

## **Standpunt van de COGEM ten aanzien van de toelaatbaarheid van het toepassen van antibioticum resistentiegenen in transgene planten**

### **Vraagstelling**

In een groot aantal transgene gewassen die voor introductie tot het marktverkeer worden aangeboden bevinden zich antibioticum resistentiegenen.

In deze notitie wordt ingegaan op de toelaatbaarheid van deze toepassing van antibioticum resistentiegenen.

De opdracht van de COGEM is de risico-analyse van toepassingen van genetische modificatie, voor zover die risico's te maken hebben met de veiligheid van mens en milieu, bij incidentele blootstelling.

Voor de COGEM valt de nadruk in deze discussie op de vraag:

- Wat kunnen de gevolgen zijn van deze toepassing voor de ontwikkeling van antibioticumresistentie in bacteriepopulaties, bij eventuele horizontale verspreiding van deze genen. Deze vraag wordt verder in deze notitie behandeld.
- Daarnaast heeft de COGEM de volgende vragen in beschouwing genomen, die in deze inleiding kort worden behandeld:
  - Kan de aanwezigheid van de antibioticum resistentie leiden tot veronkruiding?  
Deze vraag is alleen relevant voor de situatie waarin het resistentiegen wordt gereguleerd door een plantenpromoter. Voor planten die een dergelijk gen dragen zou dat een selectief voordeel kunnen zijn, indien het relevante antibioticum in het milieu voor zou komen in concentraties die remmend zijn op de groei en ontwikkeling van planten. Dergelijke concentraties worden nooit gevonden: de concentratie van antibiotica in het milieu is onmeetbaar laag. Aanwezigheid van de resistentie zal dus niet leiden tot veronkruiding.
  - Kan de aanwezigheid van een antibioticum resistentiegen leiden tot acute schadelijke effecten voor mens of dier bij incidentele blootstelling?  
Mogelijke acute schadelijke effecten zijn: toxische of allergische effecten van de genproducten of van omzettingsproducten geproduceerd onder invloed van de genproducten.  
De genproducten detoxificeren antibiotica, bijvoorbeeld door fosforylering of acetylering van het substraat, of door het openbreken van de moleculaire structuur van het substraat. Het zijn enzymen met een hoge mate van substraatspecificiteit. Er is geen reden om aan te nemen dat zij een toxische werking zouden kunnen hebben. Het substraat is onder de omstandigheden waaronder de planten normaliter worden gekweekt, niet aanwezig. Onder die omstandigheden worden er dus ook geen omzettingsproducten gevormd. De omzettingsproducten zijn bovendien niet meer toxisch dan het substraat.  
Er zijn daarom geen acute schadelijke effecten voor mens of milieu te verwachten.

### **De toepassing van antibioticum resistentiegenen in transgene planten**

In veel gevallen worden de genen doelbewust aangebracht, en wel om getransformeerde plantencellen te kunnen selecteren. In die gevallen wordt de expressie van het gen gereguleerd door een promotor die in de plantencel actief is. In andere gevallen is het resistentiegen zonder bepaalde bedoeling in de plant gekomen. Het gaat dan meestal om genen die dienen om het genconstruct dat in de plant wordt gebracht, geselecteerd te kunnen houden in bacteriële gastheren. De expressie van het gen wordt dan gereguleerd door een bacteriële promotor. De aard van de promotor is in hoge mate bepalend voor het effect van het gen na overdracht naar een nieuwe gastheer. Een gen dat gereguleerd wordt door een plantenpromotor zal over het algemeen niet tot expressie komen in een bacterie, en wel in een plant; omgekeerd zal een gen dat wordt gereguleerd door een bacteriële promotor wel in (een aantal verwante) bacteriën tot expressie komen, maar niet in een plant.

