



## Antrag 6786-01-0071

### Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten Sinorhizobien

(*Sinorhizobium meliloti*) (Derivate L1 und L33 des Stammes *S. meliloti* Rm2011)

im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens, durchgeführt von der

deutschen zuständigen Behörde, Berlin, den 20. August 1997

#### Hinweis zu diesem Dokument:

Der folgende Text fasst die Risikobewertung von gentechnisch veränderten Organismen zusammen, die für ein Freisetzungsvorhaben in Deutschland genutzt werden sollen. Der Text ist Bestandteil des Genehmigungsbescheids, der zu einem Antrag auf Genehmigung einer Freisetzung von gentechnisch veränderten Organismen nach der Richtlinie 2001/18/EG und dem deutschen Gentechnikgesetz (GenTG) erteilt worden ist. Der Bescheid wurde vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) als der in Deutschland nach dem Gentechnikrecht zuständigen Behörde ausgestellt und enthält die Abschnitte:

- I. Genehmigung
- II. Nebenbestimmungen
- III. Begründung
  - III.1. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 GenTG
    - III.1.1. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 1 Nr. 1 GenTG
    - III.1.2. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 1 Nr. 3 GenTG
    - III.1.3. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 1 Nr. 2 GenTG
    - III.1.4. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 4 und 5 GenTG
  - III.2 Würdigung und Bescheid der Einwendungen
- IV. Kosten
- V. Rechtsbehelfsbelehrung

Nur der Bescheid ist rechtlich verbindlich. Der folgende Auszug umfasst das Kapitel III.1.2. des Bescheides und wurde für das Biosafety Clearing-House zusammengestellt.

### III.1.2.1. Bewertung der durch die übertragenen Nukleinsäuresequenzen bewirkten Veränderungen in den gentechnisch veränderten Sinorhizobien

#### a) Das Luziferase-Gen aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis*

Die cDNA des Luziferase-Gens kodiert für das 62 kDa große Enzym Luziferin-4-Monooxygenase, das das Substrat Luziferin (eine heteropolyzyklische organische Säure) unter ATP-Verbrauch in Gegenwart von Sauerstoff zu Oxyluziferin oxidiert. Durch die Reaktion kommt es zu einer Emission von Licht (Biolumineszenz), die mittels geeigneter Verfahren (Luminometer, Schwärzung von Röntgenfilmen etc.) nachgewiesen werden kann. Das Luziferase-Gen von *Photinus pyralis* wird als Reportergen in verschiedenen Organismen (Prokaryoten und Eukaryoten) verwendet. In Bezug auf den molekularen Aufbau und Substratspezifität unterscheidet sich die Luziferase aus dem Leuchtkäfer grundlegend von dem prokaryotischen Biolumineszenz-System aus *Vibrio fischeri*.

Bisher publizierte Ergebnisse wissenschaftlicher Untersuchungen lassen erwarten, daß ein dem Leuchtkäfer-Gen verwandtes Gen und eine Umsetzung des Leuchtkäfer-Luziferins bei Bakterien nicht vorkommen. Es ist zwar nicht auszuschließen, daß die Luziferase auch andere dem Leuchtkäfer-Luziferin chemisch verwandte Substanzen umsetzen kann, jedoch ist durch eine potentielle Aktivität des Enzyms in *Sinorhizobium meliloti* eine Gefährdung für die Umwelt nicht zu erwarten.

#### b) Der *nptII*-Promotor aus dem Transposon Tn5 von *E. coli*

Der *nptII*-Promotor wurde vor die cDNA-Sequenz des *luc*-Gens eingefügt, um die konstitutive Expression des *luc*-Gens in *Sinorhizobium meliloti* zu erreichen. Bei dem *nptII*-Promotor handelt es sich um ein bakterielles genetisches Regulationselement, das als Bestandteil des *nptII*-Gens in gramnegativen Bakterien vorkommt und keine DNA-Sequenz des *nptII*-Strukturgens enthält.

