

Drei-Kronen-Gasse 2
D – 93047 Regensburg
Tel.: +49 (0) 941-2977761
Fax: +49 (0) 941-2977762

Schlussbericht

Validierung eines Nematodenbiotests zum Nachweis der Bioverfügbarkeit und Toxizität von B.t.-Toxinen im Boden

im Rahmen des Verbundprojekts

*Freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung transgener Maissorten mit neuen
Bt-Genen: Entwicklung und Validierung von Monitoringmethoden*

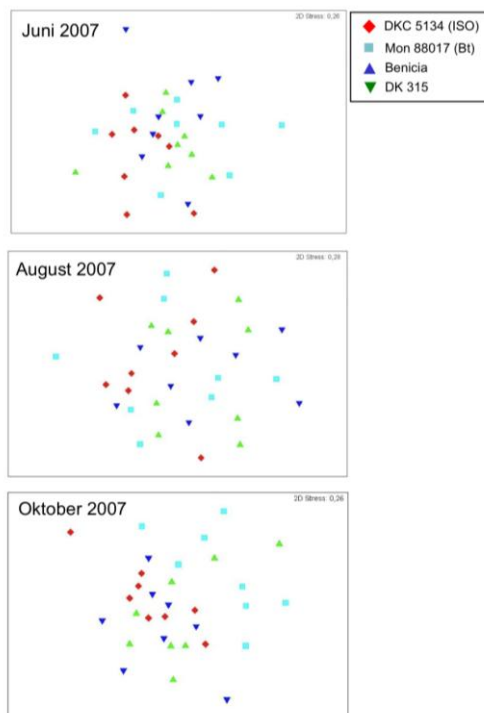
Förderkennzeichen: 0313279B

Sebastian Höss

Errata

In Abb. 14 befindet sich folgender Fehler:

Die Erklärungen der Symbole in der Legende wurden falsch zugeordnet. Folgende Abbildung enthält die richtige Legende:



Dadurch ergeben sich bei der Beschreibung der Resultate, sowie bei den Schlussfolgerungen folgende Änderungen:

— 1.3 Einfluss von Bt-Mais auf *in-situ* Nematoden

Punkt (h):

Statt:

„Im Oktober kann man dann eine Tendenz der Auftrennung der Maissorten erkennen. Zumindest die Parzellen der isogenen Sorte (DKC5134) scheinen sich von den übrigen abgesetzt zu haben (signifikante Unterschiede zu Benicia und DK315; $p < 0,05$, ANOSIM).“

muss es heissen:

„Die Parzellen der Bt -Sorte (Mon88017) scheinen sich von den übrigen abgesetzt zu haben (signifikante Unterschiede zur isogenen Sorte DKC5234 und zu Benicia; $p < 0,05$, ANOSIM). Die Unterschiede konnten nicht durch die gemessenen Bodenparameter (pH; Korngröße; organisches Material) erklärt werden.“

— 1.4 Schlussfolgerungen

Statt

„Auch diese Ergebnisse bestätigten die Unbedenklichkeit von Mon88017 für freilebende Nematoden.“

muss es heißen:

„Nematodenabundanzen, -diversität und die Zusammensetzung der Ernährungstypen unterschieden sich nicht zwischen den verschiedenen Maissorten. Allerdings zeigten sich signifikante Unterschiede in der Gattungszusammensetzung zwischen der Bt-Sorte und der isogenen und einer konventionellen Sorte. Direkte Cry3Bb1-Effekte sind auf Grund der niedrigen Konzentrationen im Boden unwahrscheinlich. Indirekte Effekte der Bt-Pflanzen auf die Nematodengemeinschaften (z.B. über veränderte Pflanzen- oder Bodeneigenschaften, die nicht gemessen wurden) können allerdings nicht ausgeschlossen werden.“

I Kurze Darstellung

1. Aufgabenstellung

Die Zielsetzung des Teilprojekts wurde auf Grund der Zwischenergebnisse im Laufe des Projekts in Absprache mit dem Koordinator und dem Projektträger modifiziert und unterscheidet sich daher in manchen Punkten von der ursprünglichen Zielsetzung im Projektantrag.

Die Untersuchungen dieses Teilprojekts hatten zum Ziel, ein Biotest-Verfahren zur Abschätzung des Risikos von Bt-Mais, bzw. Cry-Proteinen, auf Nicht-Zielorganismen im Boden zu validieren. Als Testorganismen wurde *Caenorhabditis elegans*, als Vertreter einer für Agrarökosysteme sehr wichtigen Organismengruppe, der Nematoden, gewählt. Als Fallbeispiel diente der transgene Mais Mon88017, der durch die Expression des Toxins Cry3Bb1 in der Lage ist sich vor dem Schädling, *Diabrotica virgifera* (westlicher Maiswurzelbohrer; Coleoptera, Insecta) zu schützen. Außerdem sollte das Risiko der transgenen Maissorte Mon88017 auf freilebende Nematoden abgeschätzt werden.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Zentraler Bestandteil dieses Verbundprojekts war das Versuchsfeld, auf dem die verschiedenen Maissorten, unter anderem auch die transgene Maissorte, angepflanzt wurden. Dies erforderte die Koordination der Probenahmen und des Probenaustauschs, um eine vergleichende Analyse der Daten zu gewährleisten.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Teilprojekt war in drei Module unterteilt (Abb. 1):

(a) Toxizität von Cry-Proteinen auf *C. elegans*:

Zur Erforschung des potentiellen Risikos von Cry-Proteinen auf Nematoden, wurden Toxizitätstests mit wässrigen Proteinlösungen und Cry-Protein produzierenden Bakterien (*E. coli*) durchgeführt. Die Versuche dienten dazu, die Empfindlichkeit der Nematoden gegenüber den relevanten Cry-Proteinen zu überprüfen, Informationen über mögliche Wirkmechanismen zu erhalten und dadurch die Ergebnisse aus Versuchen mit Freilandproben richtig einschätzen zu können.

(b) Ökotoxikologische Untersuchung von Böden eines Versuchsfelds mit Bt-Mais anhand von Single-Species-Tests mit *C. elegans*:

Durch die ökotoxikologische Untersuchung von Boden eines Versuchsfelds, auf dem sowohl eine transgene, die entsprechende isogene, als auch konventionelle Maissorten angebaut wurden, sollte die Eignung des Nematodentests als Mittel der Umweltverträglichkeitsprüfung in der freisetzungsbegleitenden Forschung und das potentielle Risiko des mit Cry3Bb1 belasteten Bodens überprüft werden. Diese Versuche wurden über den Zeitraum von zwei Vegetationsperioden (2005, 2006) durchgeführt.

(c) Untersuchung der *in-situ* Nematodenlebensgemeinschaft in Boden eines Versuchsfelds mit Bt-Mais:

In der dritten Vegetationsperiode (2007) sollten Wirkungen auf einer höheren ökologischen Stufe (der Stufe der Lebensgemeinschaften) erfasst werden. Dazu wurde die Struktur der Nematodenlebensgemeinschaften in Versuchspartellen mit verschiedenen Maissorten an drei Zeitpunkten untersucht.

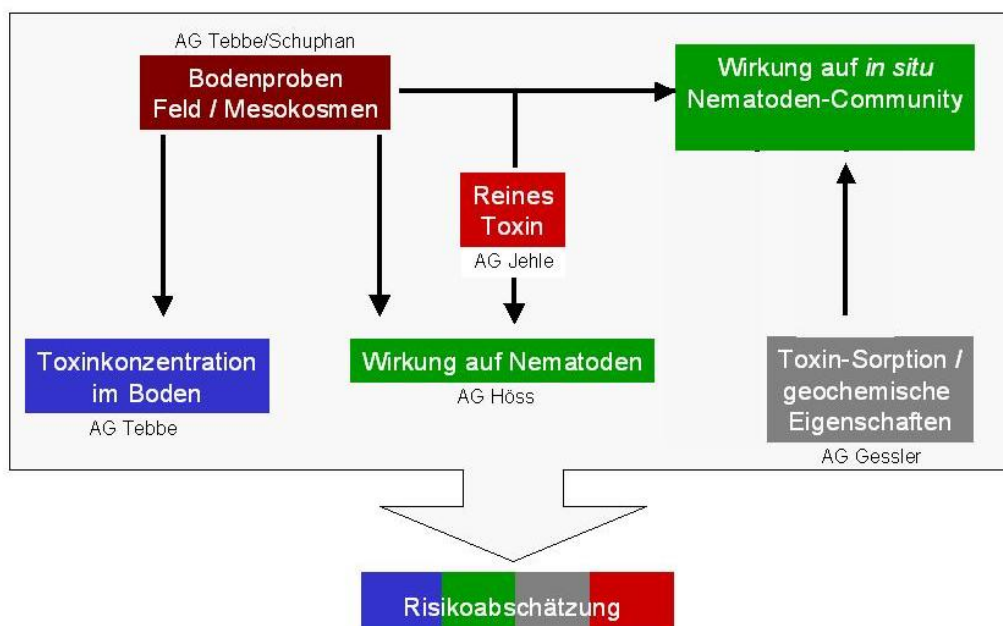


Abb. 1: Schema der Verzahnung der verschiedenen Arbeitsmodule dieses Projekts im Verbund.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, and den angeknüpft wurde

