

GENERELLE OPLYSNINGER

1. Oplysninger om anmeldelsen

Anmeldelsesmedlemsstat:

Anmeldelsesnummer:

Dato for modtagelsen af anmeldelsen:

Titel på projektet: **Rodkoloniserende bakterielle GMO'er til jord bioremediering**

EC projekt „Rhizodegradation“ med partnerne:

Ulrich Karlson, repræsenterer DMU og koordinerer projektet

Danmarks Miljøundersøgelser (DMU), Afdeling for Mikrobiel Økologi og Bioteknologi

Postboks 358, 4000 Roskilde

David N. Dowling

Department of Appl. Biol. & Chem., Institute of Technology Carlow, Kilkenny Road, Carlow, Ireland

Fergal O'Gara

BIOMERIT Research Centre, Microbiology Department, National University of Ireland, Cork, Ireland

Rafael Rivilla

Dept. Biología, Universidad Autónoma, UAM, Cantoblanco, E-28049 Madrid

Martin Bittens

WCI Umwelttechnik, Hauptstraße 45A, D-30974 Wennigsen

Stephen Francesconi

Nova Research Inc., c/o. Naval Research Laboratory, Code 6115, 4555 Overlook Ave, Washington, D.C. 20375-5321, U.S.A.

Hap Pritchard

U.S. Naval Research Laboratory, Environ. Quality Sciences Sect., 4555 Overlook Ave, Washington, D.C. 20375, U.S.A.

H.C. Pedersen

Dept. of Seed Technology, Danisco Seed, Højbygaardvej 14, DK-4960 Holeby

Foreslåede dato for udsætningen: Maj 2000

2. Anmelder

Navn på institution eller virksomhed:

Danmarks Miljøundersøgelser (DMU)
Afdeling for Mikrobiel Økologi og Bioteknologi
Postboks 358
4000 Roskilde

3. Beskrivelse af GMO

a) Angiv om GMO'en er en/et:

- Viroid
RNA-virus
DNA-virus
bakterie
svamp
plante
dyr
andet, angiv nærmere

b) GMO'ens identitet:

2 stammer:

1. *Pseudomonas fluorescens* stamme F113::lacZYrif
2. *Pseudomonas fluorescens* stamme F113rifpcb

4. Er samme GMO-udsætning planlagt i andre EF-lande (i over-ensstemmelse med artikel 5, stk. 1)?

JA NEJ VIDES IKKE

Hvis Ja angiv landekode(r)

5. Er den samme GMO blevet anmeldt med henblik på udsætning i andre EF-lande af den samme anmelder?

JA NEJ

Hvis Ja:

- Anmeldelsesmedlemsstat:
- Anmeldelsesnummer:

OPLYSNINGER I FORBINDELSE MED BILAG II TIL DIREKTIV 90/220/EØF

A. OPLYSNINGER OM RECIPIENT- ELLER FORÆLDREORGANISMEN

1. Angiv, om recipient- eller forældreorganismen er en/et:

- viroid
- RNA-virus
- DNA-virus
- bakterie
- svamp
- plante
- dyr
- andet, angiv nærmere

2. Fuldstændigt navn

- I) orden og/eller højere taksonomisk gruppe (for dyr)
- II) familie (for planter)
- III) genus *Pseudomonas*
- IV) species *fluorescens*
- V) subspecies
- VI) stamme F113
- VII) kultivar
- VIII) patovar (biotype, økotype, race osv.)
- IX) trivialnavn

3. Organismens geografiske distribution:

- a) hjemmehørende i det land, hvor anmeldelsen er indgivet:
JA NEJ VIDES IKKE
- b) hjemmehørende i andre EF-lande
- i) JA

Hvis Ja, angiv, hvilken type økosystem organismen findes i:

Atlantisk

Middelhavsområdet

Kontinentalt

ii) NEJ VIDES IKKE

c) dyrkes den almindeligvis som afgrøde i anmeldelses-landet?

JA NEJ (Ikke relevant)

d) anvendes den almindeligvis i anmeldelseslandet?

JA NEJ

som biopesticid, påeksperimentel niveau

e) holdes den almindeligvis i anmeldelseslandet?

JA NEJ

hos DMU og andre forskningsinstitutioner

4. Organismens naturlige habitat:

a) Hvis organismen er en mikroorganisme:

vand

jord, fritlevende

jord, knyttet til planterodssystemer

knyttet til planteblade/stilk-systemer

knyttet til dyr

andet (angiv nærmere)

b) Hvis organismen er en plante:

Dens naturlige habitater eller sædvanlige agro økosystem.

5.

a) Detektionsteknikker:

Udpladning af jord/rod suspensioner på selektivt medie med rifampicin (der anvendes e rifampicin resistente stammer, dannet ved spontan mutation på rifampicin)

b) Identifikationsteknikker:

Isolering på selektivt medie efterfulgt af PCR fingerprinting og genom analyse

6. Er recipientorganismen klassificeret i henhold til gældende EF-regler om beskyttelse af sundhed og/eller miljø?

JA NEJ

I bekræftende fald angiv nærmere:

I Tyskland er *P. fluorescens* klassificeret som en gruppe I organisme. Ved klassificeringen var det vurderet, at sekundære infektioner med *P. fluorescens* forekommer hos immunsvækkede personer

7. Er recipientorganismen patogen eller på anden måde skadelig (herunder ekstracellulære produkter), i levende eller død tilstand?