#### c) Der Integrationsort der *luc*-Genkassette in *Sinorhizobium meliloti*

Die *luc*-Genkassette (*nptII*-Promotor und *luc*-cDNA) wurde durch *in vivo*-Rekombination in das Chromosom von *S. meliloti* RM2011 integriert. Das angewandte Verfahren, bei dem eine doppelte Rekombination erfolgte, stellt sicher, daß nur die *luc*-Genkassette und keine Vektorsequenzen im Chromosom der gentechnisch veränderten Bakterien integriert vorliegen. Die korrekte Insertion der *luc*-Genkassette und das Fehlen von Vektorsequenzen wurden mittels DNA-Hybridisierungsverfahren der relevanten chromosomalen Bereiche überprüft und bestätigt. Als Integrationsort wurde der *recA*-Locus gewählt. Das *recA*-Gen kodiert für ein Protein, das eine zentrale Rolle bei natürlichen Rekombinationsprozessen, DNA-Reparaturprozessen und bei der Kontrolle der Genexpression nach DNA-Schädigung spielt. In einem der freizusetzenden Stämme wurde das *recA*-Gen durch Integration der *luc*-Genkassette inaktiviert (Stamm L1), in dem anderen Stamm erfolgte die Integration "stromabwärts" der kodierenden Region des *recA*-Gens (Stamm L33) ins Chromosom.

Der rekombinationsintakte Stamm L33 unterscheidet sich bis auf die durch die *luc*-Genkassette vermittelte Eigenschaft nicht vom Ausgangsstamm. Es sind keine Mutationen durch die Insertion zu erwarten, da die Integration der Kassette "stromabwärts" vom Leserahmen des *recA*-Gens in einem nichtkodierenden Bereich des Chromosoms erfolgte.

Beim Stamm L1 ist durch die Insertion der *luc*-Genkassette in die kodierende Region eine Inaktivierung des *recA*-Gens erfolgt. Untersuchungen des Antragstellers zeigen, daß *recA*-Mutanten von *S. meliloti* eine verlängerte Generationszeit haben und der Stamm L1 in Mikrokosmosversuchen mit unsterilem Boden einen Wachstumsnachteil hat. Da das *recA*-Protein eine zentrale Rolle bei Prozessen der DNA-Reparatur spielt, ist eine Verlängerung der Generationszeit bei *recA*-Mutanten plausibel. Die Klärung der Frage, ob die *recA*-Mutation in der Umwelt zu einer Reduzierung der Kompetitionsfähigkeit des Stammes L1 gegenüber der natürlichen Mikroorganismenflora führt, ist Gegenstand der geplanten Untersuchungen. Bei dem seit 1994 laufenden Freisetzungsversuch mit den Stämmen L1 und L33 in Braunschweig konnte keine signifikant verminderte Lebensfähigkeit des Stammes L1 festgestellt werden, was vermutlich an der kleinen endogenen *Sinorhizobium meliloti*-Population an diesem Standort gelegen hat. Voruntersuchungen am Standort in Straß haben ergeben, daß hier eine deutlich größere endogene *Sinorhizobium meliloti*-Population vorhanden ist.

Da die *luc*-Genkassette ins Chromosom der beiden gentechnisch veränderten Bakterienstämme integriert wurde, ist zu erwarten, daß die gentechnische Veränderung konstant an die Nachkommen weitergegeben wird und keine weiteren Auswirkungen als die bereits erörterten auf die Eigenschaften der GVO hat. Insbesondere ist nicht anzunehmen, daß die gentechnisch veränderten *S. meliloti*-Stämme ein verändertes Symbioseverhalten zeigen und mit anderen Pflanzen als ihren natürlichen Symbiosepartnern in Wechselwirkung treten können, da die Gene für die Erkennung der Symbiose-Partner (die sog. Nodulationsgene) und die für die Stickstoff-Fixierung wesentlichen Gene (*nif*- und *fix*-Gene) unverändert geblieben sind.