Trotz der spezifischen Wirkungsweise von *Bt*-Toxinen, konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass auch Nichtzielorganismen von *Bt*-Mais bzw. *Bt*-Toxinen geschädigt werden können. Die Studien, die mit Nichtzielorganismen durchgeführt wurden, erbrachten allerdings widersprüchliche Ergebnisse. Hilbeck et al. fanden in Fütterungsversuchen bei

räuberische Florfliegen (*Chrysperla carnea*; Neuroptera: Chrysopidae) einen durch die Beute vermittelten Effekt von transgenem *Bt*-Mais, der sich in signifikant höherer Mortalität der Florfliegenlarven äußerte. Der Aufnahmepfad (direkte Aufnahme oder über eine herbivore Beute) und der Ursprung des Toxins (von der transgenen Pflanze oder in künstlichem Futter) spielte dabei für den Grad der Mortalität eine wichtige Rolle (Hilbeck et al., 1998a; Hilbeck et al., 1998b). Die gleiche Florfliegenart zeigte sich allerdings nicht sensitiv gegen Cry1Ab, so dass die Autoren direkte Effekte von *Bt*-Toxinen unter Feldbedingungen ausschlossen (Romeis et al., 2004).

Die Beispiele der Wirkung von *Bt*-Toxinen auf Nichtziel-Insekten stellt die spezifische Wirkung der Toxine in Frage, wenn die Nichtziel-Organismen mit toxinhaltigem Futter in Kontakt kommen. Auch im Boden können sich *Bt*-Toxine anreichern, wenn sie dorthin über Wurzelexudate (Saxena et al., 1999) oder das Einpflügen von Ernteresten in die Erde gelangen (Zwahlen et al., 2003a). Die Toxine können im Boden an Ton und Humus binden (Crecchio and Stotzky, 1998; Tapp and Stotzky, 1998) und sich dadurch anreichern. Durch diese Bindungsform bleiben sie vor Abbau geschützt und ihre insektizide Aktivität bleibt erhalten (Koskella and Stotzky, 1997). Somit sind auch Bodenbewohner *Bt*-Toxinen exponiert.

Während der Springschwanz, *Folsomia candida* (Collembola, Isotomidae), den isogenen Mais dem *Bt*-Mais als Futter vorzog, war das bei anderen Collembolen-Arten nicht der Fall (Bakonyi et al., 2006). Wachstum und Reproduktion des Collembolen, *Protaphorura armata*, (Collembola: Onychiuridae) wurden weder durch die Anwesenheit von *Bt*-Mais, noch durch Cry1Ab-kontaminiertes Futter beeinflusst (Heckmann et al., 2006). Der Effekt von Cry1Ab auf Regenwürmer war gering oder nicht vorhanden (Saxena and Stotzky, 2001; Vercesi et al., 2006; Zwahlen et al., 2003b). Für Cry3Bb1, das Toxin des Diabrotica-resistenten Mais, konnte bisher noch keine Wirkung auf Bodenbewohner gezeigt werden (*Lumbriculus terrestris*: Ahmad et al., 2006b; Arthropods: Ahmad et al., 2006a).

Auch die Ergebnisse zur Wirkung von *Bt*-Mais auf Nematoden sind nicht einheitlich. In manchen Feldstudien konnte bereits gezeigt werden, dass *Bt*-Mais eine negative Wirkung auf bestimmte Nematoden-Ernährungstypen hat (Griffiths et al., 2005; Manachini and Lozzia, 2002). Andere Feld- und Gewächshausstudien konnten diese Effekte allerdings nicht bestätigen (Griffiths et al., 2007; Saxena and Stotzky, 2001). Es gibt allerdings einige Studien, die zeigen, dass *Bt*-Toxine eine schädliche Wirkung auf einzelne Nematodenarten haben können (Belair and Cote, 2004; Borgonie et al., 1996; Leyns et al., 1995; Meadows et al., 1990; Wharton and Bone, 1989). Spezifische Klassen von nematiziden *Bt*-Toxinen (Cry5, Cry6) haben sogar eine sehr starke toxische Wirkung auf einige Nematodenarten (*Caenorhabditis elegans*, *Panagrellus redivivus*, *Pristionchus*

pacificus; (Wei et al., 2003). Griffiths et al. (2003) zeigten, dass Kohlenhydrat-Rezeptoren, die sich auf Darmzellen von *C. elegans* befinden und von sog. *bre*-Genen codiert werden, mit Cry-Proteinen interagieren können, den Toxinen den Eintritt in die Zelle und dadurch eine Schädigung ermöglichen. Dieser Wirkungsmechanismus ist dem der Insekten sehr ähnlich (Schnepf et al., 1998). Bei *C. elegans* wurde außerdem ein Verteidigungsmechanismus gegen Cry-Proteine entdeckt (Huffman et al., 2004). Mutante Stämme von *C. elegans* (z.B. *sek-1*), die diese Fähigkeit der Verteidigung verloren haben, sind empfindlicher gegen bestimmte Cry-Proteine als der Wildtyp.

Freilebende, nicht parasitische Nematoden sind für die Funktionsfähigkeit von Böden von großer Bedeutung. Nematoden bilden die arten- und individuenreichste Organismengruppe in Böden (Andrassy, 1992; Yeates, 1981). Durch die Ausbildung einer Vielzahl von Ernährungstypen besetzen Nematoden Schlüsselstellen in terrestrischen Nahrungsnetzen (Yeates et al., 1993) und beeinflussen dadurch den Nährstoffkreislauf in Böden (Ingham et al., 1985; Yeates et al., 1982). Die Präsenz von Nematoden und die Zusammensetzung der Nematodenlebensgemeinschaften in Böden sind also auch wichtige Faktoren für die landwirtschaftliche Produktion und Nachhaltigkeit (Fiscus and Neher, 2002). Nematoden erfüllen daher wichtige Kriterien für die Eignung als ökologische Indikatoren für Monitoring und Bewertung von landwirtschaftlich genutzten Flächen (Hess et al., 2000; Neher et al., 1995).

Der Nematode *Caenorhabditis elegans* wird in vielen Bereichen der biologischen und medizinischen Wissenschaft gerne als Studienobjekt verwendet. Die Vielseitigkeit in der Verwendung von *C. elegans* liegt am einfachen anatomischen und genetischen Aufbau, an der einfachen Kultivierbarkeit und der kurzen Generationszeit des Organismus (Riddle et al., 1997). Auch in der Ökotoxikologie wurde *C. elegans* bereits als Testorganismus verwendet: Bioakkumulationsstudien (Haitzer et al., 1999); Screening für Mutagenität (Lew et al., 1983); Endokrine Effekte (Höss and Weltje, 2007); Toxizitätsstudien in Böden (Donkin and Dusenbery, 1993; Peredney and Williams, 2000), Sedimenten (Höss et al., 1999) und Abwasser (Hitchcock et al., 1997). Standardisierte Verfahren liegen bereits vor (ASTM, 2001; ISO, 2007).

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die reibungslose Kooperation innerhalb des Verbunds mit dem Koordinator (RWTH Aachen) und einigen anderen Partnern (FAL, Braunschweig; DLR Neustadt WStr.) war für den Erfolg dieses Teilprojekts von entscheidender Bedeutung.

II Eingehende Darstellung der erzielten Ergebnisse und des Verwertungsplans

1. Erzielte Ergebnisse

1.1. Toxizität von reinem Cry3Bb1 auf *Caenorhabditis elegans*

1.1.1. Einfluss des Nährmediums (pH; Futterdichte) auf die Toxizität von Cry3Bb1

In Vorversuchen sollte das richtige Nährmedium zur Untersuchung von wässrigen Cry-Protein-Lösungen mit dem Nematodentest gefunden werden. Zum einen wurde der Test in Medien verschiedener Salz-Zusammensetzung durchgeführt: a. M9-Medium (Phosphatpuffer: 6 g Na_2HPO_4 , 3 g KH_2PO_4 , 5 g NaCl, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \text{ l}^{-1}$) puffert das Medium auf pH 7.2.; b. K-Medium (3,1 g NaCl, 2,4 g KCl l^{-1}) ist ein Minimalmedium, welches den pH-Wert nicht puffert. Da die Cry-Protein-Stammlösungen in Pufferlösungen sind (Cry3Bb1: Bicarbonat-Puffer; Cry1Ab: CAPS-Puffer) mit einem pH-Wert von ca. 10, war zu vermuten, dass durch die pH-Wert-Änderung im M9-Medium, die Struktur des Proteins und dadurch auch die Aktivität verändert wird. Die Ergebnisse zeigen, dass Cry3Bb1 im K-Medium (EC50: Wachstum: 102 mg l^{-1} , Reproduktion: 55 mg l^{-1}) eine höhere Toxizität auf *C. elegans* besitzt als im M9-Medium (EC50: Wachstum: > 186 mg l^{-1} , Reproduktion: 58 mg l^{-1}) (Abb. 2). Die weiteren Versuche wurden also ungepuffert in K-Medium durchgeführt.

