

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Dhr. J.J. Atsma
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 6 juli 2011
KENMERK CGM/110706-01
ONDERWERP Advies classificatie van negen algensoorten

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 11-046 met de titel 'Genetische modificatie van algen' van de Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek, Food & Biobased Research, Wageningen UR deelt de COGEM u het volgende mee.


Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van de negen algensoorten *Chlorella zofingienesis*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloris* sp. Utex 1999, *Neochloris oleoabundans*, *Parietochloris incisa*, *Phaeodactylum tricornerutum*, *Porphyridium cruentum* en *Scenedesmus obliquus*. De aanvrager wil de negen algensoorten modificeren door gensequenties betrokken bij glycolyse en vetzuurmetabolisme in te brengen. Donorsequenties zijn afkomstig van diverse soorten organismen zoals algen, planten (*Arabidopsis thaliana*, gewassen) en micro-organismen.

Tevens is de COGEM verzocht te adviseren over de mogelijke plaatsing van deze algensoorten op Bijlage 1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen. Bijlage 1 bestaat uit een lijst van micro-organismen die in principe niet pathogeen zijn voor mens, dier of plant. Met de micro-organismen die in Bijlage 1 zijn opgenomen, mag onder bepaalde voorwaarden op het laagste inperkingsniveau ML-I gewerkt worden.

De negen algensoorten worden onder andere toegepast als supplement in voeding of in cosmetische verzorgingsproducten. Daarnaast kunnen enkele van deze algensoorten gebruikt worden voor de productie van biobrandstof.

In de wetenschappelijke literatuur is geen melding gemaakt van pathogene infecties door deze algensoorten bij mens, dier of plant. De COGEM adviseert deze negen algensoorten in de laagste pathogeniteitsklasse (klasse 1) in te delen. Tevens acht de COGEM plaatsing van deze algensoorten op Bijlage 1 gerechtvaardigd. Concluderend acht de COGEM de risico's van deze voorgenomen werkzaamheden op ML-I niveau 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. Ellen van Donk, hoofd afdeling Aquatische Ecologie aan het Nederlands Instituut voor Ecologie (NIOO-KNAW) te Wageningen

Classificatie van negen algensoorten

COGEM advies CGM/110706-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag ingediend door de Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek, Food & Biobased Research, Wageningen UR, is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de algensoorten *Chlorella zofingienesis*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloris* sp. UTEX 1999, *Neochloris oleoabundans*, *Parietochloris incisa*, *Phaeodactylum tricornerutum*, *Porphyridium cruentum* en *Scenedesmus obliquus*. Tevens is de COGEM verzocht te adviseren over de plaatsing van deze algensoorten op Bijlage 1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo) en inschaling van werkzaamheden met deze negen algensoorten.

1.1 Regeling ggo: Pathogeniteitsklassen, Bijlage 1 en inperkingsniveaus

In de Regeling ggo worden micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen.¹ 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. De indeling van pathogeniteitsklassen is van belang omdat iedere klasse gekoppeld is aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met ggo's gebaseerd op een micro-organisme uit een dergelijke pathogeniteitsklasse.

Volgens de Regeling ggo is een indeling in **pathogeniteitsklasse 1** van toepassing als het micro-organisme minimaal aan één van de volgende criteria voldoet:

- het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant.
- het heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen zijn getroffen.
- het 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.

Een indeling in **pathogeniteitsklasse 2** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat die zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat, alsmede een micro-organisme dat bij planten of dieren ziekte kan veroorzaken.

Een indeling in **pathogeniteitsklasse 3** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen een ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat die zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat.

Een indeling in **pathogeniteitsklasse 4** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat

Bijlage 1 is een lijst van micro-organismen die als apathogeen zijn aangemerkt en daarom zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. Voor de inschaling van de vervaardiging van en de handelingen met ggo's is Bijlage 1 van belang, omdat met deze gastheren onder bepaalde voorwaarden op het laagste inperkingsniveau (ML-I) gewerkt mag worden.¹

1.2 Algen

Het begrip 'algen' is een brede verzamelnaam voor diverse groepen autotrofe organismen die als energiebron licht (fotosynthese) of anorganische chemische reacties (chemosynthese) gebruiken. De meeste algen gebruiken fotosynthese als energiebron.^{2,3} Algen kunnen ééncellig of meercellig zijn en behoren tot de eukaryoten.^{2,3,4} Er worden microalgen (fytoplankton) en macroalgen (bijvoorbeeld zeewier) onderscheiden. Algen worden voor vele commerciële doeleinden toegepast zoals in de farmaceutische, voedings- en cosmetische industrie.² Binnen het algenrijk worden onder andere groenalgen, roodalgen, kiezelalgen (diatomeeën) en bruinalgen onderscheiden.⁵ Blauwalgen (cyanobacteriën) worden in de volksmond ook als alg beschouwd maar zijn in feite prokaryoten en behoren tot het bacterierijk.^{6,7} Hieronder volgt een beknopte beschrijving van de algen betrokken bij onderhavige vergunningaanvraag.

