

**VEREIN
DEUTSCHER
INGENIEURE**

Monitoring der Wirkungen gentechnisch veränderter
Organismen (GVO)
Pollenmonitoring
Technische Pollensammlung mit Pollenmassenfilter (PMF)
und Sigma-2-Sammler

Monitoring the effects of genetically modified organisms
(GMO)
Pollen monitoring
Technical pollen sampling using pollen mass filter (PMF) and
Sigma-2-sampler

VDI 4330

Blatt 3 / Part 3

**Ausg. deutsch/englisch
Issue German/English**

Die deutsche Version dieser Richtlinie ist verbindlich.

The German version of this guideline shall be taken as authoritative. No guarantee can be given with respect to the English translation.

Inhalt	Seite	Contents	Page
Einleitung	2	Introduction	2
1 Anwendungsbereich	3	1 Scope of application	3
2 Grundlage des Verfahrens	3	2 Basic principle of the procedure	3
3 Probenahmeeinrichtung	4	3 Sampling equipment	4
3.1 Geräte und Materialien	4	3.1 Instruments and materials	4
3.2 Technische Umsetzung	6	3.2 Technical implementation	6
4 Probenahme	8	4 Sampling	8
4.1 Standortbedingungen	8	4.1 Site conditions	8
4.2 Aufstellen der Geräte	9	4.2 Installing the equipment	9
4.3 Expositionsdauer	9	4.3 Exposure time	9
4.4 Probenahme im Gelände	10	4.4 Sampling at site	10
4.5 Probenaufbereitung	11	4.5 Sample preparation	11
5 Mikroskopische Pollenanalyse	14	5 Microscopic pollen analysis	14
5.1 Sigma-2	14	5.1 Sigma-2 sampler	14
5.2 PMF	17	5.2 PMF	17
6 Molekularbiologische DNA-Analysen	20	6 Molecular-biological DNA analyses	20
7 Bestimmung der Zielgrößen für das GVO-Monitoring und Darstellung der Ergebnisse	21	7 Determination of the target parameters for GMO monitoring and representation of the results	21
7.1 Sigma-2	21	7.1 Sigma-2 sampler	21
7.2 PMF	23	7.2 PMF	23
8 Kennwerte der Verfahren	25	8 Characteristic parameters of the methods	25
8.1 Validierung	25	8.1 Validation	25
8.2 Messwerteverteilung	27	8.2 Distribution of measured values	27
8.3 Methodischer Ansatz und Bestimmung grundlegender Parameter	27	8.3 Methodical approach and determination of basic parameters	27
8.4 Sigma-2	30	8.4 Sigma-2 sampler	30
8.5 PMF	36	8.5 PMF	36

VDI-Kompetenzfeld Biotechnologie

Ausschuss Technische Pollensammlung
Fachbeirat Monitoring der Wirkungen von genetisch veränderten Organismen (GVO)

VDI-Handbuch Biotechnologie, Band 1: GVO-Monitoring
VDI/DIN-Handbuch Reinhaltung der Luft, Band 1a: Maximale Immissionswerte
VDI-Handbuch Landwirtschaft/Landtechnik

	Seite
8.6 Parallelmessungen	40
8.7 Vergleichsmessungen mit der Burkard-Falle	43
8.8 Pollenspektrum	44
9 Qualitätssicherung	52
9.1 Allgemeine Messstrategie und Aufgaben- stellung des Pollenmonitoring mit technischen Sammlern	52
9.2 Standortprotokoll	52
9.3 Probenbegleitschein	52
9.4 Parallelmessungen	52
9.5 Vergleichsmessungen mit Aktivgeräten als Eichstützpunkte	53
9.6 Referenzmaterialien	53
9.7 Qualifizierung	53
Schrifttum	54