### **Horizontale genoverdracht**

Voor deze discussie gaan wij er vanuit dat toepassing van antibioticum resistentiegenen in transgene planten zal leiden tot verspreiding van die genen vanuit het planten DNA naar in het milieu voorkomende micro-organismen. De frequentie waarmee dit gebeurt, is onbekend. Volgens de berekeningen die hierover zijn uitgevoerd zal de frequentie waarmee dit gebeurt, erg laag zijn (zie bijlage 2, 'Schatting van de transformatiefrequentie van een micro-organisme in de bodem als gevolg van de teelt van kanamycine resistente tomaten', aan het eind van deze notitie). Het optreden van horizontale overdracht kan echter niet worden uitgesloten.

Men dient zich te realiseren dat, als horizontale genoverdracht plaatsvindt in de bodem, alle DNA dat zich daar bevindt bij het proces betrokken is. Hoog moleculair DNA, geschikt voor opname in micro-organismen, is in grote hoeveelheden in de bodem aanwezig. Transgeen DNA heeft ten opzichte van het overige DNA geen bijzonder voordeel boven het andere hoog moleculaire DNA.

Het succes van een gebeurtenis van horizontale genoverdracht zal in belangrijke mate afhangen van de expressie van het gen (dus van de gebruikte promotor, zie boven), en van de selectiedruk, i.e. van de concentratie aan antibiotica in het milieu. Hoewel deze onmeetbaar laag is, mag er vanuit worden gegaan dat er zeer plaatselijk microniches zijn waarin selectie kan bestaan.

### **Impact van horizontale genoverdracht**

De kans op horizontale overdracht van antibioticum resistentiegenen is zeer laag. Dat betekent op zich nog niet dat de impact van het proces ook zeer laag is. Die impact zal afhankelijk zijn van de mate waarin resistentie tegen het antibioticum reeds in het milieu voorkomt. Hierbij zal bijzondere aandacht worden gegeven aan de vraag of het gaat om

een antibioticum dat medisch of veterinair van groot belang is, en of er in de medische of veterinaire praktijk reeds een hoge mate van resistentie tegen het antibioticum wordt geconstateerd.

Afhankelijk van de argumentatie zal men soms geïnteresseerd zijn in het voorkomen van het betreffende gen; vaak gaat het echter om het voorkomen van het fenotype van resistentie / tolerantie tegen het betreffende antibioticum of tegen de groep van antibiotica waar het toe behoort.

### De gegevens voor de risico-analyse

Om een risico-analyse van de toepassing van een antibioticum resistentiegen in gewassen te kunnen doen zijn de volgende gegevens van belang:

- Tegen welke antibiotica veroorzaakt het gen resistentie? Hoe breed is het spectrum van antibiotica waartegen het genproduct resistentie veroorzaakt?
- Wat is de herkomst van het gen?  
Op basis van deze informatie kan vaak al een conclusie getrokken worden over de natuurlijke verspreiding van het gen (bijvoorbeeld als het gen op een transposon voorkomt).
- Wat is bekend over het voorkomen van de resistentie in het milieu?  
Bij het beoordelen en vergelijken van verschillende studies op dit gebied zijn de volgende punten van belang:
  - Het milieu waar gezocht is: bijvoorbeeld darmflora, watermonsters, grondmonsters.
  - De kwaliteit van de gegevens: stond de onderzochte populatie onder antibioticumdruk; heeft men gekeken naar fenotypes (en hoe werd dan 'resistentie' gedefinieerd), of heeft men gezocht naar een bepaald gen?
  - Wat is de relevantie van de gegevens gezien tegen de eigenschappen van het gen (kruisresistenties) en gezien tegen de toepassing van de plant (al dan niet geconsumeerd).
- Wat is het belang van het antibioticum voor medische of veterinaire toepassing: gaat het bijvoorbeeld om een antibioticum dat een laatste redmiddel functie heeft, en wat bedoelt men in dat geval precies met de term 'laatste redmiddel'; wat is bekend over het voorkomen van resistentie; vormt nu reeds voorkomende resistentie een belemmering voor antibioticumtherapie?