JA NEJ

Hvis Ja,

- a) for hvilken af følgende organismer?

mennesker

dyr

planter

- b) angiv de relevante oplysninger som specificeret i bilag II, IIA, 11d

8. Oplysninger om reproduktion:

- a) Generationstid i naturlige økosystemer: i størrelsesordenen timer til dage

- b) Generationstid i det økosystem, hvor organismen vil blive udsat: i størrelsesordenen timer til dage

- c) Reproduktionsmåle:

Kønnet

Ukønnet

Vegetativ

- d) For planter:

- i) Reproduktionsmåle:

selvbestøvning

krydsbestøvning

begge

- ii) Ved krydsbestøvning:

vind-bestøvning

insekt-bestøvning

andet

e) Faktorer af betydning for reproduktionsvnen: Næringsstofbegrænsning i jorden, fysisk-kemiske faktorer (pH, vand og temperatur)

9. Overlevelsessevne.

a) Evne til at danne strukturer, der fremmer overlevelse eller vækst-dvale:

- i) frø
- ii) rodknolde
- iii) løg
- iv) rhizomer
- v) endosporer
- vi) cyster
- vii) sclerotier
- viii) ukønnede sporer (svampe)
- ix) kønnede sporer (svampe)
- x) æg
- xi) pupper
- xii) larver
- xiii) andet (angiv nærmere):

Der kendes ingen strukturer der forstærker overlevelse eller vækstdvale

b) Faktorer af betydning for overlevelsesvnen:

Lav pH, predatorer (protozoa etc.), parasitter (virus etc.) og ugunstige klimatiske forhold. *Pseudomonas fluorescens* kan overleve i lavt niveau (10^3 cfu/g) i jorden i mange år.

10. a) Spredningsmåder:

Menneskers, dyrs og naturkræfters transport af planterødder og jord

b) Faktorer af betydning for spredningen:

Kendte faktorer, der påvirker spredning af mikroorganismer generelt påvirker også dissemineringen af *P. fluorescens*

11. Tidligere genetiske ændringer af recipient- eller forældreorganismen, som allerede er blevet anmeldt med henblik på udsætning i anmeldelseslandet (anfør anmeldelsesnumre):

Ingen

B1. OPLYSNINGER OM DEN GENETISKE ÆNDRING: stamme F113::lacZYrif

1. Type genetisk ændring:

- i) Insertion af genetisk materiale
- ii) deletion af genetisk materiale
- iii) Basesubstitution
- iv) cellefusion
- v) andet, anfø nærmere

2. Det ønskede resultat af den genetiske ændring:

Konstruktion af en rhizosfære-koloniserende bakterie med en genetisk markør

3. a) Er der anvendt en vektor i ændringsprocessen?

JA NEJ

Hvis *Nej*, gå videre til spørgsmål 5.

b) Hvis *Ja*, er vektoren helt eller delvis til stede i den modificerede organisme?

JA (delvis) NEJ

Hvis *Nej*, gå videre til spørgsmål 5.

4. Hvis svaret på 3 b er *Ja*, giv følgende oplysninger:

a) Type vektor:

- plasmid
- bakteriofag
- virus
- cosmid
- fasmid
- transposon
- andet, anfø nærmere

b) Vektorens identitet: pUTlacZY, Fedi *et al.* 1996

(pUT vectorer blev udviklet af Herrero *et al.* 1990; De Lorenzo *et al.* 1990)

c) Vektorens værtsspektrum: Gram negative eubakterier

d) Tilstedeværelse i vektoren af sekvenser, der giver en identificerbar fænotype:

	JA	NEJ
Antibiotika-resistens	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Tungmetal-resistens	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Andet, anfø nærmere	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

e) Vektorens bestandele:

Tilbageværende dele til stede i GMO:

19bp inverted repeats fra Tn5

Ikke-tilstedværende dele i GMO'en:

Tn5 transposase, Plasmid replicon (Herrero *et al.* 1990).

Den anvendte vektor har ikke patogene eller på anden vis skadelige egenskaber, ej heller miljømæssige skadelige egenskaber. Den anvendte vektor koder ikke for nogen kendte patogenicitets determinanter. Der er heller ikke nogen funktionelle vektorsekvenser tilstede i denne GMO.

f) Metode til at indføre vektoren i recipientorganismen:

- i) transformation
- ii) elektroinjektion
- iii) makroinjektion
- iv) mikroinjektion
- v) infektion
- vi) andet, anfø nærmere Konjugation

5. Hvis svaret på spørgsmål B.3.a) og b) er Nej, hvilken metode blev anvendt til at hindre insertet i recipient-/forædrecellen?

