).
- Schultz, E. (1999): Untersuchungen zur Depositionsgeschwindigkeit der Pollen unter atmosphärischen Bedingungen. Abstracts der 4. Fachtagung BIOMET der DMG, April 1999, München. 39-40.
- Schulz, E. (1993): Size-fractionated measurement of coarse black carbon particles in deposition samples. *Atmospheric Environment* 27A, 8, S. 1241-1249.
- Schulz, E. (1994a): Messung und Bewertung verkehrsbedingter Grobstaubemissionen. *Meteorol. Zeitschrift*, N.F. 3, S. 143-146.
- Schulz, E. (1994b): Size fractionated determination of black carbon particles in airborne dust originating from highway traffic. *The Science of the total Environment* 146/147, S. 289-296.
- Seeley, T.D. (1985): *Honeybee Ecology*. Princeton University, Press Princeton.

- Silver, H.I. (Ed.) (1970): *Aerobiology*. Proceedings of the Third International Symposium held at the University of Sussex, England, Sept. 1969. Academic Press, London.
- Silverman, B.W. (1990): *Density estimation for statistics and data analysis*. Chapman & Hill, London.
- Society for General Microbiology (1967): *Airborne microbes*. 17th Symposium held at the Imperial College, London. University Press, Cambridge.
- Stephen, R. C. (1957): A simple spore trap. *Nature, Lond.*, 179, 1360-1361.
- TA Luft (1986): Erste Allgemeine Verwaltungsvorschrift zum Bundes-Immissionsschutzgesetz (Technische Anleitung zur Reinhaltung der Luft) vom 27.2.1986: Gemeinsames Ministerialblatt, Ausgabe A, Nr. 7, 95-143. Mit Anhängen.
- TA Luft (2002): Erste Allgemeine Verwaltungsvorschrift zum Bundes-Immissionsschutzgesetz (Technische Anleitung zur Reinhaltung der Luft – TA Luft) vom 24. Juli 2002. Gemeinsames Ministerialblatt. H. 25-29, S. 511-605.
- Tao, Z.; Cai, X.F.; Yang, S.L.; Gong, Y. (2001): Detection of exogenous genes in genetically modified plants with multiplex polymerase chain reaction. *Plant-Molecular-Biology-Reporter* 2001. 19(4): 289-298.
- Tappeser, B.; Eckelkamp, C.; Weber, B. (2000): Untersuchung zu tatsächlich beobachteten (nachteiligen) Effekten von Freisetzungen gentechnisch veränderter Organismen. Öko-Institut Freiburg.
- Tauber, H. (1974): A static non-overload pollen collector. *New Phytologist* 73: 359-369
- The Royal Society (2003): The farm scale evaluations of spring-sown genetically modified crops. http://www.pubs.royalsoc.ac.uk/phil_trans_bio_content/news/fse_toc.html
- Theenhaus, A., Zeitler, R., von Brackel, W., Botsch, H.-J., Baumeister, W., Peichl, L. (2002): Langzeitmonitoring möglicher Auswirkungen gentechnisch veränderter Pflanzen auf Pflanzengesellschaften. Konzeptentwicklung am Beispiel von Raps (*Brassica napus*). UWS (online first) DOI: <http://dx.doi.org/10.1065/uwsf2002.09.044>
- Thehos, R.; Pflüger, U.; Dittmann, E.; Baltrusch, M.; Büchen, M. (1994): Vergleich von Ausbreitungsrechnungen mit der Modellkombination FITNAH/Lagrangesches Partikeldispersionsmodell und dem Verfahren nach TA Luft [Gauß-Fahnenmodell]. Hessisches Landesamt für Umwelt. Umweltplanung, Arbeits- und Umweltschutz, Heft 173.
- Thompson, C.E.; Squire, G.; Mackay, G.R.; Bradshaw, J.E.; Crawford, J.; Ramsay, G. (1999): Regional patterns of gene flow and its consequence for GM oilseed rape. In: Lutmann, P. J. W. (1999): *Gene Flow and Agriculture: Relevance for Transgenic Crops*. BCPC Symposium Proceedings No. 72, 95-100.
- Thompson, M.W.; Donnelly, J.; Grinshpun, S.A.; Juozaitis; Willeke, K. (1994): Method and testing system for evaluation of bioaerosol samplers. *J.Aerosol Sci.* (25) 8, 1579-1593.

- Timmons, A.M.; O'Brien, E.T.; Charters, Y.M.; Dubbels, S.J. and Wilkinson, M.J. (1995): Assessing the risks of wind pollination from fields of genetically modified *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *Euphytica* 85, 417-423.
- Traxler, A. (1998): Ökologische Risikoabschätzung von gentechnisch veränderten Pflanzen: Auskreuzung und Bewertung agronomisch relevanter Resistenzen. Ecological risk assessment of genetically engineered plants. Umweltbundesamt Wien. Tagungsband zum Symposium vom 19.05.98, Wien.
- Treu, R.; Emberlin, J. (2000): Pollen dispersal in the crops Maize (*Zea mays*), Oil seed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*), Potatoes (*Solanum tuberosum*), Sugar beet (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*) and Wheat (*Triticum aestivum*). Evidence from publications. A report for the Soil Association from the National Pollen Research Unit, University College Worcester, 54 pp. <http://www.soilassociation.org> [→Library → GMO] Jan. 2000.
- Tyldesley, J.B. (1978): Out-crossing in sugar-beet due to airborne pollen. *Agricultural Meteorology* 19, 463-469.
- TÜV Sachsen (1998): Keime aus Kompostanlagen – Überprüfung des Ausbreitungsverhaltens von Keimen im Vergleich zu dem von Gerüchen. Sächsisches Landesamt für Umwelt und Geologie. <http://www.umwelt.sachsen.de/de/wu/umwelt/lfug/lfug-internet/documents>.
- UBA (Umweltbundesamt) (1979): The 1st International conference of aerobiology. Munich, Federal Republic of Germany, 13-15 August, 1978, Umweltbundesamt Berlin.
- UBA (Umweltbundesamt) (1996): Langzeitmonitoring von Umwelteffekten transgener Organismen. Umweltbundesamt Berlin, UBA-Texte 58/96, 204.
- UBA (Umweltbundesamt) (1997): Kompendium der für Freisetzungen relevanten Pflanzen. hier: Brassicaceae, *Beta vulgaris*, *Linum usitatissimum*. Umweltbundesamt Berlin, UBA-Texte 38/97.
- UBA (Umweltbundesamt) (1998): Monitoring von Umweltwirkungen gentechnisch veränderter Pflanzen (GVP). Dokumentation eines Fachgespräches des Umweltbundesamtes am 4. und 5. Juni 1998. Umweltbundesamt Berlin, UBA-Texte 77/98, 116-127.
- UBA (Umweltbundesamt) (1999): Freisetzung transgener Gehölze – Stand, Probleme, Perspektiven (Tagungsband). Umweltbundesamt Berlin, UBA-Texte 99/99, Berlin.
- UBA (Umweltbundesamt) (1999): Materialien für ein Konzept zum Monitoring von Umweltwirkungen gentechnisch veränderter Pflanzen. Umweltbundesamt Berlin, UBA-Texte 52/99.
- UBA (Umweltbundesamt) (2001): Stand der Entwicklung des Monitoring von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) (Materialiensammlung). Umweltbundesamt Berlin, UBA-Texte 60/01, Berlin.

- UBA (Umweltbundesamt) (2003): Monitoring von Umweltwirkungen gentechnisch veränderter Organismen. Ergebnisse der Modellprojekte von Bund und Ländern., Fachtagung am 25.5.2003 in Berlin. (Tagungsband). Umweltbundesamt Berlin, UBA-Texte 53/03, Berlin.
- US EPA (1998) Guidelines for ecological risk assessment. EPA, Washington.
- v. d. Ohe, K.; v. d. Ohe, W. (1998): Optimized Melissopalynology by different LM-systems combined with image processing and data bank structure, Dtsch. Lebensm. Rundsch. 94, 316-321.
- v. d. Ohe, K.; v. d. Ohe, W. (2000): Celler Melissopalynologische Sammlung (CMS). Niedersächsisches Landesinstitut für Bienenkunde (Hrsg.), Celle.
- v. Klitzing, F.; Corsten, A.; Mischke, A. (1998): Umweltbeobachtungsprogramme des Bundes - Integration der Beobachtungsprogramme anderer Ressorts. Umweltbundesamt (Hrsg.) Berlin, UBA-Texte 73/98, 312.
- Vaitlingom, M.; Pijnenburg, H.; Gendre, F.; Brignon, P. (2001): Real-time quantitative PCR detection of genetically modified Maximizer maize and Roundup Ready soybean in some representative foods. American Chemical Society, published on Web.
- VDI – Richtlinie 2119 Blatt 2 (1996): Messung partikelförmiger Niederschläge. Bestimmung des Staubniederschlages mit Auffanggefäßen aus Glas (Bergerhoff-Verfahren) oder Kunststoff. Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) im VDI (Verein Deutscher Ingenieure) und DIN. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Bd. 4, VDI-Richtlinie 2119, Blatt 4, VDI, Düsseldorf, 25.
- VDI - Richtlinie 2119 Blatt 4 (1997): Messung partikelförmiger Niederschläge. Mikroskopische Unterscheidung und größenfraktionierte Bestimmung der Partikeldeposition auf Haftfolien. Probenahmegerät Sigma-2. Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) im VDI (Verein Deutscher Ingenieure) und DIN. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Bd. 4, VDI-Richtlinie 2119, Blatt 4, VDI, Düsseldorf, 25.
- Verbücheln, G. (1998): Das Biomonitoring von Nordrhein-Westfalen. In: Umweltbundesamt (Hrsg.) (1998): Monitoring von Umweltwirkungen gentechnisch veränderter Pflanzen (GVP). Dokumentation eines Fachgespräches des Umweltbundesamtes am 4. und 5. Juni 1998. UBA-Texte 77/98, 63-73, Berlin.
- von Klitzing, F.; Corsten A.; Mischke A. (1998): Umweltbeobachtungsprogramme des Bundes - Integration der Beobachtungsprogramme anderer Ressorts -. UBA-Texte 73/98), Berlin.
- Vorwohl, G. (1990): Fortschritte, Probleme und zukünftige Aufgaben der Melissopalynologie, Apidologie 21, 383-389.
- Waiblinger, H. U.; Wurz, A.; Freyer, R.; Pietsch, K. (1999): Spezifischer Nachweis von gentechnisch verändertem Raps in Honig. Deutsche Lebensmittel-Rundschau 95, Heft 2, 44-48.

