

VEREIN  
DEUTSCHER  
INGENIEURE

Monitoring der Wirkungen des Anbaus  
gentechnisch veränderter Organismen (GVO)  
Standardisierte Erfassung von Amphibien

VDI 4333

Monitoring the effects of the cultivation of  
genetically modified organisms (GMOs)  
Standardised sampling methods for amphibians

Ausg. deutsch/englisch  
Issue German/English

Die deutsche Version dieser Richtlinie ist verbindlich.

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

Inhalt	Seite	Contents	Page
Vorbemerkung . . . . .	2	Preliminary note . . . . .	2
Einleitung . . . . .	2	Introduction . . . . .	2
<b>1 Anwendungsbereich . . . . .</b>	<b>4</b>	<b>1 Scope . . . . .</b>	<b>4</b>
<b>2 Normative Verweise . . . . .</b>	<b>5</b>	<b>2 Normative references . . . . .</b>	<b>5</b>
<b>3 Begriffe . . . . .</b>	<b>5</b>	<b>3 Terms and definitions . . . . .</b>	<b>5</b>
<b>4 Artenauswahl . . . . .</b>	<b>8</b>	<b>4 Species selection. . . . .</b>	<b>8</b>
4.1 Obligate Arten. . . . .	9	4.1 Obligate species . . . . .	9
4.2 Zusatzarten . . . . .	13	4.2 Supplementary species . . . . .	13
<b>5 Grundüberlegungen, Aufbau und Struktur der Erhebung . . . . .</b>	<b>20</b>	<b>5 Basic considerations, structure and design of the monitoring scheme . . . . .</b>	<b>20</b>
<b>6 Methoden . . . . .</b>	<b>24</b>	<b>6 Methods. . . . .</b>	<b>24</b>
6.1 Monitoring terrestrischer Stadien . . . . .	24	6.1 Monitoring the terrestrial stages . . . . .	24
6.2 Larvenmonitoring . . . . .	27	6.2 Larval monitoring. . . . .	27
6.3 Weiterführende Untersuchungen . . . . .	28	6.3 Further investigations. . . . .	28
<b>7 Probenahmedesign . . . . .</b>	<b>28</b>	<b>7 Sampling design . . . . .</b>	<b>28</b>
7.1 Flächenauswahl/Gewässerauswahl . . . . .	28	7.1 Selecting sampling sites/water bodies . . . . .	28
7.2 Zeitliche Aspekte, Probenwiederholung . . . . .	30	7.2 Temporal aspects, repeat sampling . . . . .	30
<b>8 Auswertung . . . . .</b>	<b>30</b>	<b>8 Evaluation. . . . .</b>	<b>30</b>
8.1 Auswertung unmittelbarer Effekte . . . . .	33	8.1 Evaluation of direct effects . . . . .	31
8.2 Auswertung langfristiger Effekte . . . . .	31	8.2 Evaluation of long-term effects. . . . .	31
<b>9 Berichterstattung . . . . .</b>	<b>33</b>	<b>9 Reporting . . . . .</b>	<b>33</b>
<b>10 Qualitätssicherung . . . . .</b>	<b>33</b>	<b>10 Quality assurance. . . . .</b>	<b>33</b>
<b>Anhang . . . . .</b>	<b>35</b>	<b>Annex . . . . .</b>	<b>35</b>
Schrifttum. . . . .	54	Bibliography . . . . .	54

VDI-Gesellschaft Technologies of Life Sciences (TLS)  
Fachbereich Biodiversität, GVO-Monitoring und Risikomanagement

Frühere Ausgabe: 09.13, Entwurf  
Former edition: 09/13, Draft

Zu beziehen durch / Available at Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin – Alle Rechte vorbehalten / All rights reserved © Verein Deutscher Ingenieure e.V., Düsseldorf 2014

Vervielfältigung – auch für innerbetriebliche Zwecke – nicht gestattet / Reproduction – even for internal use – not permitted

## Vorbemerkung

Der Inhalt dieser Richtlinie ist entstanden unter Beachtung der Vorgaben und Empfehlungen der Richtlinie VDI 1000.

Alle Rechte, insbesondere die des Nachdrucks, der Fotokopie, der elektronischen Verwendung und der Übersetzung, jeweils auszugsweise oder vollständig, sind vorbehalten.

Die Nutzung dieser VDI-Richtlinie ist unter Wahrung des Urheberrechts und unter Beachtung der Lizenzbedingungen ([www.vdi.de/richtlinien](http://www.vdi.de/richtlinien)), die in den VDI-Merkblättern geregelt sind, möglich.

Allen, die ehrenamtlich an der Erarbeitung dieser VDI-Richtlinie mitgewirkt haben, sei gedankt.