- i) transformation
- ii) mikroinjektion
- iii) mikroindkapsling
- iv) makroinjektion
- v) andet, anfø nærmere

Ikke relevant

6. Oplysninger om insertet:

a) Insertets sammensætning:

6 Kbp DNA fragment fra plasmid pGD926 (Ditta *et al.* 1985) indeholdende *lac ZY* generne fra *Escherichia coli* K12. (Fedi *et al.* 1996)

b) Kilde for hver enkelt af insertets bestanddele:

6 Kbp fragment fra *E. coli*, (se DNA accession no.PID:g146576)

c) Den ønskede funktion af hver bestanddel af insertet i GMO'en:

6 kbp *lacZY* gener . Tillader GMO'en at udnytte laktose som eneste karbon og energikilde.

d) Insertets placering i værtsorganismen:

- i et frit plasmid
- integreret i kromosomet
- andet, anfø nærmere

e) Indeholder insertet dele, hvis produkt eller funktion ikke kendes?

JA NEJ VIDES IKKE

Hvis *Ja*, anfø nærmere:

B2. OPLYSNINGER OM DEN GENETISKE ÆNDRING Stamme F113rifpcb

1. Type genetisk ændring:

- i) Insertion af genetisk materiale
- ii) deletion af genetisk materiale
- iii) Basesubstitution
- iv) cellefusion
- v) andet, anfør nærmere

2. Det ønskede resultat af den genetiske ændring:

Konstruktion af en rhizosfære-koloniserende bakterie med evne til at metabolisere PCB'er

3. a) Er der anvendt en vektor i ændringsprocessen?

JA NEJ

Hvis *Nej*, gå videre til spørgsmål 5.

b) Hvis *Ja*, er vektoren helt eller delvis til stede i den modificerede organisme?

JA (delvis) NEJ

Hvis *Nej*, gå videre til spørgsmål 5.

4. Hvis svaret på 3 b er *Ja*, giv følgende oplysninger:

a) Type vektor:

- plasmid
- bakteriofag
- virus
- cosmid
- fasmid
- transposon
- andet, anfør nærmere

b) Vektorens identitet:

pUTPtt^f, pUT vectorer blev udviklet af Herrero *et al.* 1990; De Lorenzo *et al.* 1990

c) Vektorens værtsspektrum: Gram negative eubakterier

d) Tilstedeværelse i vektoren af sekvenser, der giver en identificerbar fænotype:

	JA	NEJ
Antibiotika-resistens	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Tungmetal-resistens	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Andet, anfø nærmere	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Bialaphos herbicid resistens fra *Streptomyces hygroscopicus*. (DNA Sequence accession no. XO5822) (Thompson *et al.* 1987)

e) Vektorens bestandele:

Tilbageværende dele i GMO:

19bp inverted repeats fra Tn5

Bialaphos resistensgener (semi-selektabel markør)

Ikke-tilstedværende dele i GMO:

Tn5 transposase

Plasmid replicon (Herrero *et al.* 1990).

Den anvendte vektor har ikke patogene eller på anden vis skadelige egenskaber, ej heller miljømæssigt skadelige egenskaber. Den anvendte vektor koder ikke for nogen kendte patogenicitets determinanter. Der er heller ikke, bortset fra herbicidresistensgener, nogen funktionelle vektorsekvenser til stede i denne GMO.

f) Metode til at indføre vektoren i recipientorganismen:

- | | | | |
|------|---------------------|-------------------------------------|-------------|
| i) | transformation | <input type="checkbox"/> | |
| ii) | elektroinjektion | <input type="checkbox"/> | |
| iii) | makroinjektion | <input type="checkbox"/> | |
| iv) | mikroinjektion | <input type="checkbox"/> | |
| v) | infektion | <input type="checkbox"/> | |
| vi) | andet, anfø nærmere | <input checked="" type="checkbox"/> | Konjugation |

5. Hvis svaret på spørgsmål B.3.a) og b) er Nej, hvilken metode blev anvendt til at hindre insertet i recipient-/forædrecellen?

- | | | | |
|------|---------------------|--------------------------|-----------------|
| i) | transformation | <input type="checkbox"/> | |
| ii) | mikroinjektion | <input type="checkbox"/> | |
| iii) | mikroindkapsling | <input type="checkbox"/> | |
| iv) | makroinjektion | <input type="checkbox"/> | |
| v) | andet, anfø nærmere | <input type="checkbox"/> | (Ikke relevant) |

6. Oplysninger om insertet:

a) Insertets sammensætning:

13.5 Kbp DNA fragmenter fra plasmid pDD530 indeholdende *bph* operon fra *B. cepacia* LB400 (Dowling *et al.* 1993)

b) Kilde for hver enkelt af insertets bestanddele:

1) 12.5 Kbp fragment fra LB400 (DNA accession no. X76500, X66122, M86348)

(Erickson and Mondelo, 1992; Dowling *et al.* 1993; Hofer *et al.* 1993; Hofer *et al.* 1994)

2) 1kbp fragment fra intermediat vektor RK2 (Pansegrau,W., Lanka,E., Barth,P.T., Figurski,D.H., Guiney,D.G., Haas,D., Helinski,D.R., Schwab,H., Stanisich,V.A. and Thomas,C.M. 1994. Complete nucleotide sequence of Birmingham IncP-alpha plasmids: compilation and comparative analysis J. Mol. Biol. 239, 623-663) (DNA accession no L27758), som er et artefakt af klonings/rekombinations processen. (Ingen detekterbar fænotype)

c) Den ønskede funktion af hver bestanddel af insertet i GMO'en:

12.5kbp *bph* operon. Tillader GMO at udnytte biphenyl som den eneste karbon og energikilde og co-metabolisere PCB'er.

d) Insertets placering i værtsorganismen:

- i et frit plasmid
- integreret i kromosomet
- andet, anfør nærmere

e) Indeholder insertet dele, hvis produkt eller funktion ikke kendes?