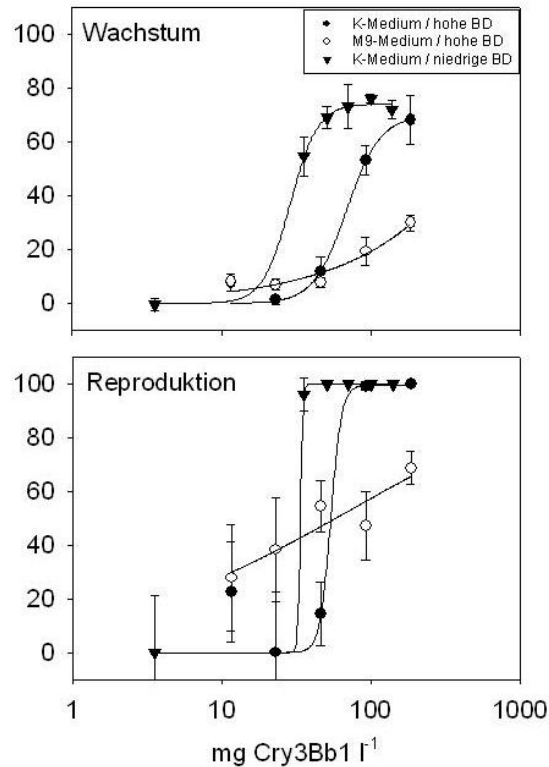


Abb. 2: % Hemmung von Wachstum und Reproduktion von *C. elegans* nach 96h Exposition in wässrigen Cry3Bb1-Lösungen verschiedener pH-Pufferkapazität bzw. Futterdichte; schwarze Kreise: K-Medium mit hoher Bakteriendichte (BD); weiße Kreise: K-Medium mit niedriger Bakteriendichte; schwarze Dreiecke: M9-Medium mit hoher Bakteriendichte.

Da es wahrscheinlich ist, dass die Cry-Proteine sich auch an die Futterbakterien binden, die sich im Testsystem befinden, wurde vermutet, dass sich die Bakteriendichte (BD) im Test auf die Verfügbarkeit der Cry-Proteine für die Testorganismen und dadurch auf die Toxizität auswirkt. Die Toxizität von Cry3Bb1 wurde deshalb bei zwei unterschiedlichen Bakteriendichten aufgenommen (hohe BD: $2,2 \times 10^9$ Zellen ml⁻¹, niedrige BD: $0,6 \times 10^9$ Zellen ml⁻¹). Die Ergebnisse zeigten, dass Cry3Bb1 bei geringerer BD (EC50: Wachstum: 28 mg l⁻¹, Reproduktion: 34 mg l⁻¹) eine höhere Toxizität auf *C. elegans* hatte als bei der hohen BD (EC50: Wachstum: 102 mg l⁻¹, Reproduktion: 55 mg l⁻¹; Abb. 2).

1.1.2. Vergleich mit Cry1Ab

Der Vergleich mit der Toxizitäten verschiedener zeigt, dass *C. elegans* Cry3Bb1 gegenüber empfindlicher ist als Cry1Ab (Abb. 3). Ein Vergleich mit anderen Umweltschadstoffen (z.B. Schwermetalle; Pestizide) zeigt, dass die Cry-Proteine auf

Grund des hohen Molekulargewichts ähnliche und z.T. sogar höhere molare Toxizitäten aufweist (Tab. 1).

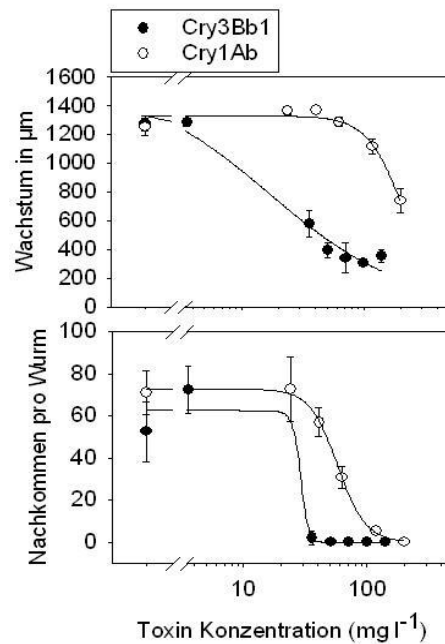


Abb. 3: Wachstum (μm) und Reproduktion (Nachkommen pro Wurm) von *C. elegans* nach 96h Exposition in wässrigen Cry-Proteinlösungen; schwarze Kreise: Cry3Bb1; weiße Kreise: Cry1Ab.

Tab. 1: Vergleich der EC50-Werte für Reproduktion verschiedener Schadstoffe auf Basis molarer Konzentrationen ($\mu\text{M} = \mu\text{mol l}^{-1}$).

Substanz	EC50 Reproduktion (μM)	Quelle
Cry3Bb1	0,4	Dieser Bericht
Cry1Ab	0,7	Dieser Bericht; Höss et al. (2008)
Cry14A	< 0,001	Wei et al. (2003)
Cry21A	< 0,001	Wei et al. (2003)
Cry5A	< 0,001	Wei et al. (2003)
Parathion	6,6	Höss et al. (2007)
Abamectin	0,1	Höss et al. (2006)
Cadmium	1,7	Traunspurger et al. (1997)

1.1.3. Versuche zum Wirkungsmechanismus von Cry3Bb1 und Cry1Ab

Um zu untersuchen, ob Cry3Bb1 bzw. Cry1Ab über den gleichen Wirkmechanismus auf *C. elegans* wirken wie die nematiziden Cry-Proteine (Cry5/Cry6), wurden folgende Versuchsansätze gewählt (siehe auch Abb. 4):

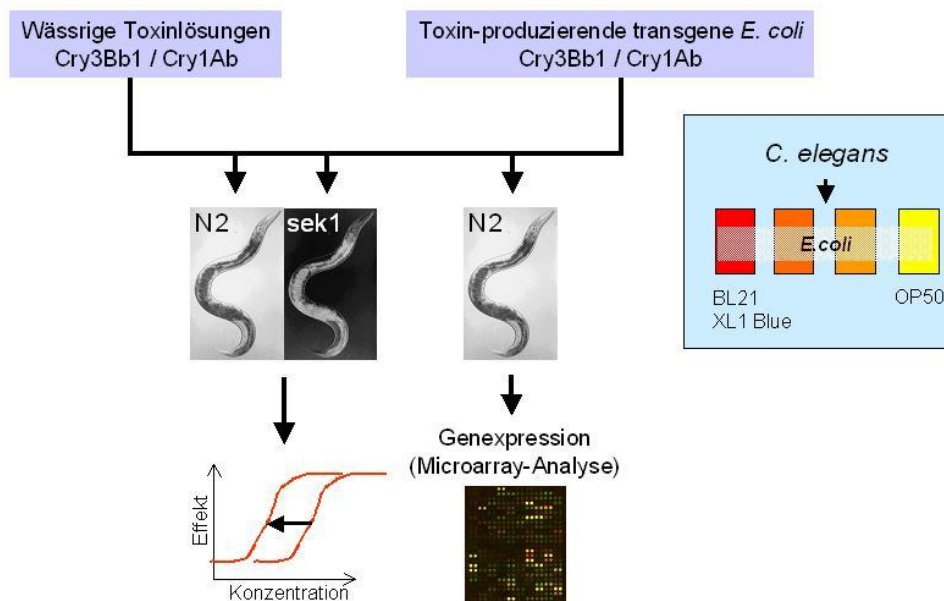


Abb. 4: Versuchsschema zu Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Cry1Ab und Cry3Bb1.

