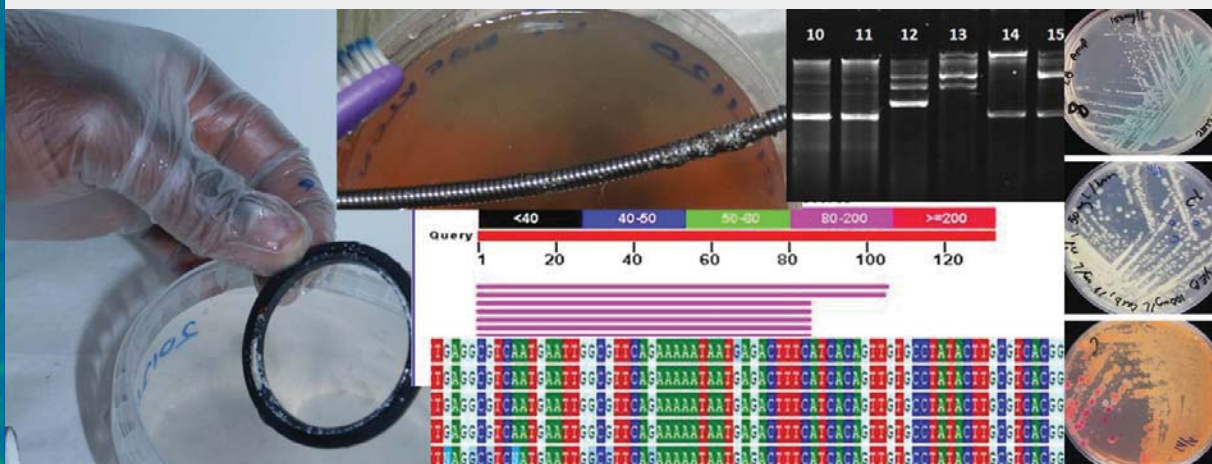


Kan utilsiktede utslipp av genmodifiserte mikroorganismer utgjøre en risiko for miljø og helse?

*Arne Holst-Jensen
Napoleon Foam
Tone M. Fagereng
Gro S. Johannessen*





Veterinærinstituttets rapportserie · 11 - 2013

Tittel

Kan utilsiktede utslipp av genmodifiserte mikroorganismer utgjøre en risiko for miljø og helse?

Publisert av

Veterinærinstituttet · Pb. 750 Sentrum · 0106 Oslo

Forsidemontasje: Arne Holst-Jensen, Napoleon Foam

Form: Graf AS
Veterinærinstituttet

Bestilling

kommunikasjon@vetinst.no
Tel: 23 21 63 66

ISSN 1890-3290 elektronisk utgave

Forslag til sitering:

Holst-Jensen A, Foam N, Fagereng TM, Johannessen GS.
Kan utilsiktede utslipp av genmodifiserte mikroorganismer utgjøre en risiko for miljø og helse? Veterinærinstituttets rapportserie 11-2013. Oslo: Veterinærinstituttet; 2013.

© Veterinærinstituttet
Kopiering tillatt når kilde gjengis

Kan utilsiktede utslipp av genmodifiserte mikroorganismer utgjøre en risiko for miljø og helse?

Forfattere

Arne Holst-Jensen

Napoleon Foam

Tone M. Fagereng

Gro S. Johannessen

Oppdragsgiver: Direktoratet for naturforvaltning

30. april 2013

ISSN 1890-3290 elektronisk utgave



Innhold

1. SAMMENDRAG	5
1.1. BAKGRUNN	5
1.2. LABORATORIER OG PRØVEUTTAK	5
1.3. BAKTERIOLOGISK OG MOLEKYLÆRBIOLOGISK ANALYSE AV PRØVENE	5
1.4. FUNN	6
1.5. VURDERING AV RISIKO KNYTTET TIL KONKRETE FUNN	6
1.6. FORSLAG TIL OPPFØLGING	6
1.7. DELTAKERNES ROLLER I PROSJEKTET	7
2. FORKORTELSER OG DEFINISJONER	8
3. INNLEDNING OG BAKGRUNN	9
4. GJENNOMFØRING AV PROSJEKTET - METODER OG DATAINNSAMLING	12
4.1. LABORATORIER	12
4.2. PRØVETAKING	12
4.3. DYRKING AV BAKTERIER	15
4.4. DNA EKSTRAKSJON	16
4.5. POLYMERASE KJEDEREAKSJON (PCR) OG DNA SEKVENSERING	16
5. RESULTATER	19
5.1. DYRKING AV BAKTERIER PÅ SELEKTIVE MEDIER	19
5.2. ISOLERING AV PLASMID FRA BAKTERIEPRØVER	19
5.3. PÅVISNING AV ENKELTELEMENTER MED PCR	20
5.3.1. <i>bla</i> _{TEM}	20
5.3.2. <i>M13</i>	21
5.3.3. <i>nptII</i>	22
5.4. PCR FOR KOMBINERTE ELEMENTER	23
5.5. SEKVENSERING AV PCR PRODUKTER	25
5.6. SEKVENSERING MED UTGANGSPUNKT I PCR MED <i>NPTII</i> PRIMERE	26
6. DISKUSJON	28
6.1. RISIKO	28
6.1.1. <i>Opptak og overføring av DNA</i>	28
6.1.2. <i>Reduksjon av risiko</i>	29
6.1.3. <i>Risiko for aktiviteten på GMMO laboratorier</i>	29
6.2. FUNN	29
6.2.1. <i>GMMO</i>	29
6.2.2. <i>Antibiotikaresistens og patogene bakterier</i>	29
6.3. METODER	30
6.4. ADMINISTRATIVE FORHOLD PÅ LABORATORIENE	31
7. KONKLUSJON OG ANBEFALINGER	32
8. REFERANSER	34

1. Sammendrag

1.1. Bakgrunn

Høsten 2011 ga Direktoratet for naturforvaltning Veterinærinstituttet (VI) i oppdrag å gjennomføre et pilotprosjekt for å se på om utilsiktede utslipp av genmodifiserte mikroorganismer (GMMO) kan skje og eventuelt hvorfor. I prosjektet (kontrakt nummer 11040087) skulle også opplæring, regler for arbeid med GMMO og mulige risikoer for helse og miljø vurderes. Representative biovitenskapelige forskningsmiljøer i Norge ble kontaktet for å finne frivillige laboratorier for prøvetaking og vurdering av veiledende dokumenter.

Utsetting av genmodifiserte organismer er enhver fremstilling og bruk som ikke regnes som innesluttet bruk etter Genteknologiloven (MD, 1993). Ansvaret for vurdering av utsetting av levende GMO er delegert til Direktoratet for naturforvaltning fra Miljøverndepartementet.

Helsedirektoratet er ansvarlig myndighet for godkjenning og kontroll med laboratorier som arbeider med GMMO i Norge, og mottok sluttrapporten parallelt med Direktoratet for naturforvaltning.

Målet med prosjektet har vært å få et inntrykk av situasjonen i Norge gjennom et begrenset pilotprosjekt. Det har vært spesielt viktig å avklare om rutineene for opplæring, dokumentasjon, risikovurdering og inneslutning er gode nok, om det er behov for ytterligere undersøkelser, og om det kan pekes på konkrete forbedringsmuligheter.

1.2. Laboratorier og prøveuttak

Prøver ble tatt ut på fem ulike laboratorier. Retningslinjer, organisering og rutiner ved de ulike laboratoriene var noe ulike. Ved to av laboratoriene har det i flere år vært stor forskningsaktivitet med mange ulike varianter av genmodifiserte bakterier. Ved ett tredje laboratorium har det vært mindre forskningsaktivitet i noen få år, mens det fjerde laboratoriet er en kurssal som benyttes til mange ulike aktiviteter og bare i liten grad til arbeid med GMMO. Det femte og siste laboratoriet var valgt ut som negativ kontroll, dvs. at det ikke har vært arbeidet med GMMO ved dette laboratoriet. Prøvene ble tatt ut i avløpsrørene under laboratorievaske, og så langt ned i avløpsrørene som det var mulig å ta ut prøver. Generelt var det høyest konsentrasjon av organisk materiale i forbindelse med laboratorievaskene, og lav konsentrasjon lenger ned i rørene.

1.3. Bakteriologisk og molekylærbiologisk analyse av prøvene

Etter prøvetaking ble prøvene konsentrert og overført til flytende (buljong) og faste (skål) dyrkingsmedier. Det ble benyttet flere ulike medier, til dels selektive, for å forsøke å isolere rene kulturer av enkeltstammer av mulig genmodifiserte bakterier.

Molekylærbiologiske metoder ble valgt som hovedstrategi for å forsøke å påvise og identifisere mulig GMMO i prøvene. Det ble utført polymerase kjedereaksjon (PCR) for påvisning av to antibiotikaresistensgener (*bla_{TEM}* og *np_{tlI}*) og for innskudd i kloningsvektorer med M13-kloningssete. I tillegg ble det utført PCR for kombinasjoner av to og to av noen av disse elementene, og for tilnærmet komplette plasmider. Antatt rene fragmenter av tilstrekkelig stor størrelse ble forsøkt isolert og rensert og deretter sekvensert. I de tilfellene der rene DNA-sekvenser ble produsert ble sekvensene sammenlignet med sekvenser i EMBL/GenBank sekvensdatabasen for identifisering.

1.4. Funn

Prøver tatt ut ved alle de fire undersøkte GMMO laboratoriene ga kraftig oppvekst av bakterier på selektive medier med høy konsentrasjon av antibiotika. Dette var ikke forventet ved prosjektstart, men innebærer at det er høy forekomst av antibiotikaresistente bakteriestammer på prøvetakingsstedene. Det er sannsynlig at det også kan være multiresistente stammer blant disse.

Generelt var det store problemer med å få tilstrekkelig rene kolonier og sekvenser. Det ble likevel med sikkerhet påvist at en GMMO hadde etablert seg i avløpet ved ett laboratorium. Det ble også påvist rene *npfl* sekvenser i prøver fra de tre GMMO-laboratoriene, men ikke på kurssalen eller laboratoriet der det ikke arbeides med GMMO. Utover dette ble det påvist sekvenser fra den opportunistiske human-patogene bakteriearten *Stenotrophomonas maltophilia* i prøver fra fire av de fem laboratoriene inkludert laboratoriet der det ikke arbeides med GMMO. Dette er en bakterie som forekommer naturlig i ulike, særlig vannrike miljøer og er rapportert å ha et bredt spekter av ARG og for å danne biofilm på plast. Funn av *S. maltophilia* er forenelige med den sterke oppveksten av bakterier på selektive medier. Dessverre var *S. maltophilia* ukjent for prosjektmedarbeiderne forut for prosjektet. Det bidro til å gjøre prosjektet vesentlig mer utfordrende å gjennomføre enn forutsett.

1.5. Vurdering av risiko knyttet til konkrete funn

Den påviste GMMOen er klassifisert for inneslutningsnivå klasse 2 (nest laveste nivå), som innebærer ubetydelig risiko. De genetiske markørene som er påvist og finnes i GMMOene det arbeides med på de besøkte laboratoriene er heller ikke spesielt risikable (alle laboratoriene har inneslutningsnivå 1 eller 2). Den høye forekomsten av antibiotikaresistens som ble påvist gir imidlertid grunn til noe bekymring. I denne sammenheng er også mulig sammenheng mellom arbeid med GMMO og forekomsten av antibiotikaresistens verdt å se nærmere på.

Utbredt forekomst av antibiotikaresistens i umiddelbar nærhet til GMMO-laboratoriene kan også representere en risiko for disse laboratoriene, dersom f.eks. multiresistente bakterier spres og forurenses forskningsmaterialet.

Stenotrophomonas maltophilia ser ut til å øke i utbredelse og forekomst, særlig knyttet til luftveisinfeksjoner men også andre infeksjoner hos mennesker med svekket immunforsvar. Det kan derfor også være verdt å se på om laboratoriearbeid generelt og med GMMO spesielt, kan bidra til at *S. maltophilia* i økende grad kan utgjøre en helserisiko.

1.6. Forslag til oppfølging

Denne rapporten tar utgangspunkt i resultater fra det som har vært et mindre pilotprosjekt. Flere av funnene tilsier at prosjektet bør følges opp med et eller flere større prosjekter. For det første er det åpenbart at det mangler data og kunnskaper om forekomsten av og årsakene til utilsiktede utslipp av GMMO. Et helt sentralt punkt i denne sammenheng er at kostnadseffektiv og egnet prøvetakings- og analysemetodikk må etableres, helst gjennom internasjonalt samarbeid med tanke på framtidig harmonisering. Veterinærinstituttet har lang erfaring på dette området, knyttet til analysemetodikk for genmodifiserte planter. Noe av metodikken må sannsynligvis først utvikles eller tilpasses. For det andre er det viktig å få bedre kunnskaper om naturlig forekomst av antibiotikaresistens i biofilm, avløp, og om hvordan og hvorfor laboratorievirksomhet kan påvirke sammensetning og genetiske forandringer i biofilmen. For det tredje er det flere konkrete tiltak som virker forebyggende eller skadebegrensende som kan studeres nærmere med tanke på kostnad-nytte forhold. En mer omfattende og detaljert gjennomgang av forslag til oppfølging er presentert som et eget kapittel i slutten av denne rapporten.

1.7. Deltakernes roller i prosjektet

Napoleon Foam har deltatt i prøvetaking og dyrking av bakterier og har utført alt molekylærbiologisk arbeid på laboratoriet. Han har også deltatt i planlegging av arbeidet og i tolking og diskusjon av resultater. *Tone M. Fagereng* har vært hovedansvarlig for alt arbeid med dyrking av bakterier, inkl. klargjøring av en del utstyr til prøvetaking. Hun har vært sentral i valg av dyrkningsmedier og antibiotika. Hun har også deltatt i tolking og diskusjon av resultater. *Gro S. Johannessen* har bidratt med generell mikrobiologisk kompetanse og erfaring med selektiv oppformering og isolering av *E. coli* og arbeid med biofilm. Hun har vært sentral i valg av dyrkningsmedier og antibiotika. Hun har også deltatt i tolking og diskusjon av resultater. *Arne Holst-Jensen* har vært prosjektleder og har hatt overordnet ansvar for planlegging og gjennomføring av prosjektet. Han har hatt hovedansvar for tolking og diskusjon av resultater og utarbeidelse av sluttrapporten.

2. Forkortelser og definisjoner

ARG = gen som koder for resistens mot et eller flere antibiotika

BCH = Biosafety Clearing House. En del av konvensjonen om biologisk mangfold (Cartagena protokollen) bl.a. med ansvar for å holde oversikt over og bidra til innsamling og spredning av informasjon om levende modifiserte organismer (LMO) som i hovedsak tilsvarer GMO.

DNA = deoksiribonukleinsyre, makromolekyl som ofte omtales som arvestoff.

GMO = genmodifisert organisme. Definert i Genteknologiloven §4 som mikroorganismer, planter og dyr hvor den genetiske sammensetning er endret ved bruk av gen- eller celleteknologi. *Genteknologi* er i denne sammenheng definert som teknikker som innebærer at arvestoff isoleres, karakteriseres, modifiseres og innsettes i levende celler eller virus. *Celleteknologi* er i denne sammenheng definert som teknikker for framstilling av levende celler med nye kombinasjoner av genetisk materiale ved fusjon av to eller flere celler.

GMMO = genmodifisert mikroorganisme. Betegnelsen mikroorganisme oppfattes ofte som ensbetydende med bakterier, men mer korrekt omfatter mikroorganismer også en rekke andre organismegrupper som sopp og mikroalger.

ENGL = European Network of GMO Laboratories. Nettverk av alle NRLer og NRL-assosierte laboratorier for GMO i EØS området + Sveits.

EU-RL GMFF = EUs referanselaboratorium for genmodifisert mat og fôr, plassert under EUs Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, Ispra, Italia.

HGO = Horisontal genoverføring. Overføring av DNA på tvers av artsgrenser eller fra miljø til mottaker. I motsetning til vertikal genoverføring som er nedarving av DNA fra foreldre til avkom.

HMS = Helse, miljø og sikkerhet

LMO-register = register knyttet til BCH som inneholder oversikt over alle registrerte transformasjons-events, genetiske modifikasjoner og (hvis tilgjengelig) en unik identifikasjonskode (UI) for hver LMO. Informasjon om alle beslutninger og risikovurderinger av hver LMO finnes i tilknytning til LMO-registeret. LMO-registeret omfatter både GMMO og genmodifiserte planter og dyr.

NRL = Nasjonalt referanselaboratorium

PCR = polymerase kjedereaksjon, se også figur 1.