## Einleitung

Um eventuelle negative Auswirkungen auf die Gesundheit und die Umwelt frühzeitig zu erkennen, wird durch die europäische Richtlinie 2001/18/EG über die absichtliche Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen (GVO) in die Umwelt ein Monitoring zur Überwachung von Anbau und Verbreitung gentechnisch veränderter Organismen vorgeschrieben. Die Belastbarkeit der Daten erfordert den Einsatz bewährter und standardisierter Erhebungsmethoden und Auswertungsverfahren. Dies ist explizit in der Ratsentscheidung 2002/811/EG festgelegt, in der weiterführende Leitlinien zu einem Monitoring formuliert werden. Entsprechende methodenspezifische Richtlinienblätter für einen Einsatz im GVO-Monitoring sind in der Richtlinienreihe VDI 4330 veröffentlicht.

Amphibien repräsentieren die Schutzziele Biodiversität und Wasser ([18; 55], siehe auch VDI 4330 Blatt 1). Da sie sowohl aquatische als auch terrestrische Habitate nutzen sowie saisonal zwischen diesen Lebensräumen wandern, gelten sie als Indikatorgruppe für negative Umwelteinflüsse in beiden Sphären. Insbesondere gilt, dass Amphibien

- einen guten Bearbeitungs- und Kenntnisstand zu Biologie, Ökologie und Gefährdungssituation der einzelnen Arten aufweisen,
- aufgrund ihrer Mobilität und ihrer komplexen Habitatansprüche räumlich-funktionale Eigenschaften der Umwelt abbilden und demzufolge für eine Bewertung auf Landschaftsebene gut geeignet sind,
- sensibel auf Veränderungen in einzelnen Teillebensräumen reagieren,
- an ihren Laichgewässern vorhersehbar anzutreffen und quantitativ erfassbar sind, saisonal wandern und ihre Fortpflanzung und Larvalentwicklung in

## Preliminary note

The content of this standard has been developed in strict accordance with the requirements and recommendations of the standard VDI 1000.

All rights are reserved, including those of reprinting, reproduction (photocopying, micro copying), storage in data processing systems and translation, either of the full text or of extracts.

The use of this standard without infringement of copyright is permitted subject to the licensing conditions specified in the VDI Notices ([www.vdi.de/richtlinien](http://www.vdi.de/richtlinien)).

We wish to express our gratitude to all honorary contributors to this standard.

## Introduction

EU Directive 2001/18/EC on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms (GMOs) prescribes the implementation of a monitoring as a means of identifying potential adverse effects of GMOs and their use on human health and the environment at an early stage. Reliable and standardised sampling and analysis methods are required to ensure that the data obtained are robust. This is explicitly defined in Council Decision 2002/811/EC, which establishes detailed guidance notes on the development of a monitoring. A corresponding set of guidelines describing specific methods to be used for GMO monitoring is published as part of the series of standards VDI 4330.

Amphibians represent the protection targets of biodiversity and water ([18; 55] see also VDI 4330 Part 1). Since they use both aquatic and terrestrial habitats and migrate seasonally between these two habitats, they are regarded as an indicator group for negative environmental effects in both spheres. The following points apply in particular to amphibians:

- There is substantial knowledge concerning the biology, ecology and conservation status of the different species.
- Due to their mobility and complex habitat requirements, they illustrate spatial and functional characteristics of the environment, which makes them particularly suitable for an assessment at the landscape level.
- They are sensitive to changes in individual habitats.
- They gather predictably at their breeding sites, which makes them suitable for quantitative sampling; they migrate seasonally; breeding and lar-

den Frühjahrs- und Sommermonaten stattfinden und somit mit dem saisonalen Anbau von gentechnisch veränderten Pflanzen (GVP) und deren spezifischen Pestizid-Behandlungen zusammenfallen.

Aufgrund der normalerweise obligaten Nutzung aquatischer Habitats während der Embryonal- und Larvalentwicklung sind Amphibien besonders geeignet, negative Effekte von GVO auf aquatische Ökosysteme anzuzeigen. Es ist zu erwarten, dass direkte Wirkungen von GVO, speziell von GVP in der Landwirtschaft, vor allem während der aquatischen Lebensphase auftreten.

Auch wenn wissenschaftliche Studien zum Thema fehlen, so muss im Sinne des Vorsorgeprinzips angenommen werden, dass GVP und ihre Produkte über die Nahrungskette (z.B. GVP-Pollen, GVP-Detritus) einen direkten Einfluss auf die Gesundheit, das Wachstum und die Entwicklung von Amphibienlarven in anbaunahen Laichgewässern haben könnten.