- a. Sowohl der Wildtyp (N2) als auch der Bt-sensitive, mutante Stamm (*sek-1*) wurden Cry3Bb1 und Cry1Ab exponiert. Die Exposition fand zum einen direkt über die Fütterung von Cry-Protein produzierenden Bakterien (transgene *E. coli*-Stämme: BL21 und XL1 Blue) zum anderen in wässriger Proteinlösung (nur Cry3Bb1) statt. Es sollte geklärt werden, ob der Bt-sensitive Stamm auch gegenüber insektiziden Cry-Proteinen sensitiver ist. Die Versuche mit transgenen Bakterien wurden im Labor der AG Jehle in Neustadt a. d. WStr. durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Fütterung der Cry3Bb1-produzierenden *E. coli* keinen Effekt auf die Nematoden zeigten, weder auf den Wildtyp, noch auf den Bt-sensitiven

Stamm (*sek-1*) (Abb. 5a). Da es möglich ist, dass die für die Nematoden verfügbare Proteinmenge zu gering war um eine Wirkung hervorzurufen, ist es nicht möglich eine Aussage darüber zu machen, ob *sek-1* sensitiver gegenüber Cry3Bb1 ist oder nicht. Deshalb wurden die zwei Stämme auch einer wässrigen CryBb1-Lösung verschiedener Proteinkonzentration ausgesetzt, um Dosis-Wirkungskurven vergleichen zu können. Die Ergebnisse zeigen, dass *sek-1* nicht empfindlicher gegenüber Cry3Bb1 ist als der Wildtyp. Der Verteidigungsmechanismus, für welchen das Gen *sek-1* mitverantwortlich ist, scheint für die Verteidigung gegen Cry3Bb1 keine Rolle zu spielen.

Bei Cry1Ab sieht das Bild etwas anders aus. In Abbildung 5b kann man erkennen, dass das Wachstum beider *C. elegans* Stämme nach Fütterung der unverdünnten Suspension der Cry1Ab-*E. coli* deutlich gehemmt wurde. Während beim Wildtyp die Hemmung bereits nach einer 1:1-Verdünnung nicht mehr zu beobachten war, benötigte es beim Bt-sensitiven Stamm *sek-1* eine 1:10-Verdünnung, um die Hemmung wieder aufzuheben. Dies weist darauf hin, dass der Verteidigungsmechanismus, für welchen das Gen *sek-1* mitverantwortlich ist, in Anwesenheit von Cry1Ab angeschaltet wird.

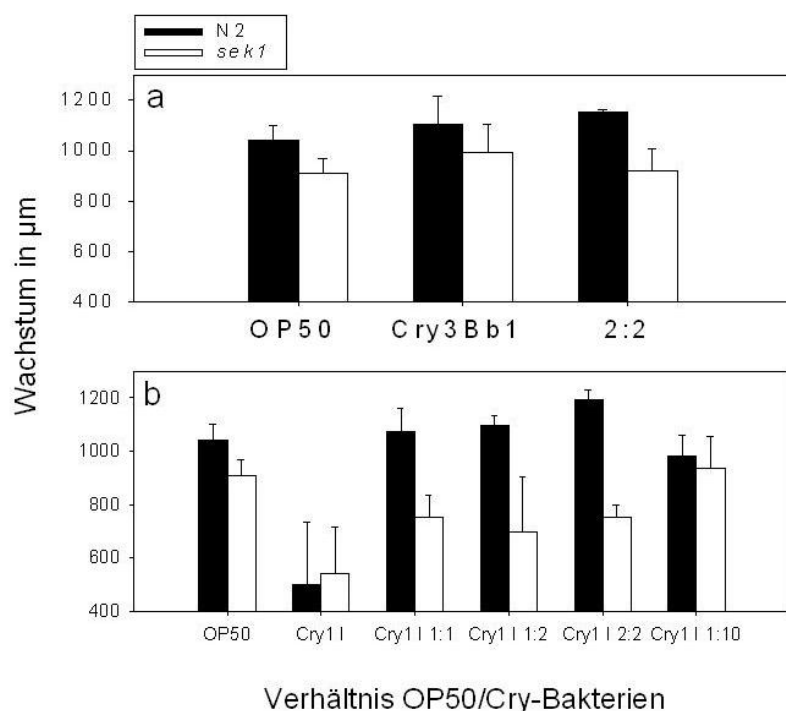


Abb. 5: Wachstum (μm) von *C. elegans* nach 96h Exposition in Suspensionen von *E. coli* OP50 (Negativkontrolle) und transgenen *E. coli*-Stämmen: (a) BL21 und (b) XL1 Blue.

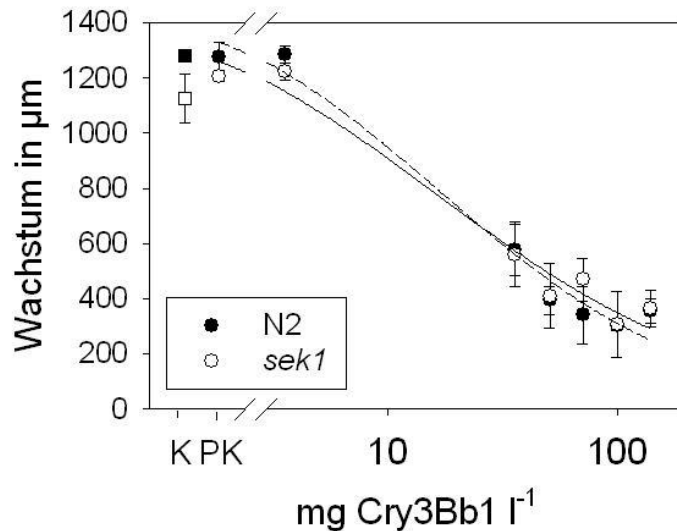


Abb. 6: Wachstum (μm) zweier Stämme von *C. elegans* nach 96h Exposition in wässrigen Lösungen von Cry3Bb1; schwarze Symbole: Wildtyp N2; weiße Symbole: *Bt*-sensitiver Stamm *sek-1*; K: Kontrolle ohne Puffer; PK: Pufferkontrolle.

b. Nach Fütterung des Wildtyps (N2) mit Cry-Protein produzierenden Bakterien (transgene *E.coli*-Stämme: BL21 und XL1 Blue) wurde die Expression zweier für den Verteidigungsmechanismus gegen Cry-Proteine verantwortlichen Genen (*ttm-1*; *ttm-2*) untersucht. Eine Hochregulierung der Genexpression könnte ein Anzeichen dafür sein, dass der Verteidigungsmechanismus auch in Anwesenheit von Cry3Bb1 bzw. Cry1Ab "angeschaltet" wird. Die Versuche mit transgenen Bakterien wurden im Labor der AG Jehle in Neustadt a. d. WStr. durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass vor allem in Anwesenheit von Cry1Ab beide Gene (*ttm-1*; *ttm-2*) hochreguliert wurden, d.h. eine höhere Genexpression aufwiesen (bis zu 3,5 fache Genexpression im Vergleich zur OP50-Kontrolle), und zwar unabhängig von der Expositionsdauer. Dies würde die Ergebnisse aus den Wirkungstests mit dem *Bt*-sensitiven *C. elegans* Stamm (*sek-1*) bestätigen. In Anwesenheit von Cry3Bb1 wurde nur *ttm-2* nach 16 und 48h Exposition hochreguliert. Der Hinweis für das "Anschalten" des Verteidigungsmechanismus ist also im Falle von Cry3Bb1 geringer als bei Cry1Ab, was auch den Ergebnissen des Wirkungstests entspräche.

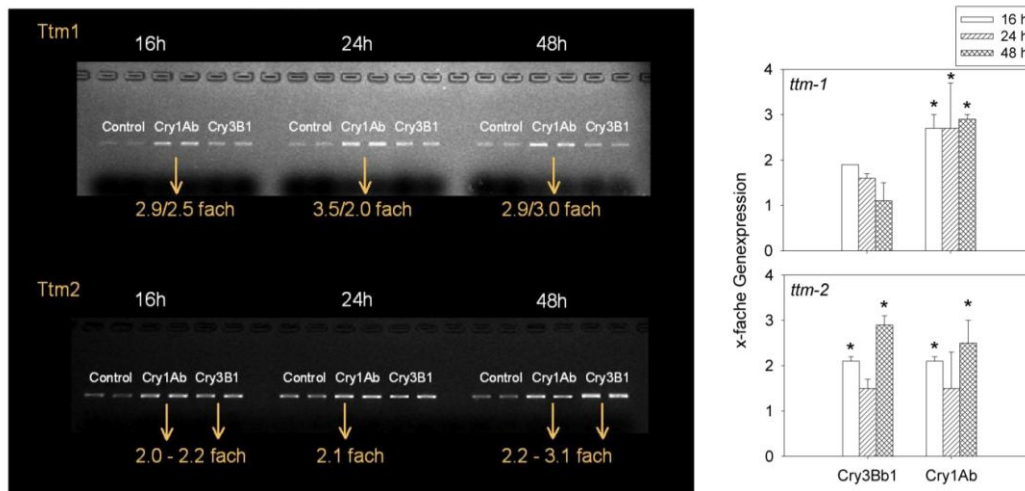


Abb. 7: Bestimmung der *ttn-1* und *ttn-2* mRNA levels in Kontrollen (Exposition in *E. coli* OP50) und in Cry1Ab und Cry3Bb1-Behandlungen (Exposition in *E. coli* BL21 und XL1 Blue); x-fache Genexpression zur Kontrolle nach 16, 24, 48 h Exposition; * = >2fache Genexpression.