- Weiss, G.; von Haeseler, A. (1997): A coalescent approach to the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*, vol. 25, no 15, 3082-3087.
- Winkler, D.; Schauz, M. (1998): Nachweismöglichkeiten gentechnischer Veränderungen in Lebensmitteln. In: Umweltbundesamt (Hrsg.) (1998): *Monitoring von Umweltwirkungen gentechnisch veränderter Pflanzen (GVP)*. Dokumentation eines Fachgespräches des Umweltbundesamtes am 4. und 5. Juni 1998. UBA-Texte 77/98, 112-115, Berlin.
- Winston, M.L. (1987): *The Biologie of the Honeybee*. Harward University, Cambridge Press.
- Zander, R. (1993): *Handwörterbuch der Pflanzennamen*. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Zander, E.; Weiss K. (1964): *Das Leben der Biene*. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Zeitler, R.; Baumeister, W. (1999): Nachweis gentechnischer Veränderungen in Pflanzen und ihre Identifizierungsmöglichkeiten. *Tätigkeitsbericht 3/99 des LfU Bayern*, 1-4.
- Zenger, A.; Beerhalter, J. (2003): Immissionsprognosen mit AUSTAL86 und AUSTAL2000. Vergleich der Ergebnisse und Sensitivität der Eingangparameter. *Immissionsschutz 4/03*. (in Druck)
- Zimmermann, R.-D.; Zimmermann-Umlauff, R. (1994): Von der Bioindikation zum Wirkungskataster. *UWSF – Z.Umweltchem.Ökotox 6 /1*), 50-54.
- Zoglauer, K.; Aurich, C.; Kowarik, I.; Schepker, H. (2000): Freisetzung transgener Gehölze und Grundlagen für Confinements. UBA-Texte 31/00. Berlin.
- Züghart, W.; Breckling, B. (2003): Konzeptionelle Entwicklung eines Langzeitmonitoring von Umweltwirkungen transgener Kulturpflanzen. UBA-Texte 50/03, Umweltbundesamt, Berlin.

ANHANG

- A1 Standortmerkmale**
- A2 Pollenanzahldeposition Sigma-2**
- A3 Pollenanzahlen der PMF-Proben und Pollenfluss**
- A4 Quantitative Pollenbestimmung in Bienenhonig und –brot**
- A5 Pollenartenspektrum in den PMF-Proben**
- A6 Pollenartenspektrum in den Honigproben**
- A7 Pollenartenspektrum in den Bienenbrotproben**

A1: Standortmerkmale

Standort	Pollen-sammler	Unter-suchungs-raum	GVO	Aufsteller Bienen-stand	Anzahl Bienen-völker	Standort und nähere Umgebung
1	B T	Sickte	HR-Raps	SI	7	Hausgarten, Siedlung
2	T	Sickte	HR-Raps			Ruderalfläche, kl. Wall, Schuttfläche
3	B T	Sickte	HR-Raps	SI	k.A.	Obstgarten, Gemengelage
4	B T	Sickte	HR-Raps	SI	8	Garten, Siedlung, Wald
5	B T	Sickte	HR-Raps	SI	5	Garten, Siedlung, Landwirtschaft
6	B T	Sickte	HR-Raps	SI	5	Waldrand, Landwirtschaft
7	B T	Sickte	HR-Raps	SI	7	Obstplantage, Siedlung, Landwirtschaft
8	B T	Sickte	HR-Raps	SI	4	Wald, Landwirtschaft
9	T	Sickte	HR-Raps			Ruderalfläche, kl. Wall, Schuttfläche
10	B T	Sickte	HR-Raps	SI	4	Hausgarten, Siedlung
11	T	Sickte	HR-Raps			Raps-Versuchsfeld, Landwirtschaft
12	T	Sickte	HR-Raps			Raps-Versuchsfeld, Landwirtschaft
13	B T	Sickte	HR-Raps	LfB	1	Raps-Versuchsfeld, Landwirtschaft, Volk 42
14	B T	Sickte	HR-Raps	LfB	1	Raps-Versuchsfeld, Landwirtschaft, Volk 53
14	T	Sickte	HR-Raps			Raps-Versuchsfeld, Landwirtschaft
15	T	Sickte	HR-Raps			Raps-Versuchsfeld, Landwirtschaft
16	T	Sickte	HR-Raps			Raps-Versuchsfeld, Landwirtschaft
17	T	Sickte	HR-Raps			Raps-Versuchsfeld, Landwirtschaft
18	T	Sickte	HR-Raps			Raps-Versuchsfeld, Landwirtschaft
19	T	Sickte	HR-Raps			Ruderalfläche, kl. Wall, Schuttfläche
20	B T	Sickte	HR-Raps	WI	5	Obstplantage, Feldgehölz, Landwirtschaft
21a	B T	Sickte	HR-Raps	SI	k. A.	Hausgarten, Siedlung, Wald
22	B T	Sickte	HR-Raps	LfB	1	Freifläche, Landwirtschaft, Siedlung
23	B T	Sickte	HR-Raps	LfB	1	Grünland, Landwirtschaft, Übungsgelände
24	B T	Sickte	HR-Raps	WI	1	Feldgehölz, Landwirtschaft
25	B T	Sickte	HR-Raps	LfB	1	Freifläche, Friedhof, Landwirtschaft
26	B T	Sickte	HR-Raps	SI	4	Hausgarten, Siedlung, Landwirtschaft
27	B T	Sickte	HR-Raps	LfB	1	Feldgehölz, Landwirtschaft
28	B T	Sickte	HR-Raps	LfB	1	Landwirtschaft, Wald
29	B T	Sickte	HR-Raps	LfB	1	Feldgehölz, Landwirtschaft
30	B T	Sickte	HR-Raps	LfB	1	Landwirtschaft, Feldgehölz, Übungsplatz
31	B T	Sickte	HR-Raps	LfB	1	Landwirtschaft, Feldgehölz
32	B T	Sickte	HR-Raps	LfB	1	Landwirtschaft, freistehend
33	T	Sickte	HR-Raps			Raps-Versuchsfeld, Landwirtschaft
34	T	Sickte	HR-Raps			Raps-Versuchsfeld, Landwirtschaft
35	T	Sickte	HR-Raps			Raps-Versuchsfeld, Landwirtschaft
36	T	Sickte	HR-Raps			Raps-Versuchsfeld, Landwirtschaft
37	T	Sickte	HR-Raps			Raps-Versuchsfeld, Landwirtschaft
38	T	Nört.-Hard.	Referenz			Siedlung, Landwirtschaft, Wald
39	T	Bremen	Referenz			Blank
40	B T	Kelheim	Referenz	SI	20	Wiesen, Grünland
41	B T	Kelheim	Referenz	SI	3	Wald, Grünland, Acker
42	B T	Kelheim	Referenz	SI/WI	70	Acker, Grünland, Obstbau
43	B T	Kelheim	Referenz	SI	9	Landwirtschaft, Wald
44	T	Kelheim	Referenz			Landwirtschaft, Grünland, Wald, Obstbau
45	B T	Kelheim	Referenz	SI	22	Wald, Obstbau, Garten
46	B T	Kelheim	Referenz	SI	10	Landwirtschaft, Grünland, Wald, Obstbau
47	B T	Kelheim	Referenz	SI	24	Siedlung, Landwirtschaft, Wald
48	B T	Bay. Wald	Referenz	SI	4	Wald, Siedlung, Grünland, Bergland
49	T	Bremen	Referenz			Siedlung, Dach
50	T	Bremen	Referenz			Siedlung, Dach
58	T	Freiburg	Referenz			Siedlung, Dach
59	T	Freiburg	Referenz			Siedlung, Dach
60	T	Aachen	VR-Rübe/ BT-Mais	SI	1	Versuchsfeld, Grünland, Feldgehölze, Universität/Klinik

A1: Standortmerkmale

Standort	Pollensammler	Untersuchungsraum	GVO	Aufsteller Bienenstand	Anzahl Bienenvölker	Standort und nähere Umgebung
61	T	Aachen	VR-Rübe/ BT-Mais	SI	1	Versuchsfeld, Grünland, Feldgehölze, Universität/Klinik
62	B T	Aachen	VR-Rübe/ BT-Mais	SI	1	Versuchsfeld, Grünland, Feldgehölze, Universität/Klinik
63	T	Aachen	VR-Rübe/ BT-Mais			Versuchsfeld, Grünland, Feldgehölze, Universität/Klinik
64	B T	Aachen	VR-Rübe/ BT-Mais	SI	1	Versuchsfeld, Grünland, Feldgehölze, Universität/Klinik
65	T	Aachen	VR-Rübe/ BT-Mais		1	Versuchsfeld, Grünland, Feldgehölze, Universität/Klinik
66	B T	Aachen	VR-Rübe/ BT-Mais	SI	1	Grünland, Landwirtschaft, Siedlung, Gemengelage, Universität/Klinik
67	B T	Aachen	VR-Rübe/ BT-Mais	SI	1	Grünland, Wald, Landwirtschaft, Gemengelage, Universität/Klinik
68	B T	Aachen	VR-Rübe/ BT-Mais	SI	1	Grünland, NSG (Feuchtlf), Universität/Klinik, Landwirtschaft
70	B T	Sickte	HR-Mais	SI	7	s. 1
71	B T	Sickte	HR-Mais	LfB	1	s. 29
72	B T	Sickte	HR-Mais	LfB	1	Mais-Versuchsfeld, Landwirtschaft, Übungsgelände
73	T	Sickte	HR-Mais			Mais-Versuchsfeld, Landwirtschaft, Übungsgelände
74	B T	Sickte	HR-Mais	LfB	1	Mais-Versuchsfeld, Landwirtschaft, Übungsgelände
75	T	Sickte	HR-Mais			Mais-Versuchsfeld, Landwirtschaft, Übungsgelände
76	B T	Sickte	HR-Mais	LfB	1	s. 22
77	B T	Sickte	HR-Mais	LfB	1	s. 23
78	B T	Sickte	HR-Mais	LfB	1	Landwirtschaft, Siedlung
79	B T	Sickte	HR-Mais	LfB	1	s. 25
80	T	Sickte	HR-Mais			s. 33
81	B T	Sickte	HR-Mais	LfB	1	Landwirtschaft, Weihnachtsbaumkultur, Siedlung, Wald
82	B T	Sickte	HR-Mais	WI	5	s. 20
83	T	Sickte	HR-Mais			s. 31
90/1	B T	Schwarzenau	BT-Mais	BLB	1	Landwirtschaft, Mainaue, Pappelanlagen
90/2	B T	Schwarzenau	BT-Mais	BLB	1	Landwirtschaft, Mainaue, Pappelanlagen, Parallelpr.
91	T	Schwarzenau	BT-Mais			Landwirtschaft, Obstplantage, Wald
92/1	B T	Schwarzenau	BT-Mais	BLB	1	Landwirtschaft, Mainaue, Pappelanlagen
92/2	B T	Schwarzenau	BT-Mais	BLB	1	Landwirtschaft, Mainaue, Pappelanlagen, Parallelpr.
93	T	Schwarzenau	BT-Mais			Landwirtschaft, Obstplantage, Wald
94	B T	Schwarzenau	BT-Mais	BLB	1	Landwirtschaft, Obstplantage, Wald
95	B T	Schwarzenau	BT-Mais	BLB	1	Landwirtschaft, Grünland
96	B T	Schwarzenau	BT-Mais	BLB	1	Landwirtschaft, Grünland, Mainaue
97	B T	Schwarzenau	BT-Mais	BLB	1	Siedlung, Landwirtschaft

Sammler: T Technischer Sammler Sigma-2/PMF
 B Biologische Sammlerin Honigbiene

Aufsteller Bienenstand:

SI Standortimker
 LfB Landesinstitut für Bienenkunde Celle
 WI Wanderimker
 BLB Bayer. Landesanstalt für Bienenzucht/Bienenprüfhof Schwarzenau