### Risico-analyses

De COGEM heeft geadviseerd dat tegen toepassing van de volgende antibioticum resistentiegen geen bezwaar bestaat, om de volgende redenen:

- *nptII*:
  - Spectrum: smal, veroorzaakt resistentie tegen kanamycine en neomycine, niet tegen de 'nieuwe generaties' aminoglycoside antibiotica.
  - Herkomst: Tn5; dit transposon is wijd en zijd aangetroffen in allerlei gram negatieve organismen; het bevindt zich vaak op zelfoverdraagbare plasmiden.
  - Voorkomen: de resistentie wordt in betrekkelijk hoge frequenties aangetroffen in het milieu (kweekbare bodemmicro-organismen) zonder dat er sprake is van verhoogde selectiedruk (bijvoorbeeld door het toevoegen van de antibiotica aan het milieu). Bij de selectie in het laboratorium wordt altijd gekeken naar de fractie die fenotypisch resistent is; als antibioticum wordt dan meestal kanamycine gebruikt, in relevante concentraties.
  - Klinische toepassing van de antibiotica: voor humane toepassingen vrijwel volledig verdrongen door nieuwere generatie antibiotica; alleen nog relevant in veterinaire toepassingen.
  - **Conclusie:** Resistentie tegen kanamycine en neomycine komt van nature reeds veel voor. De zeer geringe bijdrage die horizontale genoverdracht aan resistentieontwikkeling zal leveren, zal geen invloed hebben op de medische toepasbaarheid van het antibioticum.
- *nptIII*:
  - Spectrum: breder dan *nptII*: naast kanamycine en neomycine resistentie ook amikacine resistentie. Echter, het klinisch belang van deze resistentie staat niet ondubbelzinnig vast. Het genproduct heeft geen erg hoge affiniteit voor het substraat; het gen zal een micro-organisme slechts een geringe mate van tolerantie geven.
  - Voorkomen: over het voorkomen van *nptIII* is zijn geen duidelijke gegevens voorhanden: er zijn geen systematische studies gedaan naar het voorkomen van deze specifieke vorm van aminoglycoside resistentie. Uit de volgende gegevens kan de feitelijke situatie wel worden geëxtrapoleerd. Bij klinische toepassing treedt snel resistentie op. Dat betekent dat de resistentie reeds veelvuldig latent in de populatie aanwezig is. Het mechanisme van de resistentie is in die gevallen niet bekend. De snelle resistentieontwikkeling maakt dat amikacine slechts op beperkte schaal klinisch wordt toegepast. De potentiële, uiterst geringe, bijdrage aan deze resistentie die verwacht mag worden van toepassingen.
  - Klinische toepassing: ondanks het snelle optreden van resistentie is het antibioticum medisch bruikbaar, in die gevallen waarin de patiënt in staat is de overblijvende resistente populatie via het immuunsysteem te bestrijden. Toepassing daarom alleen in de kliniek.
  - **Conclusie:** Resistentie tegen amikacine komt reeds zoveel voor dat het potentieel een probleem is. Het bestaande gevaar van resistentieontwikkeling wordt onderkend; in de gangbare medische praktijk speelt de resistentieontwikkeling geen rol. De zeer geringe bijdrage die horizontale genoverdracht aan resistentieontwikkeling zal leveren, zal geen invloed hebben op de medische toepasbaarheid van het antibioticum.
- *bla*:
  - Spectrum: ampicilline en vergelijkbare  $\beta$ -lactam antibiotica.
  - Voorkomen: resistentie tegen  $\beta$ -lactam antibiotica, meer in het bijzonder tegen ampicilline, wordt zeer breed aangetroffen, in zeer hoge percentages van de kweekbare micro-organismen. Percentages lopen op tot tientallen procenten, zelfs in populaties die ten tijde van het onderzoek niet onder antibioticumdruk staan, maar die waarschijnlijk wel met enige regelmaat aan het antibioticum worden blootgesteld (darmflora).