1.2. Toxizität von Boden von Bt-Mais-Parzellen auf *Caenorhabditis elegans*

Um die Toxizität von Cry3Bb1 auf *C. elegans* abzuschätzen, wenn es von der Maispflanze (Mon88017) in den Boden abgegeben wird, wurden Bodenproben (Rhizosphärenboden) von allen Parzellen des Versuchsfelds mit dem Nematodentest nach ISO/CD 10872 untersucht. Von folgenden Maissorten wurden je 8 Parzellen untersucht: Mon88017 (Bt), DKC5134 (isogen), Benicia (konventionell), DK315 (konventionell). Die Bodenproben wurden zur Blütezeit des Mais (Wachstumsstadium BBCH60) genommen.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 8 und 9 dargestellt. Die Variation der beiden Parameter Wachstum und Reproduktion ist sehr gering, was eine gute Voraussetzung für eine Risikobewertung ist. Betrachtet man die Parzellen der verschiedenen Sorten, ist deutlich zu erkennen, dass es weder 2005 noch 2006 Unterschiede in Wachstum und Reproduktion von *C. elegans* gibt.

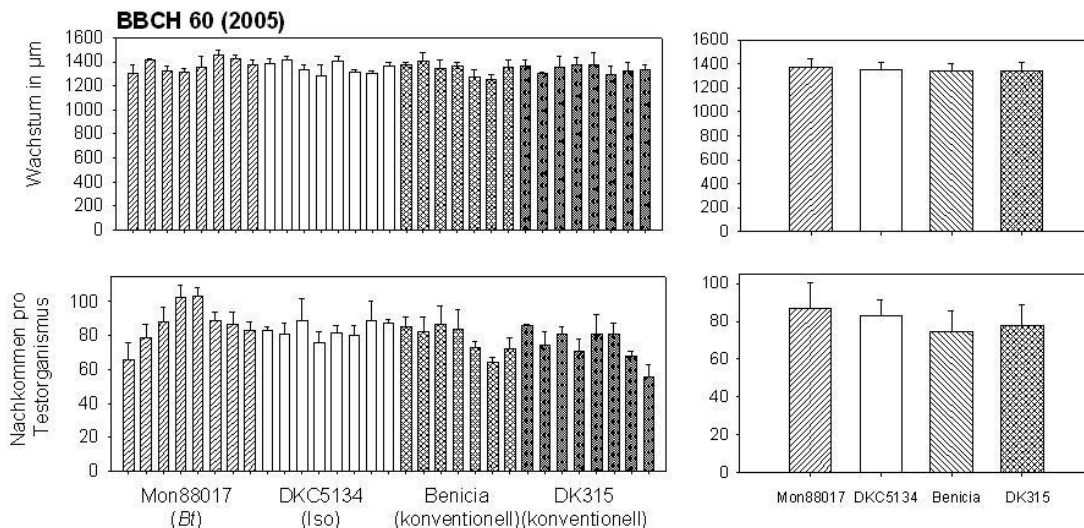


Abb. 8: Wachstum (μm) und Reproduktion (Nachkommen pro Testorganismus) von *C. elegans* nach 96 h Exposition in Böden der verschiedenen Parzellen des Versuchsfelds im Jahr 2005; Links: einzelne Parzellen; Rechts: Mittelwerte aus Parzellen-Einzelwerten.

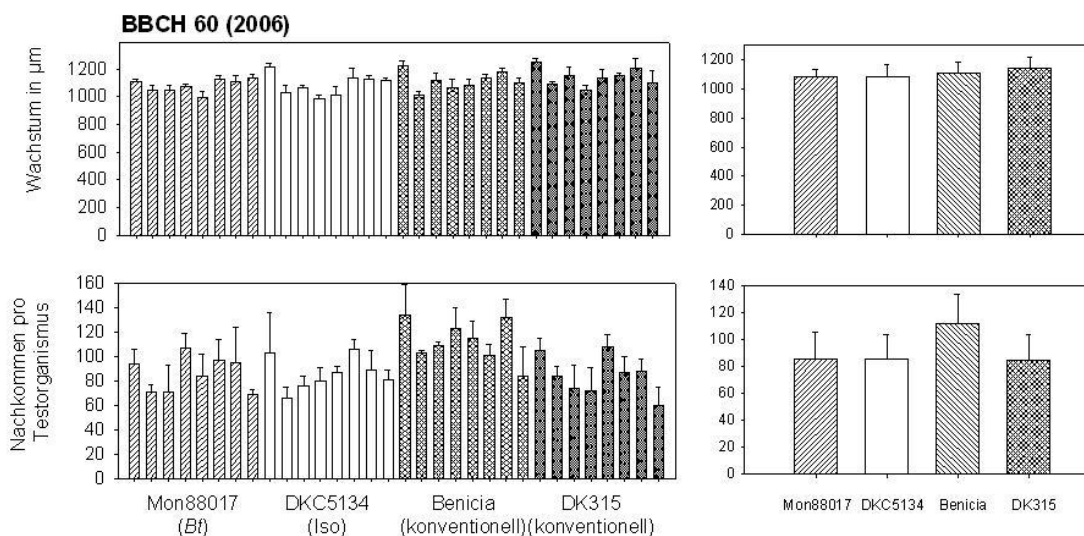


Abb. 9: Wachstum (μm) und Reproduktion (Nachkommen pro Testorganismus) von *C. elegans* nach 96 h Exposition in Böden der verschiedenen Parzellen des Versuchsfelds im Jahr 2006; Links: einzelne Parzellen; Rechts: Mittelwerte aus Parzellen-Einzelwerten.

Die im Rhizosphärenboden gemessenen Cry3Bb1-Konzentrationen (ELISA; Analysen wurden von der AG Tebbe, FAL Braunschweig, durchgeführt) zeigen sehr geringe Konzentrationen. Ein Vergleich mit den Wirkungstests mit reinem Cry3Bb1 zeigt, dass im Boden des Versuchsfelds keine Wirkung auf *C. elegans* zu erwarten war (Abb. 10) und

bestätigen die Zuverlässigkeit des Testsystems. Der Quotient von der höchsten gemessenen Konzentration im Boden ($1 \mu\text{g kg}^{-1} = 0,001 \text{ ppm}$) und des NOECs (höchste Konzentration, bei der keine Wirkung im Nematodentest auftrat; No Observed Effect Concentration) von Cry3Bb1 im Nematodentest ($3,6 \text{ mg l}^{-1} = 3,6 \text{ ppm}$) ergibt 3600. Diese Bewertungsmethode (PEC/PNEC = Predicted Environmental Concentration/Predicted No Effect Concentration) wird häufig in der Risikobewertung von Schadstoffen (z.B. Pestiziden) in aquatischen Systemen verwendet.

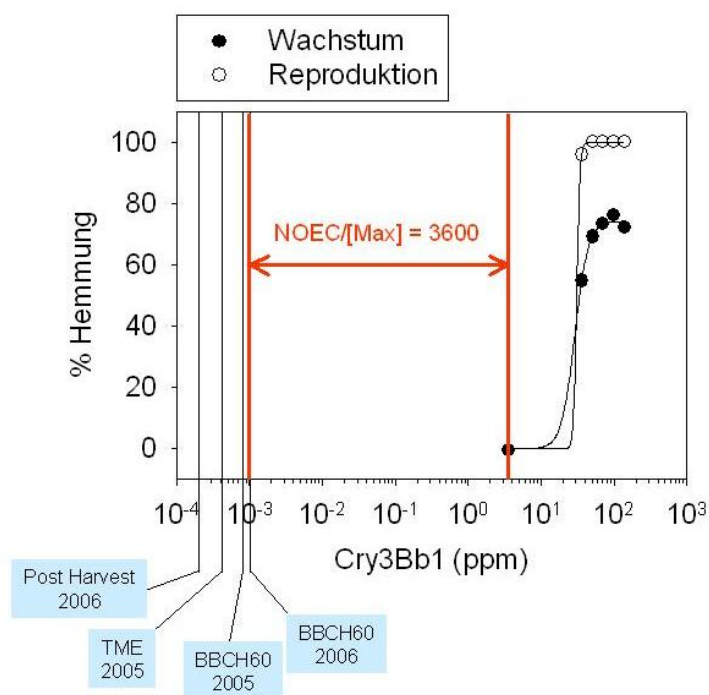


Abb. 10: Vergleich der Konzentrationsbereiche von Cry3Bb1 bei der Wirkung auf *C. elegans* und bei der in Boden gemessenen Konzentrationen.