### III.1.2.2. Bewertung der Möglichkeit, daß die gentechnisch veränderten Sinorhizobien über das Versuchsgelände hinaus verbreitet werden

Bakterien der Gattung *Sinorhizobium* sind gramnegative, aerobe Bodenbakterien, die eine Symbiose mit Leguminosen eingehen können und in der Symbiose molekularen Stickstoff in organische Verbindungen einbauen können. Die Anwesenheit der Wirtspflanzen ist für die Vermehrung von *Sinorhizobium* von großer Bedeutung, da eine wirksame Vermehrung dieser Bakterien im Boden in der Rhizosphäre der Symbiosepflanzen erfolgt. (Unter Rhizosphäre versteht man die Wurzeloberfläche und den Teil des Bodens, der unmittelbar durch das Wurzelsystem beeinflusst wird.) Bisherige Untersuchungen im Freiland mit genetisch markierten *Sinorhizobium*-Bakterien ergaben, daß die laterale und vertikale Verbreitung der Bakte-

rien weitgehend an die Wurzelentwicklung der Wirtspflanzen gebunden ist. Die enge Vergesellschaftung zwischen *Sinorhizobium* und den Wurzeln der Symbiosepartner bedeutet, daß die Verbringung durch Wind oder Regenwasser allein keine effektiven Verbreitungswege für diese Bakterien darstellen.

Die für den Freisetzungsvorhaben vorgesehene Spezies *Sinorhizobium meliloti* hat ein enges Wirtsspektrum und geht nur Symbiosen mit Leguminosen der Gattungen *Medicago* (Luzerne), *Melilotus* (Honig-, Steinklee) und *Trigonella* (Bockshornklee) ein. Da in der Nachbarschaft (bis 100 Meter) des Versuchsgeländes kein Anbau von Luzerne bzw. anderer Wirtspflanzen von *S. meliloti* erfolgt, sind die Voraussetzungen für eine Vermehrung der GVO außerhalb des Versuchsgeländes stark eingeschränkt (s. Nebenbestimmung II.8).

Gegebenenfalls natürlicherweise vorkommende Wirtspflanzen von *S. meliloti*, die im Umkreis des Versuchsgeländes wachsen, sind in die Untersuchungen einzuschließen, um eine eventuelle Ausbreitung der GVO zu prüfen (s. hierzu Nebenbestimmung II.8). Diese vorgesehene Überwachungsmaßnahme soll sicherstellen, eine unerwartete Ausbreitung der GVO frühzeitig zu erkennen. Die gegebenenfalls notwendige Entfernung der Symbiosepartner aus dem das Versuchsgelände umgebenden Bereich stellt eine Maßnahme zur Begrenzung des Versuches dar.

Eine Verschleppung von GVO ins Grundwasser durch Sickerwasser könnte zwar möglich sein, jedoch ist grundsätzlich festzustellen, daß Sinorhizobien als symbiontische Bodenbakterien in einem wässrigen Milieu mit großer Wahrscheinlichkeit nicht persistieren können, sondern durch die natürliche Mikroorganismenflora im Wasser verdrängt werden. Auch eine passive, horizontale Verbreitung von gentechnisch veränderten Bakterien durch Regenwasser über die Freisetzungspartellen hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, da das Versuchsgelände ein leichtes Gefälle aufweist. Durch das oben aufgeführte Monitoring-Programm ist aber sichergestellt, daß eine mögliche Verbreitung auch außerhalb des Versuchsgeländes verfolgt werden kann. Grundsätzlich ist festzuhalten, daß eine Verbreitung von Sinorhizobien im wesentlichen aufgrund der Wechselwirkung mit ihren Wirtspflanzen erfolgt. Bei dem mit den hier beschriebenen gentechnisch veränderten Bakterien durchgeführten Freisetzungsvorhaben in Braunschweig hat sich dieses bestätigt. Ein Jahr nach Ausbringung waren die GVO außerhalb der Partellen an Stellen, an denen keine Luzerne wuchs, nur mit einem Lebend-Titer nahe der Nachweisgrenze festzustellen.

