

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
dhr. J.J. Atsma
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 18 april 2011
KENMERK CGM/110418-03
ONDERWERP Advies: Grootschalige productie van melkzuur door genetisch gemodificeerde cyanobacteriën in een kweekstelsel voor eenmalig gebruik.

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 10-049 met de titel 'Medium scale growth of a genetically modified cyanobacterium for the production of lactic acid' van Photanol B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De aanvrager wil genetisch gemodificeerde (gg-) cyanobacteriën gebruiken voor de productie van melkzuur. De productie zal plaatsvinden in een kweekstelsel voor eenmalig gebruik. De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsclassificatie van uitgangsstam *Synechocystis* sp. PCC 6803 en over de mogelijke plaatsing van deze cyanobacteriestam op Bijlage 1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo). Tevens is de COGEM verzocht te adviseren of werkzaamheden met de gg- *Synechocystis* sp. stammen in het beschreven kweekstelsel op MI-I niveau plaats kunnen vinden.

Synechocystis sp. PCC 6803 wordt al jarenlang gebruikt als modelorganisme voor het onderzoek naar fotosynthese. Het organisme produceert geen toxines, is niet in staat te sporuleren en is niet pathogeen voor mens, dier of plant. Daarom is de COGEM van mening dat uitgangsstam *Synechocystis* sp. PCC 6803 op Bijlage 1 van de Regeling ggo geplaatst kan worden.

Werkzaamheden in kweeksystemen onder MI-I condities mogen alleen uitgevoerd worden met ggo's die een IAB erkenning hebben. De COGEM is van mening dat de gg- *Synechocystis* sp. PCC 6803 stammen in onderhavige aanvraag niet pathogeen zijn en geen risico's voor mens en milieu vormen wanneer zij (bijvoorbeeld als gevolg van lekkage) buiten de bioreactor belanden. Daarom kunnen deze gg-stammen veilig gebruikt worden voor grootschalige productie op MI-I niveau. Voorts is de COGEM van mening dat het kweekstelsel als voldoende veilig kan worden beschouwd voor werkzaamheden op MI-I niveau.

Concluderend acht de COGEM de risico's bij de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.



De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,



Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs
Dr. I. van der Leij

Dit advies is mede tot stand gekomen met inbreng van Prof. dr. ir. Rene H. Wijffels, Hoogleraar Bioprocestechnologie aan de Wageningen Universiteit.

Grootschalige productie van melkzuur door genetisch gemodificeerde cyanobacteriën in een kweekstelsel voor eenmalig gebruik

COGEM advies CGM/110418-03

Inleiding

De aanvrager, Photanol B.V., is voornemens genetisch gemodificeerde (gg-) cyanobacteriën te gebruiken voor de productie van melkzuur. De aanvrager wil de werkzaamheden uitvoeren in een kweekstelsel voor eenmalig gebruik bestaande uit transparante plastic zakken (een zogenaamde Single Use Bioreactor, hierna SUB). Deze zakken bevatten tot 1000 liter aan kweekvloeistof waar continu koolstofdioxide doorheen wordt geleid.

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsclassificatie van de uitgangsstam *Synechocystis* sp. PCC 6803 en over de mogelijke plaatsing van deze cyanobacteriestam op Bijlage 1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo). Tevens is de COGEM verzocht te adviseren of werkzaamheden met de gg- *Synechocystis* sp. PCC 6803 stammen op MI-I niveau ingeschaald kunnen worden. Als laatste is de COGEM gevraagd of het kweekstelsel gebruikt kan worden voor werkzaamheden met de gg-cyanobacteriestammen op MI-I niveau.

Eigenschappen van Synechocystis sp. PCC 6803

Synechocystis sp. PCC 6803 is een eencellige cyanobacterie (blauwalg). Deze blauwalg komt voor in zoet water en is voor zijn groei afhankelijk van fotosynthese.¹ In afwezigheid van zonlicht schakelt de blauwalg over op glycolyse en oxidatieve fosforylatie. Vanwege deze eigenschappen en door zijn relatief eenvoudige genetische opmaak, wordt de blauwalg al jarenlang als modelorganisme gebruikt voor het onderzoek naar fotosynthese.^{2,3}

In 1996 is het volledige genoom van *Synechocystis* sp. PCC 6803 gesequenced en gepubliceerd.⁴ In tegenstelling tot andere cyanobacteriestammen is *Synechocystis* sp. PCC 6803 niet in staat om toxines te produceren. Daarnaast bevat de blauwalg geen sporulatiegenen en is daardoor niet in staat te sporuleren.^{5,6}