1.3. Einfluss von Bt-Mais auf in-situ Nematoden

Um den Einfluss von Bt-Mais auch auf höherem ökologischem Niveau zu untersuchen, wurde im letzten Projektjahr (2007) die *in situ* Nematodenlebensgemeinschaften im Boden der verschiedenen Parzellen des Versuchsfelds über die gesamte Vegetationsperiode untersucht. Zu drei Zeitpunkten (kurz nach der Aussaat: Juni 07; zur Blütezeit: August 07; nach der Ernte: Oktober 07) wurden von jeder Parzelle (je 8 Parzellen pro Maissorte: Mon88017 (Bt), DKC5134 (isogen), Benicia (konventionell), DK315 (konventionell)) acht Unterproben mit Bodenstechern unterschiedlicher Größe genommen (Abb. 11). Von jedem Bohrkern wurden die obersten 20 cm zur Analyse der Nematodenlebensgemeinschaften verwendet.

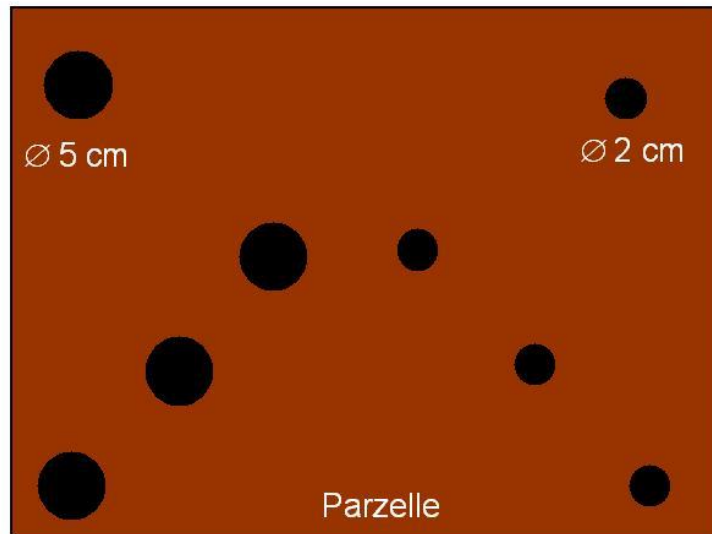


Abb. 11: Probenahmeschema in einer Parzelle des Versuchsfelds

Als Indikator für den Zustand der Nematodenlebensgemeinschaften wurden folgende Parameter gewählt:

- Abundanz (Individuen m^2)
- Zahl der Arten (innerhalb der 50 Individuen, die taxonomisch bestimmt wurden)
- Maturity Index (MI): Nematodenfamilien werden in eine Skala von 1 bis 5 entsprechend ihrer Reproduktionsstrategie eingeteilt (1 = colonizer oder r-Strategen; 5 = persister oder K-Strategen). Der MI berechnet sich dann folgendermaßen: $MI = \sum cp_i \times f_i$, wobei cp_i der cp-Wert der Art i ist und f_i der relative Anteil der Art i in einer Probe ist. Ökologischer Hintergrund ist die Annahme, dass r-Strategen schneller auf Umweltveränderungen reagieren können und außerdem resistenter gegen Stress sind. Ein geringer MI zeigt also eine gestörte Lebensgemeinschaft an.
- Shannon-Wiener-Index (H'): ein geläufiger Biodiversitätsindex: $H' = -(\sum f_i \times \log_2 f_i)$, wobei f_i der relative Anteil der Art i in einer Probe ist.
- Ernährungstypen: Nematoden haben eine Vielzahl an Ernährungstypen ausgebildet und sind dadurch fast in allen trophischen Ebenen präsent: Bakterien- und Pilzfresser, Algenfresser, Pflanzenparasiten, Omnivore, Räuber. Die Zusammensetzung der verschiedenen Ernährungstypen lässt daher Schlüsse auf Wirkungen an bestimmten Stellen des Nahrungsnetzes zu.

- Multivariate Analyse der Artenzusammensetzung:

Um Wirkungen auf Art-Niveau sichtbar zu machen, müssen multivariate Methoden verwendet werden. Bei der "Multidimensional Scaling Ordination (MDS)" werden die verschiedenen Proben, entsprechend ihrer Ähnlichkeit (Bray-Curtis-Ähnlichkeit) in der Artenzusammensetzung, in einem zweidimensionalen Plot angeordnet. Je näher zwei Proben im MDS-Plot angeordnet sind, je ähnlicher sind sie sich hinsichtlich der Artenzusammensetzung.

Es zeigten sich folgende Ergebnisse:

- a. Die Nematoden sind die einzige Organismengruppe der Metazoen, die in nennenswerten Abundanzen vorkommen (Daten nicht abgebildet).
- b. Die Nematoden kommen in sehr hohen Abundanzen vor (2 bis 4 Mio Individuen m^2 ; Abb. 12a). Dies ermöglicht eine statistisch valide Auswertung auch bei sehr geringen Probenmengen.
- c. Die Abundanzen in den Parzellen der verschiedenen Maissorten nahmen im Laufe der Vegetationsperiode leicht ab, unterschieden sich aber, bis auf eine Ausnahme nicht voneinander (Abb. 12a). Nur im August 2007 waren die Abundanzen in Boden der Sorte Benicia signifikant höher als in Boden der isogenen Sorte DKC5134 ($p = 0,029$, one-way ANOVA, post-hoc Tukey).
- d. Die Zahl der Nematodenarten befand sich zwischen 18 und 22 und war konstant über den Untersuchungszeitraum (Abb. 12b). Die Parzellen der unterschiedlichen Maissorten unterschieden sich nicht voneinander ($p > 0,05$, one-way ANOVA).
- e. Der Maturity Index schwankte zwischen 2,2 und 2,6 und blieb in den Parzellen der Maissorten Mon88017 und DKC5134 über die gesamte Vegetationsperioden konstant (Abb. 12c). In der Sorte Benicia war der MI im Oktober signifikant niedriger als im Juni und August. In der Sorte DK315 war der MI im August signifikant höher als im Juni und August. Die MI-Werte in den verschiedenen Maissorten unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt voneinander. Im August 2007 war der Maturity Index in den Parzellen des Bt-Mais (Mon88017: $MI = 2,35 \pm 0,26$) allerdings deutlich niedriger als in den Parzellen mit isogenem Mais (DKC5134: $MI = 2,69 \pm 0,25$). Der Unterschied war aber knapp nicht signifikant ($p = 0,062$, one-way ANOVA, post-hoc Tukey).
- f. Der Shannon-Wiener-Index ist für alle Maissorten über die gesamte Vegetationsperiode relativ konstant (Abb. 12d) und zeigt keine Unterschiede zwischen den Maissorten ($p > 0,05$, one-way ANOVA).

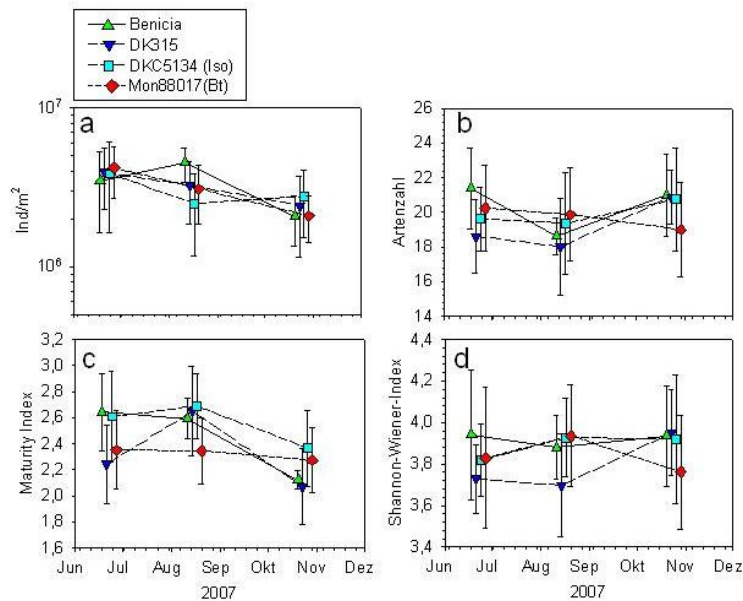


Abb. 12: Abundanzen (a), Artenzahl (b), Maturity Index (c) und Shannon-Wiener Index (d) der Nematodenlebensgemeinschaften in Parzellen der verschiedenen Maissorten (MW ± SA der 8 Parzellen).

g. Die Verteilung der Ernährungstypen ist für alle Maissorten über die gesamte Vegetationsperiode relativ konstant (Abb. 13) und zeigt, bis auf eine Ausnahme, keine Unterschiede zwischen den Maissorten ($p > 0,05$, one-way ANOVA). Nur im Juni 2007 war der relative Anteil an Pilzfressern in Parzellen der Sorte DK315 signifikant höher als in Parzellen der isogenen Sorte (DKC5134; $p = 0,021$, one-way ANOVA, post-hoc Tukey).

