

Tagungsbeitrag zu: DBG-Jahrestagung  
Titel der Tagung: Böden - Eine  
endliche Ressource  
DBG, 5.-13. September 2009, Bonn  
Berichte der DBG (nicht begutachtete  
online Publikation)  
<http://www.dbges.de>

## **Böden und gentechnisch veränderter Mais (Bt-Mais) Teil I - Quantifizierung der Sorption von Cry3Bb1 an Bodenfraktionen einer Freisetzungsfäche**

Heinz Hunfeld<sup>1\*</sup>, Christian Ahl<sup>2</sup>,  
Frank Gessler<sup>1</sup>, Jürgen Niemeyer<sup>1</sup>,  
Sibylle Pagel-Wieder<sup>1</sup>

### **1 Zusammenfassung**

Die Sorption des Cry3Bb1 Proteins aus Bt-Mais an drei Größenfraktionen der Böden einer Freisetzungsfäche und der Einfluss von pH-Wert und Ionenstärke auf die Sorption von Cry3Bb1 wurden untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Abhängigkeit der Sorption von der Partikelgröße. Der pH-Werte zeigte einen unklaren Einfluss, während die Sorption in Anwesenheit von Calcium in der Hintergrundlösung stark zunahm.

Schlüsselworte: *Bacillus thuringiensis*,  
Cry3Bb1-Protein, Adsorption, pH-  
Abhängige Sorption, Ionenstärke

<sup>1</sup>Institut für angewandte Biotechnologie der Tropen an der  
Georg-August-Universität Göttingen, 37077 Göttingen  
<sup>2</sup>Abt Agrarpädologie, DPNW, Georg-August-Universität  
Göttingen  
\*E-Mail: Heinz.Hunfeld@gmx.de

### **2 Einleitung**

Das Cry3Bb1 Protein besitzt eine spezifische Toxizität gegen den Maiswurzelbohrer (*Diabrotica virgifera*) und wird in der gentechnisch veränderten Maislinie MON88017 exprimiert. Pflanzen dieser Maissorte sind dadurch Resistent gegen dieses Schadinsekt.

Das Cry3Bb1 Protein gelangt nach der Ernte aus den Ernterückständen, aber auch während der Vegetationsperiode, z.B. über Pollen und Wurzelexsudate, in die Böden der Anbauflächen. Durch Sorption an Bodenbestandteilen wird der mikrobiologische Abbau der Proteine gehemmt, während ihre insektizide Wirkung erhalten bleibt (Saxena & Stotzky, 2000).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Größenfraktionen, sowie die Einflüsse von pH-Wert und Ionenstärke auf die Sorption des Cry3Bb1 Proteins untersucht.

### **3 Material und Methoden**

Die Bodenproben für die verschiedenen Untersuchungen zur Sorption von Cry3Bb1 stammen von einer Freisetzungsfäche, auf der Bt-Mais angebaut wurde. Das Versuchsfeld lag an einem Hang im Maintal, in der Nähe von Würzburg und war in 4 Reihen (A-D) mit je 8 Parzellen (je 31 x 40 m) unterteilt.

Um die Heterogenität des Standortes zu erfassen wurden von allen Parzellen aus dem Oberboden (0-20 cm) und dem

Unterboden (40-60 cm) Mischproben entnommen. Die Proben wurden luftgetrocknet und < 2 mm (Feinerde) gesiebt. Die Fraktion < 63 µm wurde mittels Trockensiebung gewonnen. Nach Dispergierung der Feinerde in Wasser, ohne Zusatz chemischer Dispergierungsmittel, wurde die Tonfraktion < 2 µm durch Sedimentation gewonnen und anschließend gefriergetrocknet. Die Produktion des Cry3Bb1-Proteins wurde mit einem transformierten *E. coli* Stamm durchgeführt und von J. Jehle (DLR Rheinpfalz, Neustadt a. d. Weinstr.) freundlicherweise für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Zur Erstellung der Sorptionsisothermen an den Proben der drei Fraktionen der Böden der Freisetzungsfläche wurde zu den sterilen dispergierten Bodenproben (Einwaage Tonfraktion: 10 mg, Fraktion < 63 µm: 20 mg, Feinerde: 50 mg) je 1 mL Cry3Bb1-Lösung steigender Konzentration (0-140 ng · mL<sup>-1</sup>) in 1,5 mL Reaktionsgefäßen zugegeben. Die Suspensionen wurden 30 min geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Die Cry3Bb1-Konzentrationen in Ausgangs- und Gleichgewichtslösung wurden mittels Enzyme-linked immunosorbent assay (Bt-Cry3Bb1 PathoScreen, DAS ELISA-Kit, Agdia, Elkhart, IN, USA) bestimmt. Die Sorption von Cry3Bb1 an die Bodenproben wurde aus der Differenz von Ausgangs- und Gleichgewichtskonzentration berechnet.