3. Innledning og bakgrunn

Genmodifiserte mikroorganismer (GMMO) utvikles og dyrkes i stort omfang i biovitenskapelige laboratorier i hele verden. I all hovedsak er aktiviteten knyttet til forskning, men noe utvikling og dyrking er knyttet til kommersielle formål, særlig for produksjon av medisiner, enzymer og kjemikalier til industri. Et betydelig antall GMMO er registrert i LMO-registret under Biosafety Clearing House (BCH).

Alt arbeid med GMMO i Norge er regulert av Genteknologiloven (MD, 1993). Internasjonalt er bruk av GMMO regulert av den internasjonale konvensjonen om biodiversitet, den såkalte Cartagena-protokollen (CBD, 2000). I praksis medfører dette at utvikling og dyrking av GMMO skal skje i godkjente laboratorier hvor aktiviteten skal rapporteres og følge strenge retningslinjer. Krav om effektive inneslutningstiltak for å hindre utilsiktet spredning av GMMO til miljø eller utenfor de godkjente laboratoriene er en helt sentral del av regelverk og godkjenningvilkår.

Forskrift om innesluttet bruk av genmodifiserte mikroorganismer (HOD, 2001) er det sentrale regelverksdokumentet for GMMO arbeid i Norge. Ansvarlig myndighet for godkjenning av laboratorier som skal arbeide med GMMO er Helsedirektoratet. I stor grad er ansvaret for oppfølging av laboratorienes ansvar lagt til laboratoriene selv: *“Brukers ansvar omfatter også kontroll med at den innesluttede bruken er i overensstemmelse med forskriften og den godkjenning som er gitt”* (fra §4). For eksempel er opplæring av personale og kontroll med effektiviteten av implementerte inneslutningstiltak laboratorienes eget ansvar, og bare unntaksvis blir laboratoriene kontrollert av Helsedirektoratets inspektør. *“Brukeren skal foreta en forhåndsvurdering av den innesluttede bruken med hensyn til risiko for sykdom/skade på mennesker, dyr, planter eller miljø som denne bruken måtte innebære. Forhåndsvurderingen omfatter alle typer virksomhet, og er avgjørende for hvilke inneslutningsnivå og med hvilke inneslutningstiltak virksomheten kan foregå, jf. kap.3.”* (fra §5). I denne sammenheng gis et i eget vedlegg til forskriften også en minimumsveileder. Virksomheten klassifiseres i fire inneslutningsnivåer, basert på forhåndsvurderingen av risiko. Nivå 1 er laveste risiko og inneslutningsnivå. *“Dersom det er tvil om hvilket inneslutningsnivå og inneslutningstiltak som er hensiktsmessig for en planlagt innesluttet bruk, skal de strengeste vernetiltakene anvendes, med mindre tilstrekkelig bevis, etter avtale med vedkommende myndighet, gjør det berettiget å anvende mindre strenge tiltak”* (fra §8). Av særskilt relevans for dette prosjektet er forskriftens §15 og 16 som beskriver sikkerhetstiltak og pålegger laboratoriet å føre kontroll med den innesluttede bruken.

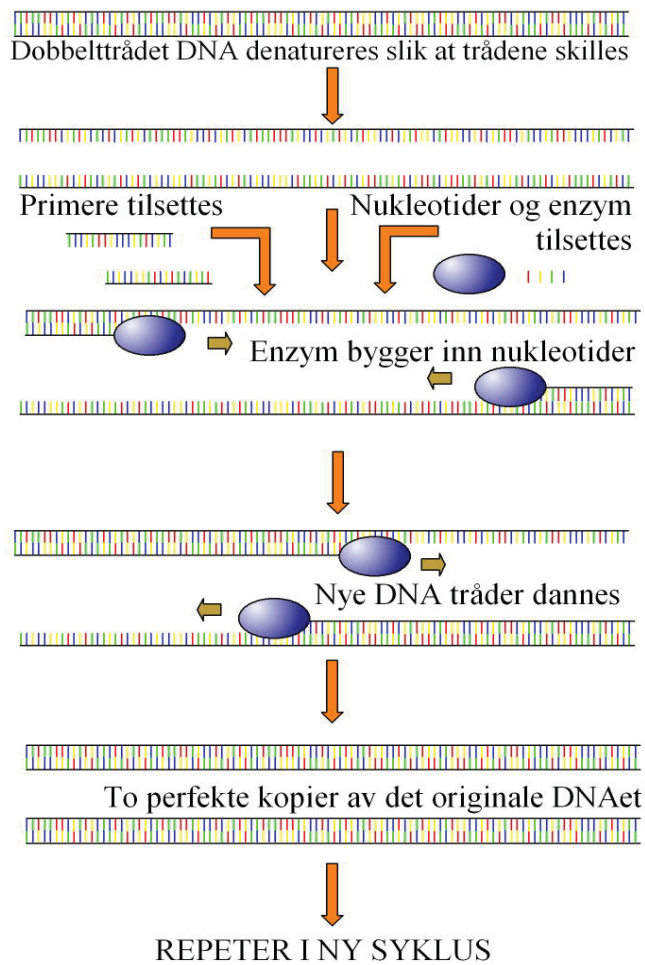
De siste 10 årene er utilsiktet spredning av genmodifiserte organismer (GMO) påvist i flere land, inkludert Norge. Dette dreier seg om planter (Holst-Jensen et al. 2012a; 2012b; Reiting et al. 2013) og akvariefisk (Emanuelson et al. 2009; Holst-Jensen 2012). I en rapport fra 1999 vises det til 7 kjente brudd på regelverk om innesluttet bruk av GMMO bare i Storbritannia (GeneWatch 1999). Disse 7 tilfellene dreide seg om mangelfulle risikovurderinger, manglende implementering av obligatoriske inneslutningstiltak o.l. Ingen dreide seg om påviste utslipp. Det er rimelig å anta at inneslutningstiltakene for GMMO heller ikke er perfekte, siden menneskelige feil aldri kan utelukkes. Utslipp av GMMO kan også i mange tilfeller være vanskeligere å oppdage enn utslipp av f.eks. genmodifiserte planter. Dette gjør det nødvendig å få en klarere forståelse av hvilke tiltak som virker og hvilke som eventuelt ikke virker godt nok. Det er også ønskelig å få en klarere forståelse av hvilket potensiale utslipp av GMMO kan ha for spredning og etablering i miljøet og hvilke effekter dette eventuelt kan ha på miljø og helse.

Det er stor internasjonal interesse for overvåking av GMO, særlig gjelder dette GMO i matvarer (planter). Veterinærinstituttet er nasjonalt referanselaboratorium (NRL) for GMO i Norge. I denne funksjonen samarbeides det tett med European Network of GMO Laboratories (ENGL) og European Unions Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed (EU-RL GMFF) om analysemetoder og erfaringer. GMO-analyser utføres på tilnærmet samme måte i hele Europa og store deler av resten av verden, etter et prinsipp som omtales som “Matrix approach” (Holst-Jensen et al. 2012b). Først gjøres en screening analyse for å se om man kan påvise et eller flere genetiske elementer som er satt inn i mange GMOer. Deretter gjøres det en mer spesifikk identifisering og eventuell kvantifisering av GMOer.

Prosjektet som er gjennomført og beskrives i det følgende har tatt utgangspunkt i det enklest mulige scenariet, utslipp av GMMO fra biovitenskapelige forskningslaboratorier til omkringliggende miljø, via avløp. Alternative veier som ventilasjonsanlegg og gjenstander og personell som beveger seg inn og ut av laboratoriene er ikke studert i dette prosjektet. De undersøkte laboratoriene er klassifisert for inneslutningsnivå 1 og 2, og GMMOene det arbeides med på disse laboratoriene er antatt ufarlige, ikke-patogene bakterier tilhørende artene *E.coli* og *Agrobacterium tumefaciens*. Genmodifiseringen av disse består normalt av å tilføre bakteriene et plasmid med et innsatt DNA segment som ønskes studert og/eller klonet inn i bakterien. Plasmider er små sirkulære DNA molekyler som er lette å overføre til bakterier. Noen av genene i plasmider er markører for å kunne identifisere mikroorganismer som har fått inn plasmidene. Slike markører er bl.a. gener som koder for antibiotikaresistens (ARG; Jansson et al. 2000). DNA-segmentet som settes inn i plasmider inneholder f.eks. gener fra mennesker, dyr eller planter. Slike ”snille” GMMOer ble antatt å være en godt egnet modell for å studere utilsiktet spredning og overlevelse. En rimelig arbeidshypotese er at dersom inneslutningstiltakene er tilstrekkelig effektive på laveste inneslutningsnivå så er det sannsynlig at de er minst like effektive på høyere inneslutningsnivå. Det ble derfor vurdert som hensiktsmessig å gjennomføre en innledende modellstudie på laveste inneslutningsnivå.

Det var forventet at man kunne benytte “Matrix approach” som prinsipp også for påvisning av GMMO, med visse tilpasninger. Polymerase kjedereaksjon (PCR) er en teknikk som er svært effektiv for å påvise og kunne studere DNA-motiver (Figur 1). PCR er derfor også svært populært som teknikk for påvisning av GMO og GMMO (Holst-Jensen et al. 2012b; Jansson et al. 2000; Schwartz et al. 2003).

Figur 1. Polymerase kjedereaksjon (PCR).



Et DNA fragment som skal studeres kan oppformeres til flere hundre millioner like kopier i løpet av en halv til tre timer ved hjelp av polymerase kjede reaksjon (PCR).

DNA er et dobbeltrådet molekyl, der rekkefølgen av baser (nukleotider) på den ene tråden er komplementær til rekkefølgen av baser på den andre tråden. DNA er sammensatt av fire baser som kalles A, C, G og T. Basepar dannes ved at en base på den ene tråden finner sin komplementære base på den andre tråden. Slike basepar består enten av A og T eller av C og G. På figuren har hver av de fire basene fått sin egen farge (blå, grønn, rød og gul).

Forutsetningen for å kunne utføre PCR er at man kjenner til DNA fragmentets baserekkefølge i hver ende av det fragmentet som skal studeres. En liten primer (ca. 20 baser lang) i hver ende fremstilles syntetisk og blir så tilsatt til PCRen. Primeren fungerer som start for en ny DNA tråd, og må basepare perfekt i den enden hvor syntese skal starte. DNA-tråden forlenges i en fast retning (kalt 5'-3') ved at hver ny nukleotid hektes på trådens 3'-ende av enzymet DNA polymerase (blå ellipse), så hver primer må ha komplementaritet til den motsatte trådens 3'-ende.

For hver syklus (illustrert) dobles antall kopier av det aktuelle DNA fragmentet, dersom PCRen fungerer optimalt. Antall kopier kan derfor øke med 2^n i løpet av n sykluser.

4. Gjennomføring av prosjektet - metoder og datainnsamling

4.1. Laboratorier

Første fase av prosjektet dreide seg om å få på plass avtaler med relevante biovitenskapelige miljøer om gjennomføring av besøk i løpet av prosjektperioden. Prosjektleder tok telefonisk kontakt med aktuelle miljøer og opplevde en positiv holdning og interesse for prosjektet. Miljøene uttrykte likevel også en viss bekymring for mulige tilleggsbelastninger knyttet til besøk ved eget laboratorium, og i sær dersom konkrete funn skulle medføre råd eller krav om endringer i rutiner. Det viste seg derfor vanskeligere enn forventet å få på plass avtaler om frivillig besøk.

En viktig forutsetning for å få et best mulig samarbeid med de frivillige laboratoriene var at alle detaljer om funn skulle anonymiseres i den offentlige sluttrapporten. Rekkefølgen på laboratorier og prøver er derfor presentert slik at det ikke skal framgå hvilke prøver som kommer fra det enkelte laboratorium. De enkelte laboratoriene er informert om detaljene i funn på eget laboratorium, mens oppdragsgivere er informert om alle detaljer i et eget appendiks som er unndratt offentlighet.

To laboratorier ved Veterinærinstituttet (VI), og tre utenfor ble besøkt (Tabell 1). De sistnevnte kom på plass etter en betydelig forsinket oppstart. De to VI laboratoriene var henholdsvis det molekylærbiologiske laboratoriet godkjent for arbeid med GMMO (laboratorium A) og et laboratorium der det aldri har vært utført arbeid med molekylærbiologi eller kloning og som derfor skulle fungere som negativ kontroll eller referanse (laboratorium E). Laboratoriene utenfor VI arbeider i hovedsak med henholdsvis planterelaterte problemstillinger (laboratorium B) og human cellebiologi (laboratorium C). Det siste laboratoriet er en kurssal som benyttes til undervisning av flere ulike biologiske fagmiljøer (laboratorium D).

Tabell 1: Oversikt over besøkte laboratorier og deres virksomhetsområder.

Laboratorium	Type av virksomhet	Aktivitetsnivå GMMO
A	Molekylært kloningsarbeid (mange ulike forskningsgrupper)	Lavt
B	Molekylær planteforskning (grunnforskning)	Høyt
C	Human cellebiologi (grunnforskning)	Høyt
D	Biovitenskapelig kurssal (undervisning på alle nivåer)	Lavt (periodevis høyt)
E	Ikke GMMO-relatert (kjemisk laboratorium)	Ingen (neg. kontroll)

4.2. Prøvetaking

Prøvetaking ble gjort fra vasker og avløpsrør på laboratoriene (Figur 2). Målet var å forsøke å isolere biofilm hvor det var antatt at mikroorganismer har etablert mer eller mindre stabile samfunn. Biofilm er gjerne slimete, men relativt fast organisk materiale som har en struktur og sammensetning som i noen grad beskytter mikroorganismene i biofilmen mot stress og skader (Elias & Banin 2012). Mange ulike typer utstyr for prøvetaking ble forsøkt. Best resultat ble oppnådd med tannbørste og skrape/spatel ved vaskene, og med rørlegger-stakefjær lenger ned i rørene hvor organisk materiale delvis ble sittende på og i den spiralsnodde metalltråden. Det viste seg imidlertid å være lite biofilm i avløpsrørene slik at det meste av prøvematerialet kom fra vannlåser og rørstusser i umiddelbar nærhet av laboratievaskene. På disse stedene kunne prøvene tas ut med tannbørster og sterile skraper og overføres direkte til egne beholdere.

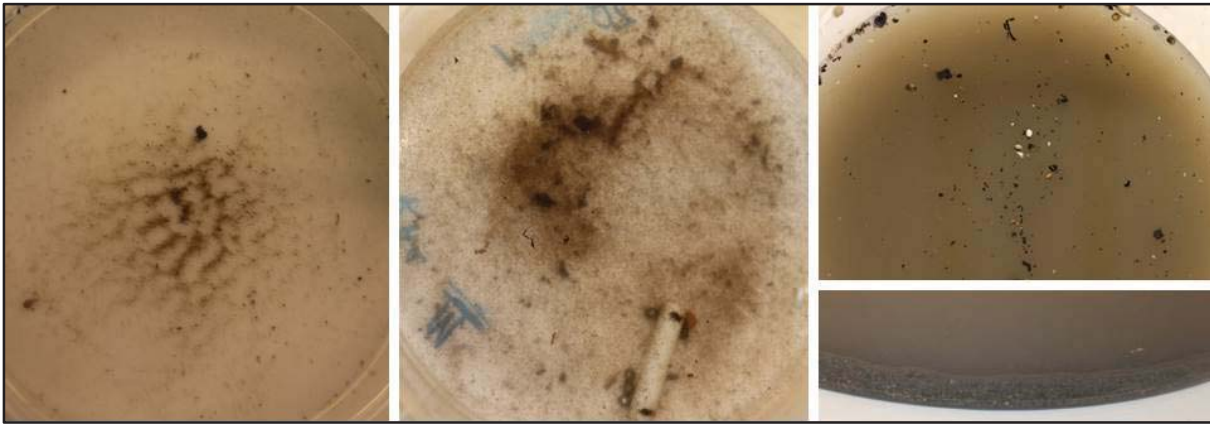


Figur 2. Prøvetaking. A) Representativ vask med vannlås. B) Etter fjerning av proppen til vannlåsen ble all væske i vannlåsen samlet opp og deretter ble biofilmen i vannlåsen samlet med tannbørste. C) Også proppen ble børstet slik at biofilm på proppen ble tatt vare på. Legg merke til gulhvite klumper av biofilm på proppen. D) Det sitter ofte en del biofilm på gummipakninger i vannlåser og rørskjøter (gråhvitt slim). E) Biofilm festet seg forholdsvis godt i og mellom spiralringene i stakefjæren (grålig slam). F) Stakefjær med pistolgrep som gjør det mulig å rotere stakefjæren opptil 7 meter nede i avløpsrøret.