JA NEJ VIDES IKKE

Hvis Ja, anfør nærmere:

OrfO – funktionen er ukendt men formodes at indgå i *bph* operon regulering.

1kbp fragment fra „broad host range“ plasmid RK2 (en artefakt af den intermediære kloningsproces) har en ukendt fænotype.

C1. OPLYSNINGER OM DEN ELLER DE ORGANISMER, SOM INSERTET STAMMER FRA (DONOR) ---

Stamme F113::lacZYrif

1. Anfø, om den er en/et:

- | | |
|----------------------|-------------------------------------|
| viroid | <input type="checkbox"/> |
| RNA-virus | <input type="checkbox"/> |
| DNA-virus | <input type="checkbox"/> |
| bakterie | <input checked="" type="checkbox"/> |
| svamp | <input type="checkbox"/> |
| plante | <input type="checkbox"/> |
| dyr | <input type="checkbox"/> |
| andet, angiv nærmere | <input type="checkbox"/> |

2. Fuldstændigt navn:

- | | | |
|-------|--|----------------------|
| i) | orden og/eller højere taksonomisk gruppe (for dyr) | |
| ii) | familie (for planter) | |
| iii) | genus | <i>Escherichia</i> |
| iv) | species: | <i>coli</i> |
| v) | subspecies | |
| vi) | stamme: | K12 |
| vii) | kultivar | |
| viii) | patovar (biotype, økotype, race osv.) | |
| ix) | trivialnavn | model labor bakterie |

3. Er organismen patogen eller på anden måde skadelig (herunder dens ekstracellulære produkter), i levende eller død til-stand?

JA NEJ VIDES IKKE

Hvis Ja, anfø følgende:

a) for hvilke af følgende organismer?

mennesker

dyr

planter

b) er de indsatte sekvenser på nogen måde involveret i organismens patogene eller skadelige egenskaber?

JA NEJ VIDES IKKE

Hvis *Ja*, giv de relevante oplysninger som specificeret i bilag II, IIA, 11d:

4. Er donororganismen klassificeret under gældende EF-regler om beskyttelse af sundhed og miljø?

JA NEJ

Hvis *Ja*, anfør nærmere:

I den Europæiske Union er arten *E.coli* klassificeret som en gruppe 2 organisme, "undtagen for non-patogene stammer".

Stamme K12 er en non-patogen laboriestamme, som i EU er klassificeret i risikogruppe 1..

5. Udveksles donor og recipientorganismerne genetisk materiale under naturlige forhold?

JA (under laborieforhold) NEJ VIDES IKKE

C2. OPLYSNINGER OM DEN ELLER DE ORGANISMER, SOM INSERTET STAMMER FRA (DONOR) ---

Stamme F113rifpcb

1. Anfør, om den er en/et:

- | | |
|----------------------|-------------------------------------|
| viroid | <input type="checkbox"/> |
| RNA-virus | <input type="checkbox"/> |
| DNA-virus | <input type="checkbox"/> |
| bakterie | <input checked="" type="checkbox"/> |
| svamp | <input type="checkbox"/> |
| plante | <input type="checkbox"/> |
| dyr | <input type="checkbox"/> |
| andet, angiv nærmere | <input type="checkbox"/> |

2. Fuldstændigt navn:

- | | | |
|-------|--|---|
| i) | orden og/eller højere taksonomisk gruppe (for dyr) | |
| ii) | familie (for planter) | |
| iii) | genus | <i>Burkholderia (tidligere Pseudomonas)</i> |
| iv) | species | <i>cepacia</i> (tidligere stamme) |
| v) | subspecies | |
| vi) | stamme | LB400 |
| | Se (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Taxonomy/wgetorg?id=36873) og (Bopp, 1986) | |
| vii) | kultivar | |
| viii) | patovar (biotype, økotype, race osv.) | |
| ix) | trivialnavn | Jord pseudomonad |

3. Er organismen patogen eller pnden måde skadelig (herunder dens ekstracellulære produkter), i levende eller død til-stand?

JA NEJ VIDES IKKE

Ikke bekendt om denne stamme er patogen. Slægten *Burkholderia* indeholder arter der er patogener overfor planter der kan inficere mennesker.

Hvis Ja, anfør følgende:

a) for hvilke af følgende organismer?

mennesker

dyr

planter

b) Er de indsatte sekvenser på nogen måde involveret i organismens patogene eller skadelige egenskaber?

JA NEJ VIDES IKKE

Hvis *Ja*, giv de relevante oplysninger som specificeret i bilag II, IIA, 11d:

4. Er donororganismen klassificeret under gældende EF-regler om beskyttelse af sundhed og miljø?

JA NEJ

Hvis *Ja*, anfør nærmere:

I Tyskland er arten *B. cepacia* klassificeret som en gruppe 2 organisme.