- Klinische toepassing: zeer breed; in gevallen waarin men vreest voor resistentie past men samen met het antibioticum een  $\beta$ -lactamase remmer toe.
- **Conclusie:** Resistentie tegen  $\beta$ -lactam antibiotica komt reeds zoveel voor dat de geringe bijdrage die horizontale genoverdracht op resistentieontwikkeling zal hebben, geen enkele invloed zal hebben.
- *hpt:*
  - Spectrum: het enzym werkt op hygromycine, dat geen klinische of veterinaire toepassingen heeft in verband met de toxiciteit van het antibioticum. De andere vragen zijn daarom hier niet relevant.
  - **Conclusie:** Tegen toepassing van het gen bestaat geen bezwaar.
- *aad:*
  - Spectrum: smal: streptomycine / spectinomycine resistentie.
  - Voorkomen: breed, tot procenten in allerlei populaties (darmflora, oppervlaktewater) ook als die niet onder selectiedruk staan. Gegevens betreffen fenotypische bepalingen, waarbij streptomycine of spectinomycine in relevante concentraties worden toegepast.
  - Klinische toepassing: beperkte medische en veterinaire toepassingen, vanwege de bijwerkingen; het is een standaardtherapie bij tuberculose, in combinatie met andere antibiotica.
  - **Conclusie:** Resistentie tegen streptomycine en spectinomycine komt van nature reeds veel voor. De zeer geringe bijdrage die horizontale genoverdracht aan resistentieontwikkeling zal leveren, zal geen invloed hebben op de medische toepasbaarheid van het antibioticum.

## BIJLAGE 1:

### DISCUSSIESTUK ANTIBIOTICUMRESISTENTIE IN PLANTEN (Uit het vergaderstuk ScM 19.6, behandeld in de Subcommissie Micro-organismen, 4-9-1998)

In de aanvragen voor plaatsing op de markt en introductie in het milieu van genetisch gemodificeerde planten wordt in veel gevallen een antibioticum resistentiegen geïntroduceerd. Regelmatig wordt er bezorgdheid geuit door overheden en maatschappelijke groeperingen over de eventuele gevolgen van de introductie van deze genen. De COGEM heeft, indien dit punt expliciet aan de orde kwam hierover een aantal adviezen gegeven. Het is zinvol dat de commissie zich op dit moment beraadt over de benadering die in deze discussie gekozen wordt.

In het onderstaande discussiestuk, dat een nadere uitwerking is van ScM 16.2, worden de hoofdpunten in beschouwing genomen die van belang zijn bij het bepalen of de toepassing van een antibioticum resistentie in transgene planten al dan niet onwenselijke gevolgen zal hebben. Per punt is geprobeerd om een conclusie op te stellen die als leidraad bij de beoordeling kan gelden.

#### **Samenvatting van de overwegingen in het discussiestuk, op grond waarvan geconcludeerd wordt dat een antibioticumresistentie aanvaardbaar is:**

- 1) *De aard van de promotor die de expressie van de resistentie bepaalt wordt niet in beschouwing genomen.*
- 2) *Verspreiding van de resistentie zou plaats kunnen vinden via horizontale genoverdracht; de frequentie wordt zeer laag geacht. Bijdrage aan de resistentieontwikkeling zal daarom zeer gering zijn, zeker in gevallen waarin er onder de in het milieu voorkomende populatie reeds een hoge mate van resistentie tegen het betreffende antibioticum bestaat.*
- 3) *Als het gaat om resistentie tegen een antibioticum dat van groot medisch belang is (laatste redmiddel) is echter zelfs een geringe kans op verhoging van de resistentie reeds onaanvaardbaar.  
(Geldt het complement ook: als het gaat om een resistentie tegen een antibioticum dat medisch niet wordt toegepast (hygromycine) dan bestaat er geen bezwaar tegen de toepassing? Moet er rekening worden gehouden met toekomstige ontwikkelingen, waardoor deze antibiotica wellicht toch toepasbaar worden?).*

**Vraag: moet worden vastgehouden aan de criteria 2 én 3, of is 3 alleen voldoende; moeten er nog andere punten in beschouwing worden genomen?**

#### **Discussiestuk antibioticumresistentie in planten**

##### **Aandachtspunten voor risico-analyses voor de toepassing van antibioticum resistentiegenen in transgene planten.**

###### **1) Expressie in non-target organismen (micro-organismen)**

Het maakt verschil of een gen achter een plantenpromoter of achter een bacteriële promotor geplaatst is. Voor het inschatten van de kans op en de effecten van antibioticum resistentie overdracht van plant naar micro-organisme is het van belang om te weten of er regulatiesignalen zijn gebruikt die expressie in het non-target organisme kunnen beïnvloeden. Indien er plantspecifieke regulatiesignalen zijn gebruikt, zal de expressie in micro-organismen alleen kunnen plaatsvinden als het gen onder controle komt van een promotor in het micro-organisme.