Innsamling av biofilm i avløpsrør er krevende. Dels fordi biofilm ofte sitter godt festet, og dels fordi den lett blir ført nedover med vannstrøm i stedet for å bli trukket opp med prøvetakingsutstyret når den løsner. Stakefjærer bestående av spiralsnodde metalltråder som kan roteres aktivt på prøvetakingsstedet ble vurdert som det beste tilgjengelige alternativet for prøvetaking nede i avløpsrørene (j.fr. Figur 2).

Umiddelbart etter isolering ble alt organisk materiale overført til fysiologisk saltvann i forseglede plastbokser, før videretransport til laboratoriet for dyrking.

Prøvene ble nummerert fortløpende fra hvert laboratorium, og totalt ble det tatt ni prøver. Den negative kontrollprøven fra laboratorium E var prøve nr. 9.



Figur 3. Eksempler på isolert prøvemateriale. Fra venstre mot høyre: Prøve med lite materiale; prøve med en del materiale blandet med laboratoriemagneter og annet uorganisk materiale; prøve med store mengder uorganisk materiale, i hovedsak sand og jord men også isopor og annet.

Prøvematerialet var relativt variabelt, j.fr. Figur 3. I flere prøver var det lite materiale, men i noen var det store mengder sand og jord. Fra hver prøve ble væsken filtrert med vakumsug. Filteret med bakterier ble deretter overført til 50 ml plastrør (Figur 4).



Figur 4. Filtrering av prøvemateriale før dyrking. Det ble benyttet 0,45 μm porestørrelse og vakumsug.

4.3. Dyrking av bakterier

Før prosjektoppstart ble det besluttet at prosjektet skulle fokusere på relativt enkle GMMOer, dvs. stammer av *E. coli* tilført plasmider med ett eller flere antibiotikaresistensgener og ukjente innskudd. Det ble derfor lagt opp en strategi for å forsøke å rendyrke bakterier fra prøvematerialet, basert på spesifikk seleksjon for *E. coli* og antibiotikaresistens (se Tabell 2). Det vanligste dyrkningsmediet for differensiering og isolering av *E. coli* er MacConkey agar som skiller laktosefermenterende bakterier (bl.a. *E. coli* som produserer rosa-røde kolonier) fra bakterier som ikke fermenterer laktose (f.eks. typiske *Pseudomonas* spp. som produserer hvite kolonier). Fargereaksjonen skyldes endring i pH som følge av fermenteringen. *Agrobacterium tumefaciens* er en viktig bakterie for arbeid med genmodifisering særlig av planter. For å øke muligheten for også å isolere genmodifiserte stammer av *A. tumefaciens* ble det benyttet YEB-medium som i noen grad favoriserer *Agrobacterium* og beslektede bakterier og i noen grad diskriminerer andre bakterier. LB-medier er standardmedier for oppdyrking av Enterobacteriaceae (inkluderer *E.coli*), men har svært begrenset selektiv kapasitet.

Fem typer antibiotika var på forhånd identifisert som særlig aktuelle: Ampicillin, carbenicillin, hygromycin, kanamycin og rifampicin. Gener for resistens mot disse er vanlige i ulike kloningsvektorer, slik som vektorfamilien Gateway som ofte brukes til kloningsarbeid. Antibiotika ble tilført dyrkningsmedier både enkeltvis og sammen, i lav eller høy konsentrasjon for å maksimere sannsynligheten for å få fram renkulturer. Det ble også benyttet dyrkningsmedier uten antibiotika.

Tabell 2. Oversikt over valgte dyrkningsmedier og tilsatte antibiotika

Antibiotikum	Konsentrasjon lav	Konsentrasjon høy	Dyrkningsmedium ¹
AB-fri	Ingen	Ingen	LB-buljong, LB-agar, YEB-buljong, YEB-agar, MacConkey agar
Ampicillin	---	100 µg/ml	LB-agar
Hygromycin	10 µg/ml	---	LB-buljong
Hygromycin	15 µg/ml	30 µg/ml	LB-agar
Kanamycin	10 µg/ml	---	LB-buljong
Kanamycin	25 µg/ml	50 µg/ml	LB-agar
Rifampicin	5 µg/ml	---	YEB-buljong
Rifampicin	50 µg/ml	100 µg/ml	YEB-agar
Rifampicin	5 µg/ml	---	YEB-buljong (flerspektret AB)
Carbenicillin	15 µg/ml	---	
Kanamycin	5 µg/ml	---	
Rifampicin	50 µg/ml	100 µg/ml	YEB-agar (flerspektret AB)
Carbenicillin	50 µg/ml	100 µg/ml	
Kanamycin	25 µg/ml	50 µg/ml	

¹ Det ble benyttet kommersielle medier (LB fra Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland; MacConkey fra BBL, Becton, Dickinson and Company, Maryland, USA). Oppskrift på YEB medium er fra CSHP (2010).

Det ble benyttet LB-buljong, LB-agar, YEB-buljong, YEB-agar og MacConkey agar til dyrkingen. MacConkey og LB-mediene ble satt til dyrking i 37 °C for oppformering av *E. coli* mens YEB-mediene ble satt til dyrking i 28 °C for oppformering av eventuelle *Agrobacterium*-stammer.

Filteret/filtrene (Figur 4) ble overført til passende buljong sammen med sterile glasskuler, og vortexet for å slå løs bakterier fra eventuelt uorganisk materiale og løse opp biofilmen. Etter vortexing ble prøvene sådd direkte ut på skåler med passende antibiotika for inkubering i inntil to døgn. Parallelt ble prøvene overført til buljong med passende antibiotika for oppformering over natt. En delprøve fra hver prøve ble tatt av for direkte molekylærbiologisk analyse.

Etter inkubering ble alle skåler lest av for typiske kolonier (Figur 5) til videre opprensing og analyse. På MacConkey agar vil laktosefermenterende kolonier være røde eller rosa mens kolonier som ikke fermenterer laktose vil være hvitere.



Figur 5. Eksempler på vekst på ulike agarskåler. Fra venstre mot høyre: Vekst på MacConkey agar; vekst på YEB med flerspektret antibiotika (høy konsentrasjon); vekst på LB med høy konsentrasjon av ampicillin. MacConkey agar skulle differensiere laktosefermenterende bakterier som *E. coli* (rosa-røde kolonier) fra bakterier som ikke fermenterer laktose (hvite kolonier, f.eks. typiske *Pseudomonas* spp.). Antibiotika ble benyttet for å selektere bort bakterier som ikke inneholder antibiotikaresistensgener (f.eks. typiske *E.coli*) og favorisere bakterier som inneholder antibiotikaresistensgener (f.eks. genmodifiserte *E. coli*). Den lyst grønne fargen på skålen til høyre er typisk for *Pseudomonas* spp.

4.4. DNA ekstraksjon

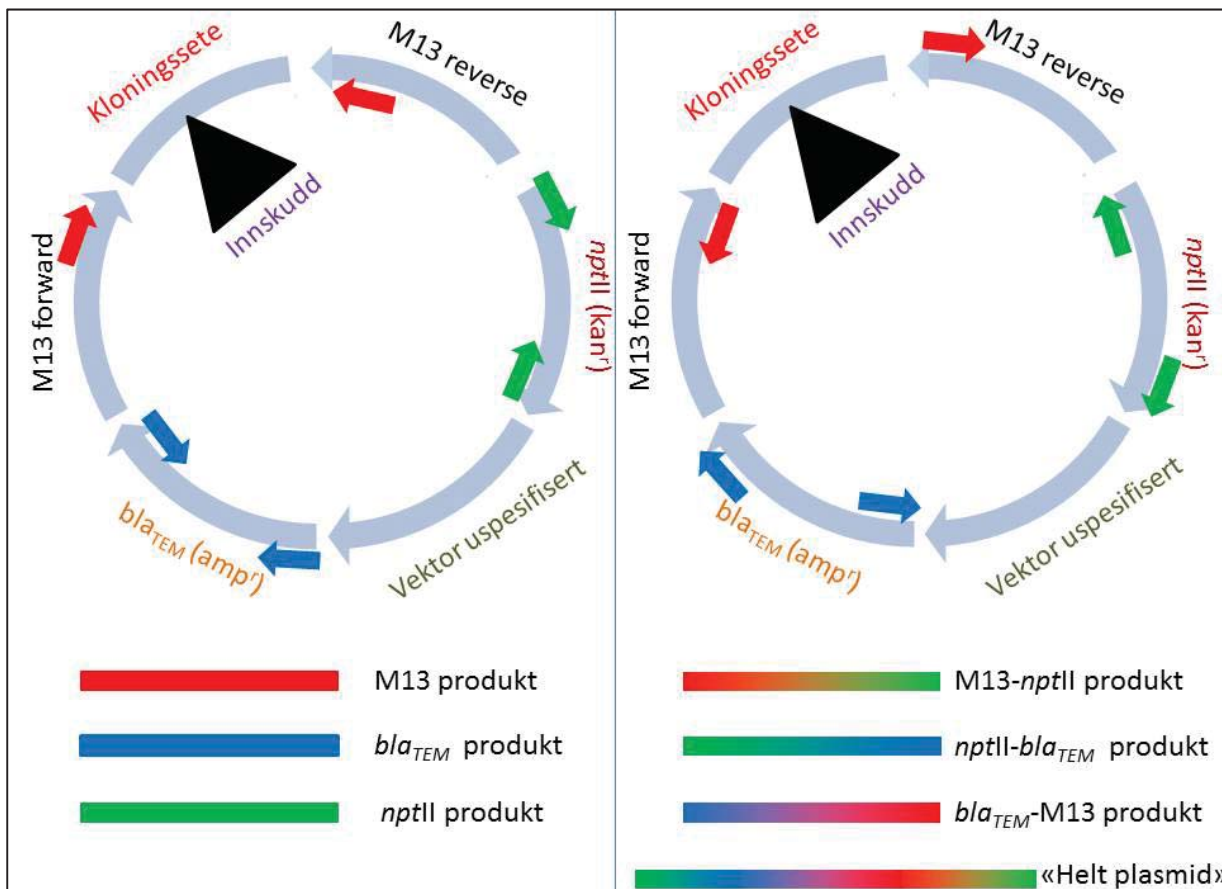
DNA ble isolert fra flytende kulturer. Disse var enten en antatt renkultur fra en enkelt koloni isolert fra skål, eller en blandingskultur direkte fra buljong.

Isolering av DNA hadde til hensikt å rense ut plasmid og ble utført med QIAprep Spin Miniprep Kit fra Qiagen (Qiagen, 2012).

4.5. Polymerase kjedereaksjon (PCR) og DNA sekvensering

Det ble gjort en grunnleggende vurdering av hva slags genetiske markører som kunne være tilstede og som kunne komme fra mulig GMMO. Et lite antall markører er veldig ofte benyttet i kloningsvektorer/plasmider, inkl. gener som koder for resistens mot beta-lactam og kanamycin antibiotika (*bla_{TEM}* og *nptII*) og polylenker/kloningssete flankert av M13 primerseter. Polymerase kjedereaksjon er en teknikk som er svært effektiv for å lage mange kopier av et DNA-motiv (Figur 1). Dette gjør det mye enklere å studere DNA-motivet i detalj. Forutsetningen for at PCR skal fungere er at man kjenner til sekvenser i begge ender av DNA-motivet.

Det ble derfor lagt opp til en PCR strategi som besto av to hovedprinsipper: 1) PCR for påvisning av enkeltelementer, og 2) PCR for påvisning av kombinerte elementer (Figur 6).



Figur 6. Alternative framgangsmåter for påvisning av DNA-fragmenter fra genmodifiserte mikroorganismer. Genmodifiseringen er vanligvis tilstede i form av et sirkulært molekyl (plasmid/vektor). Typiske kloningsvektorer inneholder ett eller flere gener som koder for antibiotika (eller en annen seleksjonsmarkør), og ett eller flere kloningsseter (der et nytt innskudd blir satt inn) flankert av konserverte primerseter som gjør det enkelt å sjekke om ett innskudd er på plass eller ikke. På figuren over vises et eksempel på en kloningsvektor med to seleksjonsmarkører *bla_{TEM}* og *nptII* som hhv. koder for resistens mot ampicillin og kanamycin antibiotika. Kloningssetet er flankert av M13 primerseter. Påvisning av elementer i kloningsvektoren ved hjelp av polymerase kjedereaksjon krever spesifikke primere (grønne, blå og røde piler). Til venstre vises plassering og orientering av primere for påvisning av enkeltelementer (ensfargete produkter nederst). Til høyre vises plassering og orientering av primere for påvisning av sammensatte motiver (tofargete produkter nederst) og tilnærmet komplette plasmider (revers orientering av elementspesifikke primere, aller nederst). DNA sekvensering av PCR produkter benyttes til å bekrefte identiteten til PCR produktene. Sammensatte motiver er generelt sikrere bevis for at et PCR produkt stammer fra GMMO enn enkeltelementer.

Det ble benyttet en rekke oligonukleotider til PCR og sekvensering av de ulike elementene fra antatte GMMO-plasmider (Tabell 3 og 4). Etter PCR ble DNA-fragmentene separert og visualisert ved gelelektroforese (se Figurene 7-13). Fragmenter (bånd) som ble vurdert som interessante å sekvensere ble deretter skåret ut og rensset med MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, MinElute Handbook 03/2008).

DNA sekvenseringsreaksjoner ble gjort med BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Life Technologies Corporation), deretter rensset med ExoSAP-IT Kit (Affymetrix, Santa Clara, California, USA). Rensete sekvenseringsprodukter ble analysert på en ABI PRISM® 3100-Avant™ Genetic Analyzer.

Tabell 3. Oligonukleotider benyttet til PCR og sekvensering.

Element	Navn på oligonukleotid	Sekvens 5' → 3'	Orientering på plasmid
<i>bla</i> _{TEM}	Bla136_155	TACCGCGAGACCCACGCTCA	Kodende
	Bla601_620rc	TGTTGACGCCGGGCAAGAGC	Antikodende
<i>nptII</i>	<i>nptII</i> rev-3	GCTCTTCGTCCAGATCATCC	Antikodende
	<i>nptII</i> forw-4	CATACGCTTGATCCGGCTAC	Kodende
	<i>nptII</i> rev-6	CAGAGTCCCCTCAGAAGAA	Antikodende
	<i>nptII</i> rev-6 rc	TTCTTCTGAGCGGGACTCTG	Kodende
	<i>nptII</i> forw-7	GATTGAACAAGATGGATTGCAC	Kodende
	<i>nptII</i> forw-7 rc	GTGCAATCCATCTTGTTCAATC	Antikodende
M13	M13 Forward (-20)	GTA AACGACGGCCAG	Kodende
	M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC	Antikodende

Tabell 4. Primerkombinasjoner og forventet størrelse på PCR produkter.

Kodende primer	Antikodende primer	Forventet produkt	Forventet lengde i basepar (bp)
Rene enkelt-elementer			
Bla136_155	Bla601_620rc	<i>bla</i> _{TEM}	485 bp
<i>nptII</i> forw-4	<i>nptII</i> rev-3	<i>nptII</i>	115 bp
<i>nptII</i> forw-4	<i>nptII</i> rev-6	<i>nptII</i>	437 bp
<i>nptII</i> forw-7	<i>nptII</i> rev-3	<i>nptII</i>	482 bp
<i>nptII</i> forw-7	<i>nptII</i> rev-6	<i>nptII</i>	804 bp
M13 Forward (-20)	M13 Reverse	Transgent innskudd i M13 kloningssetet	> 300 bp ^a
Kombinerte elementer ^b			
<i>nptII</i> forw-4	M13 Forward (-20)	Del av kloningsvektor, evt. med innskudd	> 600 bp
<i>nptII</i> forw-7	M13 Forward (-20)	Del av kloningsvektor, evt. med innskudd	> 1000 bp
Bla136_155	M13 Reverse	Del av kloningsvektor, evt. med innskudd	> 1500 bp
<i>nptII</i> forw-7 rc	<i>nptII</i> rev-6 rc	Komplett plasmid (minus kort segment av <i>nptII</i> genet)	>>1500 bp

^a I en kloningsvektor uten innskudd vil disse primerne gi et PCR produkt på 103 bp.

^b Øvrige kombinasjoner ble vurdert som lite aktuelle med utgangspunkt i BLAST analyse mot EMBL/GenBank sekvensdatabasen.