Eigenschappen van het ggo

De aanvrager wil voor de productie van melkzuur gebruik maken van een tweetal ggo's, genaamd *Synechocystis* sp. PCC 6803 ph1 en *Synechocystis* sp. PCC 6803 ph2. Beide stammen zijn vervaardigd door insertie van het *lactaatdehydrogenase* gen (*ldh*) en het kanamycine resistentiegen (*nptII*) in het genoom van uitgangsstam *Synechocystis* sp. PCC 6803 met behulp van de zogenaamde pBPSldh vector. Deze genen worden door homologe recombinatie in het genoom geïntegreerd. De insertie is niet mobiliseerbaar of overdraagbaar. Het *nptII* gen komt wijdverspreid voor in allerlei gram negatieve bacteriën.⁷

De ph2 stam bevat, naast het *ldh* en *nptII* gen, nog een extra insertie. In deze stam is het *acid glucose-1-phosphatase* (*agp*) gen geïnactiveerd door insertie van een chlooramphenicol resistentiegen. Dit leidt tot een blokkade van glycogeensynthese. Door de afwezigheid van

glycogeen heeft de blauwalg geen energievoorraad om in afwezigheid van zonlicht te kunnen groeien.

Kweekstelsel

De bacteriestammen ph1 en ph2 zullen worden gekweekt in transparante plastic zakken van drie meter hoog, één meter breed en maximaal vijf centimeter dik. Er wordt continu koolstofdioxide door de zakken geleid. De zakken worden opgehangen in een (planten)kas met een dak van glas en buitenwanden van lichtdoorlatend polycarbonaat. Onder de opstelling wordt een lekbak geplaatst die het complete volume van het systeem, in geval van lekkage, op kan vangen.

Wanneer de lactaatconcentratie of de celdichtheid een maximum heeft bereikt wordt een gedeelte van de inhoud van het systeem geoogst. De cyanobacteriën worden vervolgens verwijderd uit de oplossing door middel van membraanfiltratie en afgedood door sterilisatie (20 minuten op 120 °C). Uit de overblijvende vloeistof wordt vervolgens het lactaat gezuiverd.

Classificatie

In de Regeling ggo worden micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen. Deze indeling start met pathogeniteitsklasse 1, die gevormd wordt door apathogene micro-organismen en loopt op tot pathogeniteitsklasse 4, de groep van hoog pathogene micro-organismen. Bijlage 1 van de regeling ggo is een lijst van micro-organismen die in principe niet pathogeen (apathogeen) zijn voor mens, dier of plant. Deze bijlage is voor vergunningaanvragers van belang, omdat met deze micro-organismen onder bepaalde voorwaarden op het laagste inperkingsniveau, ML-I, gewerkt mag worden. Dit is toegestaan wanneer voor het vervaardigen van het ggo een veilig geachte vector gebruikt wordt en zich in deze vector geen insertie bevindt die een potentieel gevaar voor mens en milieu vormt.⁸ Voorbeelden van potentieel ‘gevaarlijke’ inserties zijn genen die coderen voor toxines, virulentie- of pathogeniteitsfactoren en virale en cellulaire oncogenen. Micro-organismen die op Bijlage 1 vermeld staan, voldoen in ieder geval aan één van de volgende criteria.

- Het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant.
- Het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen zijn getroffen.
- Het micro-organisme behoort tot een soort die wel vertegenwoordigers bevat van klasse 2, 3 of 4, maar de stam in kwestie bevat geen genetisch materiaal dat verantwoordelijk is voor de virulentie.
- Het niet-virulente karakter van het micro-organisme is door middel van adequate tests aangetoond.

In de huidige inschalingspraktijk wordt een micro-organisme als pathogeen gezien als deze bij mensen met een normaal functionerend immuunsysteem ziekte kan veroorzaken. Opportunistische pathogenen, die uitsluitend ziekte kunnen veroorzaken bij individuen met een verzwakt

immuunsysteem, worden in de regel als niet pathogeen (apathogeen) beschouwd en kunnen derhalve op Bijlage 1 geplaatst worden.

Inrichtingsvoorschriften procesinstallaties

Grootschalige kweek van ggo's is gebonden aan regels die worden voorgeschreven in bijlage 4 van de Regeling ggo.⁵ Binnen een MI-I inperking stelt de Regeling dat het fysisch inperkende systeem moet voldoen aan de eisen die voor het ouderorganisme gelden in procesinstallaties. Daarnaast geldt dat de werkvoorschriften gevolgd worden die gebruikelijk zijn voor activiteiten met het ouderorganisme in procesinstallaties.