**Conclusie:** Indien bacteriële regulatiesignalen zijn gebruikt is de kans op expressie in micro-organismen, en daarmee het risico dat aan de toepassing verbonden is, groter. In de uiteindelijke afweging wordt de aard van de promotor echter niet meegenomen.

###### **2) Frequentie van horizontale genoverdracht**

Horizontale genoverdracht (van plant naar micro-organismen) kan niet uitgesloten kan worden. Er zijn mondelinge mededelingen dat in één publicatie aanwijzingen te vinden zouden zijn dat een dergelijke overdracht kan plaatsvinden, maar dat het resulterende micro-organisme alleen onder constante, hoge selectiedruk wordt gevonden. Wij zijn er niet in geslaagd deze publicatie te achterhalen.

Het milieu waarin de overdracht plaatsvindt bepaalt in hoge mate de frequentie van overdracht.

###### **a) De bodem.**

In het door het CPRO-DLO opgestelde rapport over de toepassing van het *nptII* gen (kanamycine resistentie) is een poging gedaan om de frequentie van overdracht in de bodem te schatten. Deze berekeningen kwamen op een frequentie van  $10^{-11}$  uit. Hierbij moet worden aangetekend dat bij de berekening wordt uitgegaan van 5% competentie; beter was geweest om 100 % competentie te veronderstellen zodat er een "worst case" berekening ontstaat. Daarnaast is in de calculatie alleen de overdracht van plant naar bacterie middels transformatie in beschouwing genomen.

In het algemeen kan gezegd worden dat deze berekening een indicatie is voor het feit dat de frequentie van overdracht erg laag ligt. De berekening zal niet alleen opgaan voor kanamycine resistentie, omdat de factoren die in de berekening zijn meegenomen gelden voor iedere willekeurig gen.

**Conclusie:** Genoverdracht van plant naar micro-organismen in de bodem is tot nu toe niet aangetoond; de frequentie zal zeer laag liggen.

###### **b) Na consumptie.**

Voor de overdracht van genetisch materiaal vanuit planten naar de darmflora zijn geen empirische gegevens bekend. De aanname tot op dit moment is dat de maagsappen en proteolytische activiteit in de darm het planten DNA grotendeels, binnen korte tijd zullen inactiveren. Hierdoor zou de mogelijkheden voor genoverdracht naar

de darmflora zeer sterk ingeperkt worden. Overigens is in de muis aangetoond dat oraal toegediend DNA (M13) niet volledig wordt afgebroken (Schubbert et al., abstract als bijlage hierbij).

**Conclusie:** Genoverdracht van plant naar micro-organismen in de darm is tot nu toe niet aangetoond, de frequentie zal zeer laag liggen.

### 3) Medische toepassing van het antibioticum.

Bij de beoordeling of de overdracht van een antibioticum resistentie al dan niet een risico met zich brengt is het van belang te weten in hoeverre de toepassing van het antibioticum van cruciaal belang is voor de geneeskunde. Er zijn drie situaties mogelijk:

- Het antibioticum wordt noch medisch noch veterinair toegepast. Een eventuele verhoging van de resistentiefrequentie is in die gevallen niet erg relevant. Voorbeeld: hygromycine resistentie; hygromycine kan niet medisch of veterinair worden toegepast vanwege de hoge toxiciteit.
- Het antibioticum wordt medisch / veterinair toegepast, maar er zijn redenen waarom een effect van de toepassing van een resistentiegen op de overall resistentiefrequentie als niet relevant wordt gezien. Voorbeeld: ampicilline resistentie.
- Verhoging van de resistentie frequentie is absoluut onwenselijk omdat het antibioticum een "laatste redmiddel" is waartegen de resistentie zich (nog) niet op grote schaal ontwikkeld heeft. In de medische literatuur worden diverse antibiotica genoemd die in deze situatie worden gebruikt: vancomycine, cefotaxime, ceftriaxone, imipenem.