1.2.1 *Chlorella zofingiensis*

Chlorella zofingiensis is een groenalg en behoort tot het fylum van de *Chlorophyta*.⁵ Sommige stammen zijn in staat astaxanthine en luteïne te produceren. Deze pigmenten worden als voedselkleurstof gebruikt en toegepast als voedseladditief in de aquacultuur (bijvoorbeeld zalmkweek) en pluimveehouderij.^{8,9} De alg behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant^{10,11,12,13} *Chlorella zofingiensis* wordt al gedurende langere tijd gebruikt voor onderwijsdoeleinden.¹⁴

1.2.2 *Dunaliella tertiolecta*

Dunaliella tertiolecta is een groenalg en behoort tot het fylum van de *Chlorophyta*.⁵ Toepassingen van de alg zijn veelzijdig. Zo kan deze ingezet worden bij de afbraak van aromatische koolwaterstoffen en is hij daardoor een potentiële kandidaat voor bioremediatie (inzet van biotechnologie bij het verhelpen van milieuverontreiniging).¹⁵ Daarnaast wordt er een antiproliferatieve werking tegen kankercellen aan de alg toegeschreven.¹⁶ De alg behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of

plant.^{10,11,12,13} *Dunaliella tertiolecta* wordt al gedurende langere tijd gebruikt voor onderwijsdoeleinden.¹⁴

1.2.3 *Isochrysis galbana*

Isochrysis galbana behoort tot het fylum van de *Haptophyta*. De alg wordt al geruime tijd gebruikt in de aquacultuur onder andere als voedsel voor zoöplankton en schaaldieren.^{10,11,12} De alg behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant.^{10,11,12,13}

1.2.4 *Nannochloris* sp. Utex 1999

Nannochloris sp. Utex 1999 is een groenalg en behoort tot het fylum van de *Chlorophyta*.⁵ De alg behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant.^{10,11,12,13} Studies met ratten hebben geen negatief effect van *Nannochloris* sp. laten zien.¹⁷ De alg is in staat toxische effecten van andere algen te neutraliseren door onder andere cytolytische agentia (namelijk de ‘Apparent Oceanic Naturally Occurring Cytolins’) te inactiveren.^{18,19}

1.2.5 *Neochloris oleoabundans*

Neochloris oleoabundans is een groenalg en behoort tot het fylum van de *Chlorophyta*.⁵ De toepassingen van deze alg zijn veelzijdig. Gezien zijn hoge gehalte aan triglyceriden en verzadigde vetzuren is hij geschikt voor de productie van biobrandstof.²⁰ Tevens wordt *Neochloris oleoabundans*-extract toegepast in huidverzorgingsmiddelen.²¹ Daarnaast kan *Neochloris oleoabundans* afvalwater zuiveren van stikstof en fosfaten.²² De alg behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant.^{10,11,12,13}

1.2.6 *Parietochloris incisa*

Parietochloris incisa is een groenalg en behoort tot het fylum van de *Chlorophyta*.⁵ De alg behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant.^{10,11,12,13} *Parietochloris incisa* is een niet-dierlijke bron van arachidonzuur. Arachidonzuur is een belangrijk supplement in babyvoeding.²³

1.2.7 *Phaeodactylum tricornutum*

Phaeodactylum tricornutum is een kiezelalg (diatomee) en behoort tot het fylum *Bacillariophyta*.⁵ *Phaeodactylum tricornutum*-extract wordt toegepast in cosmetica wegens zijn vochtinbrengende en verzachtende eigenschappen en is daarnaast als voedingssupplement getest in pelsdierenvoer.^{24,25} Deze kiezelalg behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant.^{10,11,12,13} Door de ‘Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit’ (ZKBS) in Duitsland zijn werkzaamheden met *Phaeodactylum tricornutum* ingedeeld in de laagste risicoklasse.²⁶