5. Resultater

5.1. Dyrking av bakterier på selektive medier

Det var på forhånd forventet at de valgte selektive dyrkningsmediene skulle favorisere vekst av *E.coli* og genmodifiserte bakteriestammer. En av hovedbekymringene på forhånd var at høye konsentrasjoner av antibiotika ville kunne slå ut interessante bakteriestammer, i sær på medier der flere antibiotika ble tilsatt samtidig. For lite bakterievekst var ikke et problem i praksis ettersom det var meget sterk vekst på samtlige medier fra samtlige prøver.

MacConkey agar som skulle bidra til enklere isolering av antatte *E.coli* stammer ga sterk oppvekst av kolonier som ikke framsto som typiske *E.coli* (rosa kolonier) men i stedet framsto som *Pseudomonas* lignende (hvite eller blekt gulgrønne kolonier). Det ble derfor antatt at identifiserbare enkeltkolonier sannsynligvis ikke var *E.coli*, men et lite antall kolonier ble likevel repodet til nye skåler for framstilling av renkultur. De som ble valgt var de koloniene som ved visuell inspeksjon var minst atypiske i forhold til forventet utseende på *E.coli* kolonier. Ved videre dyrking ble det klart at det ikke var isolert kolonier av *E.coli*. Kolonimorfologien styrket mistanken om at det var *Pseudomonas*-lignende bakterier som dominerte.

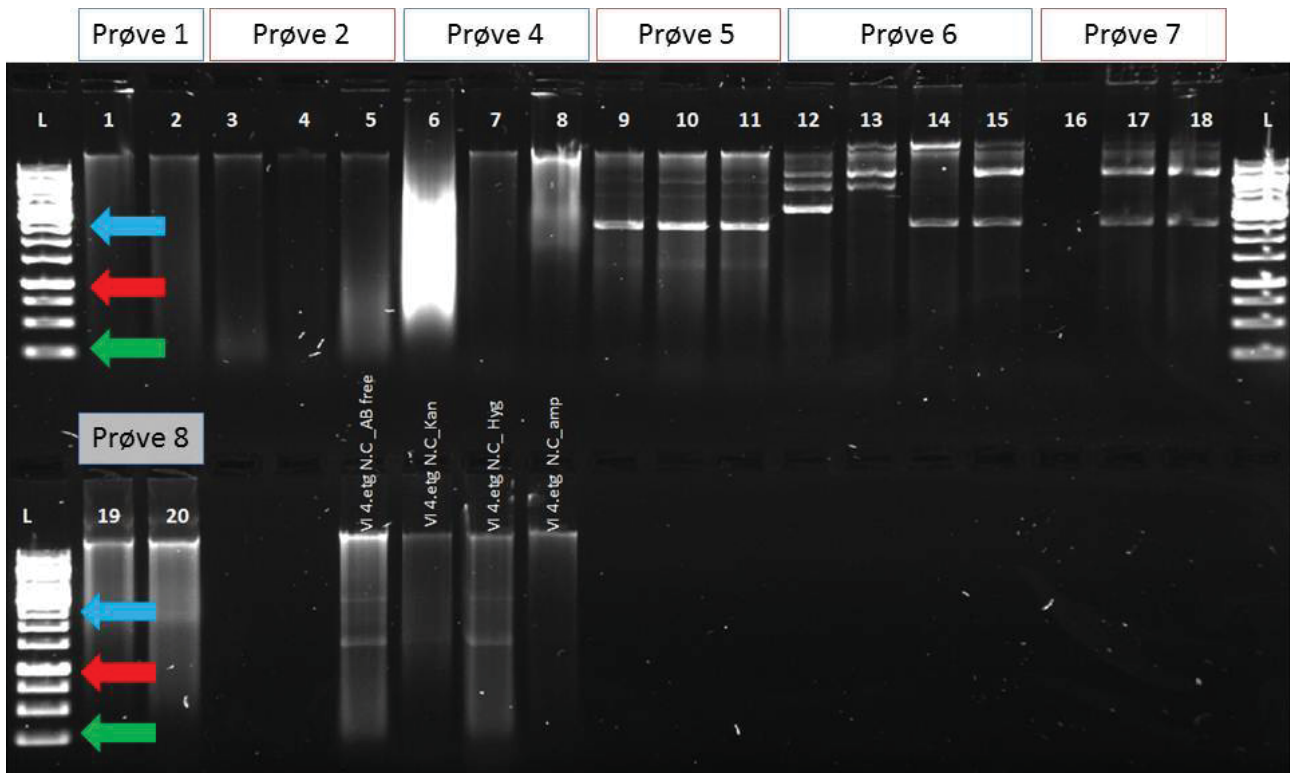
Skåler med både høye og lave konsentrasjoner av antibiotika ga uten unntak sterk vekst av kolonier med *Pseudomonas*-lignende karaktertrekk. På dette stadiet var det rimelig å vurdere det som en mulighet at også kolonier av *Agrobacterium tumefaciens* kunne være tilstede i noen av prøvene. *Pseudomonas* og *Agrobacterium* kan sameksistere i biofilm hvor *Pseudomonas* dominerer på en slik måte at det kan være vanskelig å oppdage at *Agrobacterium* er tilstede (An et al. 2006).

Det ble altså tidlig klart at det på alle prøvetakingsstedene var høy forekomst av resistens mot flere ulike antibiotika. På grunnlag av disse dyrkningsforsøkene var det ikke mulig å vurdere om antibiotikaresistens blant bakterier fra prøvetakingsstedene skyldtes naturlige forekomster av ARG eller om kilden var ARG fra GMO. Det ble derfor vurdert som mest hensiktsmessig å foreta videre karakterisering av prøvene med molekylære analysemetoder (PCR).

5.2. Isolering av plasmid fra bakterieprøver

Fra samtlige prøver ble det isolert plasmid-DNA. Mengden, størrelsen og variasjonsbredden på plasmider varierte vesentlig mellom prøvene (Figur 7).

Plasmider fra GMMO vil normalt være minst 3-4 kilobasepar (kbp) lange og kan unntaksvis være opptil 50 kbp lange (kosmider). Det ble isolert plasmid-DNA i dette størrelsesspennet fra samtlige av prøvene (Figur 7).



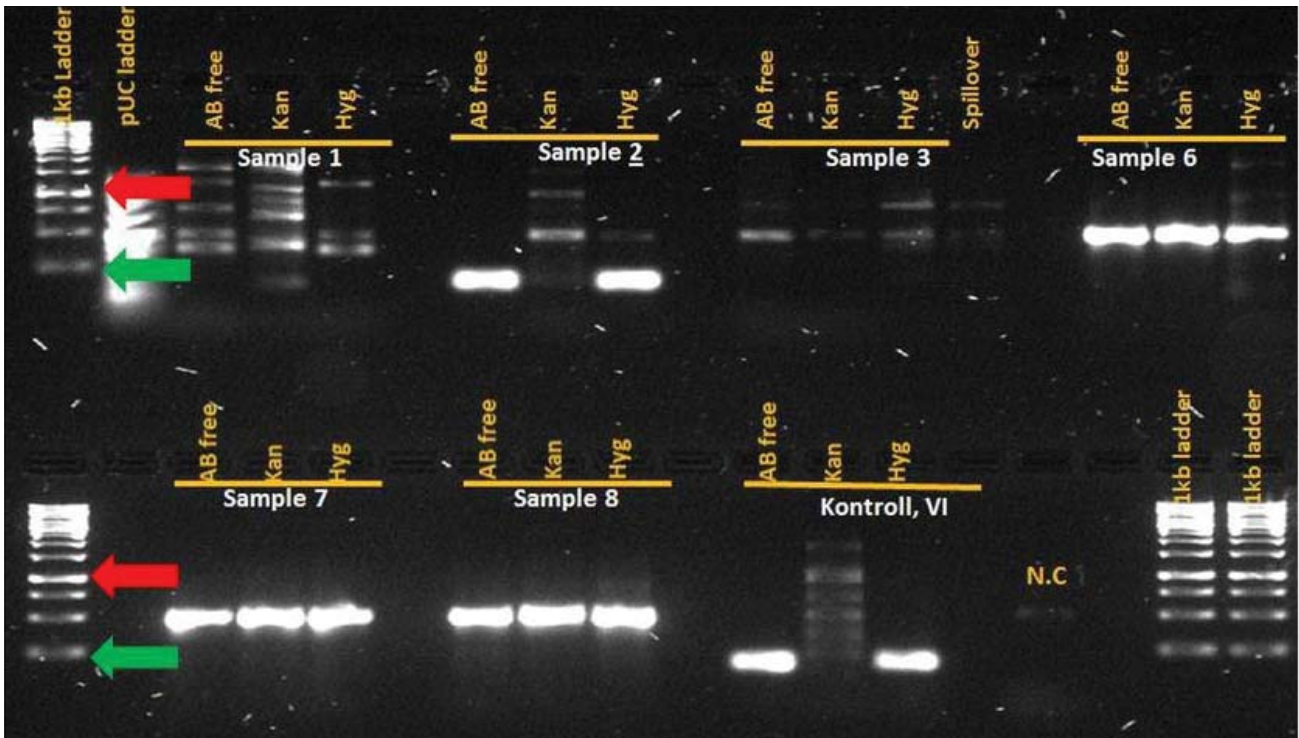
Figur 7. Isolering av plasmid fra renkulturer av enkeltkolonier eller blandingskulturer. Fra den enkelte prøve (prøvene 1-9) ble enkeltkolonier eller blandingskulturer dyrket på ett eller flere medier. Hver av brønnene 1-20 på bildet representerer en slik kombinasjon av koloni/blandingskultur og ett bestemt medium med eller uten antibiotika. DNA isolert fra ulike kolonier fra kontrollaboratoriet (E) er vist nederst i midten og er fra blandingskultur. Det ble gjort flere isoleringer enn de som er vist i figuren. Fragmentstørrelser (ovenfra og ned): Blå pil = 5000 bp, rød pil = 1000 bp, grønn pil = 250 bp.

5.3. Påvisning av enkeltelementer med PCR

5.3.1. *bla_{TEM}*

Det finnes mange kjente varianter av gener som koder for resistens mot beta-lactam antibiotika (penicillin o.l.). Den varianten som bl.a. benyttes i kloningsvektorer kalles *bla_{TEM}*. Det finnes flere ulike naturlige varianter av *bla_{TEM}*, men de skiller seg bare på noen få baseposisjoner. PCR vil derfor i liten grad skille mellom typene, mens DNA-sekvensering vil avsløre forskjellene. Et problem med *bla_{TEM}* markøren er at svært mange av de enzymene som benyttes i molekylærbiologiske analyser, inkludert DNA polymeraser, kommer fra genmodifiserte bakteriestammer. Det er svært få av disse enzymene som er helt frie for DNA fra bakteriestammen. Det er derfor regelen at små mengder *bla_{TEM}* DNA er tilstede i DNA polymeraser som benyttes til PCR. Det er derfor også en utfordrende oppgave å avgjøre om et PCR produkt påvist ved analyse av en konkret prøve skyldes tilstedeværelse av *bla_{TEM}* i prøven, eller om det skyldes urenheter i DNA-polymerasen. Signalstyrken og antall PCR sykler er viktige faktorer å ta hensyn til ved en slik vurdering. Generelt vil et sterkt signal og få PCR sykler tilsi at det er prøven som er kilden, mens svake signaler og mange PCR sykler øker sannsynligheten for at det er DNA-polymerasen som er kilden.

PCR analyser for *bla_{TEM}* ble gjort med kun ett sett PCR primere (Tabell 3 og 4). Noen av disse ga uspesifikke produkter hvor båndene i liten grad kunne skilles fra bakgrunnssignalet (produkt når rent vann ble analysert med PCR). Med primerne Bla136_155 og Bla601_620rc ble det produsert tre typer bånd (Figur 8): 1) Forventet produkt med lengde 485 basepar (bp); 2) et vesentlig kortere bånd (antatt størrelse ca. 180 bp); og 3) en gruppe uspesifikke bånd større enn 500 bp. Det ble ikke gjort forsøk på å isolere og sekvensere rene *bla_{TEM}* PCR produkter.

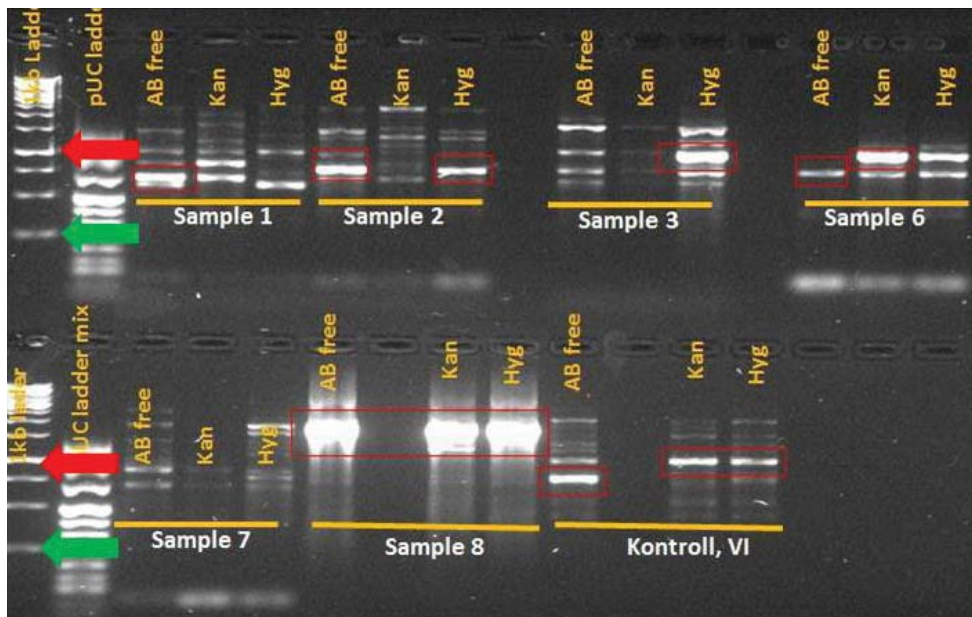


Figur 8. PCR med Bla136_155 og Bla601_620rc primere for *bla*_{TEM}. Bånd av forventet størrelse (485 bp) ble påvist i prøvene 6, 7 og 8. Et veldig svakt signal tilsvarende bånd på 485 bp ble også påvist i DNA-fri PCR (N.C.) og i prøve 2 og 3. Et klart men vesentlig kortere bånd (antatt størrelse ca. 180 bp) ble påvist i prøvene 2 og 9 (kontroll VI) i DNA fra kulturer dyrket uten antibiotika (AB free) og med hygromycin, men ikke fra kulturer dyrket med kanamycin. I prøvene 1 og 3, samt i DNA fra kulturer dyrket med kanamycin fra prøvene 2 og 9 (kontroll VI) ble det i tillegg påvist uspesifikke bånd større enn 500 bp. Fragmentstørrelser (ovenfra og ned): Rød pil = 1000 bp, grønn pil = 250 bp.

5.3.2. M13

Bakteriofag M13 er en naturlig forekommende bakteriofag (virus) assosiert med *E.coli*. Bakteriofagen er ikke dødelig for bakteriene, men svekker dem og fører til dårligere vekst. Påvisning av M13 DNA er derfor ikke ensbetydende med at det er GMMO tilstede i en prøve. Imidlertid er de M13 avledete sekvensmotivene i kloningsvektorer ikke identiske med naturlig M13 DNA. I kloningsvektorer er det laget et kunstig kloningssete flankert av korte primerseter, slik at det skal være enkelt å formere opp ett innskudd i kloningsvektoren ved hjelp av de to M13-avledete primermotivene. Både størrelsen og selve sekvensen på PCR produktet man får, gjør det mulig å skille et naturlig M13 motiv fra et GMMO-motiv. Fordi primere for PCR analyser mot M13 kloningssete i vektorer ikke har naturlige bindingsseter i det originale virusets genom, skal M13 PCR ikke gi produkt fra virusinfisert materiale. PCR var forventet å gi kort produkt (103 bp) fra kloningsvektor uten innskudd og langt produkt (>300 bp) fra kloningsvektor med transgent innskudd.

Som det framgår av Figur 9 ble det med PCR produsert DNA-bånd større enn 500 bp i samtlige prøver, også i prøve 9 (negativ kontroll fra VI). Ut fra størrelsen kunne dette indikere transgent innskudd i M13 sete i vektor. Det store antall bånd og relativt kort lengde (hovedandelen var mindre enn 1000 bp) kunne imidlertid tyde på høy grad av uspesifikk reaksjon. Bare i prøve 8 var det klare indikasjoner på et tilnærmet rent transgent innskudd med en størrelse på omkring 2000 bp.