**Conclusie:** De eventuele gevolgen van het gebruik van een antibioticum resistentie hangt samen met het medisch gebruik van het antibioticum. In het volgende overzicht wordt een beeld gegeven van het gebruik van diverse belangrijke antibiotica.

#### GEBRUIK VAN ANTIBIOTICA

ANTIBIOTICIUM	HUMAAN MEDISCHE TOEPASSING	veterinaire toepassing
kanamycine	ja, soms als pre- en post-operatieve therapie	ja, infecties met entero- en streptococci
neomycine	ja, bacteriële infecties van ogen en huid, sterilisatie het darmkanaal	ja, bacteriële infecties van ogen en huid, ook oraal tegen gastro-intestinale infecties bij kalveren, varkens en pluimvee
ampicilline	ja, breed spectrum antibioticum	ja, breed spectrum antibioticum
streptomycine/ spectinomycine	ja, met name bij <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ja, leptospira, chronical respiratory disease, infectious sinusitis en intestinale infecties
amikacine	ja, alleen in de kliniek; er treedt snel resistentie op.	nee
bleomycine	ja, behandeling stamcel kanker	nee
Chloramphenicol	ja, behandeling meningitis en typhus	ja, uitsluitend bij gezelschapsdieren
tetracycline	ja, veelgebruikt breed spectrum antibioticum	ja, veelvuldig voor luchtweg- en darm-infecties
hygromycine	nee	nee

### 4) Voorkomen van de resistentie

Naast het gebruik van het antibioticum is ook het voorkomen van de natuurlijke resistentie van belang, hierbij kunnen drie niches worden onderscheiden:

- de bodemflora
- de humane darmflora
- de dierlijke darmflora

Het verzamelen van de relevante gegevens over het voorkomen van antibioticumresistenties in deze niches vergt een uitgebreidere literatuurstudie dan wij hebben kunnen uitvoeren. Eén obstakel is dat van veel literatuurgegevens niet gedocumenteerd is of het populaties betreft die onder antibioticumdruk staan of hebben gestaan. Anderzijds is veelal niet beschreven met welke concentratie van het antibioticum de resultaten zijn verkregen waardoor onduidelijk is of er sprake is van werkelijke resistentie of tolerantie.

Globaal kan gesteld worden dat de volgende resistenties veel (i.e. procenten van de populatie in darmflora, frequentie rond  $10^{-5}$  in de bodem) voorkomen: kanamycine / neomycine / amikacine, streptomycine / spectinomycine, ampicilline, chloramphenicol en tetracycline. Resistentie tegen bleomycine en hygromycine komen minder voor.

**Conclusie:** In het algemeen kan gesteld worden dat indien een resistentie al in redelijke mate aanwezig is in één van deze niches, door genoverdracht de resistentie frequentie niet in significante mate zal worden verhoogd in de betreffende niche.

### 5) Hoogte selectiedruk

Om micro-organismen die een antibioticum resistentie hebben verkregen door overdracht vanuit plantenmateriaal een selectief voordeel te geven ten opzichte van "onaangepaste" micro-organismen moet er een voldoende hoge selectiedruk aanwezig zijn in de niche waarin dit micro-organisme zich bevindt. Voor de humane darmflora en dierlijke darmflora zal deze selectiedruk samenhangen met het al dan niet gebruiken van het antibioticum.

Voor bodemmicro-organismen wordt de antibioticum concentratie bepaald door meerdere factoren:

- a) het antibioticum wordt door andere micro-organismen gemaakt. Zo ja, wat is de concentratie en verspreiding van het antibioticum.
- b) het antibioticum wordt via dierlijke mest aan de grond toegevoegd. Dit kan alleen indien het betreffende antibioticum daadwerkelijk werd toegepast als geneesmiddel of als toevoeging aan diervoeders (zie brief van Van den Bogaard aan Bergmans, d.d. 20 juli 1997).