A2: Pollenzahldeposition Sigma-2

Frühlings-/Rapsperiode							
Probe	Zählfläche	Pollenzahldeposition Sigma-2 Haftfolie (4.225 mm ²)			Vertikale Pollenzahldeposition Sigma-2 pro m ²		
		Brassica	Koniferen	Gesamt	Brassica	Koniferen	Gesamt
Nr	mm ²	n Pollen/ Haftfolie	n Pollen/ Haftfolie	n Pollen/ Haftfolie	n Pollen / m ²	n Pollen / m ²	n Pollen / m ²
1	110	310	15.500	44.500	7.300	366.400	1.053.600
2	110	1.200	16.100	41.000	27.300	381.800	970.000
3	110	380	22.000	45.900	9.100	520.900	1.086.400
4	120	210	21.300	48.900	5.000	505.000	1.156.700
5	120	70	22.600	42.100	1.700	535.800	995.800
6	120	320	17.400	35.800	7.500	412.500	847.500
7	120	180	18.100	38.900	4.200	428.300	920.000
8	120	140	17.000	55.200	3.300	401.700	1.307.500
9	110	350	16.800	38.200	8.200	397.300	903.600
10	120	350	21.100	39.500	8.300	500.000	934.200
11	110	2.800	19.200	41.500	67.300	454.500	982.700
12	110	3.000	16.700	37.800	70.900	395.500	893.600
13	110	1.100	18.100	39.200	26.400	428.200	927.300
14	120	2.500	18.600	38.700	60.000	439.200	915.800
15	110	1.800	18.100	40.100	42.700	427.300	950.000
16	120	1.600	19.000	40.100	37.500	450.000	949.200
17	110	2.400	29.900	56.300	57.300	708.200	1.331.800
18	120	1.900	20.100	42.700	44.200	475.800	1.010.000
19	110	1.100	18.600	44.800	25.500	440.900	1.060.000
20	120	3.600	18.700	49.100	85.000	441.700	1.162.500
21	120	140	10.400	38.000	3.300	245.000	898.300
22	120	600	20.300	46.100	14.200	480.800	1.090.000
23	120	350	16.300	35.500	8.300	386.700	840.000
24	120	110	15.300	34.900	2.500	361.700	825.800
25	120	140	20.900	53.700	3.300	495.800	1.270.800
26	120	390	40.500	64.400	9.200	958.300	1.524.200
27	120	180	18.400	43.300	4.200	435.800	1.024.200
28	120	280	22.200	53.900	6.700	525.800	1.275.000
29	120	920	22.300	57.600	21.700	526.700	1.364.200
30	110	770	11.100	34.800	18.200	261.800	823.600
31	110	610	19.900	43.600	14.500	470.900	1.031.800
32	110	4.300	18.700	55.200	102.700	441.800	1.307.300
33	110	150	17.100	38.600	3.600	403.600	913.600
34	110	350	22.200	44.300	8.200	525.500	1.049.100
35	110	580	20.300	40.400	13.600	480.000	956.400
36	110	310	17.200	36.800	7.300	406.400	871.800
37	110	920	19.000	47.700	21.800	449.100	1.128.200
38	120	420	8.600	23.200	10.000	204.200	550.000
40	120	1.400	48.600	93.600	33.300	1.149.200	2.215.800
41	120	110	71.900	113.900	2.500	1.702.500	2.696.700
42	120	2.100	24.800	82.500	49.200	587.500	1.951.700
43	120	280	49.200	83.600	6.700	1.164.200	1.979.200
44	120	20	40.100	74.700	560	948.300	1.767.500
45	120	110	28.000	66.500	2.500	663.300	1.575.000
46	120	740	37.400	96.600	17.500	884.200	2.287.500
47	120	2.000	34.800	67.900	47.500	823.300	1.606.700
48	120	70	22.400	68.600	1.700	530.000	1.623.300
49	120	110	15.700	63.300	2.500	370.800	1.499.200

A3: Pollenanzahlen der PMF-Proben und Pollenfluss

Probe	Zähl- aus- schnitt	Pollenanzahlmenge in Probe				Horizontaler Pollenfluss			
		Brassica-Pollen	Zea- Pollen	Beta- Pollen	Gesamt-Pollen	Brassica-Pollen	Zea-Pollen	Beta-Pollen	Gesamt-Pollen
Nr	%	n Pollen/Probe	n Pollen/Probe	n Pollen/Probe	n Pollen/Probe	n Pollen / m ²			
Frühlings-/Rapsperiode									
1	0,91	880	-	-	109.900	109.900	-	-	13.736.300
2	0,91	41.200	-	-	443.100	5.151.100	-	-	55.388.200
3	0,91	6.000	-	-	503.700	755.500	-	-	62.957.900
4	0,91	1.300	-	-	65.900	164.800	-	-	8.241.800
5	0,91	3.700	-	-	747.300	467.000	-	-	93.406.600
6	0,91	12.600	-	-	702.100	1.579.700	-	-	87.759.500
7	0,91	550	-	-	109.900	68.700	-	-	13.736.300
8	0,91	4.000	-	-	1.318.700	494.500	-	-	164.835.200
9	0,91	102.200	-	-	1.098.900	12.774.700	-	-	137.362.600
10	0,91	2.000	-	-	219.800	247.300	-	-	27.472.500
11	0,91	575.800	-	-	2.117.000	71.978.000	-	-	264.625.100
12	0,91	265.400	-	-	1.078.800	33.173.100	-	-	134.849.900
13	0,91	102.700	-	-	600.900	12.843.400	-	-	75.107.600
14	0,91	165.900	-	-	887.300	20.741.800	-	-	110.918.500
15	0,91	46.700	-	-	346.000	5.837.900	-	-	43.243.800
16	0,91	142.300	-	-	906.400	17.788.500	-	-	113.302.300
17	0,91	67.000	-	-	558.600	8.379.100	-	-	69.826.000
18	0,91	81.300	-	-	1.161.700	10.164.800	-	-	145.211.900
19	0,91	46.700	-	-	631.100	5.837.900	-	-	78.890.700
20	0,91	6.200	-	-	77.900	769.200	-	-	9.737.100
21	0,91	1.500	-	-	170.900	192.300	-	-	21.367.500
22	0,91	15.400	-	-	427.400	1.923.100	-	-	53.418.800
23	0,91	5.200	-	-	1.033.000	645.600	-	-	129.120.900
24	0,91	1.800	-	-	195.400	219.800	-	-	24.420.000
25	0,91	2.400	-	-	268.600	302.200	-	-	33.577.500
26	0,91	1.100	-	-	157.000	137.400	-	-	19.623.200
27	0,91	4.300	-	-	476.200	535.700	-	-	59.523.800
28	0,91	5.700	-	-	238.100	714.300	-	-	29.761.900
29	0,91	11.500	-	-	576.900	1.442.300	-	-	72.115.400
30	0,91	28.000	-	-	667.200	3.502.700	-	-	83.398.700
31	0,91	5.200	-	-	737.800	645.600	-	-	92.229.200
32	0,91	191.200	-	-	861.300	23.901.100	-	-	107.662.600
33	0,91	1.400	-	-	238.100	178.600	-	-	29.761.900
34	0,91	4.300	-	-	857.100	535.700	-	-	107.142.900
35	0,91	57.100	-	-	2.040.800	7.142.900	-	-	255.102.000
36	0,91	52.700	-	-	976.800	6.593.400	-	-	122.100.100
37	0,91	161.000	-	-	1.257.700	20.123.600	-	-	157.215.800
38	0,91	1.200	-	-	134.300	151.100	-	-	16.788.800
40	0,91	46.700	-	-	934.100	5.837.900	-	-	116.758.200
41	0,91	70	-	-	1.648.400	9.200	-	-	206.044.000
42	0,91	8.400	-	-	2.087.900	1.044.000	-	-	260.989.000
43	0,91	8.200	-	-	2.060.400	1.030.200	-	-	257.554.900
44	0,91	70	-	-	1.153.800	9.200	-	-	144.230.800
45	0,91	2.300	-	-	769.200	288.500	-	-	96.153.800
46	0,91	4.900	-	-	494.500	618.100	-	-	61.813.200
47	0,91	25.300	-	-	337.000	3.159.300	-	-	42.124.500
48	0,91	220	-	-	109.900	27.500	-	-	13.736.300
49	0,91	660	-	-	94.200	82.400	-	-	11.773.900
50	0,91	550	-	-	137.400	68.700	-	-	17.170.300
51	0,91	70	-	-	660	9.200	-	-	82.400
52	0,91	7.800	-	-	776.100	978.500	-	-	97.015.700
53	0,91	6.300	-	-	779.200	789.100	-	-	97.405.800

A3: Pollenanzahlen der PMF-Proben und Pollenfluss

Probe	Zähl-aus-schnitt	Pollenanzahlmenge in Probe				Horizontaler Pollenfluss			
		Brassica-Pollen	Zea- Pollen	Beta- Pollen	Gesamt-Pollen	Brassica-Pollen	Zea-Pollen	Beta-Pollen	Gesamt-Pollen
Nr	%	n Pollen/Probe	n Pollen/Probe	n Pollen/Probe	n Pollen/Probe	n Pollen / m ²			
Sommerperiode									
58	1,8%	-	380	-	12.800	-	48.100	-	1.602.600
59	1,8%	-	270	-	5.500	-	34.300	-	686.800
60	1,8%	-	1.900	164.000	504.600	-	240.400	20.501.400	63.081.100
61	1,8%	-	3.700	326.100	433.100	-	460.200	40.762.400	54.137.000
62	1,8%	-	3.200	155.800	450.200	-	398.400	19.471.200	56.275.000
63	1,8%	-	6.800	73.600	639.400	-	851.600	9.203.300	79.926.200
64	1,8%	-	600	<20	302.200	-	75.500	<2.500	37.774.700
65	1,8%	-	1.000	1.600	33.000	-	130.500	206.000	4.120.900
66	1,8%	-	660	660	22.000	-	82.400	82.400	2.747.300
67	1,8%	-	550	30	18.300	-	68.700	3.400	2.289.400
68	1,8%	-	1.600	<20	824.200	-	206.000	<2.500	103.022.000
70	1,8%	-	50	-	4.600	-	6.900	-	572.300
71	1,8%	-	770	-	45.200	-	96.200	-	5.656.100
72	1,8%	-	25.000	-	69.400	-	3.125.000	-	8.680.600
73	1,8%	-	9.400	-	46.500	-	1.174.500	-	5.814.100
74	1,8%	-	2.900	-	34.700	-	364.000	-	4.333.500
75	1,8%	-	2.600	-	50.600	-	322.800	-	6.329.500
76	1,8%	-	1.300	-	48.600	-	158.000	-	6.075.700
77	1,8%	-	380	-	24.000	-	48.100	-	3.004.800
78	1,8%	-	1.700	-	24.000	-	212.900	-	2.998.800
79	1,8%	-	270	-	91.600	-	34.300	-	11.446.900
80	1,8%	-	820	-	63.400	-	103.000	-	7.924.800
81	1,8%	-	220	-	31.400	-	27.500	-	3.924.600
82	1,8%	-	820	-	68.700	-	103.000	-	8.585.200
83	1,8%	-	2.000	-	47.100	-	247.300	-	5.887.000
90	1,8%	-	1.900	-	160.300	-	240.400	-	20.032.100
91	1,8%	-	1.400	-	158.700	-	178.600	-	19.841.300
92	1,8%	-	1.500	-	45.200	-	192.300	-	5.656.100
93	1,8%	-	1.300	-	37.200	-	158.000	-	4.646.100
94	1,8%	-	110	-	18.300	-	13.700	-	2.289.400
95	1,8%	-	160	-	82.400	-	20.600	-	10.302.200
96	1,8%	-	160	-	11.800	-	20.600	-	1.471.700
97	1,8%	-	710	-	102.000	-	89.300	-	12.755.100