5. Udveksles donor og recipientorganismerne genetisk materiale under naturlige forhold?

JA NEJ VIDES IKKE

D1. OPLYSNINGER OM DEN GENETISK MODIFICEREDE ORGANISME ---- Stamme F113::lacZYrif

1. Genetiske træk og fænotypiske karakteristika ved recipient- eller forældreorganismen, som er blevet ændret som resultat af den genetiske modifikation:

a) Adskiller den genetisk modificerede organisme sig fra recipientorganismen med hensyn til overlevelsessevne?

JA NEJ VIDES IKKE

(Ramos *et al.* 1994; Brazil *et al.* 1995; Fedi *et al.*, 1996)

Hvis *Ja*, angiv nærmere:

b) Adskiller den genetisk modificerede organisme sig på nogen måde fra recipientorganismen med hensyn til reproduktionsmåde og/eller -hyppighed?

JA NEJ VIDES IKKE

(Ramos *et al.* 1994; Brazil *et al.* 1995; Fedi *et al.*, 1996)

Hvis *Ja*, angiv nærmere:

c) Adskiller den genetisk modificerede organisme sig på nogen måde fra recipientorganismen med hensyn til spredningsevne?

JA NEJ VIDES IKKE

Forskelle i spredning mellem wild type og GMO er ikke observeret (Sheehan & O'Gara, upublikeret).

Hvis *Ja*, angiv nærmere:

2. Den genetisk modificerede organismes genetiske stabilitet:

I adskillige laboratoriebaserede forsøg, inklusiv specifikke undersøgelser af stabilitet, har insert'et ikke vist nogen tegn på genetisk ustabilitet (Corich *et al.*, 1994; Fedi *et al.*, 1995; Fedi *et al.*, 1996).

3. Er GMO'en patogen eller på anden måde skadelig (her-under ekstracellulære produkter), i levende eller død tilstand?

JA NEJ VIDES IKKE

Der findes ingen bevis for, at GMO'en er patogen overfor planter, dyr eller mennesker.

Hvis *Ja*,

a) for hvilke af følgende organismer?

mennesker

dyr

planter

b) angiv de relevante oplysninger som specificeret i bilag II, IIA, IId) og IIC 2(i)

4. Beskrivelse af identifikations- og detektionsmetoderne:

a) teknikker til detektion af GMO'erne i miljøet:

- Plade tælling med anvendelse af selektivt medie SA + Rif
- Stamme F113lacZYrif kan detekteres som blå kolonier, når den udplades på selektivt medie SA med rifampicin (50 mg/l) og X-Gal (40 mg/L).
- Derudover er der udviklet et system baseret på „most probable number“ (MPN) for at genfinde og estimere den introducerede *P. fluorescens* F113 som indeholder lacZY gener fra plante rhizosfære (Fedi *et al.*, 1995).

b) teknikker til identifikation af GMO'en:

- Fysiologiske analyser af væsentligste fænotypiske egenskaber, f.eks. biokontrol aktivitet (DAPG og HCN produktion), og vækst på laktose
- Metabolsk profilering ved hjælp af BIOLOG
- RAPD analyser med anvendelse af tidligere undersøgte primere og forhold
- rRNA subunit sekvensanalyse.

D2. OPLYSNINGER OM DEN GENETISK MODIFICEREDE ORGANISME Stamme F113rifpcb

1. Genetiske træk og fænotypiske karakteristika ved recipient- eller forældreorganismen, som er blevet ændret som resultat af den genetiske modifikation:

a) Adskiller den genetisk modificerede organisme sig fra recipientorganismen med hensyn til overlevelsessevne?

JA

NEJ

VIDES IKKE

Publicerede data indikerer, at stammen ikke er mere konkurrencedygtig end wildtype. (Ramos *et al.* 1994; Brazil *et al.* 1995)

Hvis *Ja*, angiv nærmere:

b) Adskiller den genetisk modificerede organisme sig på nogen måde fra recipientorganismen med hensyn til reproduktionsmåle og/eller -hyppighed?

JA

NEJ

VIDES IKKE

Reproduktionsmåle og -hastighed er den samme som for forældrestamme. (Ramos *et al.* 1994; Brazil *et al.* 1995)

Hvis *Ja*, angiv nærmere:

c) Adskiller den genetisk modificerede organisme sig på nogen måde fra recipientorganismen med hensyn til spredningsevne?

JA

NEJ

VIDES IKKE

Hvis *Ja*, angiv nærmere:

2. Den genetisk modificerede organismes genetiske stabilitet:

I adskillige laboratoriebaserede forsøg, inklusiv specifikke undersøgelser af stabilitet, har insert'et ikke vist nogen tegn på genetisk ustabilitet (Ramos *et al.* 1994; Brazil *et al.* 1995; D.N.Dowling upublicerede observationer)

3. Er GMO'en patogen eller på anden måde skadelig (her- under ekstracellulære produkter), i levende eller død tilstand?

JA

NEJ

VIDES IKKE

Der er ingen bevis for at GMO'en er patogen over for planter, dyr eller mennesker.