1.2.8 *Porphyridium cruentum*

Porphyridium cruentum is een roodalg en behoort tot het fylum *Rhodophyta*.⁵ Deze roodalg behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant.^{10,11,12,13} *Porphyridium cruentum* wordt al gedurende langere tijd gebruikt voor onderwijsdoeleinden.¹⁴ Daarnaast wordt *Porphyridium cruentum*-extract toegepast in huidverzorgingsproducten.²⁷

1.2.9 *Scenedesmus obliquus*

Scenedesmus obliquus is een groenalg en behoort tot het fylum *Chlorophyta*.⁵ Deze groenalg behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant.^{10,11,12,13} Studies met ratten hebben geen negatief effect van *Scenedesmus obliquus* laten zien.²⁸ De toepassingen van deze alg zijn veelzijdig. Gezien zijn samenstelling is hij geschikt voor de productie van biodiesel en kan hij daarnaast ingezet worden in afvalwaterzuiveringsinstallaties.²⁹ *Scenedesmus obliquus* wordt al gedurende langere tijd gebruikt voor onderwijsdoeleinden.¹⁴ Door de ZKBS zijn werkzaamheden met *Scenedesmus obliquus* ingedeeld in de laagste risicoklasse.²⁶

2. Eerder afgegeven COGEM adviezen

De COGEM heeft in het verleden verschillende malen geadviseerd over werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) algen. De algen *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlamydomonas moewusii*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella kessleri*, *Dunaliella bardawil* en *Dunaliella salina* konden worden beschouwd als gastheren voor de vervaardiging van organismen behorend tot Bijlage I.³⁰ Ook de algen *Chlorella saccharophila* en *Chlorella ellipsoidea* konden worden beschouwd als gastheren voor de vervaardiging van organismen behorend tot Bijlage I.³¹

3. Voorgenomen werkzaamheden

De werkzaamheden betreffen het genetisch modificeren van de hiervoor beschreven negen algensoorten. De voor de modificatie toegepaste donorsequenties zijn genen betrokken bij glycolyse en vetzuurmetabolisme en daarvan afgeleide antisense sequenties. De aanvrager geeft aan dat alle donorsequenties niet toxisch zijn en niet coderen voor een schadelijk product. Sequenties zullen voorafgaand aan transformatie door middel van sequencing worden gekarakteriseerd.

De donorsequenties zijn afkomstig van de hierboven genoemde negen algensoorten en van de algen *Chlamydomonas reinhardtii* en *Chlorella vulgaris*. Laatstgenoemde twee algensoorten zijn reeds geplaatst op Bijlage 1. Daarnaast zijn donorsequenties afkomstig van landbouw-, tuinbouw- en voedergewassen, *Arabidopsis thaliana* (zandraket) en micro-organismen van Bijlage 1 van de Regeling ggo. Geen van deze donororganismen is pathogeen. Werkzaamheden zullen uitgevoerd worden met volumina van maximaal 1 L.

4. Overweging en advies

Wetenschappelijk gezien is de pathogeniteit van een micro-organisme goed aan te tonen. De afwezigheid van pathogeniteit is echter moeilijk te bewijzen. Daarbij worden gevallen van pathogeniteit gepubliceerd, terwijl er nauwelijks wordt gerapporteerd over de apathogeniteit van micro-organismen. Hierdoor is van veel micro-organismen weinig literatuur over apathogeniteit voorhanden. Een lange historie van veilig gebruik, waarbij geen nadelige effecten zijn gerapporteerd, vormt in dit opzicht een belangrijk referentiekader voor apathogeniteit. Als kanttekening moet hierbij opgemerkt worden dat effecten mogelijkerwijs moeilijk worden opgemerkt als zij niet erg uitgesproken van aard zijn en er niet gericht naar wordt gezocht. Anderzijds zijn vanuit de meeste micro-organismen apathogeen. Daarom worden micro-organismen bij afwezigheid van expliciete aanwijzingen voor pathogeniteit bij langdurig gebruik als apathogeen beschouwd.

De aanvrager geeft aan dat voor de vergunning expliciet algen zijn geselecteerd waarvan geen schadelijke effecten bekend zijn. Volgens de aanvrager is het zeer aannemelijk dat voornoemde negen algensoorten veilig zijn voor mens en milieu.