A4: Quantitative Pollenbestimmung in Bienenhonig und -brot

Frühlings- honige	Brassica - pollen	Brassica - Anteil	Gesamt - pollen	Sommer- honige	Zea - pollen	Beta - Pollen	Gesamt- pollen	Bienen - brot	Bienen- brot- menge	Zea - pollen	Beta - Pollen	Gesamt- pollen
	Pollen / g Honig	% (n=500)	Pollen / g Honig		Pollen / 10 g Honig	Pollen / 10 g Honig	Pollen / g Honig		g Bienenbrot	Pollen / 0,01 g	Pollen / 0,01 g	Pollen / 0,01 g
B 1	4.875	91,0	5.357	B 62	2	<0,2%	20.000	B 62	9,2	<0,2%	<0,2%	112.500
B 3	7.770	81,2	9.569	B 64	3	<0,2%	15.000	B 64	9,9	<0,2%	<0,2%	135.000
B 4	4.450	80,6	5.521	B 66	<0,2%	<0,2%	48.000	B 66	15,8	<0,2%	<0,2%	180.000
B 5	2.385	84,6	2.819	B 67	2	<0,2%	20.000	B 67	5,9	<0,2%	<0,2%	180.000
B 6	2.890	95,0	3.042	B 68	1	<0,2%	10.000	B 68	8,2	<0,2%	<0,2%	225.000
B 7	8.850	94,0	9.415	B 70	<0,2%	<0,2%	27.000	B 70	34,8	<0,2%		225.000
B 8	885	80,6	1.098	B 71	3	<0,2%	30.000	B 90/1	26,7	601		315.000
B 10	3.065	42,2	7.263	B 72	238	<0,2%	23.800	B 90/2	12,9	825		360.000
B 13	5.505	91,4	6.023	B 74	3	<0,2%	100.000	B 92/1	9,8	230		135.000
B 14	3.285	84,8	3.874	B 76	<0,2%	<0,2%	54.000	B 92/2	13,2	5.425		135.000
B 20	3.930	94,0	4.181	B 77	<0,2%	<0,2%	54.000	B 94	4,6	1		135.000
B 21 a	2.340	50,0	4.680	B 78	<0,2%	<0,2%	19.800	B 95	12,9	2.750		112.500
B 22	2.135	87,6	2.437	B 81	<0,2%	<0,2%	15.300	B 96	13,9	618		90.000
B 23	4.180	95,4	4.382	B 90/1	148	<0,2%	14.800	B 97	38,6	73		225.000
B 24	5.160	95,3	5.414	B 90/2	15	<0,2%	15.000					
B 25	2.450	68,2	3.592	B 92/1	10	<0,2%	3.333					
B 26	2.550	18,7	13.636	B 92/2	47	<0,2%	23.500					
B 27	3.355	84,8	3.956	B 94	50	<0,2%	25.000					
B 28	3.095	87,8	3.525	B 95	59	<0,2%	11.800					
B 29	2.290	91,0	2.516	B 96	1.968	<0,2%	19.294					
B 30	6.440	93,2	6.910	B 97	<0,2%	<0,2%	4.500					
B 31	2.415	87,4	2.763									
B 32	3.005	69,0	4.355									
B 40	3.270	91,2	3.586									
B 41	1.015	67,4	1.506									
B 42	8.080	90,2	8.958									
B 43	5.840	90,4	6.460									
B 45	11.230	91,0	12.341									
B 46	1.955	79,2	2.468									
B 47	4.985	57,6	8.655									
B 48	<0,2%	<0,2	26.000									

A5: Pollenartenspektrum in den PMF-Proben

Nr	Pollenart/Gattung in PMF-Proben	Frühling (Rapsperiode)		Sommerperiode		Gesamt		Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26			
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%																														
49	Erica-T. (Eric.)	2	4%	0	0%	2	2%					1	1																								
50	Erodium / Reiherschnabel / heron's bill (Ger.)	0	0%	0	0%	0	0%																														
51	Eupatorium-T. / Wasserdost-T. / hemp agrimony-T. (Ast.)	4	8%	3	9%	7	8%			1	1																										1
52	Fagopyrum esculentum / Buchweizen / buckwheat (Polyg.)	0	0%	0	0%	0	0%																														
53	Fagus* / Buche / beech (Fag.)	43	84%	2	6%	45	54%		1	1	1	1	1			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
54	Filipendula* / Mädesüß / dropwort (Ros.)	0	0%	1	3%	1	1%																														
55	Fragaria / Erdbeere / strawberry (Ros.)	0	0%	0	0%	0	0%																														
56	Frangula / Faulbaum / buckthorn (Rham.)	1	2%	2	6%	3	4%																														
57	Fraxinus excelsior* / Esche / ash (Oleac.)	35	69%	0	0%	35	42%		1	1	1	1	1	1		1	1		1	1	1		1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
58	Galium / Labkraut / bedstraw (Rub.)	0	0%	0	0%	0	0%																														
59	Genista-T. / Ginster-T. / broom-T. (Fab.)	0	0%	0	0%	0	0%																														
60	Geranium / Storchschnabel / cranesbill (Ger.)	0	0%	1	3%	1	1%																														
61	Gleditsia / Gleditschie / honey locust (Fab.)	0	0%	0	0%	0	0%																														
62	Helianthemum* / Sonnenröschen / sun rose (Cist.)	0	0%	0	0%	0	0%																														
63	Helianthus annuus / Sonnenblume / sunflower (Ast.)	0	0%	6	18%	6	7%																														
64	Helianthus-T. / Sonnenblumen-T. / sunflower-T. (Ast.)	0	0%	2	6%	2	2%																														
65	Heracleum / Bärenklau / hogweed (Apiac.)	0	0%	14	42%	14	17%																														
66	Heracleum mantegazzianum / Riesenbärenklau / giant hogweed (Apiac.)	1	2%	1	3%	2	2%																														
67	Hypericum* / Johanniskraut / St. John's Wort (Gutt.)	0	0%	0	0%	0	0%																														
68	Ilex aquifolium / Stechpalme / common holly (Aquif.)	0	0%	0	0%	0	0%																														
69	Impatiens / Springkraut / balsam (Bal.)	0	0%	1	3%	1	1%																														
70	Juglandaceae* / Walnussgewächse / Walnut Family	42	82%	1	3%	43	51%		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
71	Juncaceae* / Binsengewächse / Rush Family	0	0%	0	0%	0	0%																														
72	Lavandula / Lavendel / lavender (Lam.)	0	0%	0	0%	0	0%																														
73	Ligustrum / Rainweide / privet (Oleac.)	2	4%	7	21%	9	11%																														
74	Liliaceae / Liliengewächse / Lily Family	1	2%	1	3%	2	2%								1																						
75	Liriodendron / Tilpenbaum / tulip tree (Mag.)	0	0%	0	0%	0	0%																														
76	Lonicera / Heckenkirsche / honeysuckle (Capr.)	0	0%	2	6%	2	2%																														
77	Lotus / Hornklee / bird's foot trefoil (Fab.)	0	0%	0	0%	0	0%																														
78	Lotus uliginosus / Sumpf-Hornklee / greater bird's foot trefoil (Fab.)	0	0%	0	0%	0	0%																														
79	Lychnis / Lichtnelke / pink-T. (Car.)	0	0%	0	0%	0	0%																														
80	Lythraceae / Weiderichgewächse / Loosestrife Family	0	0%	1	3%	1	1%																														
81	Malvaceae / Malvengewächse / Mallow Family	0	0%	2	6%	2	2%																														
82	Melilotus / Steinklee / melilot (Fab.)	0	0%	0	0%	0	0%																														
83	Moraceae* / Maulbeergewächse / Mulberry Family	3	6%	1	3%	4	5%																														
84	Morus* / Maulbeere / mulberry (Mor.)	0	0%	7	21%	7	8%																														
85	Myosotis / Vergissmeinnicht / forget-me-not (Bor.)	0	0%	0	0%	0	0%																														
86	Nymphaea* / Seerose / water lily (Nym.)	0	0%	1	3%	1	1%																														
87	Oenothera / Nachtkerze / evening primrose (Onagr.)	0	0%	0	0%	0	0%																														
88	Onagraceae / Nachtkerzengewächse / Evening Primrose Family	0	0%	0	0%	0	0%																														
89	Ononis / Hauhechel / restharrow (Fab.)	0	0%	0	0%	0	0%																														
90	Origanum-T. / Majoran-T. / marjoram-T. (Lam.)	0	0%	1	3%	1	1%																														
91	Pachysandra terminalis / Ysander / Spurge (Bux.)	0	0%	0	0%	0	0%																														
92	Papaver-T.* / Mohn / poppy (Pap.)	0	0%	0	0%	0	0%																														
93	Parthenocissus / Wilder Wein / woodbine (Vit.)	0	0%	3	9%	3	4%																														
94	Pastinaca sativa / Pastinak / parsnip (Apiac.)	0	0%	3	9%	3	4%																														
95	Persicaria maculosa / Flohknöterich (Polyg.)	0	0%	4	12%	4	5%																														
96	Phacelia tanacetifolia / BÜschelschön / fiddle neck (Hyd.)	1	2%	1	3%	2	2%					1																									
97	Picea* / Fichte / spruce (Pin.)	50	98%	24	73%	75	89%		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