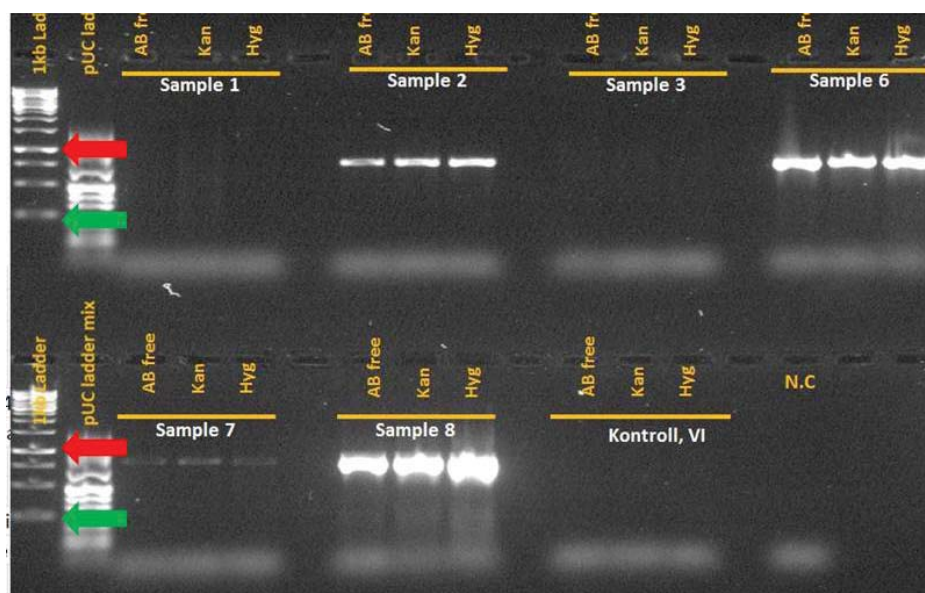


Figur 9. PCR med M13 primerne M13 Forward (-20) og M13 Reverse. Gul horisontal linje tilsvarer fragmenter på ca. 500 bp. Signaler på oversiden av gul linje tilsvarer fragmenter større enn 500 bp. Fragmentstørrelser (ovenfra og ned): Rød pil = 1000 bp, grønn pil = 250 bp.

5.3.3. *nptII*

Den genetiske markøren som kanskje er mest utbredt i arbeid med genmodifisering, særlig av planter, er neomycin phosphotransferase II (*nptII*) som også omtales som *aph(3')II* i deler av litteraturen. Denne markøren kommer opprinnelig fra Tn5 transposon i *E. coli* stammen K12 men er forholdsvis lite utbredt i naturen (Smalla et al. 1993) og derfor en relativt pålitelig markør for påvisning av DNA avledet fra genmodifisering.

PCR med primere for *nptII* (Figur 10) ga klart positive reaksjoner i prøvene 2, 6, 7 og 8, mens prøvene 1 og 3 samt prøve 9 var klart negative. Også DNA-fri prøve (NC) var negativ. Tilstedeværelse av *nptII* er ikke bevis for GMMO, og kan skyldes naturlig forekomst av bakterier med kanamycinresistens.

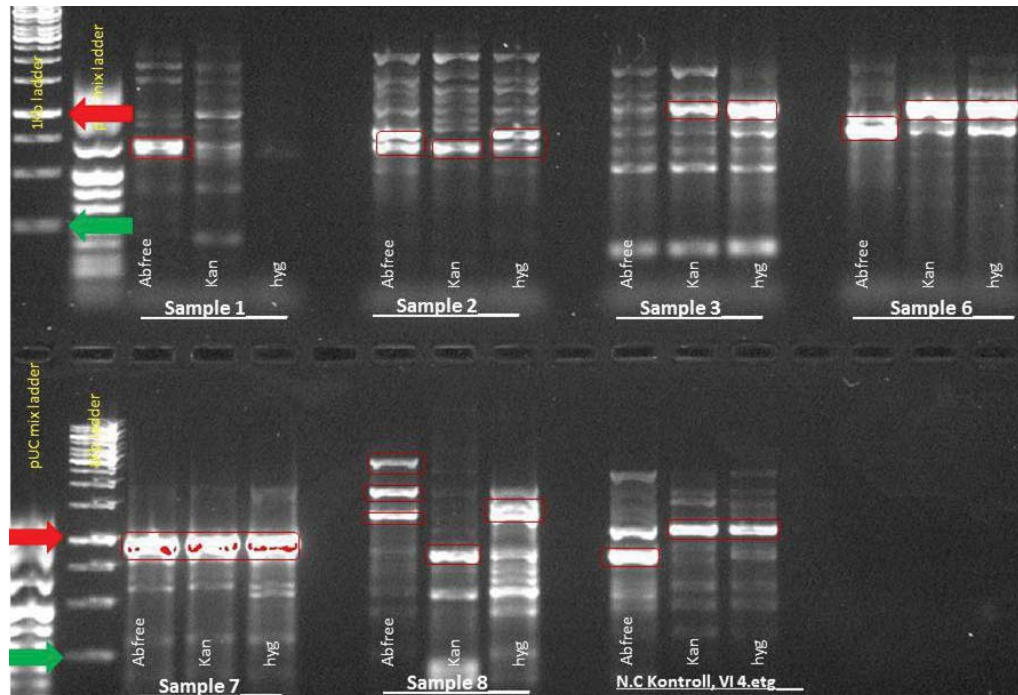


Figur 10. PCR med *nptII* primere *nptII* forw-7 og *nptII* rev-6. Forventet størrelse på PCR produkt var 804 bp. Klart positive reaksjoner ble observert fra samtlige av kulturene i prøvene 2, 6 og 8. Relativt mye svakere men likevel positive reaksjoner ble også observert i samtlige av kulturene i prøve 7. Fragmentstørrelser (ovenfra og ned): Rød pil = 1000 bp, grønn pil = 250 bp.

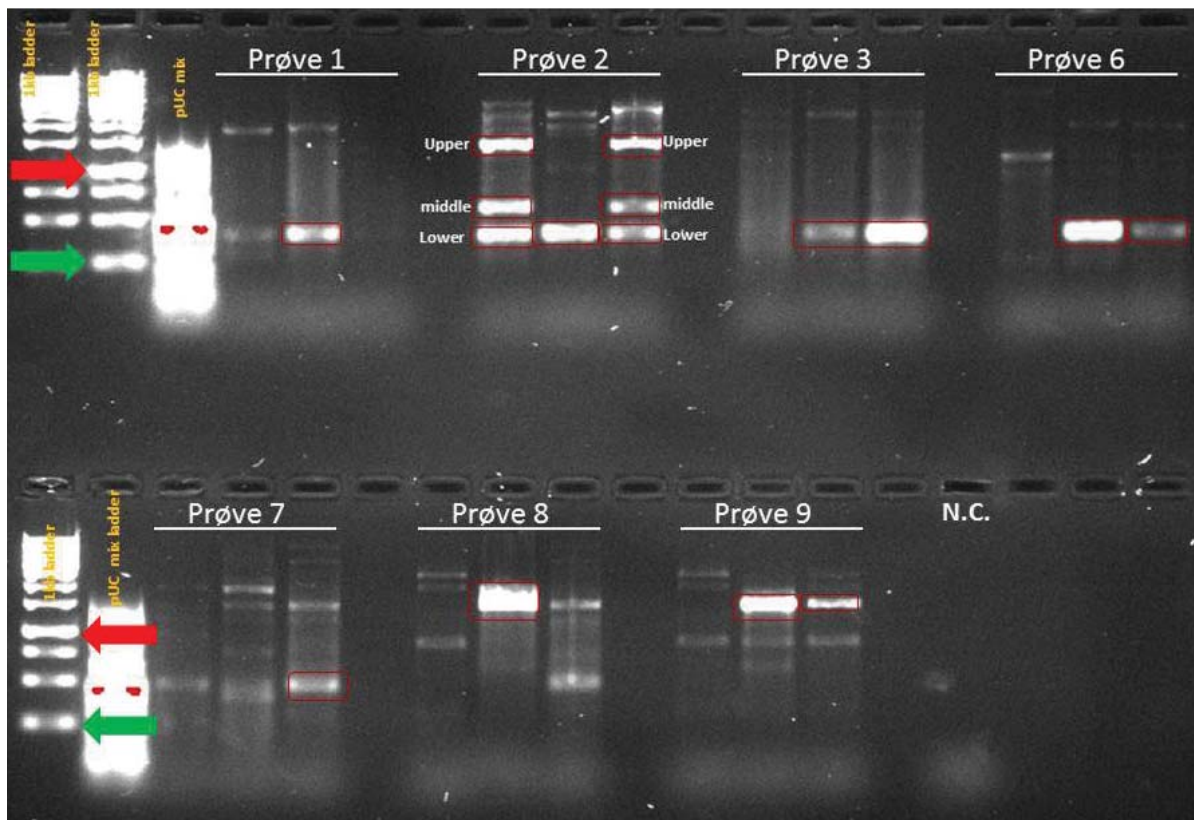
5.4. PCR for kombinerte elementer

Det ble satt opp PCR med to kombinasjoner av PCR primere fra forskjellige elementer. I tillegg ble det satt opp PCR med revers orientering av *nptII* primere for å forsøke å generere PCR produkter som tilsvarer nesten komplett plasmid:

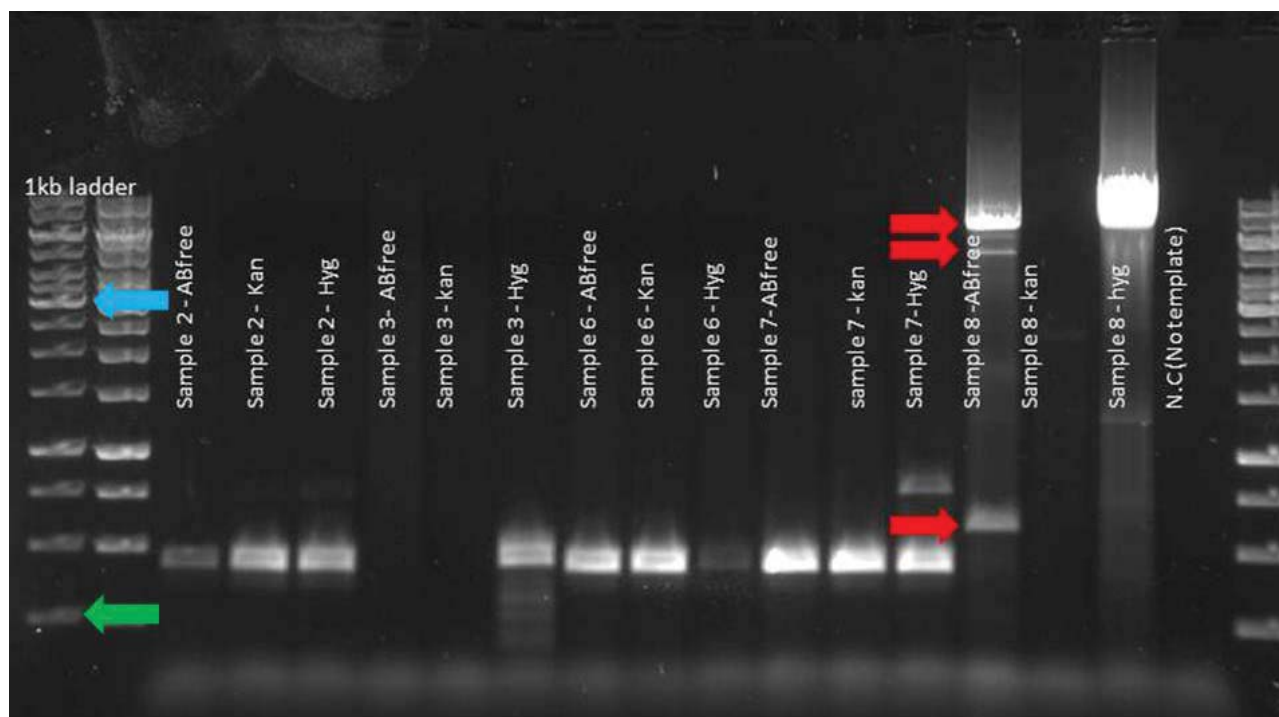
- *nptII* forw-4 + M13 forward (-20), se Figur 11.
- *Bla*136_155 + M13 Reverse, se Figur 12.
- *nptII* forw-7_rc + *nptII* rev-6_rc, se Figur 13.



Figur 11. Kombinert PCR for *nptII* og M13 med primere *nptII* forw-4 + M13 forward (-20). Forventet størrelse på produkter fra transgene innskudd var større enn 600 bp. Fragmenter som er innrammet i rød firkant oppfylte dette kriteriet og ble forsøkt isolert og sekvensert. For hver prøver er DNA isolert fra kultur dyrket på medium uten antibiotika (venstre), med kanamycin (midten) og med hygromycin (høyre). Fragmentstørrelser (ovenfra og ned): Rød pil = 1000 bp, grønn pil = 250 bp.



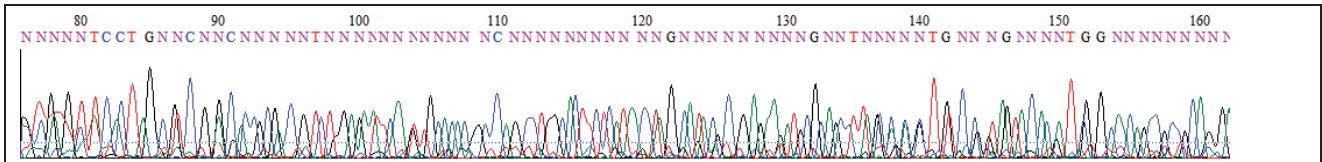
Figur 12. Kombinert PCR for *bla*_{TEM} og M13 med primere Bla136_155 + M13 Reverse. Forventet størrelse på produkter fra transgene innskudd var større enn 1500 bp. Fragmenter som er innrammet i rød firkant ble forsøkt isolert og sekvensert. For hver prøver er DNA isolert fra kultur dyrket på medium uten antibiotika (venstre), med kanamycin (midten) og med hygromycin (høyre). Fragmentstørrelser (ovenfra og ned): Rød pil = 1000 bp, grønn pil = 250 bp.



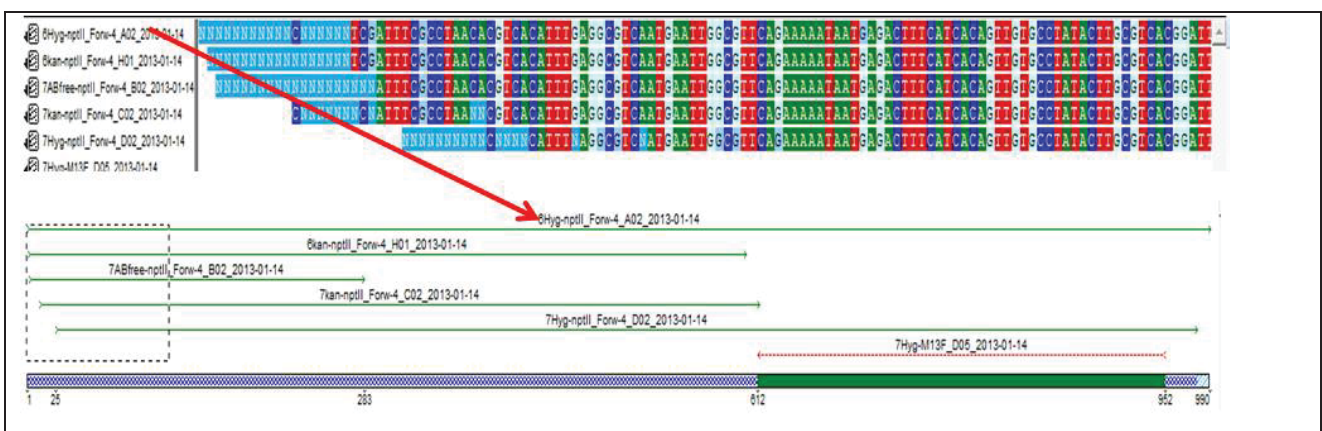
Figur 13. PCR for å forsøke å oppformere rent plasmid med revers orienterte *nptII* primere *nptII* forw-7_rc + *nptII* rev-6_rc. Kun prøve 8 ga produkt som tilsvarer komplett plasmid. Alle bånd indikert med rød pil ble isolert og sekvensert. Fragmentstørrelser (ovenfra og ned): Blå pil = 5000 bp, grønn pil = 250 bp.