Hvis *Ja*,

a) for hvilke af følgende organismer?

mennesker

dyr

planter

b) angiv de relevante oplysninger som specificeret i bilag II, IIA, IId) og IIC 2(i)

4. Beskrivelse af identifikations- og detektionsmetoderne:

a) teknikker til detektion af GMO'er i miljøet:

- Pladdetælling med selektivt medie, SA + Rif, og colorimetrisk spray test af kolonier på pladder (f.eks. for 10^2 kultiverbare celler/g jord eller rødder)
- Detektion af tilstedeværelse af *bphC* genen ved direkte amplifikation med brug af specifikke primere fra jordekstraheret DNA.

b) Teknikker til identifikation af GMO'en:

- Fysiologiske analyser af væsentligste fænotypiske egenskaber, f.eks. biokontrol aktivitet (DAPG og HCN produktion), vækst på biphenyl
- Metabolisk profiler ved hjælp af BIOLOG
- RAPD analyser med anvendelse af tidligere undersøgte primere og forhold
- rRNA subunit sekvensanalyse.

E. OPLYSNINGER OM UDSÆTNINGEN

1. Formålet med udsætningen:

Det almene formål med frigivelsen er at dokumentere sikkerheden af GMO bioremedierings-stammer, der er baserede på *Pseudomonas fluorescens* F113. Den teknologiske hensigt med forsøget er at udvikle ny genetisk modificerede mikrobiel teknologi mht. problemer med forurenede jord.

Det specifikke formål med frigivelsen er at få svar på følgende forskningsmæssige spørgsmål:

- Vil bakterielle system virke fysiologisk (kompatibilitet af plante og bakterie i forurenede jord), dvs. vil den genetisk modificerede bakterielle inokulum kolonisere planterødderne og overleve i den forurenede jord under feltforhold?
- Vil det biologiske system virke fysiologisk, dvs. vil *bph* generne give fordele mht. bakteriernes overlevelse i forurenede jord under feltforhold?
- Vil det genetisk modificerede system klare sig bedre end eksisterende ikke-genetisk-modificerede bakterier i forurenede jord under feltforhold (sammenligning af LB400's og F113pcb's evne for overlevelse og bioremediering)?

2. Er udsætningsstedet forskelligt fra recipientorganismens naturlige habitat eller fra det økosystem, hvor den almindeligvis anvendes, dyrkes, holdes eller findes?

JA NEJ

I bekræftende fald, angiv nærmere:

Den naturlige habitat for stamme F113 er (ikke-forurenede) landbrugsjord, særligt overflader på planterødder i jorden.

Forskellen på frigivelsesstederne er kontamineringen af jorden med PCB'er. Kontamineringens effekt på genetisk modificerede stammers overlevelse skal undersøges ved frigivelse.

3. Oplysninger om udsætningen og det omgivende område:

a) Geografisk beliggenhed (administrativ enhed og i givet fald angivelse af kvadratnetsreference):

Overfladejord i et hjørne (Dansk UTM referencesystem 565995; 6217373) af en skrotmetal genbrugsgård. Adressen på frigivelsesstedet er:

Uniscrap A/S
Beringvej 45
DK-8464 Hasselager

Den administrative region er Århus Amt, Danmark.

b) Stedets størrelse (m²)

i) aktuelt udsætningssted (m²): 81 m²

ii) videre udsætningsområde (m²): 4000 m², som er størrelsen på den skrotmetalgård der er tilplantet med pil i foråret 1999

c) Afstand til internationalt anerkendte biotoper eller beskyttede områder (herunder drikkevandsreservoirer), som vil kunne påvirkes:

Der er ingen internationalt anerkendte biotoper eller fredede områder i nærheden. Afstanden i lige linje til den nærmeste internationalt anerkendte biotop (som foreslået af Danmark på listen over 194 "EF-habitatområder") er 14 km (Mossø WSW), 25 km (Tved Kær, ENE), 27 km (Sydlige Helgenæs, E), og 28 km (Silkeborg Skove, W).

d) Flora og fauna, herunder afgrøder, kvæg og migrerende arter, som kan vekselvirke med GMO'en:

Det omkringliggende område er mod øst og nord bebygget med erhvervsjendomme, veje og ufrugtbar jord, som anvendes til skrotopbevaring (kontamineret med op til 7600 mg/kg total hydrokarboner og 1100 mg/kg total cyanid, potentielt kontamineret med PCB'er; analyserapport i Appendix E), og mod syd og øst med uopdyrket græs, buskads og vegetation med enkeltstående træer (ingen forhistorie med forurening). Frigivelsesstedet kan anses som værende et afgrænset område i forhold til større dyr, eftersom det vil blive indhegnet.

4. Udsætningsmetode og -mængde:

a) Mængder af GMO'er, der skal udsættes:

Total: $6.3 \cdot 10^{11}$ genetisk modificerede bacterieceller skal frigives, halvdelen af dem stamme F113::lacZYrif, og den anden halvdel stamme F113rifpcb.

b) Operationens varighed:

Frigivelsen udføres på én dag i dagtimerne.