Op MI-I inperkingsniveau worden uitsluitend organismen gehanteerd die voldoen aan de IAB criteria. Volgens deze criteria moeten de organismen niet-pathogeen zijn, een veilige vector en ongevaarlijke sequenties bevatten. Na afloop van de werkzaamheden hoeven deze ggo's niet eerst afgedood te worden voordat zij worden geloosd, omdat IAB organismen geen risico vormen voor mens en milieu.

Op MI-II inperking of hoger worden organismen gehanteerd die geen IAB erkenning hebben. In deze ruimten moet het fysisch inperkende systeem zo geconstrueerd zijn dat de verspreiding van de ggo's wordt beperkt. Tevens moeten de ggo's na afloop van de werkzaamheden volgens een gevalideerde methode zijn geïnactiveerd alvorens de inhoud van het fysisch inperkende systeem geloosd mag worden.

Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft verschillende keren geadviseerd over de toepassing van kweeksystemen voor eenmalig gebruik.^{9,10} In januari 2011 heeft de COGEM geadviseerd over productie van monoklonale antilichamen door gg-dierlijke cellen in een SUB op MI-I niveau.¹¹ Het betrof hier gg-dierlijke cellen met een IAB erkenning. De COGEM kon instemmen met het gebruik van de bioreactor voor werkzaamheden met het ggo op MI-I niveau zonder aanvullende eisen. De COGEM achtte de risico's bij de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Er zijn reeds in 1996 laboratoriumwerkzaamheden met een gg- *Synechocystis sp.* PCC 6803 stam vergund (IG 96-075) De werkzaamheden met deze stam zijn toen ingeschaald op ML-I niveau. In deze stam zijn extra nucleotiden aangebracht in een subunit van het ATPase gen (waardoor deze niet tot expressie komt). Als onderbouwing van de inschaling is destijds een toxiciteitstudie uitgevoerd waaruit bleek dat een dosis van 2000mg van deze gg- *Synechocystis sp.* PCC 6803 stam per kilogram lichaamsgewicht bij muizen niet toxisch was.

Overweging en Advies

Classificatie van Synechocystis sp.

Synechocystis sp. PCC 6803 wordt al jarenlang gebruikt als modelorganisme voor het onderzoek naar fotosynthese.^{2,3} In tegenstelling tot andere cyanobacteriestammen is *Synechocystis sp.* PCC

6803 niet in staat om toxines te produceren. Daarnaast bevat de stam geen sporulatiegenen en is daardoor niet in staat te sporuleren.^{5,6}

Er zijn geen aanwijzingen dat *Synechocystis* sp. PCC 6803 ziekteverwekkend is voor mens, dier of plant. In 2008 is de genotoxiciteit van een transgene *Synechocystis* sp. PCC 6803 stam getest op beenmerg erythrocyten van muizen en op erythrocyten uit een vis.¹² In de transgene cyanobacteriën werd een vis (bot) groeihormoon tot expressie gebracht. In deze studie werd geen genotoxisch effect gemeten.

Op basis van deze gegevens adviseert de COGEM *Synechocystis* sp. PCC 6803 in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en acht zij de opname van deze cyanobacterie op Bijlage 1 van de Regeling ggo gerechtvaardigd. Tevens kan de bacteriestam beschouwd worden als gastheer waarmee labhandelingen en grootschalige handelingen kunnen worden uitgevoerd.

IAB erkenning

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijke IAB erkenning van de gg-*Synechocystis* sp. PCC 6803 stammen. Om voor een IAB erkenning in aanmerking te komen moeten de stammen aan enkele voorwaarden voldoen. Zo moet de gastheer een lange historie van veilig gebruik kennen en van nature geen bacteriesporen vormen of defect sporulerend zijn. Daarnaast mogen de vectoren en inserties geen schadelijke sequenties bevatten en mag de insertie geen genen bevatten die coderen voor potentieel pathogene eigenschappen.

Zoals eerder vermeld wordt *Synechocystis* sp. PCC 6803 al jarenlang gebruikt als modelorganisme voor het onderzoek naar fotosynthese en is de stam niet in staat te sporuleren. Het ingebracht *ldh* gen is afkomstig van een niet-pathogeen donororganisme genaamd *Lactococcus lactis*. Daarnaast levert de aanwezigheid van de ingebrachte kanamycine en chlooramphenicol resistentiegenen geen aanvullend risico op voor mens en milieu omdat deze genen veelvuldig voorkomen in de natuur.