Indirekte Effekte können durch Veränderungen in der landwirtschaftlichen Praxis auftreten, speziell beim Anbau herbizidresistenter (HR) GVP. Ein Mehreintrag von Pestiziden, speziell Breitbandherbiziden, in die Umwelt sowie ein im Jahresverlauf variabler Einsatz ist, wie in den USA beobachtet, möglich [3]. Aufgrund von erworbenen Resistenzen bei Ackerunkräutern gegen die Breitbandherbizide [47] kann es zu einer Kombination mit konventionellen Herbiziden und einem insgesamt höheren Herbizidaufwand kommen [3].

- Eine verstärkte Reduktion der Ackerbegleitflora durch den Einsatz von Breitbandherbiziden sowie die Unverträglichkeit mit Untersaaten können zu einer Erhöhung der Bodenerosion beitragen. Zudem werden Breitbandherbizide in der Regel zusätzlich zu späteren Zeitpunkten als selektive Herbizide gespritzt. Durch das fortgeschrittene Pflanzenwachstum kann es daher über die höhere SpritzhöhenEinstellung zu einer stärkeren Abdrift kommen. Klimawandelbedingt nimmt die Wahrscheinlichkeit von fröhsommerlichen Starkregenereignissen in Westeuropa zu. Verstärkte Erosion, erhöhte Abdrift und stärkere Niederschläge können dazu führen, dass angrenzende Amphibienhabitats durch den Einsatz von Breitbandherbiziden stärker kontaminiert werden [64].
- Laichgewässers von Amphibien in der Agrarlandschaft sind häufig flache Tümpel oder Gräben, in denen Pestizide nach Starkregenereignissen akkumulieren können [31].
- Die toxischen Wirkungen eingesetzter Breitbandherbizide und/oder ihrer Formulierungen können

val development occur in spring and summer, which coincides with the seasonal cultivation of genetically modified plants (GMP) and the specific application of pesticides.

Since amphibians are typically dependent on aquatic habitats during their embryonic and larval development, they are considered a particularly sensitive indicator group for the negative effects of GMOs on aquatic ecosystems. Direct effects of GMOs, and in particular of GMP on farmland, are expected to occur primarily during the aquatic life phase.

Even in the absence of scientific studies on the subject, we must assume on the basis of the precautionary principle that GMP and their products may have a direct impact on the health, growth and development of amphibian larvae in breeding sites close to the area under cultivation via the food chain (e.g. GM pollen, detritus from GMP).

Indirect effects may occur due to changes in farming practice, in particular as a result of growing herbicide-resistant (HR) GMP. Increased pesticide input, especially broad-spectrum herbicides, into the environment and variable applications throughout the year may occur, as observed in the USA [3]. Due to the acquired resistance of weeds to broad-spectrum herbicides [47], a combination of conventional herbicides may be used with higher overall application rates and frequencies [3].

- A marked reduction in arable flora caused by the use of broad-spectrum herbicides and an intolerance of undercropping can contribute to increased soil erosion. Moreover, broad-spectrum herbicides are generally applied later in the year than selective herbicides. Increasing the spraying height to accommodate plant growth later in the growing season may lead to increased drift. The probability of heavy rainfall events in early summer is increasing in western Europe due to climate change. Greater erosion, increased drift and heavier rainfall may cause adjacent amphibian habitats to become more heavily contaminated through the use of broad-spectrum herbicides [64].
- Amphibian breeding sites on farmland are often shallow ponds or ditches where pesticides can accumulate after heavy rainfall events [31].
- The toxic effects of the broad-spectrum herbicides used and/or their formulations can affect the em-

die Embryogenese und Larvalentwicklung bei Amphibien beeinflussen und verstärkt zu Missbildungen oder erhöhter Mortalität führen [31; 45; 50]. Bei akuten Toxizitätstests zeigen Amphibienlarven häufig eine andere Empfindlichkeit als standardmäßig untersuchte Fischarten. Auf bestimmte Herbizide, z.B. Glyphosat, reagieren Amphibienlarven deutlich empfindlicher als Fische [1]. Bestimmte Breitbandherbizide scheinen in umweltrelevanten Konzentrationen zudem gefährlicher für Amphibienlarven zu sein als die selektiven Herbizide, die ersetzt werden sollen [66].

- Amphibien können in Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt und/oder von der Häufigkeit der Anwendung durch Breitbandherbizide in ihren Landlebensräumen letal geschädigt werden [50].
- Subletale Effekte der Breitbandherbizide können das Wachstum und die Entwicklungsgeschwindigkeit von Amphibien, speziell ihrer Larven, beeinflussen und zu verminderter Fitness führen [10; 34; 49; 50; 53; 58]. Die Belastung mit weiteren Pestiziden [49; 52] und Interaktionen mit ökologischen Stressfaktoren, z.B. Prädatoren- oder Parasitendruck [38; 53], verstärken solche Effekte.