Planter og frø vil blive inokuleret i GMO laboratoriet hos DMU Roskilde. Den dag udsættelsen gennemføres, vil materialerne blive pakket i hensigtsmæssige emballager og køret til fosøgsstedet vha. en automobil.

c) Metoder og procedurer til at undgå og/eller mindske GMO'ernes spredning ud over udsætningsstedet:

GMO bakteriecellerne bliver immobiliserede i et bæremateriale, og coatede omkring stiklinge henholdsvis frø før frigivelsen (denne del af proceduren vil blive udført i et lukket GMO laboratorium på DMU i Roskilde). Selve frigivelsen vil inkludere fjernelse af emballagen fra de coatede frø eller stiklinge, plantning i jorden og tildækning med jord. Bakteriernes kontakt med luft vil blive minimal. Bakterier bliver ikke spredt på jordoverfladen. Ingen aerosoler dannes på stedet.

F. VEKSELVIRKNINGER MELLEML GMO'en OG MILJØET SAMT POTENTIEL MILJØPÅVIRKNING

1. Fuldstændig navn på målorganismene:

- i) orden og/eller højere taksonomisk gruppe (for dyr)
- ii) familie (for planter)
- iii) genus
- iv) species
- v) subspecies
- vi) stamme
- vii) kultivar
- viii) patovar
- ix) trivialnavn

Ikke relevant: Det ultimative mål for begge GMO'er som frigives, er kontaminanter i jorden.

2. Forventet mekanisme for og resultat af vekselvirkning mellem de udsatte GMO'er og målorganismen:

(Ikke relevant)

3. Andre potentielt vigtige vekselvirkninger med andre organismer i miljøet:

Stamme F113 blev isoleret fra sukkerroe rhizosfære pga. dens potentielle anvendelse som biokontrol organisme og den kan interagere med andre organismer pga. dens evne til at kolonisere plante rhizosfæren. Dette er blevet grundigt undersøgt *in vitro*, i mikrokosmos modeller og i en tidligere udsætningsforsøg (O'Gara *et al.* 1994; Dowling *et al.* 1995; Corich *et al.* 1995). F113 stammer kan potentielt have virkninger på andre jordbundsmikroorganismer. Der er dog ikke observeret sådanne effekter på gavnlige mikrosymbionter. Derudover var gær og svampekoloni-dannende enheder ikke signifikant påvirket af F113 stammer i en ærte-rhizosfære mikrokosmos ved nogen af de undersøgte jord-pH (Naseby and Lynch, 1999). Disse resultater er i modsætning til den biokontrol effekt, som F113 udviser overfor plante patogene svampe (Carroll *et al.*, 1995; Dunne *et al.*, 1995) og bakterier (Cronin *et al.*, 1997).

4. Kan selektion til fordel for GMO'en ventes at forekomme efter udsætningen?

JA NEJ VIDES IKKE

Hvis Ja, anfør nærmere:

5. Typer af økosystemer, hvortil GMO'en kan spredes fra udsætningsstedet og hvor den vil kunne etablere sig:

Ingen

6. Fuldstændigt navn på ikke-målorganismen, som utilsigtet vil kunne påvirkes:

- i) orden og/eller højere taksonomisk gruppe (for dyr)
- ii) familie (for planter)
- iii) genus
- iv) species
- v) subspecies
- vi) stamme
- vii) kultivar
- viii) patovar
- ix) trivialnavn

Ingen

7. Sandsynlighed for genetisk udveksling in vivo

- a) fra GMO'en til andre organismer i det økosystem, hvor udsætningen finder sted:

Indsættelsen af *LacZY* og *bph* generne i F113 er udført med transposition, herved dannes stabile insertioner, som ikke indeholder transposase genet (Fedi *et al.*, 1996; Brazil *et al.*, 1996). Dog har horisontal *in vitro* overførsel af *LacZY* generne vist sig med en frekvens på 10^{-6} - 10^{-7} , hvorimod eksperimenter i mikrokosmos ikke viste nogen overførsel (Fedi *et al.*, 1996), hvilket indikerer, at overførsel i naturlig jord ikke sker, eller kun sker med meget lav frekvens.

- b) fra andre organismer til GMO'en:

(Ikke relevant)

8. Referencer til relevante resultater af undersøgelser af GMO'ens adfærd og karakteristika samt den økologiske betydning heraf, udført i simulerede naturlige miljøer (f.eks. mikrokosmer):

Disse stammer er grundigt undersøgt *in vitro*, i mikrokosmos-modeller og i et tidligere udsætningsforsøg (O'Gara *et al.* 1994; Dowling *et al.* 1995; Corich *et al.* 1995). Ingen bivirkninger blev observeret på micorrhizasymbiosen i *Glomus mosseae*-tomaten når den blev inokuleret med F113 stammer, inklusiv en DAPG overproducerende stamme (Barea *et al.* 1998). Gær og svampes kolonidannende enheder blev ikke signifikant påvirket af F113 stammer i en ærte rhizosfære mikrokosmos ved nogen af de undersøgte jord-pH (Naseby and Lynch, 1999). Disse resultater er i kontrast til den biokontroleffekt som F113 udviser overfor plante patogene svampe (Carroll *et al.*, 1995; Dunne *et al.*, 1995) og bakterier (Cronin *et al.*, 1997). Alle de tilgængelige data indikerer, at selvom F113 måske påvirker nogle arter af mikroorganismer vil den ikke have nogen effekt på jordens overordnede mikroflora, og den vil ikke påvirke vigtige nøgle arter, der har gavnlige effekter i jorden. Den erfaring, der er fra tidligere forsøgsudsætninger sammen med laboratorieeksperimenter tyder på at interaktionerne mellem den genetisk modificerede stamme af F113 og andre organismer ikke er forskellig fra F113 wildtypen.