Die Versuche bei Variation des pH-Wertes und der Ionenstärke wurden mit Proben der Tonfraktion des Oberbodens durchgeführt.

Zur Bestimmung des Einflusses des pH-Wertes auf die Sorption wurden die pH-Werte der Lösungen durch Zugabe von 0,1 M HCl bzw. 0,1 M NaOH eingestellt. Es wurde je Probe ein Sorptionspunkt, bei Zugabe von 140 ng · mL<sup>-1</sup> Cry3Bb1-Lösung, in dreifacher Wiederholung aufgenommen.

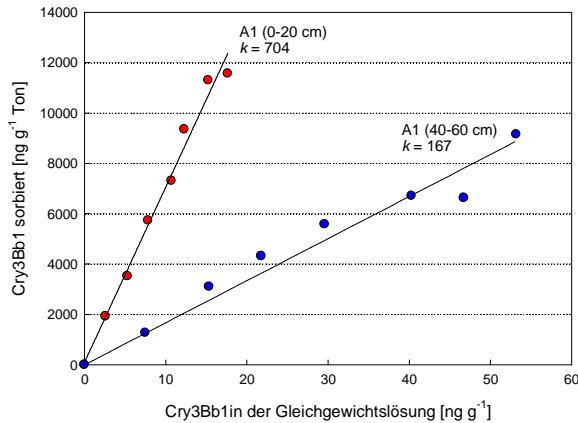
Zur Einstellung der Ionenstärken in den wässrigen Suspensionen wurden CaCl<sub>2</sub>-, NaCl- bzw. KCl-Lösungen zugegeben. Dabei wurden in den Reaktionsgefäßen folgende Konzentrationen eingestellt, die in einem für einen Ackerstandort typischen Bereich liegen: Ca<sup>2+</sup>: 2,25 mmol · L<sup>-1</sup>, Na<sup>+</sup>: 0,7 mmol · L<sup>-1</sup>, K<sup>+</sup>: 0,4 mmol · L<sup>-1</sup>.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Die Sorption von Cry3Bb1 an die Proben der drei untersuchten Fraktionen lässt sich mathematisch mit einer linearen Isotherme beschreiben:

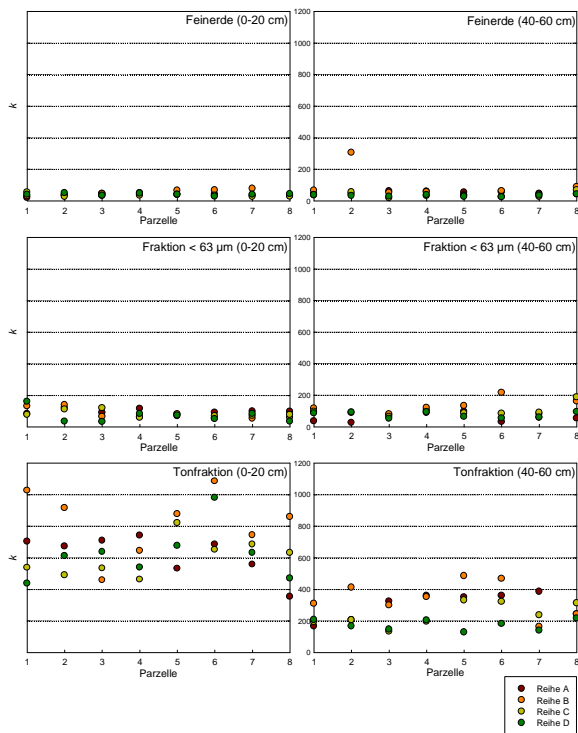
$$X_S = k \cdot X_L$$

$X_S$  ist die Menge an Cry3Bb1 Protein, die an die Probe sorbiert wurde und  $X_L$  der Anteil des Proteins, der im Gleichgewicht in der Lösung gemessen wurde. Der Parameter  $k$  ist ein Maß für die Affinität des Sorbenten gegenüber dem Cry3Bb1-Protein und der Verteilung des Cry-Moleküls auf der Partikeloberfläche.