Die Freisetzungspartellen liegen innerhalb eines von einem Wildschutzzaun umgebenen Geländes der Staatlichen Versuchsgüterverwaltung Freising. Dadurch werden Wildtiere ferngehalten und ein unabsichtlicher Zutritt unbefugter Personen zum Versuchsgelände ist nicht zu erwarten. Diese Maßnahme ist als ausreichend anzusehen, um ein unbeabsichtigtes Verschleppen von GVO durch Personen oder Wildtiere zu mindern.

Gegenstände (Schuhwerk, Werkzeuge etc.), die im Rahmen von Versuchsarbeiten (z. B. Ausbringung der GVO, Probenahmen) mit GVO in Berührung kommen, sind zur Verminderung des Austragens von GVO nach Beendigung der Arbeit auf dem Versuchsgelände zu säubern (s. Nebenbestimmung II.5).

### III.1.2.3. Bewertung der Fähigkeit der gentechnisch veränderten Sinorhizobien, sich auf den Freisetzungspartellen zu etablieren

Für die wirksame Vermehrung der Sinorhizobien ist die Rhizosphäre der Wirtspflanze, mit der eine Symbiose eingegangen werden kann, von großer Bedeutung. Die Generationszeit von Sinorhizobien im Boden außerhalb der Rhizosphäre unter sonst geeigneten Bedingungen beträgt mehr als 200 Stunden, während die Generationszeit in der Rhizosphäre auf 9 bis 12 Stunden geschätzt wird. Dauerstadien, wie z. B. Sporen, werden von Sinorhizobien nicht gebildet. Über mehrere Jahrzehnte wurden weltweit Sinorhizobien zur Verbesserung des Wachstums von Leguminosen in großem Umfang ausgebracht; dabei wurde festgestellt, daß die zu diesem Zweck in den Boden eingebrachten Sinorhizobien ohne Anwesenheit von Wirtspflanzen in ihrem Titer zurückgingen.

Beim vorliegenden Freisetzungsvorhaben sollen die gentechnisch veränderten *Sinorhizobium*-Stämme 1997 in Partellen ausgebracht werden. Die Menge der freizusetzenden GVO ist so berechnet, daß pro Gramm Boden bis zu einer Tiefe von 25 cm ein Bakterientiter von 10<sup>6</sup> Bakterien pro Gramm Boden erreicht wird. Nach Ausbringung der Bakterien wird auf den 49 Partellen der Symbiosepartner Luzerne (*Medicago sativa*) ausgesät. Bei 21 dieser Partellen soll im zweiten Versuchsjahr die Luzerne entfernt, der Boden umgegraben und Getreide eingesät werden. Die Luzerne soll bis zu dreimal pro Jahr, das Getreide einmal pro Jahr geerntet werden, wobei die geernteten Partellen auf dem Versuchsgelände kompostiert werden sollen. Eine Entfernung eventuell verbleibender gentechnisch veränderter Sinorhizobien aus den Freisetzungspartellen nach Beendigung des Versuches ist von der Antragstellerin nicht vorgesehen.

Aufgrund der vorliegenden Erfahrung mit Freisetzungsvorhaben von Sinorhizobien kann davon ausgegangen werden, daß die gentechnisch veränderten Bakterien im Bereich der Rhizosphäre der Luzernewurzeln persistieren können. In den Bodenbereichen der Partellen, die nicht zur Rhizosphäre der Wirtspflanzen gehören, wird keine effektive Vermehrung der GVO erwartet, folglich ist in diesen Bodenbereichen mit einer Abnahme des anfänglichen GVO-Titers zu rechnen.