Het kanamycine rapport geeft voor deze situatie een grove schatting, waarbij de berekening ervan uit gaat dat al het verkochte antibioticum (kanamycine en neomycine) over 75% van het Nederlandse landbouw areaal wordt verspreid, er wordt geen adsorptie en biologische afbraak van het antibioticum verondersteld bij deze berekening. De berekening kwam uit op 0.13 microgram/ml grond. De verwachting is dan ook dat de werkelijke waarde nog lager zal liggen.

**Conclusie:** In het algemeen zal het hierbij om zeer lage concentraties antibioticum gaan die alleen in zeer bepaalde micro-niches tot selectieve concentraties zullen leiden.

**BIJLAGE 2 (deze bijlage is overgenomen uit het rapport 'Kanamycine resistentie in transgene planten, inventarisatie en evaluatie van mogelijke risico's', J.F.M. Bijvoet en J.P.H. Nap, CPRO-DLO, 1991).**

**Schatting van de transformatiefrequentie van een micro-organisme in de bodem als gevolg van de teelt van kanamycine resistente tomaten.**

Belangrijke parameters voor het schatten van een transformatiefrequentie in de bodem zijn (a) de concentratie van het DNA in de bodem en (b) de mogelijkheid tot opname van dat DNA.

(a) *Schatting van de concentratie DNA in de bodem.*

Voor de schatting is uitgegaan van de volgende veronderstellingen.

1. De totaal in Nederland geproduceerde hoeveelheid tomaat bedraagt  $5 \cdot 10^8$  kg per jaar op een areaal van 1600 hectare (CBS, 1991).
2. De volledige tomataplant, inclusief vrucht, wordt gebruikt als groenbemester.
3. De massaverhouding vrucht : plant is 2 : 1, zodat per jaar  $(5 \cdot 10^8 \text{ kg}) \cdot (1.5) / (1600 \text{ ha}) = 4.7 \cdot 10^5 \text{ kg/ha}$  tomatemateriaal in de bodem terecht komt.
4. De gemiddelde dichtheid van een plantecel is  $1 \text{ g/cm}^3$  (DT).
5. De gemiddelde grootte van een volwassen plantecel bedraagt  $1.25 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^3$  (VT).
6. De grootte van het haploïde genoom bedraagt  $7 \cdot 10^5 \text{ kb}$ .
7. De DNA inhoud per cel is  $((7 \cdot 10^5 \text{ kb}) \cdot (660 \text{ g/mol bp}) \cdot (10^3)^2) / (6.02 \cdot 10^{23} / \text{mol}) = 1.5 \cdot 10^{-12} \text{ g/cel}$  (DI).
8. Het plantaardige materiaal wordt 30 cm ondergeploegd.
9. De dichtheid van de bodem is  $1.5 \text{ g/cm}^3$  (Brady, 1974).
10. De bodemmassa tot 30 cm diepte per hectare bedraagt  $(10^8 \text{ cm}^2/\text{ha}) \cdot (30 \text{ cm}) \cdot (1.5 \text{ g/cm}^3) = 4.5 \cdot 10^9 \text{ g/ha}$ .
11. Van het DNA in de bodem blijft 10% intact (Greaves & Wilson, 1970) (A1).
12. Uit het plantaardig materiaal komt 10% van het DNA vrij. (Aardema *et al.*, 1983) (A2).
13. De relatieve vochtigheid van de grond is 20%, zodat de hoeveelheid bodemwater  $(0.2 \text{ ml H}_2\text{O/g}) \cdot (4.5 \cdot 10^9 \text{ g/ha}) = 9.0 \cdot 10^8 \text{ ml/ha}$  is (A3).

De jaarlijkse belasting van een hectare landbouwgrond met tomaat-DNA kan nu berekend worden volgens:

$$DM = (PM \cdot DI) / (VT \cdot DT)$$

met:

- DM = hoeveelheid DNA per jaar per hectare in de bodem (kg/jaar/ha).
- PM = hoeveelheid plantaardig materiaal per jaar per hectare ( $4.7 \cdot 10^5 \text{ kg/jaar/ha}$ ).
- DI = DNA gehalte tomatcel ( $1.5 \cdot 10^{-12} \text{ g/cel}$ ).
- VT = volume tomatcel ( $1.25 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^3/\text{g}$ ).
- DT = dichtheid tomatcel ( $1 \text{ g/cm}^3$ ).