	Page
8.6 Parallel measurements	40
8.7 Comparative measurements using the Burkard trap	43
8.8 Pollen diversity	44
9 Quality assurance and quality control	52
9.1 General monitoring strategy and terms of reference of pollen monitoring with technical samplers	52
9.2 Site protocol	52
9.3 Accompanying documentation for samples	52
9.4 Parallel measurements	52
9.5 Comparative measurements using active samplers as calibration bases	53
9.6 Reference materials	53
9.7 Qualification	53
Bibliography	54

Einleitung

In der Ausbreitung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) kommt dem Pollenflug eine bedeutsame Rolle zu. Für ein Monitoring von GVO wird daher ein Verfahren beschrieben, das die Erfassung und Dokumentation von Eintrag und Verbreitung von GVO über Pollen in einem bundesweit und naturraum-repräsentativ angelegten Messnetz ermöglicht. Bei diesem Verfahren werden technische und biologische Pollensammler (VDI 4330 Blatt 4) sowie PCR-Screening-Verfahren zum Nachweis des GVO-Eintrages (VDI 4330 Blatt 5, Blatt 6, Blatt 7 und Blatt 8) eingesetzt. In der vorliegenden Richtlinie wird ein technisches Sammelsystem beschrieben.

Die derzeit bekannten Pollenfallen sind hierzu nur bedingt geeignet, da sie entweder nicht standardisierbar oder die Geräte für Expositionszeiträume ausgelegt sind, die für das GVO-Monitoring ungeeignet sind. Eine Einschränkung bei den gebräuchlichen Pollensammlern ist auch die notwendige Stromversorgung, wie es z.B. bei der Burkard-Falle der Fall ist. Solche Geräte sind damit räumlich nur begrenzt einsetzbar.

Aus diesen Gründen wurde für das GVO-Monitoring ein Passivsammler entwickelt, der als Kombinationsgerät, bestehend aus einem neuartigen Pollensammler – dem Pollenmassenfilter (PMF) – und dem Depositionssammler Sigma-2 nach VDI 2119 Blatt 4, eingesetzt wird. Die vorliegende Richtlinie ersetzt nicht VDI 2119 Blatt 4, sondern behandelt die für das GVO-Monitoring erforderlichen spezifischen Ergänzungen.

Introduction

Pollen dispersal plays a significant role in the dissemination of genetically modified organisms (GMO). For a GMO monitoring a procedure is described that enables quantification and documentation of GMO input and spread through pollen in a nationwide measuring network that represents natural lands. Technical and biological pollen samplers (VDI 4330 Part 4) and PCR screening procedures are used for the detection of GMO input (VDI 4330 Part 5, Part 6, Part 7 and Part 8). In this guideline a technical sampling system is described.

Presently known pollen traps are only partially suited for this purpose, since they can neither be standardised nor is the instrumentation designed for exposure times that are suitable for GMO monitoring. Another limitation of commonly used pollen samplers is the requirement for a power supply, e.g. as for the Burkard trap. The use of these instruments is therefore restricted to a limited exposure area.

For these reasons, a new type of pollen sampler, the pollen mass filter (PMF), was developed. The PMF is used in combination as accessory device to the Sigma-2 deposition sampler according to VDI 2119 Part 4. This guideline deals with specific supplements required for GMO monitoring; it does not replace VDI 2119 Part 4.

1 Anwendungsbereich

Diese Richtlinie beschreibt ein Verfahren, mit dem Pollen mit dem Depositionssammler Sigma-2 zusammen mit dem PMF gesammelt werden können. An den Proben soll der Polleneintrag nach Art und Anzahl sowie der Anteil an transgenen Pollen bestimmt werden. Der Sigma-2-Sammler dient hierbei der standardisierten Probenahme zur direkten mikroskopischen Pollenanalyse. Mit dem PMF erhält man ausreichende Pollenmengen für eine molekularbiologische Diagnostik.