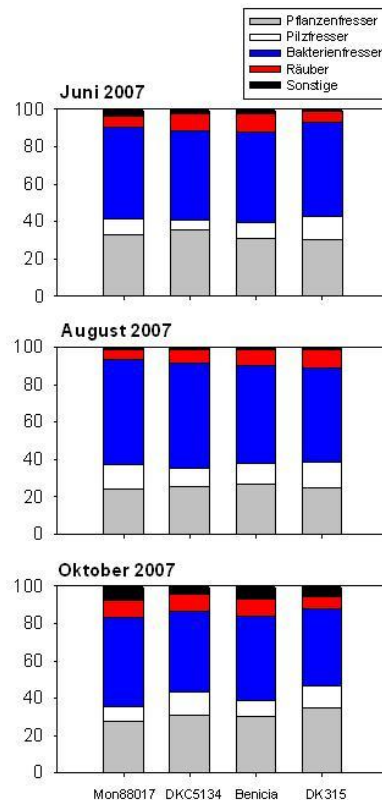


Abb. 13: Verteilung der verschiedenen Ernährungstypen (relative Abundanzen) in den Nematodenlebensgemeinschaften in Parzellen der verschiedenen Maissorten (MW aus 8 Parzellen).

- h. Die MDS-Plots vom Juni und August zeigen kein eindeutiges Muster, d.h. die Parzellen der verschiedenen Maissorten (gleiche Symbole = gleiche Maissorte) sind nicht geclustert (Abb. 14). Die Artenzusammensetzung in den Parzellen der verschiedenen Sorten kann also nicht voneinander unterschieden werden. Im Oktober kann man dann eine Tendenz der Auftrennung der Maissorten erkennen. Die Parzellen der Bt -Sorte (Mon88017) scheinen sich von den übrigen abgesetzt zu haben (signifikante Unterschiede zur isogenen Sorte DKC5234 und zu Benicia; $p < 0,05$, ANOSIM). Die Unterschiede konnten nicht durch die gemessenen Bodenparameter (pH; Korngröße; organisches Material) erklärt werden.

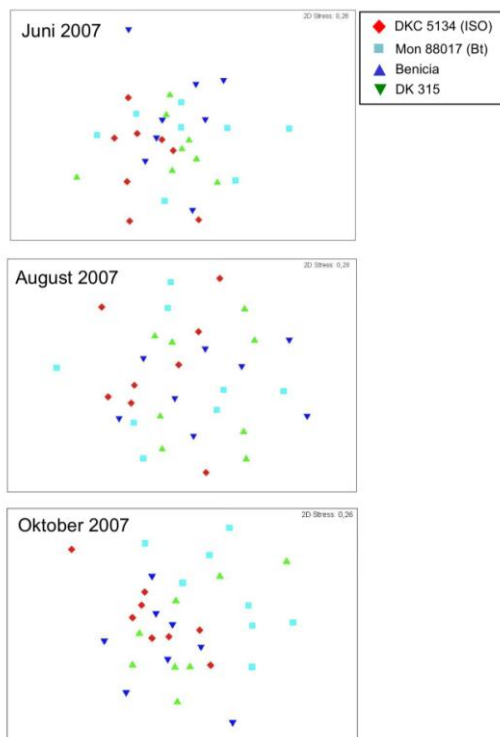


Abb. 14: Multidimensional Scaling Ordination (MDS) auf Grundlage der Ähnlichkeit (Bray-Curtis) der Artenzusammensetzung der Nematoden in Parzellen der verschiedenen Maissorten.

1.4. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieses dreijährigen Forschungsvorhabens haben gezeigt, dass der Toxizitätstest mit dem Nematoden *C. elegans* und die Analyse von Nematodenlebensgemeinschaften gut für die Risikobewertung von gentechnisch veränderten Pflanzen (GVPs) geeignet ist. Der Toxizitätstest lieferte valide und zuverlässige Daten, sowohl in wässrigen Toxinlösungen, als auch in komplexen Matrices wie Boden von Anbauflächen. Der Nematodentest zeigte eine deutliche Wirkung von Cry3Bb1 mit EC50 Werten von 28 mg l⁻¹ bzw. 0,36 µmol l⁻¹. Das entspricht der Toxizität, die auch andere Umweltschadstoffe wie z.B. Pestizide auf *C. elegans* haben. Trotzdem sind die gemessenen Effektkonzentrationen weit oberhalb des im Boden zu erwartenden Konzentrationsbereich von Cry3Bb1. Im Rhizosphären Boden wurden von Verbundpartnern (AG Tebbe) höchstens 1 µg Cry3Bb1 kg⁻¹ gemessen. Die Tatsache, dass im Boden von Parzellen vom Versuchsfeld keine Wirkung auf *C. elegans* gefunden wurde, ist durch die geringen Cry3Bb1-Konzentrationen im Boden zu erklären. Die Ergebnisse des Single-Species-Tests zeigen also an, dass von Mon88017 kein Risiko auf Nematoden ausgeht. Da es bei Risikobewertungen schwierig ist Ergebnisse von Single-Species-Tests auf ganze Lebensgemeinschaften zu extrapolieren, wurde auch der Einfluss

von *Bt*-Mais auf die Struktur von Nematodenlebensgemeinschaften untersucht. Nematodenabundanzen, -diversität und die Zusammensetzung der Ernährungstypen unterschieden sich nicht zwischen den verschiedenen Maissorten. Allerdings zeigten sich signifikante Unterschiede in der Gattungszusammensetzung zwischen der *Bt*-Sorte und der isogenen und einer konventionellen Sorte. Direkte Cry3Bb1-Effekte sind auf Grund der niedrigen Konzentrationen im Boden unwahrscheinlich. Indirekte Effekte der *Bt*-Pflanzen auf die Nematodengemeinschaften (z.B. über veränderte Pflanzen- oder Bodeneigenschaften, die nicht gemessen wurden) können allerdings nicht ausgeschlossen werden.

2. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebene Verwertungsplans

2.1. Normungsarbeit

Die Erkenntnisse, die im bisherigen Verlauf des Projekts gewonnen wurden, trugen zur Normungsentwicklung des Nematodentests bei. Die Normvorschrift des Nematodentest hat mittlerweile bei ISO den Status des Committee-Draft (ISO/CD 10872) erreicht.

2.2. Ökotoxikologische Bewertung der Wirkung von Bt-Mais bzw. Bt-Toxine

Die Normierung schafft die Basis für eine routinemäßige Anwendung zur ökotoxikologischen Überwachung von Umweltproben. Durch die Eignung des Nematodentests zur Untersuchung von Böden und Cry-Protein-Lösungen, wird dadurch die Routineanwendung bei GVP-Zulassungsverfahren und freisetzungsbegleitenden Monitoringprogrammen erleichtert.

2.3. Nematoden als Indikatoren für Biomonitoring

Die Ergebnisse der Untersuchung der *in-situ* Nematodenlebensgemeinschaften können zur Erarbeitung von Richtlinien zur freisetzungsbegleitenden Sicherheitsforschung beitragen. Ein VDI Richtlinienausschuss (Monitoring der Wirkungen von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) – Wirkungen auf Bodenorganismen; VDI 4331), dem der Bearbeiter angehört, beschäftigt sich mit der Erstellung von Richtlinien zum Monitoring der Wirkung von GVOs. Die Nematoden gelten dabei als eine wichtige und geeignete Organismengruppe.

2.3. Publikationen

- Tagungsbeiträge

Höss S, Baumgarte S, Miethling-Graff R, Tebbe C, Nguyen-Thu H, Jehle J (2007)
Effects of the *Bt* toxin Cry3Bb1 on the nematode *Caenorhabditis elegans* – Stu-

dies with pure toxin and soil from experimental fields. 17th Annual Meeting of SETAC Europe, Porto, Portugal.



- Fachzeitschriften:

Höss S, Arndt M, Baumgarte S, Tebbe CC, Nguyen-Thu H, Jehle J (2008) Effects of transgenic corn and Cry1Ab protein on the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 70, 334-340.

Höss S, Traunspurger W, Tebbe CC, Nguyen-Thu H, Jehle J (in Vorbereitung) Risk assessment of transgenic corn (Mon88017) using nematodes as bioindicators.