Die genannten direkten und indirekten Effekte des Anbaus von GVP, die durch einen veränderten Einsatz von Pestiziden verursacht werden, können zu Veränderungen in den Abundanzen einzelner Arten bis hin zum lokalen Aussterben führen [13; 34; 49; 50; 58].

In der vorliegenden Richtlinie wird ein standardisiertes Monitoringverfahren zur Erfassung von Amphibien, speziell ihren Larven, beschrieben, das erlaubt, die Wirkung des GVP-Anbaus auf Amphibien zu bestimmen.

## 1 Anwendungsbereich

Die vorliegende Richtlinie soll beim Monitoring der Umweltwirkungen von GVO entsprechend den Maßgaben der EU-Richtlinie 2001/18/EG und der Ratsentscheidung 2002/811/EG eingesetzt werden. Das Monitoring von Amphibien zielt darauf ab, potenziell negative Einflüsse von GVO bzw. vom GVO-Anbausystem auf die Umwelt nachzuweisen. Die Richtlinie beschreibt das zu untersuchende Artenspektrum sowie die im Gelände artspezifisch anzuwendenden Erfassungsmethoden und die erforderlichen Erfassungszeiträume und -zeitpunkte. Sie legt die Auswahlkriterien der im Mittelpunkt des Amphibien-Monitorings stehenden Laichgewässer fest. Die Standardisierung der Erfassungsmethoden gewährleistet Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der aufgenommenen Da-

bryogenesis and larval development of amphibians, leading to increased deformations or higher mortality rates [31; 45; 50]. In acute toxicity tests, the sensitivity of amphibian larvae often differs from that of standard fish species. Amphibian larvae are significantly more sensitive than fishes to certain herbicides such as glyphosate [1]. Moreover, environmentally relevant concentrations of certain broad-spectrum herbicides appear to be more harmful to amphibian larvae than the selective herbicides that are intended to be replaced [66].

- Depending on application times and/or frequencies, broad-spectrum herbicides can cause lethal harm to amphibians in their terrestrial habitats [50].
- Sublethal effects of broad-spectrum herbicides can affect the growth and development rate of amphibians, and their larvae in particular, leading to reduced fitness [10; 34; 49; 50; 53; 58]. Contamination with further pesticides [49; 52] as well as interactions with ecological stress factors such as predatory or parasitic pressure [38; 53] intensify such effects.

The cited direct and indirect effects of GMP cultivation caused by changes in the way farmers use pesticides may lead to changes in the abundance of individual species and even to localised extinctions [13; 34; 49; 50; 58].

This standard describes a standardised monitoring method for sampling amphibians, and their larvae in particular, which enables the impact of GMP cultivation on amphibians to be determined.

## 1 Scope

The present standard is intended to be used to monitor the environmental effects of genetically modified organisms (GMOs) based on the provisions of EU Directive 2001/18/EC and Council Decision 2002/811/EC. The aim of amphibian monitoring is to detect potentially adverse effects of GMOs and GMO cultivation systems on the environment. This standard describes the species spectrum to be investigated as well as the sampling methods to be used for different species on the study site and the sampling periods and timeframes required. It defines criteria for selecting the breeding sites, which generally are the focal point of amphibian monitoring. The standardisation of sampling methods ensures that the data obtained are reproducible and comparable. The standard stipu-

ten. Es werden Vorgaben zum Untersuchungsdesign und -umfang sowie zur Auswertung gemacht.

Die Richtlinie beschreibt im Einzelnen Methoden, mit denen potenzielle Auswirkungen des Anbaus von GVP auf Individuen und Populationen festgestellt werden können. Die Anwendung der Richtlinie soll sicherstellen, dass über eine repräsentative Beprobung regionale und überregionale Effekte erfasst werden. Durch die vorgegebene Methodik ist gewährleistet, dass die Ergebnisse dieser Studien später im Sinne einer Metaanalyse zusammengefasst und für weitergehende Analysen zu GVO-Effekten verwendet werden können.

## 2 Normative Verweise

Das folgende zitierte Dokument ist für die Anwendung dieser Richtlinie erforderlich:

VDI 4330 Blatt 1:2006-10 Beobachtungen ökologischer Wirkungen gentechnisch veränderter Organismen; Gentechnisch veränderte Pflanzen; Grundlagen und Strategien

lates requirements for the design, scope and subsequent analysis of the study.

The standard describes in detail methods for determining the potential effects of GMP cultivation on individuals and populations. The use of this standard should ensure that both on-site effects and off-site effects are detected through representative sampling. The prescribed methodology is designed to ensure that the results from these studies can be combined in a meta-analysis and thus made available for further analysis of the effects of GMOs.

## 2 Normative references

The following referenced document is indispensable for the application of this standard:

VDI 4330 Part 1:2006-10 Monitoring the ecological effects of genetically modified organisms; Genetically modified plants; Basic principles and strategies