De gg-stammen besteden volgens de aanvrager een groot deel van hun energie aan de vorming van melkzuur. Dit betekent dat de gg-stammen significant langzamer groeien dan het uitgangsgenorganisme. Daarnaast is stam ph2 niet in staat om glycogeen te vormen. Dit betekent dat het organisme weinig reserve-energie heeft en dus een donkere periode, waarin fotosynthese niet mogelijk is, moeilijker kan overleven.

Op basis van deze gegevens is de COGEM van mening dat de stammen *Synechocystis* sp. PCC 6803 ph1 en *Synechocystis* sp. PCC 6803 ph2 erkend kunnen worden als IAB organisme en derhalve veilig gebruikt kunnen worden voor grootschalige productie.

Veiligheid kweekstelsel

De COGEM is gevraagd te adviseren of gebruik van het door de aanvrager beschreven kweekstelsel als fysisch inperkend systeem voldoende veilig wordt geacht voor werkzaamheden op MI-I inperkingsniveau.

De nadruk bij het hanteren van kweeksystemen onder MI-I condities ligt op de veiligheid van het organisme en daarmee minder op de fysische inperking. Alleen als het organisme erkend veilig is, mag het op MI-I niveau gehanteerd worden. Zoals hierboven beschreven is de COGEM

van mening dat de gebruikte ggo's als IAB organisme kunnen worden erkend. Daarmee is het ggo veilig bevonden voor werkzaamheden op MI-I niveau.

In theorie bestaat er bij gebruik van een kweekstelsel bestaande uit plastic zakken een verhoogde kans op lekkage waarbij het ggo kan vrijkomen. Deze lekkage kan bijvoorbeeld optreden als gevolg van scheurtjes in de zak. Echter, omdat het hier een veilig ggo betreft, leidt lekkage van het stelsel niet tot risico's voor mens en milieu. Bovendien geeft de aanvrager aan dat er onder de opstelling een lekbak wordt geplaatst die het complete volume van het stelsel op kan vangen. Derhalve is de COGEM van mening dat het kweekstelsel als voldoende veilig kan worden beschouwd voor werkzaamheden met de beschreven gg- *Synechocystis* sp. PCC 6803 stammen op MI-I niveau.

Samenvattend is de COGEM van mening dat uitgangsstam *Synechocystis* sp. PCC 6803 op Bijlage 1 van de Regeling ggo geplaatst kan worden en dat beide gg-stammen erkend kunnen worden als IAB organisme. Voorts is de COGEM van mening dat het kweekstelsel als voldoende veilig kan worden beschouwd voor werkzaamheden met de beschreven gg- *Synechocystis* sp. PCC 6803 stammen op MI-I niveau. Concluderend acht de COGEM de risico's bij de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Kaneko T, *et al.* (2003). Structural analysis of four large plasmids harboring in a unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res* 31;10: 221-8
2. Ikeuchi M & Tabata S (2001). *Synechocystis* sp. PCC 6803 – a useful tool in the study of the genetics of cyanobacteria. *Photosynth Res* 70: 73-83.
3. Koksharova OA & Wolk CP (2002) Genetic tools for cyanobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* (2002) 58:123–137
4. Kaneko T, *et al.* (1996). Sequence Analysis of the Genome of the Unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. II. Sequence Determination of the Entire Genome and Assignment of Potential Protein-coding Regions. *DNA Res* 3:109-136
5. <http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?database=ntss01> (12-4-2011)
6. <http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/Synechocystis#summary> (6-4-2011)
7. COGEM 2000. Advies antibioticumresistentie genen. COGEM advies CGM/000918-01
8. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. <http://bggo.rivm.nl/Documenten/Documenten%20regelgeving/Regeling-genetisch-gemodificeerde-organismen.pdf> (12-4-2011)
9. COGEM 2010. Advies grootschalige productie monoklonale antistoffen in een SUB. COGEM advies CGM/100503-01
10. COGEM 2010. Advies Grootschalige kweek van genetisch gemodificeerde dierlijke cellen in een Single use bioreactor. COGEM advies CGM/101028-03
11. COGEM 2011. Commerciële productie van genetisch gemodificeerde dierlijke cellen in

- een Single Use Bioreactor onder MI-I condities. COGEM advies CGM/ 110110-02
12. Liu S, *et al.* (2008). Genotoxic evaluation of the GH transgenic *Synechocystis* using mice and turbot (*Scophthalmus maximus* L.) *Mutat Res* 653: 113-116