**Abb. 1: Sorptionsisothermen für die Sorption des Cry3Bb1 Proteins an die Proben A1 (0-20 und 40-60 cm) der Tonfraktion**

### Sorption des Cry3Bb1 Proteins an die Bodenfraktionen



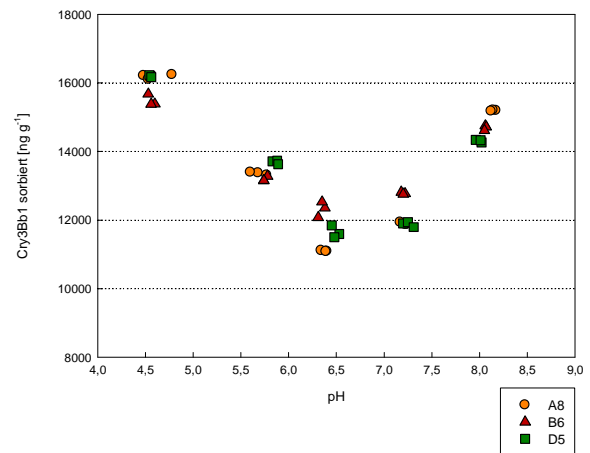
**Abb. 2: Verteilung der k-Werte für die Sorption des Cry3Bb1 Proteins an die drei Bodenfraktionen, nach Reihe und Parzelle**

Bei der Sorption des Cry3Bb1 Proteins an die drei Größenfraktionen < 2 mm, < 63 µm und < 2 µm, fällt ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Partikelgröße der einzelnen Fraktionen

und dem Verteilungskoeffizienten  $k$  auf (siehe Abb. 2).

### Variation des pH-Wertes

Die sorbierte Proteinmenge nimmt bei den drei untersuchten Proben von pH 4,5 bis pH 6,5 stetig ab. Oberhalb des isoelektrischen Punkts (IEP) des Cry3Bb1 Proteins bei pH 5,9 steigt die sorbierte Proteinmenge wieder an (Abb.3).



**Abb. 3: Adsorption des Cry3Bb1 Proteins an die Tonfraktion der Parzellen A8, B6 und D5 aus dem Oberboden, bei Variation des pH-Wertes**

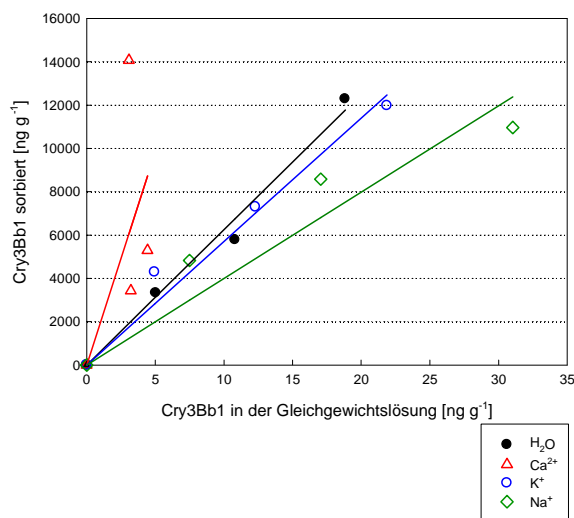
Bei pH-Werten unterhalb des IEP von Cry3Bb1 kann es zu einer Verstärkung der Sorption kommen, da es zu einer Anziehung zwischen der, in diesem pH-Bereich, positiv geladenen Protein-oberfläche und der negativ geladenen Tonmineraloberfläche kommt.

Oberhalb des IEP des Cry3Bb1 Proteins kommt es zu einer erneuten Zunahme der Sorption. Dieses Verhalten konnte bislang nicht abschließend erklärt werden.

### Variation der Ionenstärke

Die untersuchten Proben zeigen eine deutliche Zunahme der Sorption, wenn Calcium als Hintergrundelektrolyt in der Lösung vorliegt.

Zwischen der Variante H<sub>2</sub>O (kein Hintergrundelektrolyt) und den Varianten mit Kalium bzw. Natrium im Hintergrund sind jedoch keine Unterschiede zu beobachten (Abb.4).



**Abb. 4: Adsorption des Cry3Bb1 Proteins an die Probe A8 der Tonfraktion (0-20 cm) bei Variation der Ionenstärke**

Für die stärkere Sorption in Gegenwart von Calcium gibt es mehrere mögliche Erklärungen:

- Calcium erhöht als zweiwertiges Kation die Sorption, da es als Brückenkation zwischen der negativ geladenen Tonmineraloberfläche und dem Protein fungiert.
- durch die Erhöhung der Ionenstärke könnte sich die Dicke der diffusen Doppelschicht verringern. Somit

könnten die Cry3Bb1 Proteine bedingt durch den geringeren Abstand zwischen Protein und Bodenpartikeloberfläche besser an die Oberfläche der Bodenpartikel gelangen.

---

### Danksagung

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen FKZ 0313279G gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

### Literatur

Saxena, D., Stotzky, G., 2000. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic *Bt*-corn in vitro and in situ. FEMS Microbiology Ecology 33, 35-39.