Da *Sinorhizobium meliloti* für eine effiziente Vermehrung im Boden auf die Anwesenheit des Symbiosepartners Luzerne angewiesen ist, sind die in der Nebenbestimmung II.9 genannten Maßnahmen (Zerstörung der Wachstumsfähigkeit der Wirtspflanzen, Monitoring des GVO-

Titers) nach Beendigung der Versuchszeiten zur vorsorglichen Begrenzung des Versuches geeignet.

Es wird erwartet, daß nach Zerstörung der Wachstumsfähigkeit der Wirtspflanzen auf den Versuchspartellen der GVO-Titer abnimmt. Um auch eine unerwartete Populationszunahme der GVO erfassen zu können, ist eine Überwachung des GVO-Titers nach Zerstörung der Wachstumsfähigkeit der Wirtspflanzen angeordnet worden. Sollte diese Überwachung Hinweise auf eine unerwartete Populationszunahme der GVO ergeben, wären Maßnahmen zur Beseitigung der GVO erforderlich. Bei einer Abnahme des GVO-Titers in den Partellen sind Maßnahmen zur Beseitigung der GVO entbehrlich, da aus der Risikobewertung der gentechnisch veränderten Organismen eine Gefährdung für die Rechtsgüter nach § 1 Nr.1 GenTG nicht zu erwarten ist.

#### III.1.2.4. Bewertung der Möglichkeit einer Übertragung des eingeführten Fremdgens von den gentechnisch veränderten Sinorhizobien über horizontalen Gentransfer auf andere Mikroorganismen

Die eingeführte DNA-Sequenz wurde stabil in das Chromosom des Empfängerorganismus durch *in vivo*-Rekombination inseriert. Die Integration der *luc*-Genkassette ins Chromosom der GVO macht eine Übertragung der Sequenz durch konjugative Prozesse unwahrscheinlich.

Ein Transfer chromosomaler Gene ist im Prinzip durch Bakteriophagen-vermittelte Transduktion möglich. Gesicherte Erkenntnisse über die Häufigkeit und Bedeutung dieser Form des Gentransfers in der natürlichen Umwelt liegen bisher für Sinorhizobien nicht vor.

Ein Transfer der *luc*-Genkassette auf andere Organismen könnte durch Freiwerden der chromosomalen DNA aus abgestorbenen GVO und Aufnahme der reinen Nukleinsäuren durch andere Bodenbakterien erfolgen. Solche Transformationsprozesse sind bei Bodenbakterien, die eine natürliche Kompetenz zur DNA-Aufnahme besitzen, denkbar. Zu diesen gehören auch *Sinorhizobium meliloti* und andere Bodenbakterien. Zur Integration einer aufgenommenen DNA mittels homologer Rekombination in die DNA eines Empfängerorganismus muß zudem eine Homologie der die Kassette flankierenden DNA-Sequenzen vorliegen. Es ist nicht bekannt, ob Transformation, d. h. Aufnahme freier DNA und eine mögliche Etablierung dieser DNA, unter natürlichen Bedingungen einen signifikanten Beitrag zum Gentransfer leistet.

Möglichkeiten des Transfers der *luc*-Genkassette auf andere Organismen sind nur von geringer Wahrscheinlichkeit, aber doch vorstellbar. Eine solche Möglichkeit besteht jedoch für jegliche DNA unabhängig von der Herkunft und nicht im besonderen Maße für die *luc*-Genkassette. Es gibt keinen Grund anzunehmen, daß die *luc*-Genkassette *Sinorhizobium meliloti* oder anderen Bodenmikroorganismen einen Selektionsvorteil vermitteln kann. Eine

über die beabsichtigte Freisetzung hinausgehende Verbreitung der *luc*-Genkassette über Makroorganismen ist nicht zu erwarten. Mit der *luc*-Genkassette sind keine risikobedingenden Eigenschaften verbunden. Selbst bei einem Transfer der *luc*-Genkassette in andere Bodenbakterien ist nicht erkennbar, daß dies eine Gefährdung darstellen kann.