5.5. Sekvensering av PCR produkter

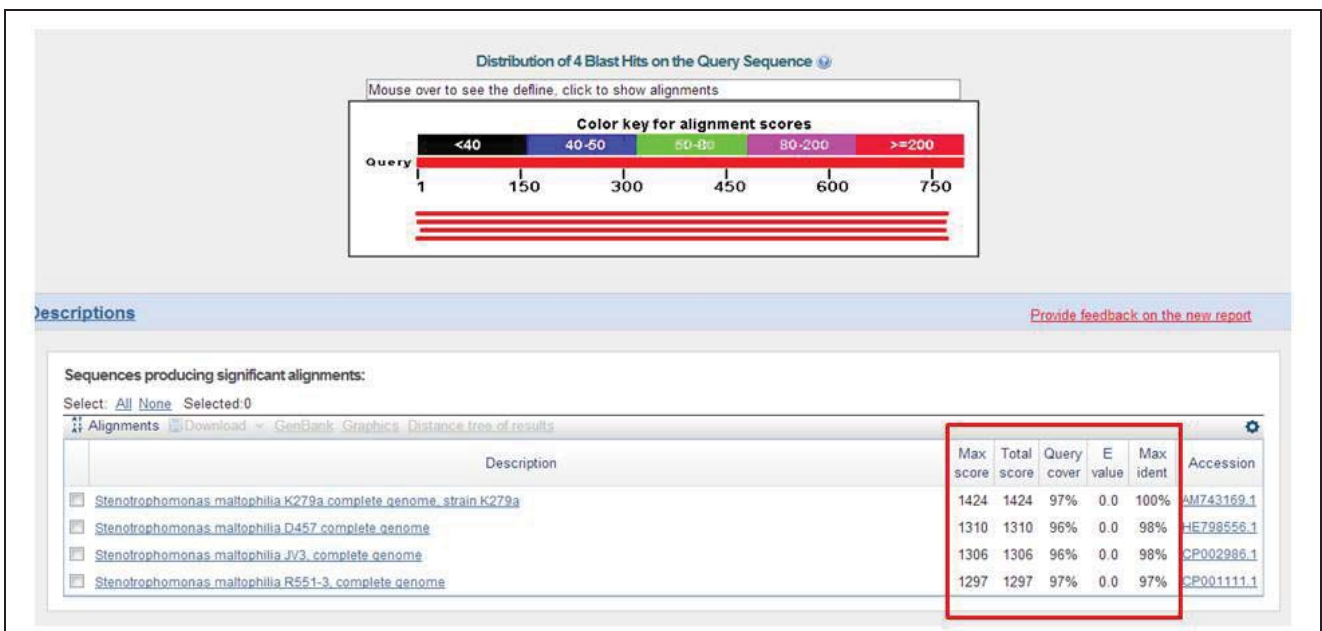
Sekvensering av PCR produkter ga i de fleste tilfeller sammensatte sekvenser som ikke lot seg tolke entydig (se eksempel i Figur 14). Dette skyldes trolig at PCR produktene ikke var tilstrekkelig rene, dvs. at de besto av flere ulike sekvensmotiver. I noen få tilfeller var det imidlertid mulig å lese rene sekvenser. Nesten uten unntak viste sekvensen da store likhetstrekk med sekvenser fra *Stenotrophomonas maltophilia* (Figur 15 og 16).



Figur 14. Eksempel på sammensatt sekvens som ikke lot seg tolke entydig.

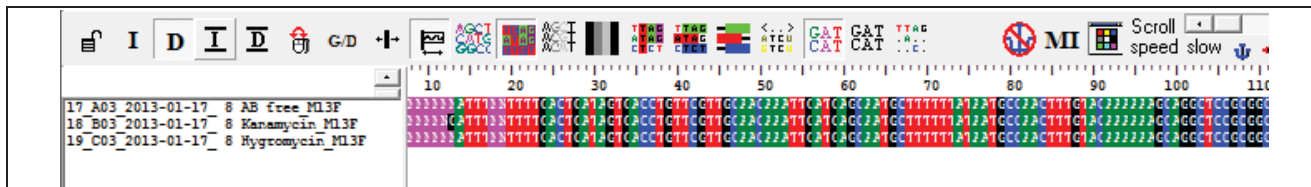


Figur 15. Parallell sammenstilling av sekvenser fra isolerte PCR bånd. Øverste del av figuren viser sammenstilling base for base. Nederste del av figuren viser sammenstilling i større skala hvor lesbar sekvens fra hvert enkelt bånd er vist i forhold til lesbar sekvens fra de øvrige båndene.

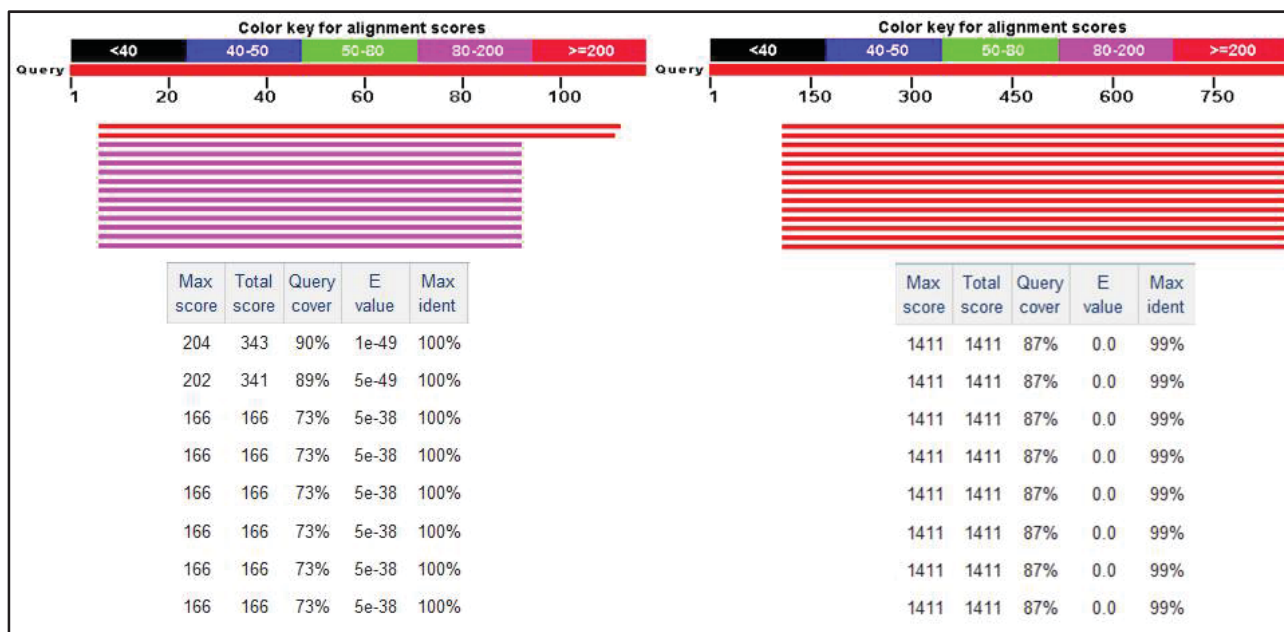


Figur 16. Resultat av BLAST analyse av sekvensene vist i Figur 15. Med utgangspunkt i skåre (se rød boks) er konklusjonen entydig: Sekvensmotivet som er lest stammer fra *Stenotrophomonas maltophilia*.

For primerkombinasjonen *npII* forw-4 + M13 forward (-20) var det imidlertid en helt annen sekvens som gikk igjen i samtlige isolerte PCR produkter fra prøve 8 (Figur 17 og 18). Denne sekvensen besto av to delsekvenser, henholdsvis en typisk vektorsekvens og en åpenbar klonet innskuddssekvens. Det var derfor ingen tvil om at prøve 8 inneholdt en GMMO og at den aktuelle GMMOen kunne knyttes til en konkret forskningsaktivitet ved laboratoriet.



Figur 17. Parallell sammenligning av sekvenser avlest fra PCR produkter fra prøve 8. PCR produktene er fra bakterier dyrket uten antibiotika (øverst), med kanamycin (midten) og med hygromycin (nederst). Sekvensen er 100% identisk i de tre tilfellene.



Figur 18. Resultat av BLAST analyse for å identifisere opprinnelsen til sekvens påvist i prøve 8. Til venstre, første del av påvist sekvens viser klare likhetstrekk med kloningsvektorelementer. Til høyre, siste del av påvist sekvens viser klare likhetstrekk med kjent sekvens som også er gjenstand for pågående forskningsaktivitet ved laboratoriet. Skåre angitt under, for hver av de to delene.

5.6. Sekvensering med utgangspunkt i PCR med *npII* primere

Det ble gjort to typer PCR med utgangspunkt i *npII* primere. Den ene for å påvise *npII* fragmenter. Den andre for å forsøke å formere opp ren plasmidsekvens ved å ta utgangspunkt i revers orienterte *npII* primere.

Den første varianten ga sekvenserbare PCR produkter fra prøvene 2, 6, 7 og 8. Sekvensering av disse PCR produktene ga i alle tilfeller samme sekvens (Figur 19), og når denne ble parallellstilt med *npII* sekvens fra kloningsvektor var det klart at det var *npII* som var påvist. Prøvene 3-5 og 9 ga ikke produkt med denne varianten.

```

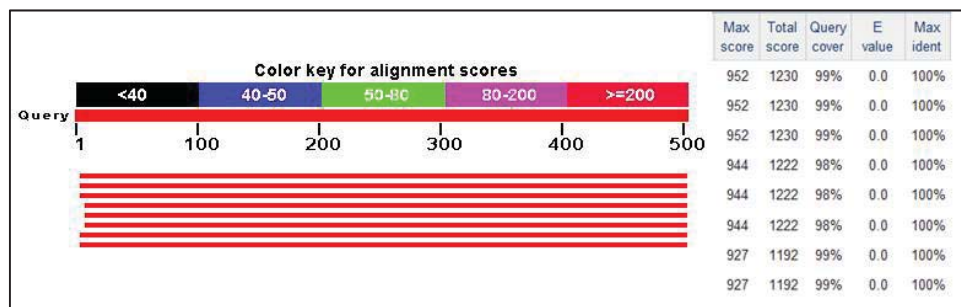
NPTII gene from Vector gactggggcacaacagacaatcggctgctctgatgcccggctgtccggctgtcagcgaggggcgcccggttctttttgt
45 A07 2013-01-17 2 AB GACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCANNGGCGCCCGGTTCTTTTGT
46 B07 2013-01-17 2 kar GACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCANNGGCGCCCGGTTCTTTTGT
47 C07 2013-01-17 2 Hyc GACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCANNGGCGCCCGGTTCTTTTGT
48 D07 2013-01-17 6 AB GACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCANNGGCGCCCGGTTCTTTTGT
49 E07 2013-01-17 6 kar GACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCANNGGCGCCCGGTTCTTTTGT
50 F07 2013-01-17 6 Hyc GACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCANNGGCGCCCGGTTCTTTTGT
51 G07 2013-01-17 7 AB GACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCANNGGCGCCCGGTTCTTTTGT
52 H07 2013-01-17 7 kar GACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCANNGGCGCCCGGTTCTTTTGT
53 A08 2013-01-17 7 Hyc GACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCANNGGCGCCCGGTTCTTTTGT
54 B08 2013-01-17 8 kar GACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCANNGGCGCCCGGTTCTTTTGT
55 C08 2013-01-17 8 Hyc GACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCANNGGCGCCCGGTTCTTTTGT

```

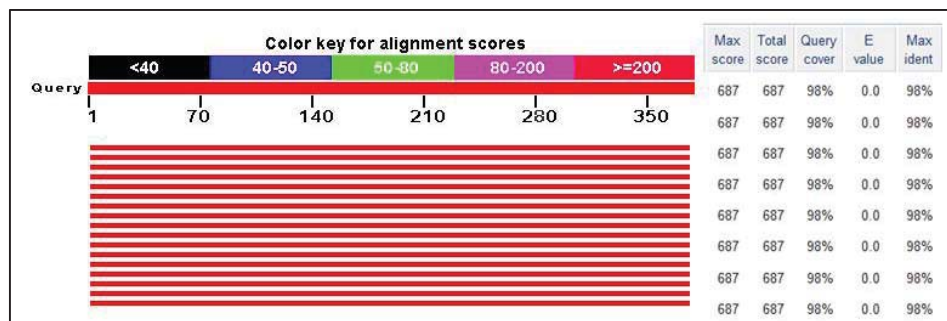
Figur 19. Sammenstilling av *npII* sekvenser fra PCR produkter fra prøve 2, 6, 7 og 8 med offisiell sekvens fra vektor i EMBL/GenBank sekvensdatabase (øverst).

Den andre varianten av *npII* PCR ga korte produkter (ca. 450 bp) i prøvene 2, 6 og 7, men et meget stort PCR produkt i prøve 8 (>10 kbp; Figur 13). Dette siste produktet ble derfor antatt å være fra et plasmid som inneholder *npII*, mens de øvrige ble antatt å være resultat av uspesifikk PCR.

Sekvensering av det lange PCR produktet fra prøve 8 ga en sekvens på ca. 500 bp i den ene orienteringen (antikodende; Figur 20) og en sekvens på ca. 400 bp i den andre orienteringen (kodende; Figur 21). Sekvensene var ikke entydig avledet fra typiske kloningsvektorer, og ikke overlappende med sekvensene fra *npII*-M13 kombinasjonen (Figur 15 og 16). De to leste sekvensmotivene fra det lange PCR produktet fra prøve 8 var ikke tilstrekkelig lange til å gi overlappende sekvens. De var imidlertid homologe til sekvensmotiver fra samme kloningsvektor i posisjoner som lå i underkant av 1 kbp fra hverandre i flere ulike vektorer. Totalt tilsa dette at et sekvensmotiv på 1729 bp kunne identifiseres, og at dette sekvensmotivet trolig kommer fra selve kloningsvektoren og ikke er del av innskuddet som laboratoriet selv har satt inn i plasmidet.



Figur 20. BLAST analyse av antikodende sekvens fra *npII* reversorientert langt PCR produkt antatt å representere komplett plasmid fra GMMO. En lang rekke kloningsvektorer ga 99-100% treff i EMBL/GenBank sekvensdatabasen, j.fr. skåre angitt til høyre.



Figur 21. BLAST analyse av kodende sekvens fra *npII* reversorientert langt PCR produkt antatt å representere komplett plasmid fra GMMO. En lang rekke kloningsvektorer ga 99-100% treff i EMBL/GenBank sekvensdatabasen, j.fr. skåre angitt til høyre. Disse treffene var tilnærmet eksakt de samme som ble funnet med antikodende sekvens (Figur 20). Dette gjør det overveiende sannsynlig at det er snakk om en sammenhengende sekvens fra vanlige kloningsvektorer og ikke et innskudd satt inn i plasmidet av det aktuelle laboratoriet.

6. Diskusjon

6.1. Risiko

Risiko er definert som sannsynlighet ganger konsekvens. Lav frekvens (sannsynlighet) er derfor ikke tilstrekkelig til å sikre lav risiko. I dette prosjektet er det vist at GMMO kan slippe ut fra laboratorier, og etablere seg i en biofilm i et avløp. Både GMMO, genetisk materiale fra GMMO og biofilm kan representere en risiko.

6.1.1. Opptak og overføring av DNA

Overføring av DNA på tvers av artsgrenser omtales som horisontal genoverføring (HGO). Spørsmålet om hvor ofte HGO finner sted, og hva slags DNA sekvenser som overføres, er blant de sentrale problemstillingene når man risikovurderer GMO og GMMO. Gjennom studier av hele genomer har man etter hvert fått relativt god innsikt i forekomsten av HGO. HGO har spilt en avgjørende rolle i utviklingen av alle høyere (Eukaryote) livsformer som planter og dyr. Likevel er det grundig dokumentert at HGO er ekstremt usannsynlig og derfor ikke utgjør noen stor risiko for disse livsformene, om man ser på den delen av arvestoffet som overføres vertikalt (nedarves fra foreldre til avkom). Mer sannsynlig er det at HGO kan finne sted lokalt i f.eks. tarmceller, som ikke påvirker kjønscellene men kan ha lokal effekt. HGO fra bakterier og andre mikroorganismer til Eukaryoter er langt vanligere enn HGO mellom høyere Eukaryoter (Keeling 2009). HGO mellom mikroorganismer er derimot svært viktig og relativt vanlig i naturen.