A5: Pollenartenspektrum in den PMF-Proben

Nr	Pollenart/Gattung in PMF-Proben	Frühling (Rapsperiode)		Sommerperiode		Gesamt		Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26		
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%																													
98	Pinus* / Kiefer / pine (Pin.)	51	100%	32	97%	84	100%		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
99	Pisum-T. / Erbsen-T. / pea-T. (Fab.)	0	0%	0	0%	0	0%																													
100	Plantaginaceae* / Wegerichgewächse / Plantain Family	7	14%	18	55%	25	30%								1																					
101	Poaceae* / Süßgräser / Grass Family	28	55%	32	97%	60	71%	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					1	1								
102	Populus* / Pappel / poplar (Sal.)	2	4%	1	3%	3	4%														1		1													
103	Potentilla* / Fingerkraut / cinquefoil (Ros.)	0	0%	0	0%	0	0%																													
104	Prunus-T. / Steinobst-T. / stone fruits (Ros.)	19	37%	0	0%	19	23%	1			1	1	1			1			1								1						1	1	1	
105	Pyrus-T. / Kernobst-T. / pomaceous fruits (Ros.)	0	0%	1	3%	1	1%																													
106	Quercus* / Eiche / oak (Fag.)	49	96%	9	27%	59	70%	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
107	Ranunculaceae* / Hahnenfußgewächse / Buttercup Family	4	8%	1	3%	5	6%																													
108	Ranunculus-T.* / Hahnenfuß-T. / buttercup-T. (Ran.)	0	0%	0	0%	0	0%																													
109	Rhamnaceae / Kreuzdorngewächse / Buckthorn Family	0	0%	0	0%	0	0%																													
110	Rhus typhina / Essigbaum / sumac (Anac.)	0	0%	0	0%	0	0%																													
111	Robinia pseudoacacia / Scheinakazie / locust (Fab.)	0	0%	0	0%	0	0%																													
112	Rosaceae / Rosengewächse / Rose Family	0	0%	0	0%	0	0%																													
113	Rubus / Himbeere, Brombeere / raspberry (Ros.)	0	0%	0	0%	0	0%																													
114	Rumex* / Ampfer / sorrel (Polyg.)	6	12%	4	12%	10	12%																													
115	Ruta graveolens / Weinraute / rue (Rut.)	0	0%	0	0%	0	0%																													
116	Salix / Weide / willow (Sal.)	41	80%	8	24%	49	58%	1	1	1	1	1	1	1					1		1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
117	Sambucus* / Holunder / elder (Capr.)	1	2%	0	0%	1	1%													1																
118	Sanguisorba minor* / Kleiner Wiesenknopf / small burnet (Ros.)	0	0%	0	0%	0	0%																													
119	Sedum-T. / Fetthennen-T. / stonecrop (Crass.)	0	0%	0	0%	0	0%																													
120	Senecio / Greiskraut / groundsel (Ast.)	0	0%	1	3%	1	1%																													
121	Serratula-T. / Scharten-T. / saw wort-T. (Ast.)	0	0%	23	70%	23	27%																													
122	Sinapis-T. / Senf-T. / mustard-T. (Brass.)	1	2%	9	27%	10	12%																													
123	Solanum-T. / Nachtschatten-T. / nightshade-T. (Sol.)	0	0%	0	0%	0	0%																													
124	Sorbus-T. / Ebereschen-T. / mountain ash (Ros.)	0	0%	0	0%	0	0%																													
125	Symphoricarpos / Schneebeere / snowberry (Capr.)	1	2%	0	0%	1	1%																													
126	Symphytum / Beinwell / comfrey (Bor.)	0	0%	0	0%	0	0%																													
127	Taraxacum-T. / Löwenzahn-T. / dandelion-T. (Ast.)	18	35%	11	33%	29	35%					1	1					1	1	1				1				1	1		1				1	
128	Taxaceae* / Eibengewächse / Yew Family	8	16%	3	9%	11	13%	1														1		1												
129	Tilia / Linde / lime (Til.)	2	4%	22	67%	24	29%			1																										
130	Trifolium incarnatum / Inkernatklees / crimson clover (Fab.)	0	0%	0	0%	0	0%																													
131	Trifolium pratense / Rotklee / red clover (Fab.)	0	0%	4	12%	4	5%																													
132	Trifolium repens / Weißklee / white clover (Fab.)	0	0%	5	15%	5	6%																													
133	Trifolium-T. / Klee-T. / clover-T. (Fab.)	0	0%	0	0%	0	0%																													
134	Tussilago / Huflattich / coltsfoot (Ast.)	2	4%	0	0%	2	2%																													
135	Typhaceae* / Rohrkolbengewächse / Cattail Family	0	0%	6	18%	6	7%																													
136	Ulmaceae* / Ulmengewächse / Elm Family	0	0%	0	0%	0	0%																													
137	Urticaceae* / Nesselgewächse / Nettle Family	0	0%	0	0%	0	0%																													
138	Vaccinium-T. / Heidelbeer-T. / blueberry-T. (Eric.)	0	0%	0	0%	0	0%																													
139	Veronica / Ehrenpreis / speedwell (Capr.)	0	0%	0	0%	0	0%																													
140	Viburnum / Schneeball / viburnum (Capr.)	1	2%	1	3%	2	2%																													
141	Vicia cracca / Vogelwicke / tufted vetch (Fab.)	0	0%	0	0%	0	0%																													
142	Violaceae / Veilchengewächse / Violet Family	0	0%	1	3%	1	1%																													
143	Viscum / Mistel / mistletoe (Lor.)	0	0%	0	0%	0	0%																													
144	Zea mays* / Mais / corn (Poac.)	0	0%	33	100%	33	39%																													

A6: Pollenartenspektrum in den Honigproben

Nr	Pollenart/Gattung	Frühhonig		Sommerhonig		Gesamt		Probe	1	3	4	5	6	7	8	10	13	14	20	21a	22	23	24	25	26	27	
		Funde	%	Funde	%	Funde	%																				
	Anzahl Honigproben	31		22		53																					
1	Acer / Ahorn / maple (Acer.)	31	100%	8	36%	39	74%		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	Achillea-T. / Schafgarben-T. / yarrow (Comp.)	8	26%	14	64%	22	42%			1									1				1		1		
3	Aesculus / Rosskastanie / horse chestnut (Hip.)	25	81%	5	23%	30	57%		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
4	Ailanthus / Götterbaum / tree of heaven (Sim.)	0	0%	4	18%	4	8%																				
5	Alismataceae / Froschlöffelgewächse / Water Plantain Family	4	13%	0	0%	4	8%				1			1						1				1			
6	Allium / Lauch (Lil.)	1	3%	0	0%	1	2%															1					
7	Alnus* / Erle / alder (Bet.)	10	32%	2	9%	12	23%		1	1	1		1					1		1					1		
8	Anemone / Windröschen / wind rose (Ran.)	0	0%	1	5%	1	2%																				
9	Anthriscus-T. / Wiesen-Kerbel-T. / cow parsley-T. (Apiac.)	4	13%	7	32%	11	21%		1		1			1						1							
10	Arctium / Klette / burdock (Ast.)	0	0%	9	41%	9	17%																				
11	Artemisia* / Beifuß / mugwort (Ast.)	0	0%	2	9%	2	4%																				
12	Asparagus / Spargel / asparagus (Lil.)	3	10%	9	41%	12	23%			1																1	
13	Begonia / Begonie (Beg.)	1	3%	2	9%	3	6%																			1	
14	Berberidaceae / Sauerdorngewächse / Barberry Family	4	13%	0	0%	4	8%										1	1				1					
15	Betula* / Birke / birch (Bet.)	15	48%	5	23%	20	38%			1	1	1			1	1			1					1		1	
16	Bistorta officinalis / Wiesenknöterich / meadow bistort (Polyg.)	2	6%	3	14%	5	9%																				
17	Borago / Borretsch / borage (Bor.)	28	90%	15	68%	43	81%		1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1		1	1	1	1	1	
18	Brassica / Raps / rape (Brass.)	7	23%	4	18%	11	21%										1	1								1	
19	Brassicaceae / Kreuzblütler / Mustard Family	0	0%	1	5%	1	2%																				
20	Bryonia / Zaunrübe / bryony (Cuc.)	0	0%	6	27%	6	11%																				
21	Buddleja / Schmetterlingsstrauch / butterfly bush (Bud.)	0	0%	2	9%	2	4%																				
22	Calluna vulgaris / Besenheide / ling (Eric.)	0	0%	5	23%	5	9%																				
23	Calystegia / Zaunwinde / great bindweed (Conv.)	0	0%	4	18%	4	8%																				
24	Campanulaceae / Glockenblumengewächse / Bellflower Family	3	10%	3	14%	6	11%									1										1	
25	Carpinus* / Hainbuche / hornbeam (Bet.)	0	0%	1	5%	1	2%																				
26	Caryophyllaceae / Nelkengewächse / Pink Family	4	13%	3	14%	7	13%									1										1	
27	Castanea sativa / Edelkastanie / sweet chestnut (Fag.)	2	6%	8	36%	10	19%		1															1			
28	Catalpa / Trompetenbaum / catalpa (Big.)	0	0%	2	9%	2	4%																				
29	Centaurea cyanus / Kornblume / cornflower (Ast.)	2	6%	7	32%	9	17%													1						1	
30	Centaurea jacea-T. / Flockenblume / knapweed (Ast.)	1	3%	0	0%	1	2%							1													
31	Centaurea montana / Bergflockenblume / perennial cornflower (Ast.)	1	3%	8	36%	9	17%													1							
32	Chelidonium* / Schöllkraut / greater celandine (Pap.)	3	10%	0	0%	3	6%															1			1		
33	Chenopodiaceae* / Meldegewächse / Goosefoot Family	0	0%	8	36%	8	15%																				
34	Cichorium-T. / Wegwarten-T. / chicory-t. (Ast.)	0	0%	1	5%	1	2%																				
35	Cistus / Zistrose / rock rose (Cist.)	0	0%	3	14%	3	6%																				
36	Convolvulus / Ackerwinde / bindweed (Conv.)	1	3%	13	59%	14	26%																			1	
37	Cornaceae / Hartregielgewächse / Dodwood Family	1	3%	0	0%	1	2%																				
38	Cornus sanguineum / Hartriegel / dogwood (Corn.)	12	39%	2	9%	14	26%		1	1	1			1		1	1			1					1	1	
39	Corydalis cava / Hohler Lerchensporn / hollowroot (Fum.)	0	0%	1	5%	1	2%																				
40	Corylus / Hasel / hazel (Bet.)	2	6%	0	0%	2	4%									1											
41	Cucumis / Gurke / cucumber (Cuc.)	0	0%	2	9%	2	4%																				
42	Cynoglossum / Hundszunge / hound's tong (Bor.)	2	6%	0	0%	2	4%																				
43	Cyperaceae* / Sauergräser / Sedge Family	2	6%	0	0%	2	4%																				
44	Datura innoxia / Stechapfel / thornapple (Sol.)	2	6%	0	0%	2	4%																				
45	Deutzia / Deutzie / snow flower (Sax.)	2	6%	0	0%	2	4%									1			1								
46	Dipsacaceae / Kardengewächse / Scabious Family	0	0%	5	23%	5	9%																				
47	Echium / Natterkopf / bugloss (Bor.)	1	3%	7	32%	8	15%																			1	
48	Eleagnus / Ölweide / oleaster (Elaeg.)	0	0%	1	5%	1	2%																				
49	Epilobium / Weidenröschen / fire weed (Onag.)	0	0%	6	27%	6	11%																				
50	Erica-T. (Eric.)	2	6%	2	9%	4	8%																				
51	Erodium / Reiherschnabel / heron's bill (Ger.)	0	0%	1	5%	1	2%																			1	
52	Eupatorium-T. / Wasserdost-T. / hemp agrimony-T. (Ast.)	2	6%	3	14%	5	9%													1				1			