Notwendige Grundlagen zum Verständnis dieser Richtlinie sind in VDI 4330 Blatt 1 und Blatt 2 dargestellt. Die Sammlung von Pollen mit technischen Sammlern für das GVO-Monitoring ist in unmittelbarem Zusammenhang mit der biologischen Honigsammlung durch die Honigbiene zu sehen (VDI 4330 Blatt 4).

Der Einsatz der technischen Passivsammler und der biologischen, aktiven Sammler Honigbiene ergänzen sich in vielfältiger Weise für das Pollenmonitoring von GVO. Während die technischen Sammler Ergebnisse zum Polleneintrag am Standort liefern, zeigen die Bienen eine raumübergreifende Sammelaktivität, die einen Querschnitt über die im Raum etablierten, blühenden Pflanzen ergibt. Mit beiden Sammelverfahren wird ein breites Pollenartenspektrum erfasst, wobei sich die Verfahren über die Vegetationszeit ergänzen. Für Rückschlüsse auf eine Herkunft von GVO sind gegebenenfalls weitere, hier nicht behandelte Verfahren und Informationen erforderlich.

2 Grundlage des Verfahrens

Der technische Pollensammler besteht aus zwei Geräten:

Der **Sigma-2** dient der Bestimmung der Pollendepositionsrates. Die luftgetragenen Pollen gelangen durch die seitlich versetzten Schlitze in den Innenraum des Depositionssammlers. Sie sedimentieren in dem Sammler auf der am Grund befindlichen Haftfolie. Die Abscheidung erfolgt wind- und niederschlaggeschützt in dem turbulenzarmen Innenraum des Sammlers.

Die abgeschiedenen Pollen werden auf der Depositionsfläche lichtmikroskopisch direkt nach Art und Anzahl ausgewertet. Hierfür können auch bildanalytische Verfahren zur automatischen Erkennung eingesetzt werden. Die Regelexpositionsdauer nach VDI 2119 Blatt 4 beträgt eine Woche, für den in dieser Richtlinie beschriebenen besonderen Anwendungszweck wird eine zwei- bis vierwöchige Expositionsdauer empfohlen (Begründung siehe

1 Scope of application

This guideline describes a procedure for the combined use of the deposition-type Sigma-2 sampler and the PMF to sample pollen. Collected samples are used to analyse pollen input with regard to species and amount, and percentage of transgenic pollen. The Sigma-2 sampler here provides a standardised sampling method for direct microscopic pollen analysis. Using the PMF yields sufficient amounts of pollen to carry out molecular-biological diagnostics.

The essential background in order to understand this guideline is given in VDI 4330 Part 1 and Part 2. Pollen sampling using technical samplers for GMO monitoring should be directly related to the biological collection of honey by bees (VDI 4330 Part 4).

The application of technical passive samplers and the use of honey bee colonies as active biological collectors complement each other in a manifold way for monitoring of GMO through pollen. Whereas technical samplers provide results from the pollen input at the sampling site, the wide-ranging collecting activity of bees gives rise to a representative profile of fluxing plants established in the area. By using these two sampling methods a broad range of pollen species is covered, as the methods complement each other with regard to the vegetation period, too. To draw conclusions on the origin of GMO further procedures are required, which are not mentioned here as necessary.

2 Basic principle of the procedure

The technical pollen sampler consists of two instruments:

The **Sigma-2** sampler is designed for determining the pollen deposition rate. Wind-dispersed pollen grains enter the interior through the laterally shifted slits of the deposition sampler. The pollen sediment on the adhesive foil at the bottom of the sampler. Thus, the deposition takes place in the turbulence-depleted interior of the sampler which provides protection from wind and rain.

Pollen adhering to the deposition area is directly analysed with regard to species and amount by means of light microscopy. For this purpose, image-analysis methods can be employed for automated identification. According to VDI 2119 Part 4 the regular exposure time is one week; for the particular application described in this guideline a two- to four-week exposure time is recommended (the rationale for this is given in Section 4.3). The microscopic single-particle