Fritt DNA utgjør normalt ikke noen stor risiko. Dels vil det ofte brytes ned i kortere fragmenter relativt raskt. Dels er det veldig liten sannsynlighet for at det tas opp av en levende organisme. Om det likevel tas opp er det enda lavere sannsynlighet for at det aktuelle DNAet i så fall blir satt inn i organismens eget arvestoff. Nielsen et al. (2007) foretok en grundig gjennomgang av hvordan fritt DNA havner i miljøet og hvor stabilt det er. Under spesielle betingelser kan likevel fritt DNA både tas opp og settes inn i en ny organisme. Dette fenomenet, som omtales som transformasjon, forekommer naturlig i et betydelig antall kjente bakteriearter (både gram positive og gram negative) og er grundig oppsummert av Chen & Dubnau (2004). Johnsborg et al. (2007) omtaler nær 70 slike arter, men disse omfatter f.eks. ikke *S. maltophilia*. Johnsborg et al. påpeker at den felles stammoren til Proteobacteria sannsynligvis hadde denne evnen. Det reelle antallet er derfor trolig betydelig høyere. Forutsetningen er at bakteriene er såkalt kompetente; - en tilstand som kan oppstå for eksempel om bakteriene mangler næring eller stresses av andre faktorer. Om DNA forekommer som sirkulære plasmider eller lineære fragmenter kan være avgjørende for både stabilitet og sannsynlighet for transformasjon av DNAet. Visse typer av sekvensmotiver kan også øke sannsynligheten for transformasjon i visse gram-negative bakteriegrupper (Chen & Dubnau, 2004). I de aller fleste bakterier er imidlertid DNA opptak ikke sekvensspesifikt. Transformasjon er viktig for bakterier i naturen (Domingues et al. 2012).

DNA kan også overføres mellom bakterier, et fenomen som omtales som konjugasjon. Konjugasjon skjer primært mellom individer av samme eller svært nærtstående bakteriearter. Konjugasjon kan betraktes som en form for bakteriesex, og involverer normalt overføring av plasmid fra en bakterie til en annen (som mangler plasmid). Konjugasjon er viktig for effektiv spredning av gunstige gener i bakteriepopulasjoner, slik som gener som koder for antibiotikaresistens (Heuer & Smalla 2012). Studier av kliniske isolater av *E. coli* viser klart at konjugasjon har vært en viktig mekanisme i utviklingen av mange slike stammer. Konjugasjon er også dokumentert for bl.a. *S. maltophilia* (Brooke 2012).

Det siste naturlige systemet for å overføre nye gener til bakterier omtales som transduksjon. Det skjer når virus (bakteriofager) injiserer sitt arvestoff i bakterien og dette arvestoffet deretter blir funksjonelt i bakterien. Med tanke på problemstillingene som dette prosjektet fokuserte på er transduksjon ikke viktig, i motsetning til transformasjon og konjugasjon.

Muligheten for transformasjon og konjugasjon i biofilm gjør det mulig å se for seg at både genetisk komplementering og stabling av gener (stacking) kan skje ved utslipp av GMMO eller plasmider. Komplementering dreier seg om at ikke-funksjonelle varianter av et gen eller en genetisk syntesevei kan bli funksjonell ved å kombineres med et annet ikke-funksjonelt gen eller syntesevei (se f.eks. Crepin et al. 2012). Ved mange laboratorier utvikles GMMO der defekte varianter av et gen eller en syntesevei for toksin, et skadelig protein eller evne til å infisere bestemte vertsorganismer settes inn for å studeres. Teoretisk kan det da oppstå en funksjonell variant ved utslipp og komplementering. Stacking er blitt veldig vanlig i forbindelse med utvikling av nye genmodifiserte planter (Taverniers et al. 2008). Stacking kan skje på flere ulike måter. Det vesentlige er at ulike nye egenskaper ender med å være tilstede samtidig i organismen. Den biologiske effekten av å kombinere gener diskuteres bl.a. i forbindelse med gener som koder for visse insektgifter (Cry-proteiner; VKM 2012). Det kan tenkes at risikovurderinger rundt arbeid med GMMO i for liten grad tar hensyn til slike muligheter.

6.1.2. Reduksjon av risiko

Hvis konsekvensene av transformasjon eller konjugasjon er alvorlige kan man stå overfor en stor risiko. De viktigste enkeltfaktorene for å minimere risiko i forbindelse med GMMO er forebyggende tiltak som hver for seg minimerer sannsynlighet for, og/eller konsekvens av skade. Tiltak som først vil virke når skaden allerede har oppstått vil bare kunne virke begrensende. At et utslipp oppdages er heller ikke ensbetydende med at man kan stoppe spredning.

6.1.3. Risiko for aktiviteten på GMMO laboratorier

Utbredt forekomst av multiresistente bakteriestammer i biofilm i avløpsrør fra laboratorier utgjør en hittil lite diskutert risiko. I tillegg til å være en risiko for miljøet utenfor GMMO laboratoriene, er det her snakk om en risiko for det forsknings- og utviklingsarbeidet som foregår på GMMO laboratoriene. De resistente stammene som åpenbart fantes i biofilm i flere av prøvene i dette prosjektet er resistente mot de samme antibiotika som benyttes til å rendyrke GMMO i laboratoriet. Om stammer med multiresistens mot disse antibiotika kommer inn i laboratoriemiljøet kan de gjøre det mye vanskeligere å skille ønsket GMMO fra forurensing. Dette er det viktig å ta hensyn til dersom man ønsker å gjøre jevnlig prøvetaking av f.eks. avløpsrør for å føre kontroll med utslipp fra laboratoriene. Prøvetaking må også ivareta sikkerheten for det personalet som tar prøvene (nødvendig verneutstyr).

6.2. Funn

6.2.1. GMMO

Prøven som avslørte utslipp ble tatt 7 uker etter siste gang det ble arbeidet med den aktuelle GMMOen. Årsaken til utslippet kunne ikke fastslås med sikkerhet, men det mistenkes at det kan skyldes at kjemikalieløsningen som skulle inaktivere GMMO var så gammel at inaktivering ikke var god nok, og at løsning med rester av GMMO deretter er tømt i vasken på laboratoriet. Det er ikke fastslått hvor langt ned i avløpssystemene GMMOen hadde etablert seg. Det foreligger heller ikke data eller litteratur som indikerer hvor langt ned etablering kan skje.

6.2.2. Antibiotikaresistens og patogene bakterier

ARG finnes naturlig i de fleste miljøer. Det ble klart dokumentert at bakterier med resistens mot flere typer antibiotika også finnes og er vanlige i biofilm ved flere av de undersøkte laboratoriene. Spesielt er funn av *S. maltophilia* i prøver fra nesten alle laboratoriene verdt å merke seg. Datagrunnlaget er for sparsomt til å trekke klare konklusjoner om kilden til ARG i de undersøkte biofilmene/bakteriepopulasjonene. Vi har for lite kunnskap om naturlig forekomst av ARG i tilsvarende miljøer ved laboratorier der det ikke arbeides med GMMO. Og vi har for lite detaljer om sameksistensen av konkrete genvarianter i de enkelte bakteriestammene i den biofilmen som ble samlet inn i prosjektet. Det kan ikke utelukkes at transformasjon og

konjugasjon har vært medvirkende til etablering av multiresistente bakteriestammer. Også rester av antibiotika i medier som har havnet i avløp kan ha bidratt til å øke forekomsten av ARG i disse bakteriepopulasjonene. Vi mener dette er problemstillinger som bør undersøkes grundigere, noe det ikke har vært ressurser til i dette pilotprosjektet.

Brooke (2012) peker på gram-negative patogener som viktige multi drug resistant organisms (MDRO), og hun omtaler *S. maltophilia* som en «environmental global emerging Gram-negative MDRO that is most commonly associated with respiratory infections in humans». Altså som en multiresistent opportunistisk patogen. *Stenotrophomonas maltophilia* kan erverve gener (bl.a. ARG) fra andre bakteriestammer og den kan også overføre ARG til andre bakterier. Evnen til å ta erverve DNA fra andre bakteriearter har, etter Brookes vurdering, alvorlige implikasjoner for genoverføring i mikrobielle samfunn i miljøet, slik som avløpsvann og biofilm i rørsystemer hvor *S. maltophilia* har blitt påvist assosiert med andre MDROer. Et eksempel på andre gram-negative MDROer er *Pseudomonas* spp. som også finnes i mange av de samme miljøene som *S. maltophilia*. Disse bakteriene kan også sameksistere i og påvirke hverandre i biofilm (Ryan et al. 2008). Nyere forskning viser også at organismer i biofilm utvikler egne spredningsceller (McDougald et al. 2012). Den biologiske og helse- og miljømessige betydningen av spredning av GMMO og/eller genetisk materiale fra disse til biofilm kan derfor være undervurdert.

6.3. Metoder

Dette prosjektet var et pionerprosjekt. Det hersket derfor en viss usikkerhet om metodenes egnethet. Metodene som ble valgt for prosjektet var på forhånd vurdert som egnet for formålet med bakgrunn i relevant litteratur (f.eks. Jansson et al., 2000; Schwartz et al., 2003). I ettertid er det klart at de valgte metodene ikke var optimale. Den utbredte forekomsten av ARG, og av *S. maltophilia* i sær, var også overraskende og skapte store problemer i forbindelse med forsøk på rendyrking av GMMO. Litteratursøk i den anerkjente Web-of-Science databasen indikerte ikke at *S. maltophilia* er en vanlig og viktig bakterie i avløpsvann. Kun tre artikler som har norske forfattere og omtaler *S. maltophilia* er registrert i denne databasen. Ingen av disse artiklene dreier seg om forekomst i vann/avløp eller nevner den som en vanlig/viktig bakterie i miljøet.

Basert på erfaringene fra dette prosjektet konkluderer vi med at bakterier dyrket på skål burde vært analysert med dot-blotting (Todd et al., 1999; Niu et al. 2012; Yeom et al. 2011), med prober for et større antall markørelementer enn *bla*_{TEM}, *nptII* og M13, for å forsøke å identifisere spesielt interessante stammer.

Det ble isolert plasmid fra blandingskulturer og renkulturer. Analysene av disse plasmidene ble i sin helhet gjort ved hjelp av PCR. Også dette viste seg å være sub-optimalt. Metodikken fungerte godt med prøve 8, og førte til funn og identifisering av en konkret GMMO. Trolig var denne GMMOen dominerende i bakteriemiljøet i prøve 8, kanskje fordi det var snakk om et relativt ferskt utslipp. For de øvrige prøvene kan mye tyde på at bakteriepopulasjonene var sammensatte og komplekse. Dels slik at de inneholdt mange ulike varianter av plasmider med en eller flere av markørene som skulle påvises med PCR. Dels slik at det ble produsert uspesifikke PCR produkter. Resultatet var hyppig forekomst av mange PCR produkter, som vist både i form av bånd av ulike størrelser på gel (j.fr. Figur 9 og 11) og i form av uleselige/ikke-tolkbare sekvensdata (j.fr. Figur 14). En alternativ strategi som kan være aktuell ved et oppfølgingsprosjekt er å gjøre metagenomsekvensering av isolerte plasmider med såkalt Next Generation sekvensering (NGS). Med NGS kan man generere svært store mengder sekvensinformasjon som etterpå må bearbeides med avanserte dataprogrammer. En slik tilnærming må planlegges godt, men vil trolig være kostnadseffektiv sammenholdt med konvensjonell PCR-strategi. Riktig gjennomført ville man med NGS få tilnærmet komplette sekvensdata for samtlige isolerte plasmider fra hver prøve. På det grunnlaget ville det være enkelt å avgjøre om det var snakk om transgene plasmider, og å identifisere hva slags genmodifiseringer som var utført.

TRACA (transposon aided capture) er et dyrkingsuavhengig system for å fange plasmider i en blandet populasjon av mikroorganismer (som prøvene tatt i dette prosjektet; Jones et al. 2007).

Nylig har to artikler blitt publisert der TRACA er kombinert med NGS for metagenomsekvensering av nye plasmider fra komplekse populasjoner av mikroorganismer (Jones et al. 2010; Zhang et al. 2011). Dette systemet er svært aktuelt å benytte i et eventuelt oppfølgingsprosjekt. Ikke minst fordi det kan være egnet til å belyse om ARG eller andre gener spres horisontalt fra GMMO, og om dette i så fall skyldes konjugasjon, transformasjon eller andre mekanismer.

6.4. Administrative forhold på laboratoriene

Det var betydelige forskjeller i ansvarsorganisering, opplæring og rutiner på de besøkte laboratoriene. Administrativt er den vanligste modellen at et laboratorium er organisert under en ledende forsker med egen forskningsgruppe knyttet til laboratoriet. Det er vanlig at slike gruppeledere tilbringer relativt lite tid på laboratoriet. Som regel er det derfor en underordnet forsker som har det praktiske ansvaret for praktisk opplæring og kontroll med daglige rutiner. På laboratorier som ikke er knyttet til en enkelt forskningsgruppe er ansvaret ikke alltid like klart plassert. Dette er et punkt hvor det kan være behov for at ansvarlig myndighet er spesielt oppmerksom på faren for svikt i opplæring, rutiner, m.m. Skriftlige retningslinjer for arbeid på laboratorier er gjerne utarbeidet i fellesskap av forskningsgruppene, instituttens ledelse og HMS-ansvarlige. På samtlige av de besøkte laboratoriene har retningslinjer for arbeid med GMO vært underlagt den generelle HMS-instruksen. På laboratorier som helt eller delvis opererer under ISO akkreditering, slik som Veterinærinstituttet, er det i tillegg til HMS-instruksen et omfattende kvalitetssikringssystem (KS-system) som i detalj beskriver arbeid på ulike laboratorier og med ulike typer av prøver, metoder, osv. Fordelen med et KS-system er at det øker bevisstheten omkring kvalitetssikring og rutiner generelt. Ulempen kan være at systemet blir for detaljert og uoversiktlig, og at det kan oppstå uklarhet om hvor man finner relevant informasjon. Teoretisk kan det også være inkonsistens mellom beskrivelser i KS-system og HMS-instruks. Dette innebærer at det er stort behov for samordning og oppdatering av KS og HMS.

Gjennom dialogen med de involverte laboratoriene ble det etablert et inntrykk av at det er for lite fokus på §15 og 16 i Forskrift om innesluttet bruk av genmodifiserte mikroorganismer (HOD, 2001). Disse to paragrafene regulerer sikkerhetstiltak og kontroll av innesluttet bruk.

Forskriftens §15 "Sikkerhetstiltak" lyder i sin helhet:

- *Ved all innesluttet bruk gjelder prinsippet om god mikrobiologisk praksis. Sikkerhetstiltakene skal være i overensstemmelse med vedlegg V.*
- *Genmodifiserte mikroorganismer skal inaktiveres ved bruk av anerkjente metoder i alt avfall og utslipp, herunder avløpsvann. Det skal om nødvendig undersøkes om det forekommer levedyktige organismer utenfor den primære fysiske inneslutningen.*
- *I tillegg til kravene i annet ledd, skal alt utslipp til miljøet, der det benyttes antibiotikaresistensgener, behandles slik at disse genene ødelegges for eksempel ved fragmentering.*
- *Effekten av behandlingen i annet og tredje ledd skal dokumenteres.*

Forskriftens §16 "Kontroll" lyder (i første setning, første led) slik:

- *Ansvarlig for laboratoriet/anlegget skal føre kontroll med den innesluttede bruken.*

Hvordan GMMO og annet materiale ble inaktivert var ikke et sentralt spørsmål i dette prosjektet. Problemstillingen ble imidlertid aktualisert av det konkrete funnet av GMMO i biofilm på et laboratorium og den etterfølgende prosessen med å finne mulig forklaring på utslippet. Menneskelig feil kan aldri utelukkes. Det er derfor viktig å etablere systemer som tar hensyn til menneskelig feil. Samtidig må systemer ikke bli urimelig krevende. Både den levende GMMOen, plasmid-DNA og antibiotika bør i minst mulig grad slippes ut i miljøet. En kombinasjon av oppsamling av materiale i beholdere med kjemisk inaktivering kan enkelt kombineres med fysisk inaktivering med autoklaving eller forbrenning. Uansett må retningslinjene for inaktivering være entydige og klare. På flere av de besøkte laboratoriene framkom det gjennom samtaler med personalet og dokumentgjennomgang at det var det ulik praksis fra person til person. Dette henger åpenbart sammen med at de skriftlige retningslinjene for inaktivering var lite konkrete på alle de besøkte laboratoriene.