A6: Pollenartenspektrum in den Honigproben

Nr	Pollenart/Gattung	Frühhonig		Sommerhonig		Gesamt		Probe	1	3	4	5	6	7	8	10	13	14	20	21a	22	23	24	25	26	27		
		Funde	%	Funde	%	Funde	%																					
53	Euphorbia-T. / Wolfsmilch-T / spurge-T. (Euph.)	1	3%	0	0%	1	2%																				1	
54	Fagopyrum esculentum / Buchweizen / buckwheat (Polyg.)	1	3%	0	0%	1	2%																					
55	Fagus* / Buche / beech (Fag.)	4	13%	0	0%	4	8%									1												
56	Filipendula* / Mädesüß / dropwort (Ros.)	10	32%	4	18%	14	26%	1										1	1	1							1	
57	Fragaria / Erdbeere / strawberry (Ros.)	2	6%	7	32%	9	17%																	1				
58	Frangula / Faulbaum / buckthorn (Rham.)	14	45%	9	41%	23	43%		1				1	1	1			1	1				1					
59	Fraxinus excelsior* / Esche / ash (Oleac.)	2	6%	0	0%	2	4%																					
60	Galium / Labkraut / bedstraw (Rub.)	0	0%	1	5%	1	2%																					
61	Genista-T. / Ginster-T. / broom-T. (Fab.)	0	0%	3	14%	3	6%																					
62	Gleditsia / Gleditschie / honey locust (Fab.)	0	0%	3	14%	3	6%																					
63	Helianthemum* / Sonnenröschen / sun rose (Cist.)	1	3%	2	9%	3	6%																					
64	Helianthus annuus / Sonnenblume / sunflower (Ast.)	0	0%	10	45%	10	19%																					
65	Heracleum mantegazzianum / Riesenbärenklau / giant hogweed (Apiac.)	1	3%	10	45%	11	21%	1																				
66	Hypericum* / Johanniskraut / St. John's Wort (Gutt.)	3	10%	6	27%	9	17%									1					1							
67	Ilex aquifolium / Stechpalme / common holly (Aquif.)	1	3%	0	0%	1	2%							1														
68	Impatiens / Springkraut / balsam (Bal.)	1	3%	2	9%	3	6%																					
69	Juglandaceae* / Walnussgewächse / Walnut Family	2	6%	0	0%	2	4%	1												1								
70	Juncaceae* / Binsengewächse / Rush Family	0	0%	1	5%	1	2%																					
71	Lavandula / Lavendel / lavender (Lam.)	0	0%	2	9%	2	4%																					
72	Ligustrum / Rainweide / privet (Oleac.)	5	16%	6	27%	11	21%	1										1								1		
73	Liliaceae / Liliengewächse / Lily Family	2	6%	10	45%	12	23%				1										1							
74	Liriodendron / Tilpenbaum / tulip tree (Mag.)	0	0%	1	5%	1	2%																					
75	Lonicera / Heckenkirsche / honeysuckle (Capr.)	13	42%	3	14%	16	30%		1	1				1	1	1	1		1			1	1				1	
76	Lotus / Hornklee / bird's foot trefoil (Fab.)	4	13%	6	27%	10	19%													1				1		1		
77	Lotus uliginosus / Sumpf-Hornklee / greater bird's foot trefoil (Fab.)	1	3%	4	18%	5	9%													1								
78	Lychnis / Lichtnelke / pink-T. (Car.)	2	6%	1	5%	3	6%																					
79	Malvaceae / Malvengewächse / Mallow Family	0	0%	8	36%	8	15%																					
80	Mellilotus / Steinklee / meililot (Fab.)	2	6%	0	0%	2	4%																			1		
81	Morus* / Maulbeere / mulberry (Mor.)	1	3%	2	9%	3	6%	1																				
82	Myosotis / Vergissmeinnicht / forget-me-not (Bor.)	20	65%	0	0%	20	38%	1				1		1		1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	
83	Nymphaea* / Seerose / water lily (Nym.)	0	0%	1	5%	1	2%																					
84	Oenothera / Nachtkerze / evening primrose (Onagr.)	0	0%	1	5%	1	2%																					
85	Onagraceae / Nachtkerzengewächse / Evening Primrose Family	1	3%	0	0%	1	2%																					
86	Ononis / Hauhechel / restharrow (Fab.)	2	6%	3	14%	5	9%			1																		
87	Origanum-T. / Majoran-T. / marjoram-T. (Lam.)	0	0%	2	9%	2	4%																					
88	Pachysandra terminalis / Ysander / Spurge (Bux.)	0	0%	1	5%	1	2%																					
89	Papaver-T.* / Mohn / poppy (Pap.)	8	26%	7	32%	15	28%	1											1		1				1	1		
90	Parthenocissus / Wilder Wein / woodbine (Vit.)	0	0%	11	50%	11	21%																					
91	Pastinaca sativa / Pastinak / parsnip (Apiac.)	0	0%	1	5%	1	2%																					
92	Persicaria maculosa / Flohknöterich (Polyg.)	9	29%	18	82%	27	51%			1	1	1		1					1					1	1		1	
93	Phacelia tanacetifolia / Büschelschön / fiddle neck (Hyd.)	0	0%	6	27%	6	11%																					
94	Picea* / Fichte / spruce (Pin.)	14	45%	9	41%	23	43%			1	1		1						1	1						1		
95	Pinus* / Kiefer / pine (Pin.)	22	71%	15	68%	37	70%	1	1	1				1	1			1	1	1			1	1	1	1	1	
96	Pisum-T. / Erbsen-T. / pea-T. (Fab.)	1	3%	1	5%	2	4%																				1	
97	Plantaginaceae* / Wegerichgewächse / Plantain Family	6	19%	7	32%	13	25%			1										1						1		
98	Poaceae* / Süßgräser / Grass Family	27	87%	20	91%	47	89%	1	1	1			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	
99	Potentilla* / Fingerkraut / cinquefoil (Ros.)	2	6%	2	9%	4	8%																				1	
100	Prunus-T. / Steinobst-T. / stone fruits (Ros.)	29	94%	8	36%	37	70%	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	
101	Pyrus-T. / Kernobst-T. / pomaceous fruits (Ros.)	29	94%	18	82%	47	89%	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	
102	Quercus* / Eiche / oak (Fag.)	22	71%	7	32%	29	55%	1	1			1	1	1	1					1	1	1	1	1	1	1	1	
103	Ranunculaceae* / Hahnenfußgewächse / Buttercup Family	1	3%	4	18%	5	9%																					
104	Ranunculus-T.* / Hahnenfuß-T. / buttercup-T. (Ran.)	1	3%	3	14%	4	8%																			1		
105	Rhamnaceae / Kreuzdorngewächse / Buckthorn Family	4	13%	2	9%	6	11%																			1		

A6: Pollenartenspektrum in den Honigproben

Nr	Pollenart/Gattung	Frühhonig		Sommerhonig		Gesamt		Probe	1	3	4	5	6	7	8	10	13	14	20	21a	22	23	24	25	26	27			
		Funde	%	Funde	%	Funde	%																						
106	Rhus typhina / Essigbaum / sumac (Anac.)	6	19%	5	23%	11	21%																						
107	Robinia pseudoacacia / Scheinakazie / locust (Fab.)	3	10%	2	9%	5	9%														1								
108	Rosaceae / Rosengewächse / Rose Family	2	6%	4	18%	6	11%														1		1						
109	Rubus / Himbeere, Brombeere / raspberry (Ros.)	2	6%	4	18%	6	11%															1							
110	Rumex* / Ampfer / sorrel (Polyg.)	6	19%	5	23%	11	21%											1	1		1							1	
111	Ruta graveolens / Weinraute / rue (Rut.)	0	0%	1	5%	1	2%																						
112	Salix / Weide / willow (Sal.)	29	94%	5	23%	34	64%	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
113	Sambucus* / Holunder / elder (Capr.)	19	61%	5	23%	24	45%	1	1	1	1	1	1				1		1	1	1	1	1	1	1	1			
114	Sanguisorba minor* / Kleiner Wiesenknopf / small burnet (Ros.)	4	13%	1	5%	5	9%	1									1												
115	Sedum-T. / Fetthennen-T. / stonecrop (Crass.)	2	6%	3	14%	5	9%				1																	1	
116	Senecio / Greiskraut / groundsel (Ast.)	3	10%	6	27%	9	17%														1				1				
117	Serratula-T. / Scharten-T. / saw wort-T. (Ast.)	2	6%	14	64%	16	30%																					1	
118	Sinapis-T. / Senf-T. / mustard-T. (Brass.)	7	23%	20	91%	27	51%				1				1											1	1		
119	Solanum-T. / Nachtschatten-T. / nightshade-T. (Sol.)	0	0%	4	18%	4	8%																					1	1
120	Sorbus-T. / Ebereschen-T. / mountain ash (Ros.)	7	23%	0	0%	7	13%			1	1							1								1			
121	Symphoricarpos / Schneebeere / snowberry (Capr.)	4	13%	11	50%	15	28%							1														1	
122	Symphytum / Beinwell / comfrey (Bor.)	1	3%	0	0%	1	2%																					1	
123	Syringa / Flieder/ lilac (Oleac.)	1	3%	0	0%	1	2%																						
124	Taraxacum-T. / Löwenzahn-T. / dandelion-T. (Ast.)	18	58%	16	73%	34	64%					1	1					1	1	1		1	1		1	1	1	1	
125	Taxaceae* / Eibengewächse / Yew Family	0	0%	1	5%	1	2%																						
126	Tilia / Linde / lime (Til.)	4	13%	18	82%	22	42%					1		1	1													1	
127	Trifolium incarnatum / Inkernatkleee / crimson clover (Fab.)	2	6%	6	27%	8	15%																						
128	Trifolium pratense / Rotkleee / red clover (Fab.)	6	19%	5	23%	11	21%			1	1		1						1										
129	Trifolium repens / Weißkleee / white clover (Fab.)	11	35%	20	91%	31	58%						1							1	1							1	
130	Trifolium-T. / Klee-T. / clover-T. (Fab.)	2	6%	0	0%	2	4%																						
131	Tussilago / Hufblattich / coltsfoot (Ast.)	0	0%	1	5%	1	2%																						
132	Typhaceae* / Rohrkolbengewächse / Cattail Family	0	0%	1	5%	1	2%																						
133	Ulmaceae* / Ulmengewächse / Elm Family	1	3%	0	0%	1	2%														1								
134	Urticaceae* / Nesselgewächse / Nettle Family	0	0%	3	14%	3	6%																						
135	Vaccinium-T. / Heidelbeer-T. / blueberry-T. (Eric.)	2	6%	4	18%	6	11%																						
136	Veronica / Ehrenpreis / speedwell (Capr.)	0	0%	5	23%	5	9%																						
137	Viburnum / Schneeball / viburnum (Capr.)	8	26%	0	0%	8	15%							1														1	
138	Vicia cracca / Vogelwicke / tufted vetch (Fab.)	3	10%	5	23%	8	15%		1																			1	
139	Violaceae / Veilchengewächse / Violet Family	1	3%	6	27%	7	13%																						
140	Viscum / Mistel / mistletoe (Lor.)	1	3%	0	0%	1	2%		1																				
141	Zea mays* / Mais / corn (Poac.)	3	10%	15	68%	18	34%																						