Dit geeft:

$$DM = ((4.7 \cdot 10^5) \cdot (1.5 \cdot 10^{-12})) / ((1.25 \cdot 10^{-7}) \cdot (1)) = \underline{5.6 \text{ kg/jaar/ha.}}$$

De concentratie van het DNA in de bodem volgt dan uit:

$$DB = DM \cdot A1 \cdot A2 \cdot A3$$

$$\text{Dit geeft: } DB = (5.6) \cdot (0.1) \cdot (0.1) / (9.0 \cdot 10^8) = \underline{6.2 \cdot 10^{-2} \text{ } \mu\text{g/ml.}}$$

(b) *Schatting van de hoeveelheid DNA die wordt opgenomen.*

De opname van van vrij DNA door bodemmicro-organismen is van een groot aantal factoren afhankelijk. De volgende veronderstellingen gaan uit van een organisme dat efficiënt getransformeerd kan worden (zie ook Calgene, 1990).

1. In de bodem is 10% van de organismen transformeerbaar.
2. Van de transformeerbare cellen is 5% competent (Cahn & Fox, 1968).

3. De natuurlijke transformatiefrequentie is 0.02 (Cahn & Fox, 1968).
4. Indien  $[DNA] < 10 \mu\text{g/ml}$  moet de transformatiefrequentie gecorrigeerd worden met een factor  $[DNA]/0.1$ . In dit geval is dit  $6.2 \cdot 10^{-3}$ .
5. Alle DNA fragmenten zijn 1 kb of groter en bevatten altijd de volledige *aphA2* informatie, of geen *aphA2*-DNA.
6. De transgene planten bevatten 10 kopiën van het *aphA2*-gen.
7. Het te transformeren *aphA2*-DNA fragment is 1 kb, zodat de fractie *aphA2*-DNA  $10^6/7 \cdot 10^5 = 1.4 \cdot 10^{-5}$  van het totaal bedraagt.
8. Het gen wordt niet geïnactiveerd tijdens integratie.
9. Het gen komt na integratie tot expressie.
10. Het acceptor-organisme is niet resistent tegen kanamycine.
11. Er is geen invloed van de genoomcomplexiteit.

De frequentie waarmee in de bodem kanamycine resistentie naar een micro-organisme wordt overgedragen is nu te schatten volgens:

$$FT = B1 * B2 * B3 * B4 * B5$$

met:

- FT = transformatiefrequentie kanamycine resistentie.
- B1 = transformeerbaarheid bodemorganismen (0.1).
- B2 = competentie transformeerbare bodemorganismen (0.05).
- B3 = natuurlijke transformatiefrequentie (0.02).
- B4 = correctiefactor natuurlijke transformatiefrequentie ( $6.2 \cdot 10^{-3}$ ).
- B5 = fractie *aphA2*-DNA ( $1.4 \cdot 10^{-5}$ ).

$$\text{Dit geeft : } FT = (0.1) \cdot (0.05) \cdot (0.02) \cdot (6.2 \cdot 10^{-3}) \cdot (1.4 \cdot 10^{-5}) = \underline{8.7 \cdot 10^{-12}}$$

Indien er zich  $10^7$  levensvatbare microben per gram in de bodem bevinden, dan betekent deze frequentie dat er  $8.7 \cdot 10^{-5}$  transformanten per gram zullen ontstaan. Volgens Henschke & Schmidt (1990) bevinden zich van nature 1600 kanamycine resistente organismen in een gram grond, zodat de bijdrage door de transformatie met transgeen *aphA2*-DNA  $5.4 \cdot 10^{-6} \%$  bedraagt. Deze bijdrage aan de hoeveelheid kanamycine resistente organismen ligt in de orde van grootte van de natuurlijke mutatiefrequentie (IFBC, 1990).