7. Konklusjon og anbefalinger

Det gjennomførte prosjektet var et pionerprosjekt. Det har derfor vært umulig å gi en fullstendig dekning av alle problemstillinger, all relevant litteratur, osv. Prosjektet har først og fremst gitt bedre grunnlag for å vurdere om det er sider ved arbeid med GMMO som trenger tettere oppfølging framover, og peke ut de viktigste.

Vitenskapelig litteratur om overvåking og kontroll med GMMO i miljøer utenfor forskningslaboratorier handler i all hovedsak om hvordan man kan utføre slik overvåking og kontroll. Det meste av denne litteraturen er av noe eldre dato (minst 10 år gammel) og de beskrevne metodene viste seg å være sub-optimale. Vi har ikke klart å finne eksempler på at det er gjennomført prøvetaking og analyse av miljøet utenfor GMMO-laboratorier for å kartlegge om utilsiktede utslipp faktisk finner sted. Det eksisterer heller ikke, så langt vi kjenner til, noen oversikt som oppsummerer kjente tilfeller av utilsiktede utslipp av GMMO. Et slikt register finnes for GM planter og dyr (GMCR, 2013). Derimot fant vi dokumentert at det i andre land er rapportert om utilsiktede utslipp. I noen særlig alvorlige tilfeller er utslippene oppdaget på grunn av skader på mennesker (GM virus som infiserte laboratoriepersonale; HSE 2003). I andre tilfeller har bedrifter selv oppgitt at de forventer utslipp knyttet til sin kommersielle virksomhet (GeneWatch 1999). Vi vil spesielt peke på laboratorienes eget ansvar for å føre kontroll med etterlevelse og effekten av inneslutningstiltak. Dette er, så langt vi kan vurdere, et punkt hvor det er stort forbedringspotensial.

GMMO kan slippe ut fra forskningslaboratorier, og de kan trolig også etablere seg mer permanent i biofilm i avløp. Naturlig biofilm består som regel av mange ulike mikroorganismer i et komplekst samfunn (McDougald et al. 2012). Biofilm i avløp fra laboratorier har høy forekomst av ARG, om man skal konkludere fra dette prosjektet. Det har ikke vært mulig innenfor et så begrenset prosjekt som dette å fastslå om GMMO er en medvirkende årsak til den høye forekomsten av ARG. Diversitet av bakterier og forekomst av ARG er ikke avhengig av arbeid med GMMO (Andam et al. 2012; Brooke 2012; Domingues et al. 2012).

Det er flere problemstillinger som åpenbart trenger oppfølging, for eksempel gjennom et eller flere forskningsprosjekter. For det første, etablering av bedre analysemetodikk for kombinert prøvetaking og karakterisering av biofilm fra GMMO-laboratorier. Metodikken bør være egnet for et bredt spekter av GMMOer, inkludert sopp og GMMO uten de vanligste ARG. Metodikken bør være kostnadseffektiv. Om den etableres gjennom internasjonalt samarbeid vil dette øke potensialet for at metodikken på sikt blir etablert som internasjonalt harmonisert metodikk for formålet. Slik harmonisering er i svært stor grad gjennomført for GM planter i mat og fôr i EØS-området, bl.a. på grunn av det tette samarbeidet i ENGL og med EU-RL GMFF. Også globalt har man kommet langt i å harmonisere metodikken for GM planter i mat og fôr. Tilsvarende samarbeid er foreløpig fraværende for GMMO.

For det andre mangler det nødvendig kunnskap om naturlig forekomst av ARG i biofilm i avløpsrør. Tyerman et al. (2013) viste at bredspektret antibiotikaresistens kan oppstå i forbindelse med dannelse av biofilm også uten antibiotikaseleksjon. Om og hvordan GMMO aktiviteter påvirker biofilm er dårlig kjent, men man kan se for seg både direkte og indirekte påvirkning. Direkte påvirkning vil f.eks. være at GMMO etablerer seg og/eller at ARG fra GMMO tas opp og spres i bakteriepopulasjonene. Indirekte påvirkning vil f.eks. være at rester av antibiotika eller andre stressrelaterte faktorer fra GMMO-arbeidet bidrar til å selektere fram antibiotikaresistente eller stresstolerante stammer spesielt i avløpsrørene fra GMMO-laboratoriene. Det vil dessuten være interessant å få dokumentert om horisontal genoverføring (konjugasjon eller transformasjon) har spilt eller kan spille en rolle for spredning av ARG eller andre gener fra GMMO til mikroorganismer i biofilm. Regelverket peker på nødvendigheten av gode inneslutningstiltak og kontroll med utslipp av både levende GMMO og genetisk materiale som ARG.

For det tredje må det undersøkes hvor langt nedover i avløpssystemene mikroorganismer fra slik biofilm generelt og fra GMMO spesielt, klarer å etablere seg, og hvor stabilt de blir i biofilmen.

Det er flere tiltak knyttet til forebygging og kontroll med GMMO-laboratorier som kan ha betydning for å minimere risiko for utilsiktede utslipp og skadebegrensning ved slike utslipp. I denne omgang vil vi spesielt peke på seks slike tiltak:

1. Klare regler og retningslinjer ved det enkelte laboratoriet. Disse bør i betydelig grad være harmonisert både nasjonalt og internasjonalt. De må være så detaljerte og konkrete at det ikke oppstår tvil om hvordan nødvendig inneslutning skal sikres og hvordan både levende og ikke-levende materiale skal håndteres. Både GMMO, fritt DNA og antibiotika i dyrkingsmedier er eksempler på materiale som skal håndteres på risikoforebyggende måter.
2. Klare ansvarslinjer, bl.a. for oppdatering av regler og retningslinjer, opplæring, internkontroll, rapportering og beredskap for håndtering av uhell.
3. Opplæring og oppfølging av personalet slik at regler og retningslinjer blir kjent av personene som skal arbeide på GMMO-laboratorier. Tidsbegrenset godkjenning og fysisk adgangsbegrensning til laboratorier kan være med på å sikre at kun personer med nødvendig opplæring og oppdatert kompetanse kommer i kontakt med GMMO.
4. Kultur for å tenke konsekvenser av utslipp og for å diskutere biosikkerhet i et bredere perspektiv kan bevisstgjøre personale som arbeider med GMMO.
5. Rutinemessige egenkontroller av opplæringsrutiner, kompetansenivå, og etterlevelse av regler og retningslinjer, j.fr. §15 og 16 i Forskrift om innesluttet bruk av genmodifiserte mikroorganismer (HOD, 2001). I tillegg kan det være fornuftig å ta prøver av miljøet utenfor laboratoriet, inkludert biofilm i avløpsrør, for å kontrollere om inneslutningstiltakene fungerer slik de skal. Hvis prøvetaking og analyser benyttes må de kobles til en beredskapsplan for håndtering av eventuelle utslipp. For eksempel for hvordan man skal få full oversikt over omfang og årsaker til utslipp, og hvordan man skal minimere skadevirkningene.
6. Eksterne kontroller av godkjente laboratorier. I første omgang vil disse kunne bygge på å føre kontroll med at egenkontroller utføres jevnlig og på en tilfredsstillende måte. Ved svikt i egenkontroller bør det vurderes å gjennomføre mer omfattende eksterntkontroll, f.eks. med prøvetaking og analyser. Dette kan medføre behov for etablering av et nasjonalt referanselaboratorium for analyser av slike prøver.

8. Referanser

- An D, Danhorn T, Fuqua C, Parsek MR (2006). Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 103: 3828-3833.
- Andam CP, Fournier GP, Gogarten JP. (2012). Multilevel populations and the evolution of antibiotic resistance through horizontal gene transfer. *FEMS Microbiology Reviews* 35: 756-767.
- Brooke JS (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 25 (1): 2-41.
- CBD (2000). Cartagena protocol on biosafety to the convention on biological diversity: text and annexes. Report, Secretariat of the convention on biological diversity. 2000. ISBN: 92-807-1924-6. bch.cbd.int/protocol/text/
- Crepin S, Harel J, Dozois CM (2012). Chromosomal complementation using Tn7 transposon vectors in Enterobacteriaceae. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 6001-6008.
- CSHP (2010). Cold Spring Harbor Protocols. YEB medium. doi:10.1101/pdb.rec12216. cshprotocols.cshlp.org/content/2010/5/pdb.rec12216.
- Chen I, Dubnau D (March 2004). "DNA uptake during bacterial transformation". *Nature Reviews Microbiology* 2 (3): 241-249.
- Domingues S, Harms K, Fricke WF, Johnsen PJ, da Silva GJ, Nielsen KM (2012). Natural transformation facilitates transfer of transposons, integrons and gene cassettes between bacterial species. *PLoS Pathogens* 8(8): e1002837.
- Elias S, Banin E. (2012). Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews* 36: 990-1004.
- Emanuelson L, Rud RB, Berdal KG, Holst-Jensen A. (2009). Molekylærbiologisk deteksjon av genmodifisert sebrafisk (GloFish). Veterinærinstituttets rapportserie 18-2009.
- GeneWatch (1999). Genetically modified microorganisms: Leaking from the lab? The contained use of genetically modified microorganisms in the UK. 54 sider. <http://www.genewatch.org>.
- GMCR (2013). GM Contamination Register. GeneWatch UK & Greenpeace International. www.gmcontaminationregister.org/
- HOD (2001). Forskrift om innesluttet bruk av genmodifiserte mikroorganismer. FOR 2001-12-21 nr 1600. Helse- og omsorgsdepartementet. www.lovdata.no/for/sf/ho/xo-20011221-1600.html
- Heuer H, Smalla K. (2012). Plasmids foster diversification and adaptation of bacterial populations in soil. *FEMS Microbiology Reviews* 36: 1083-1104.
- Holst-Jensen A, Ali AR, Emanuelson L, Grønbeck TM, Harbo SB, Skjæret C, Spilsberg B & Waiblinger HU. (2012a). Testing for genetically modified organisms (GMOs) of rice imported to Norway. Chapter 37, in: J. Hoorfar (ed.). Case studies in food safety and authenticity: Lessons from real-life situations. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition No. 240, pp. 334-341. Woodhead Publishing Ltd., UK. ISBN-13: 978 0 85709 412 4.
- Holst-Jensen A, Bertheau Y, De Loose M, Grohmann L, Hamels S, Hougs L, Morisset D, Pecoraro S, Pla M, Van den Bulcke M, Wulff D. (2012b). Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials. *Biotechnology Advances* 30(6): 1318-1335.

- Holst-Jensen A. (2012). Analyserapport - sebrafisk mistenkt for å være genmodifisert med gen som koder for rødt fluorescerende protein. www.dirnat.no/multimedia/54640/Analyserapport-sebrafisk.pdf&contentdisposition=attachment.
- HSE (2003). Incidents - lessons to be learnt. Accidental infection with vaccinia virus. Health and Safety Executive, UK. ACGM newsletter No. 32. www.hse.gov.uk/biosafety/gmo/acgm/acgm32/paper8.htm
- Jansson JK, Molin S, Romantschuk M. (2000). Test methods for monitoring genetically modified microorganisms (GMMs) in nature. Nordtest Technical Report 455. Nordtest, Espoo, Finland.
- Johnsborg O, Eldholm V, Håvarstein LS (2007). Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res. Microbiol.* 158 (10): 767-778.
- Jones BV, Marchesi JR (2007). Transposon-aided capture (TRACA) of plasmids resident in the human gut mobile metagenome. *Nature Methods* 4: 55-61
- Jones BV, Sun F, Marchesi JR (2010) Comparative metagenomic analysis of plasmid encoded functions in the human gut microbiome. *BMC Genomics* 11: 46. www.biomedcentral.com/1471-2164/11/46
- Keeling PJ (2009). Functional and ecological impacts of horizontal gene transfer in eukaryotes. *Current Opinion in Genetics and Development* 19: 613-619.
- McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD, Kjelleberg S. (2012). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology* 10: 39-50.
- MD (1993). Genteknologiloven - LOV 1993-04-02 nr 38: Lov om framstilling og bruk av genmodifiserte organismer m.m. 1993. Miljøverndepartementet. www.lovdata.no/all/hl-19930402-038.html.
- Nielsen KM, Johnsen PJ, Bensasson D, Daffonchio D. (2007). Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environmental Biosafety Research* 6: 37-53.
- Niu C, Wang S, Lu C. (2012). Development and evaluation of a dot blot assay for rapid determination of invasion-associated gene *ibeA* directly in fresh bacteria cultures of *E. coli*. *Folia Microbiology* 57: 557-561.
- Qiagen (2012). QIAprep® Miniprep Handbook. 2nd Ed.
- Reiting R, Grohmann L, Moris G, Mäde D. (2013). Detection and characterization of an unknown rice event in Basmati rice products. *European Food Research and Technology* 236 (4): 715-723.
- Ryan RP, Fouhy Y, Garcia BF, Watt SA, Niehaus K, Yang L, Tolker-Nielsen T, Dow JM. (2008). Interspecies signalling via the *Stenotrophomonas maltophilia* diffusible signal factor influences biofilm formation and polymyxin tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 68: 75-86.
- Schwartz T, Kohnen W, Jansen B, Obst U. (2003). Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology* 43: 325-335.
- Smalla K, van Overbeek LS, Pukall R, and van Elsas JD. 1993. Prevalence of *nptII* and Tn5 in kanamycin-resistant bacteria from different environments. *FEMS Microbiology Ecology* 13: 47-58.

Taverniers I, Papazova N, Bertheau Y, De Loose M, Holst-Jensen A. (2008). Gene stacking in transgenic plants: towards compliance between definitions, terminology, and detection within the EU regulatory framework. *Environmental Biosafety Research* 7: 197-218.

Todd ECD, Szabo RA, MacKenzie JM, Martin A, Rahn K, Gyles C, Gao A, Alves D, Yee AJ. (1999). Application of a DNA hybridization-hydrophobic-grid membrane filter method for detection and isolation of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (11): 4775-4780.

Tyerman JG, Ponciano JM, Joyce P, Forney LJ, Harmon LJ. (2013). The evolution of antibiotic susceptibility and resistance during the formation of *Escherichia coli* biofilms in the absence of antibiotics. *BMC Evolutionary Biology* 13: 22. www.biomedcentral.com/1471-2148/13/22.

VKM (2012). Helserisikovurdering av Cry-proteiners adjuvanseffekter. Vitenskapskomiteen for mattrygghet. ISBN: 978-82-8259-055-6. www.vkm.no/dav/d6991c1718.pdf.

Yeom J, Lee Y, Noh J, Jung J, Park J, Seo H, Kim J, Han J, Jeon CO, Kim T, Park W. (2011). Detection of genetically modified microorganisms in soil using the most-probable-number method with multiplex PCR and DNA dot blot. *Research in Microbiology* 162: 807-816.

Zhang T, Zhang X-X, Ye L (2011) Plasmid Metagenome Reveals High Levels of Antibiotic Resistance Genes and Mobile Genetic Elements in Activated Sludge. *PLoS ONE* 6 (10): e26041. doi:10.1371/journal.pone.0026041.



Veterinærinstituttet er et nasjonalt forskningsinstitutt innen dyrehelse, fiskehelse, mattrygghet og dyrevelferd med uavhengig forvaltningsstøtte til departementer og myndigheter som primær oppgave. Beredskap, diagnostikk, overvåking, referansefunksjoner, rådgivning og risikovurderinger er de viktigste virksomhetsområdene.

Veterinærinstituttet har hovedlaboratorium i Oslo og regionale laboratorier i Sandnes, Bergen, Trondheim, Harstad og Tromsø, med til sammen ca. 360 ansatte.

www.vetinst.no

Tromsø

Stakkevollvn. 23b · 9010 Tromsø
Stakkevollvn. 23b · 9010 Tromsø
t 77 61 92 30 · f 77 69 49 11
vitr@vetinst.no

Harstad

Havnegata 4 · 9404 Harstad
9480 Harstad
t 77 04 15 50 · f 77 04 15 51
vih@vetinst.no

Bergen

Bontelabo 8 b · 5003 Bergen
Pb 1263 Sentrum · 5811 Bergen
t 55 36 38 38 · f 55 32 18 80
post.vib@vetinst.no

Sandnes

Kyrkjeveien 334 · 4325 Sandnes
Pb 295 · 4303 Sandnes
t 51 60 35 40 · f 51 60 35 41
vis@vetinst.no

Trondheim

Tungasletta 2 · 7047 Trondheim
Pb 5695 Sluppen · 7485 Trondheim
t 73 58 07 50 · f 73 58 07 88
vit@vetinst.no

Oslo

Ullevålsveien 68 · 0454 Oslo
Pb 750 Sentrum · 0106 Oslo
t 23 21 60 00 · f 23 21 60 01
post@vetinst.no