A6: Pollenartenspektrum in den Honigproben

Nr	28	29	30	31	32	40	41	42	43	45	46	47	48	62	64	66	67	68	70	71	72	74	76	77	78	81	82	90,1	90,2	92,1	92,2	94	95	96	97				
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1				1		1									1			1		1				
2			1						1		1		1		1					1				1	1	1			1	1	1		1	1	1				
3		1	1	1	1			1	1	1				1	1	1				1					1	1			1	1									
4														1	1	1		1																					
5																																							
6																																							
7		1			1										1	1																							
8																																					1		
9														1																						1	1		
10																				1	1			1	1				1	1	1		1			1			
11																					1																		
12								1												1										1	1	1	1	1	1	1	1		
13															1				1												1	1	1	1	1	1	1		
14					1																																		
15		1			1		1	1		1	1	1			1									1											1	1			
16								1							1						1																		
17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1							1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
18	1		1						1	1										1	1	1													1				
19																									1														
20															1	1	1	1	1		1																		
21															1																								
22																					1	1																	
23																					1																		
24														1	1					1	1																		
25																											1												
26		1				1																																	
27														1	1	1	1	1	1						1												1		
28															1						1																		
29																				1	1								1	1									
30																																							
31															1																								
32									1																														
33															1				1																				
34																																							
35															1																								
36															1	1	1	1	1	1	1																		
37																																							
38																																							
39																																							
40																																							
41																																							
42																																							
43	1	1																																					
44		1																																					
45																																							
46																																							
47																																							
48															1																								
49																																							
50																																							
51																																							
52																																							

A6: Pollenartenspektrum in den Honigproben

Nr	28	29	30	31	32	40	41	42	43	45	46	47	48	62	64	66	67	68	70	71	72	74	76	77	78	81	82	90,1	90,2	92,1	92,2	94	95	96	97				
53																																							
54								1																															
55										1	1	1																											
56		1	1		1	1	1										1					1	1													1			
57								1																	1			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
58	1		1	1			1	1	1		1								1						1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
59				1		1																		1															
60																								1															
61																																		1			1		
62															1	1		1																					
63										1																			1										
64																	1	1										1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
65															1	1	1	1	1					1	1				1	1							1		
66													1						1		1				1	1		1							1				
67																																							
68													1																								1		
69																																						1	
70															1																								
71																1	1																						
72		1													1	1	1	1					1					1											
73															1	1	1	1	1										1	1	1	1	1	1	1	1	1		
74																													1										
75	1		1								1								1	1									1										
76									1		1				1	1	1		1							1												1	
77																								1	1													1	
78													1	1									1																
79																1	1			1		1							1	1	1	1	1	1	1	1	1		
80	1																																						
81															1				1																				
82	1	1	1	1	1		1				1																												
83																													1										
84																																						1	
85													1																										
86			1												1				1	1																			
87																								1			1												
88																				1																			
89								1		1		1				1		1	1																1	1	1	1	
90															1		1	1	1	1	1			1					1					1	1	1	1		
91																																							
92									1						1	1	1		1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
93																					1	1	1																
94						1	1	1	1	1	1		1						1	1	1	1							1			1	1	1	1	1	1	1	
95	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1				1		1		1	1	1	1	1	1			1		1	1	1	1	1	1	1	1		
96																																							
97																	1	1																					
98	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
99													1																										1
100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			1	1	1	1		1	1						1										1	
101	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
102	1	1	1	1	1	1		1			1	1								1	1															1	1		
103													1											1	1														
104																1																							1
105								1	1			1			1																								1

A6: Pollenartenspektrum in den Honigproben

Nr	28	29	30	31	32	40	41	42	43	45	46	47	48	62	64	66	67	68	70	71	72	74	76	77	78	81	82	90,1	90,2	92,1	92,2	94	95	96	97			
106	1							1						1	1		1	1																	1			
107							1				1									1								1										
108														1	1		1	1																				
109											1				1	1		1	1																			
110					1								1	1	1	1	1	1																				
111																						1																
112	1	1	1	1	1	1			1	1	1	1	1		1				1	1								1									1	
113	1	1	1	1	1								1	1	1		1	1																			1	
114		1											1																								1	
115																1									1												1	
116					1									1	1	1		1				1					1										1	
117											1				1	1	1	1		1					1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	
118						1			1				1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
119																					1										1							1
120	1			1	1																																	
121								1	1					1	1	1	1	1	1					1	1		1	1									1	
122																																						
123																																						
124		1					1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				1	1	1	1	1	1		1	1		1	1	1	1	1	1	1		
125																																						1
126														1	1	1	1	1	1	1	1		1	1			1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	
127								1											1		1	1			1	1	1											
128							1			1			1						1	1	1														1			1
129	1	1					1	1		1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
130											1		1																									
131																																						1
132																																						1
133																																						
134														1	1			1																				
135						1							1								1	1			1		1											
136														1	1	1	1	1																				
137					1	1			1	1	1																											
138													1						1				1								1				1			1
139											1					1						1	1			1									1	1		
140																																						
141						1		1		1				1	1		1	1		1	1	1						1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

A7: Pollenartenspektrum in den Bienenbrotproben

Nr	Pollenart/Gattung	Funde	%	Anzahl Proben															
				Probe	B 62	B 64	B 66	B 67	B 68	B 70	B 90/1	B 90/2	B 92/1	B 92/2	B 94	B 95	B 96	B 97	
1	Acer / Ahorn / maple (Acer.)	2	14%								1							1	
2	Achillea-T. / Schafgarben-T. / yarrow (Comp.)	9	64%	1				1	1	1	1	1		1			1	1	
3	Aesculus / Rosskastanie / horse chestnut (Hip.)	0	0%																
4	Ailanthus / Götterbaum / tree of heaven (Sim.)	1	7%	1															
5	Alismataceae / Froschlöffelgewächse / Water Plantain Family	1	7%							1									
6	Allium / Lauch (Lil.)	0	0%																
7	Alnus* / Erle / alder (Bet.)	0	0%																
8	Anemone / Windröschen / wind rose (Ran.)	0	0%																
9	Anthriscus-T. / Wiesen-Kerbel-T. / cow parsley-T. (Apiac.)	1	7%															1	
10	Araliaceae / Efeugewächse / Ginseng Family	1	7%															1	
11	Arctium / Klette / burdock (Ast.)	7	50%				1			1	1	1	1		1		1		
12	Artemisia* / Beifuß / mugwort (Ast.)	2	14%								1							1	
13	Asparagus / Spargel / asparagus (Lil.)	8	57%						1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
14	Begonia / Begonie (Beg.)	2	14%													1		1	
15	Berberidaceae / Sauerdomgewächse / Barberry Family	0	0%																
16	Betula* / Birke / birch (Bet.)	0	0%																
17	Bistorta officinalis / Wiesenknöterich / meadow bistort (Polyg.)	0	0%																
18	Borago / Borretsch / borage (Bor.)	2	14%													1	1		
19	Brassica / Raps / rape (Brass.)	6	43%					1	1	1	1	1						1	
20	Brassicaceae / Kreuzblütler / Mustard Family	2	14%							1	1								
21	Bryonia / Zaunrübe / bryony (Cuc.)	4	29%			1	1	1	1										
22	Buddleja / Schmetterlingsstrauch / butterfly bush (Bud.)	1	7%														1		
23	Calluna vulgaris / Besenheide / ling (Eric.)	0	0%																
24	Calystegia / Zauwinde / great bindweed (Conv.)	7	50%	1					1		1		1	1	1	1	1		
25	Campanulaceae / Glockenblumengewächse / Bellflower Family	1	7%							1									
26	Carpinus* / Hainbuche / hornbeam (Bet.)	0	0%																
27	Caryophyllaceae / Nelkengewächse / Pink Family	1	7%								1								
28	Castanea sativa / Edelkastanie / sweet chestnut (Fag.)	6	43%	1	1	1	1	1										1	
29	Catalpa / Trompetenbaum / catalpa (Big.)	0	0%																
30	Centaurea cyanus / Kornblume / cornflower (Ast.)	5	36%						1	1	1		1	1					
31	Centaurea jacea-T. / Flockenblume / knapweed (Ast.)	11	79%	1		1		1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	
32	Centaurea montana / Bergflockenblume / perennial cornflower (Ast.)	0	0%																
33	Cerastium / Hornkraut / chickweed (Car.)	2	14%												1		1		
34	Chelidonium* / Schöllkraut / greater celandine (Pap.)	1	7%							1									
35	Chenopodiaceae* / Meldegewächse / Goosefoot Family	10	71%				1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
36	Cichorium-T. / Wegwarten-T. / chicory-t. (Ast.)	3	21%									1		1	1				
37	Cistaceae / Zistrosengewächse / Rockrose Family	1	7%	1															
38	Cistus / Zistrose / rock rose (Cist.)	0	0%																
39	Convolvulus / Ackerwinde / bindweed (Conv.)	10	71%	1	1	1		1		1			1	1	1	1	1	1	
40	Comaceae / Hartregelgewächse / Dodwodd Family	1	7%															1	
41	Cornus sanguineum / Hartriegel / dogwood (Corn.)	5	36%				1	1		1	1					1			
42	Corydalis cava / Hohler Lerchenspom / hollowroot (Fum.)	0	0%																
43	Corylus / Hasel / hazel (Bet.)	0	0%																
44	Cucumis / Gurke / cucumber (Cuc.)	1	7%												1				
45	Cucurbita / Kürbis / pumpkin (Cuc.)	1	7%													1			
46	Cynoglossum / Hundszunge / hound's tong (Bor.)	0	0%																
47	Cyperaceae* / Sauergräser / Sedge Family	0	0%																
48	Datura innoxia / Stechapfel / thornapple (Sol.)	1	7%							1									
49	Deutzia / Deutzie / snow flower (Sax.)	0	0%																
50	Dipsacaceae / Kardengewächse / Scabious Family	1	7%															1	
51	Echinops / Kugeldistel / globe thistle	2	14%				1			1									
52	Echium / Natterkopf / bugloss (Bor.)	3	21%							1						1		1	
53	Eleagnus / Ölweide / oleaster (Eleag.)	0	0%																
54	Epilobium / Weidenröschen / fire weed (Onag.)	5	36%			1	1	1		1								1	
55	Erica-T. (Eric.)	0	0%																