G. OPLYSNINGER OM OVERVÅGNING

1. Metoder til overvågning af GMO'er:

- Jord, rod og bladprøver vil blive taget periodisk og analyseret. Levedygtige bakterieceller vil blive talt ved selektiv udpladning på agarmedie (sucrose-asparagin + Rifampicin; Lactose; Spray test med 2,3-dihydroxy-biphenyl)

Detektion and kvantificering: SA rif Xgal plader vil blive brugt til at skelne mellem naturlig jord-mikroflora og de to frigivne stammer (SA = selektiv lav jern sucrose-asparaginmedie):

- a. non-fluorescente kolonier + spray test positive = rifampicin resistente PCB-nedbrydere, dvs. *Burkholderia cepacia* LB400
 - b. fluorescente kolonier + spray test positive = *P. fluorescens* F113rifpcb
 - c. blue colonies = *P. fluorescens* F113::lacZYrif
- Alternativt kan der benyttes en MPN metode (Fedi *et al.* 1996) målrettet på fænotypisk ekspresion af lacZY generne for at kvantificere stamme F113::lacZY.

2. Teknikker til overvågning af GMO'ernes effekt på økosystemet:

Uønskede effekter på økosystemet kann ikke forventes uden for frigivelsesområdet. Potentielle effekter er begrænset til tilstedeværelsen af jord-kontaminant type, PCB'er. Porevand analyser ved og under PCB-kontaminerede jordlag (i 20, 50 og 100 cm dybde) vil blive udført for at bekræfte fravær af vandopløselige klorbenzoater, der teoretisk kan blive dannet som mellemprodukt i PCB-metabolisme. I givet fald vil jordoverfladen dækkes med plast for at minimere nedsivning.

3. Teknikker til at påvise overførsel af det indførte genetiske materiale fra GMO'en til andre organismer:

Overvejede andre organismer: andre bakterier.

Jord, rod og bladprøver vil blive taget på frigivelsesstedet og i omgivelserne. Fra disse prøver vil der blive dyrket bakterier på næringsstofmedie. Kolonierne vil blive „blotted“ og lyseret. Specifikke DNA prober skal bruges til at visualisere DNA fra de overførte gener. Doneret DNA detekteret i kolonier, der ikke opfylder kravene under 1a.-1c. vil blive betraget som recipientorganismer for overført DNA.

4. Overvågningsområdets udstrækning (m²):

500 m i alle retninger

5. Overvågningens varighed:

Under eksperimentet (1 til 2 sæsoner) plus 5 år herefter. Kan forlænges i forhold til miljømæssige krav.

6. Overvågningens hyppighed:

1 gang pr. måned under de første 6 måneder.

1 gang hver tredje måned gennem perioden måned 7-18 efter frigivelsen.

To gange om året herefter.

H. OPLYSNINGER OM BEHANDLINGSOPERATIONER EFTER UDSÆTNINGEN OG OM BEHANDLING AF AFFALD

1. Behandling af stedet efter udsætningen:

Ingen

2. Behandling af GMO'erne efter udsætningen:

Ingen

- 3)

- a) Det fremkomne affalds art og mængde:

Emballager brugt på frigivelsesdagen; et par kg.

Prøver taget under monitoring, 10—100 kg pr. prøvetagning, se punkt G.6 for monitoringsplan.

- b) Affaldsbehandling:

Alt affald vil blive indsamlet i plasticposer og transporteret med bil til laboratoriet på DMU, Roskilde, som er godkendt til at arbejde med GMO'er. Tilslut vil alt blive destrueret ved autoklaving.

I. OPLYSNINGER OM BEREDSKABSPLANER

1. Metoder og procedurer til kontrol med GMO'er i tilfælde af uventet spredning:

Sprøjtning af vegetation med Roundup. Herved elimineres værtsplanten for F113 stammerne. Desuden er stamme F113 Roundup-sensitiv, dvs. overlevelse af F113 stammer vil blive reduceret.

2. Metoder til dekontaminering af de berørte områder:

Fjernelse af jord og planter efterfulgt af afbrænding: Overjordiske plantedele høstes. Planternes hovedrødder samt den omliggende jord (områder med højste bakteriedensitet) graves op. Alt forpakkes i plast sække og behandles som sygehusaffald.

- 3 Metoder til bortskaffelse eller sanering af planter, dyr, jord osv., der har været eksponeret under eller efter spredningen:

Autoklavering, afbrænding.

4. Planer til beskyttelse af menneskers sundhed og miljøet i tilfælde af uønskede virkninger:

Se punkt 1) – 3).