Zitierte Literatur

- Ahmad, A., Wilde, G.E., Whitworth, R.J., Zolnerowich, G. (2006a) Effect of corn hybrids expressing the coleopteran-specific Cry3Bb1 protein for corn rootworm control on aboveground insect predators. *Journal of Economic Entomology* 99, 1085-1095.
- Ahmad, A., Wilde, G.E., Zhu, K.Y. (2006b) Evaluation of effects of coleopteran-specific Cry3Bb1 protein on earthworms exposed to soil containing corn roots or biomass. *Environmental Entomology* 35, 976-985.
- Andrassy, I. (1992) A short census of free-living nematodes. *Fundamental and Applied Nematology* 15, 187-188.
- ASTM (2001) Standard guide for conducting laboratory soil toxicity tests with the nematode *Caenorhabditis elegans* ASTM E2172-01, American Society for Testing and Materials, Westconshohocken, PA, USA.
- Bakonyi, G., Szira, F., Kiss, I., Villanyi, I., Seres, A., Szekacs, A. (2006) Preference tests with collembolas on isogenic and Bt-maize. *European Journal of Soil Biology* 42, S132-S135.
- Belair, G. and Cote, J.C. (2004) Screening of nematicidal activity of the bacterium *Bacillus thuringiensis* Berliner on the nematode *Caenorhabditis elegans* *Russian Journal of Nematology* 12, 131-138.
- Borgonie, G., Claeys, M., Leyns, F., Arnaut, G., De Waele, D., Coomans, A. (1996) Effect of nematicidal *Bacillus thuringiensis* strains on free-living nematodes. 1. Light microscopic observations, species and biological stage specificity and identification of resistant mutants of *Caenorhabditis elegans* *Fundamental and Applied Nematology* 19, 391-398.
- Crecchio, C. and Stotzky, G. (1998) Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to humic acids from soil. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 463-470.
- Donkin, S.G. and Dusenbery, D.B. (1993) A soil toxicity test using the nematode *C. elegans* and an effective method of recovery. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 25, 145-151.
- Fiscus, D.A. and Neher, D.A. (2002) Distinguishing sensitivity of free-living soil nematode genera to physical and chemical disturbances. *Ecological Applications* 12, 565-575.
- Griffiths, B.S., et al. (2005) A comparison of soil microbial community structure, protozoa and nematodes in field plots of conventional and genetically modified maize expressing the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Plant and Soil* 275, 135-146.
- Griffiths, B.S., Heckmann, L.H., Caul, S., Thompson, J., Scrimgeour, C., Krogh, P.H. (2007) Varietal effects of eight paired lines of transgenic Bt maize and near-

- isogenic non-Bt maize on soil microbial and nematode community structure. *Plant Biotechnology Journal* 5, 60-68.
- Griffitts, J.S., et al. (2003) Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin-host interaction. *Journal of Biological Chemistry* 278, 45594-45602.
- Haitzer, M., Abbt-Braun, G., Traunspurger, W., Steinberg, C.E.W. (1999) Effects of humic substances on the bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons: Correlations with spectroscopic and chemical properties of humic substances. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 2782-2788.
- Heckmann, L.H., Griffiths, B.S., Caul, S., Thompson, J., Pusztai-Carey, M.N., Moar, W.J., Andersen, M.N., Krogh, P.H. (2006) Consequences for *Protaphorura armata* (Collembola: Onychiuridae) following exposure to genetically modified *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize and non-Bt maize. *Environmental Pollution* 142, 212-216.
- Hess, G.R., Campbell, C.L., Fiscus, D.A., Hellkamp, A.S., McQuaid, B.M., Munster, M.L., Peck, S.L., Shafer, S.R. (2000) A conceptual model and indicators for assessing the ecological conditions of agricultural lands. *Journal of Environmental Quality* 29, 728-737.
- Hilbeck, A., Baumgartener, M., Friend, P.M., Bigler, F. (1998a) Effect of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea*. *Environ. Entomol.* 27, 480-487.
- Hilbeck, A., Pusztai-Carey, M., Fillippini, A., Bigler, F. (1998b) Toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin on the predator *Chrysoperla carnea*. *Environ. Entomol.* 27, 1255-1263.
- Hitchcock, D.R., Black, M.C., Williams, P.L. (1997) Investigations into using the nematode *Caenorhabditis elegans* for municipal and industrial wastewater toxicity testing. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 33, 252-260.
- Höss, S., Haitzer, M., Traunspurger, W., Steinberg, C.E.W. (1999) Growth and fertility of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) in unpolluted freshwater sediments - response to particle size distribution and organic content. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 2921-2925.
- Höss, S. and Weltje, L. (2007) Endocrine disruption in nematodes - effects and mechanisms. *Ecotoxicology* 16, 15-28.
- Huffman, D.L., Abrami, L., Sasik, R., Corbeil, J., van der Goot, G., Aroian, R.V. (2004) Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 101, 10995-11000.
- Ingham, R.E., Trofymow, J.A., Ingham, E.R., Coleman, D.C. (1985) Interactions of bacteria, fungi, and their nematode grazers: effects on nutrient cycling and plant growth. *Ecological Monographs* 55, 119-140.
- ISO (2007) Water quality - Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). ISO/CD 10872, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Koskella, J. and Stotzky, G. (1997) Microbial utilization of free and clay-bound insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* and their retention of insecticidal activity after incubation with microbes. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3561-3568.
- Lew, K.K., Nichols, D.G., Kolber, A.W., Kolber, A.R., de Woskin, R.S., Hughes, T.J. (1983) In vivo assay to screen for mutagens/carcinogens in the nematode *C.elegans*. *In Vitro Toxicity Testing of Environmental Agents: A Survey of Test Systems*. Plenum, New York, pp. 139-150.
- Leyns, F., Borgonie, G., Arnaut, G., De Waele, D. (1995) Nematicidal activity of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Fundamental and Applied Nematology* 18, 211-218.
- Manachini, B. and Lozzia, G.C. (2002) First results into the effects of Bt corn crop on nematofauna. *Bolletino di Zoologia e di Bachicoltura* 34, 85-96.

- Meadows, J., Gill, S.S., Bone, L.W. (1990) *Bacillus thuringiensis* strains affect population growth of the free living nematode *Turbatrix aceti* *Invertebrate Reproduction and Development* 17, 73-76.
- Neher, D.A., Peck, S.L., Rawlings, J.O., Campbell, C.L. (1995) Measures of nematode community structure and sources of variability among and within fields. *Plant and Soil* 170, 167-181.
- Peredney, C.L. and Williams, P.L. (2000) Utility of *Caenorhabditis elegans* for assessing heavy metal contamination in artificial soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39, 113-118.
- Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J., Priess, J.R. (1997) *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Romeis, J., Dutton, A., Bigler, F. (2004) *Bacillus thuringiensis* toxin (Cry1Ab) has no direct effect on larvae of the green lacewing *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae). *Journal of Insect Physiology* 50, 175-183.
- Saxena, D., Flores, S., Stotzky, G. (1999) Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. *Nature (London)* 402, 480-480.
- Saxena, D. and Stotzky, G. (2001) *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1225-1230.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J.S., Zeigler, D.R., Dean, D.H. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 775-806.
- Tapp, H. and Stotzky, G. (1998) Persistence of the insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 471-476.
- Vercesi, M.L., Krogh, P.H., Holmstrup, M. (2006) *Bacillus thuringiensis* (Bt) corn residues and Bt-corn plants affect life-history traits in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*? *Applied Soil Ecology* 32, 180-187.
- Wei, J.Z., Hale, K., Carta, L., Platzer, E., Wong, C., Fang, S.C., Aroian, R.V. (2003) *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 100, 2760-2765.
- Wharton, D.A. and Bone, L.W. (1989) *Bacillus thuringiensis israelensis* toxin affects egg shell ultrastructure of *Trichostronylus colubriformis* (Nematoda). *Invertebrate Reproduction and Development* 15, 155-158.
- Yeates, G.W. (1981) Nematode populations in relation to soil environmental factors: a review. *Pedobiologia* 22, 312-338.
- Yeates, G.W., Coleman, D.C., Freckman, D.W. (1982) Role of nematodes in decomposition. *Nematodes in Soil Ecosystems*. University of Texas Press, Austin, TX, USA, pp. 55-80.
- Yeates, G.W., Bongers, T., De Goede, R.G.M., Freckman, D.W., Georgieva, S.S. (1993) Feeding habits in soil nematode families and genera - An outline for soil ecologists. *Journal of Nematology* 25, 315-331.
- Zwahlen, C., Hilbeck, A., Gugerli, P., Nentwig, W. (2003a) Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. *Molecular Ecology* 12, 765-775.
- Zwahlen, C., Hilbeck, A., Howald, R., Nentwig, W. (2003b) Effects of transgenic Bt corn litter on the earthworm *Lumbricus terrestris* *Molecular Ecology* 12, 1077-1086.