A7: Pollenartenspektrum in den Bienenbrotproben

Nr	Pollenart/Gattung	Funde	%	Anzahl Proben													
				Probe	B 62	B 64	B 66	B 67	B 68	B 70	B 90/1	B 90/2	B 92/1	B 92/2	B 94	B 95	B 96
	Anzahl Proben	14	14														
56	Erodium / Reiher Schnabel / heron's bill (Ger.)	0	0%														
57	Eryngium / Edeldistel / holly (Apiac.)	1	7%											1			
58	Eupatorium-T. / Wasserdost-T. / hemp agrimony-T. (Ast.)	2	14%			1	1										
59	Euphorbia-T. / Wolfsmilch-T / spurge-T. (Euph.)	1	7%											1			
60	Fagopyrum esculentum / Buchweizen / buckwheat (Polyg.)	0	0%														
61	Fagus* / Buche / beech (Fag.)	0	0%														
62	Filipendula* / Mädesüß / dropwort (Ros.)	7	50%			1	1			1		1	1		1		1
63	Fragaria / Erdbeere / strawberry (Ros.)	4	29%							1		1			1		1
64	Frangula / Faulbaum / buckthorn (Rham.)	4	29%							1		1			1		1
65	Fraxinus excelsior* / Esche / ash (Oleac.)	0	0%														
66	Galium / Labkraut / bedstraw (Rub.)	0	0%														
67	Genista-T. / Ginster-T. / broom-T. (Fab.)	0	0%														
68	Geranium / Storchschnabel / cranesbill (Ger.)	5	36%							1	1			1		1	1
69	Gleditsia / Gleditschie / honey locust (Fab.)	0	0%														
70	Helianthemum* / Sonnenröschen / sun rose (Cist.)	0	0%														
71	Helianthus annuus / Sonnenblume / sunflower (Ast.)	10	71%							1	1	1	1	1	1	1	1
72	Heracleum / Bärenklau / hogweed (Apiac.)	6	43%			1	1	1	1	1							1
73	Heracleum mantegazzianum / Riesenbärenklau / giant hogweed (Apiac.)	0	0%														
74	Hypericum* / Johanniskraut / St. John's Wort (Gutt.)	2	14%							1							1
75	Ilex aquifolium / Stechpalme / common holly (Aquif.)	0	0%														
76	Impatiens / Springkraut / balsam (Bal.)	3	21%									1		1		1	
77	Juglandaceae* / Walnussgewächse / Walnut Family	0	0%														
78	Juncaceae* / Binsengewächse / Rush Family	2	14%							1					1		
79	Lavandula / Lavendel / lavender (Lam.)	0	0%														
80	Ligustrum / Rainweide / privet (Oleac.)	4	29%			1	1	1	1								
81	Liliaceae / Liliengewächse / Lily Family	2	14%												1	1	
82	Liriodendron / Tulpenbaum / tulip tree (Mag.)	2	14%			1	1										
83	Lonicera / Heckenkirsche / honeysuckle (Capr.)	4	29%			1	1			1							
84	Lotus / Hornklee / bird's foot trefoil (Fab.)	2	14%			1	1										
85	Lotus uliginosus / Sumpf-Hornklee / greater bird's foot trefoil (Fab.)	0	0%														
86	Lychnis / Lichtnelke / pink-T. (Car.)	0	0%														
87	Lythrum / Weiderich / Loosestrife (Lythr.)	2	14%										1		1		
88	Malvaceae / Malvengewächse / Mallow Family	8	57%				1		1	1	1	1		1	1	1	1
89	Melilotus / Steinklee / melilot (Fab.)	1	7%										1				
90	Morus* / Maulbeere / mulberry (Mor.)	0	0%														
91	Myosotis / Vergissmeinnicht / forget-me-not (Bor.)	0	0%														
92	Nymphaea* / Seerose / water lily (Nym.)	0	0%														
93	Oenothera / Nachtkerze / evening primrose (Onagr.)	0	0%														
94	Onagraceae / Nachtkerzengewächse / Evening Primrose Family	0	0%														
95	Ononis / Hauhechel / restharrow (Fab.)	0	0%														
96	Origanum-T. / Majoran-T. / marjoram-T. (Lam.)	3	21%									1			1	1	
97	Pachysandra terminalis / Ysander / Spurge (Bux.)	0	0%														
98	Papaver-T.* / Mohn / poppy (Pap.)	7	50%				1	1	1	1	1				1	1	
99	Parthenocissus / Wilder Wein / woodbine (Vit.)	11	79%				1	1	1		1	1	1	1	1	1	1
100	Pastinaca sativa / Pastinak / parsnip (Apiac.)	1	7%									1					
101	Persicaria maculosa / Flohknöterich (Polyg.)	1	7%					1									
102	Phacelia tanacetifolia / Büschelschön / fiddle neck (Hyd.)	4	29%							1		1		1			1
103	Picea* / Fichte / spruce (Pin.)	2	14%								1		1				
104	Pinus* / Kiefer / pine (Pin.)	4	29%							1	1	1			1		
105	Pisum-T. / Erbsen-T. / pea-T. (Fab.)	3	21%							1				1			1
106	Plantaginaceae* / Wegerichgewächse / Plantain Family	9	64%					1	1		1	1	1	1	1	1	1
107	Poaceae* / Süßgräser / Grass Family	2	14%							1							1
108	Potentilla* / Fingerkraut / cinquefoil (Ros.)	1	7%													1	
109	Prunus-T. / Steinobst-T. / stone fruits (Ros.)	1	7%				1										
110	Pyrus-T. / Kernobst-T. / pomaceous fruits (Ros.)	9	64%			1	1			1		1	1	1	1	1	1

A7: Pollenartenspektrum in den Bienenbrotproben

Nr	Pollenart/Gattung	Funde	%	Probe																	
				B 62	B 64	B 66	B 67	B 68	B 70	B 90/1	B 90/2	B 92/1	B 92/2	B 94	B 95	B 96	B 97				
	Anzahl Proben	14	14																		
111	Quercus* / Eiche / oak (Fag.)	3	21%							1	1	1									
112	Ranunculaceae* / Hahnenfußgewächse / Buttercup Family	1	7%																1		
113	Ranunculus-T.* / Hahnenfuß-T. / buttercup-T. (Ran.)	1	7%													1					
114	Rhamnaceae / Kreuzdorngewächse / Buckthorn Family	0	0%																		
115	Rhus typhina / Essigbaum / sumac (Anac.)	3	21%					1	1	1											
116	Robinia pseudoacacia / Scheinakazie / locust (Fab.)	0	0%																		
117	Rosaceae / Rosengewächse / Rose Family	0	0%																		
118	Rubus / Himbeere, Brombeere / raspberry (Ros.)	1	7%																1		
119	Rumex* / Ampfer / sorrel (Polyg.)	4	29%							1	1			1					1		
120	Ruta graveolens / Weinraute / rue (Rut.)	0	0%																		
121	Salix / Weide / willow (Sal.)	0	0%																		
122	Salvia-T. / Salbei-T. / sage-T. (Lam.)	1	7%																1		
123	Sambucus* / Holunder / elder (Capr.)	0	0%																		
124	Sanguisorba minor* / Kleiner Wiesenknopf / small bumet (Ros.)	0	0%																		
125	Sanguisorba off.* / Gr. Wiesenknopf / great bumet (Ros.)	1	7%																1		
126	Sedum-T. / Fetthennen-T. / stonecrop (Crass.)	2	14%				1											1			
127	Senecio / Greiskraut / groundsel (Ast.)	2	14%							1	1										
128	Serratula-T. / Scharten-T. / saw wort-T. (Ast.)	11	79%		1	1	1	1	1		1			1	1		1	1	1		
129	Sinapis-T. / Senf-T. / mustard-T. (Brass.)	10	71%			1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
130	Solanum-T. / Nachtschatten-T. / nightshade-T. (Sol.)	2	14%								1	1									
131	Sorbus-T. / Ebereschen-T. / mountain ash (Ros.)	2	14%		1			1													
132	Symphoricarpos / Schneebeere / snowberry (Capr.)	0	0%																		
133	Symphytum / Beinwell / comfrey (Bor.)	0	0%																		
134	Syringa / Flieder / lilac (Oleac.)	0	0%																		
135	Taraxacum-T. / Löwenzahn-T. / dandelion-T. (Ast.)	8	57%		1		1				1	1	1	1				1	1		
136	Taxaceae* / Eibengewächse / Yew Family	0	0%																		
137	Tilia / Linde / lime (Til.)	5	36%			1		1		1								1	1		
138	Trifolium incarnatum / Inkernatkle / crimson clover (Fab.)	0	0%																		
139	Trifolium pratense / Rotkle / red clover (Fab.)	1	7%							1											
140	Trifolium repens / Weißkle / white clover (Fab.)	13	93%		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
141	Trifolium-T. / Klee-T. / clover-T. (Fab.)	1	7%							1											
142	Tussilago / Huflattich / coltsfoot (Ast.)	0	0%																		
143	Typhaceae* / Rohrkolbengewächse / Cattail Family	0	0%																		
144	Ulmaceae* / Ulmengewächse / Elm Family	0	0%																		
145	Urticaceae* / Nesselgewächse / Nettle Family	0	0%																		
146	Vaccinium-T. / Heidelbeer-T. / blueberry-T. (Eric.)	0	0%																		
147	Veronica / Ehrenpreis / speedwell (Capr.)	2	14%		1	1															
148	Viburnum / Schneeball / viburnum (Capr.)	0	0%																		
149	Vicia cracca / Vogelwicke / tufted vetch (Fab.)	4	29%								1	1	1					1			
150	Vicia faba / Ackerbohne / broad bean (Fab.)	1	7%										1								
151	Violaceae / Veilchengewächse / Violet Family	2	14%								1							1			
152	Viscum / Mistel / mistletoe (Lor.)	0	0%																		
153	Zea mays* / Mais / corn (Poac.)	9	64%								1	1	1	1	1	1	1	1	1		
154	Anzahl Funde gesamt	94																			

Danksagung

Wir bedanken uns bei allen Beteiligten Personen und Institutionen für die freundliche Unterstützung und Kooperation, namentlich:

Den Ländern Bremen, Bayern, Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen

Niedersächsisches Landesamt für Ökologie (NLÖ) (Dr. Neuber, Dr. Hofmann)

LfU Augsburg (Dr. Theenhaus, Dr. Zeitler, Dr. Peichl, Dr. Gietl mit MitarbeiterInnen)

BBA (Prof. Dr. Bartels, Dr. Schiemann und Dr. Brasse mit MitarbeiterInnen)

RWTH Aachen (Dr. Bartsch, Prof. Schuphan mit MitarbeiterInnen)

Bayer Crop Science, vormals Aventis Crop Science (Dr. Bübl, Dr. Harms)

KWS Saatgut AG (Dr. Matzke)

Den regionalen Imkerverbänden und örtlichen Imkervereinen

Den Standort- und Wanderimkern, den Herren Beckenbauer, Behrens, Brey, Dauter, Enzmann, Frater Rupert, Giffhorn, Goldmann, Golz, Häcker, Hagen, Hahn, Halbe, Koch, Lür, Pape, Polzer, Sänger, Schlüter, Sperling, Stier, Sturm, Vogt, Vossen, Waschk.

Staatl. Lehr u. Versuchsanstalt Schwarzenau (Dr. Lindner)

Bienenprüfhof Schwarzenau (Frau Polzer)

Bayer. Landesanstalt f. Bienenzucht (Dr. Mautz)

Herr Härtl, Amt f. Landwirtschaft, Deggendorf

Dr. Beudert, Nationalparkverwaltung Bayer. Wald, Forschungsstelle Integriertes Monitoring

Dr. Vogt, Agrarmeteorologischer Dienst des DWD, Braunschweig

SSP Sampler Systems Products, Horben

Freudenberger Vliestechnik GmbH

Dr. Holländer, Fraunhofer Institut, Hannover

Bremer Erfrischungsgetränke GmbH, Bremen

Vilsa Mineralbrunnen AG, Bruchhausen-Vilsen

H. Weiner und G. Mäutzner

Dr. M. Römer

Dr. J. Hildenbrandt

Den FachbetreuerInnen im BfN und UBA (F. Berhorn, A. Miehe) und im Land Bremen (Dr. Probst, Dr. Gottwald) sowie bei der BIA (Dr. Schieferstein, Dr. Pukrop)