In de wetenschappelijke literatuur worden de negen algensoorten niet geassocieerd met pathogeniteit voor mens, dier of plant.^{10,11,12,13} Daarnaast kennen *Isochrysis galbana*, *Nannochloris* sp. Utex, *Phaedodactylum tricorutum*, *Porphyridium cruentum* en *Scenedesmus obliquus* een lange historie van veilig gebruik. *Chlorella zofingiensis*, *Dunaliella tertiolecta*, *Porphyridium cruentum* en *Scenedesmus obliquus* worden voor toepassing in het onderwijs als veilig beschouwd.¹⁴

Chlorella zofingiensis, *Isochrysis galbana* en *Phaedodactylum tricorutum* worden toegepast als voedingssupplement in hetzij de aquacultuur, de pluimveehouderij of pelsdierenvoer.^{8,9,10,11,12,13,24,25} Geen schadelijke effecten zijn gerapporteerd. *Nannochloris* sp. Utex en *Scenedesmus obliquus* zijn getest in rattenstudies. Er zijn geen schadelijke effecten gerapporteerd.^{17,28}

Neochloris oleoabundans, *Phaedodactylum tricorutum* en *Porphyridium cruentum* worden toegepast in cosmetica.^{21,24,27} Geen negatieve effecten zijn bekend.

Door de ZKBS zijn werkzaamheden met *Phaedodactylum tricorutum* en *Scenedesmus obliquus* ingedeeld in de laagste risicoklasse.²⁶

5. Conclusie

Op basis van bovenstaande gegevens adviseert de COGEM alle negen algensoorten in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en acht zij de opname van de genoemde negen algensoorten op Bijlage 1 van de Regeling ggo gerechtvaardigd.

Gebaseerd op de indeling van de algensoorten in pathogeniteitsklasse 1 en conform de Regeling ggo acht de COGEM de risico's van de voorgenomen werkzaamheden op ML-I niveau voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Regeling ggo (2010). <http://bggo.rivm.nl/Documenten/Documenten%20regelgeving/Regeling-genetisch-gemodificeerde-organismen.pdf>
2. Stengel DB *et al.* (2011). Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Advances*.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.016>
3. Raven PH *et al.* (1999). *Biology of plants*. 6th edition. Eds W.H. Freeman and Company, New York
4. Allaby M (1992). *Algae*. The Concise Dictionary of Botany. Oxford University Press, Oxford
5. UniProt Taxonomy (30 juni 2011). <http://www.uniprot.org/taxonomy/>
6. Nabors MW. (2004). *Introduction to Botany*. Pearson Education Inc., San Francisco, CA
7. Guiry MD *et al.* (2007). *New Survey of Clare Island Volume 6: The Freshwater and Terrestrial Algae*. Royal Irish Academy, Dublin
8. Del Campo JA *et al.* (2004). Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (*Chlorophyta*). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 848-854.
9. Yuan JP *et al.* (2011). Review. Potential health-promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae. *Mol. Nutr. Food Res.* 55: 150-165
10. *Phycology* by Robert Edward Lee, Cambridge University Press
11. Graham LE and Wilcox LW (). *Algae*, Prentice Hall
12. Canter-Lund H and Lund JWG (1995). *Freshwater Algae: Their microscopic world explored*, Biopress Ltd., Bristol
13. Aquatic pathogens: Algae. <http://www.env.gov.bc.ca/wat/wq/reference/toxicalgae.html>
14. Ewald HT *et al.* (1997). Micro-organisms for education. <http://www.science-projects.com/safemicrobes.htm>
15. Quesnel DM *et al.* (2011). Naphthenic acid biodegradation by the unicellular alga *Dunaliella teriolecta*. *Chemosphere* 84: 504-511
16. Pasquet V *et al.* (2011). Antiproliferative activity of violaxanthin isolated from bioguided fractionating of *Dunaliella teriolecta* extracts. *Mar Drugs* 9(5):819-831
17. Markovits A *et al.* (1992). Evaluation of marine microalga *Nannochloris* sp. As a potential dietary supplement. Chemical, nutritional and short term toxicological evaluation in rats. *Nutrition research.* 12: 1273-1284
18. Derby ML *et al.* (2003). Studies of the effect of Ψ -APONIN from *Nannochloris* sp. On the Florida red tide organism *Karenia brevis*. *Toxicon.* 41(2): 245-249
19. Derby ML *et al.* (2005). Effect of *Nannochloris* sp. on the toxicity of four algae. *J. Environ Sci. Health.* 40(1): 151-156
20. Li Y *et al.* (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81: 629-636
21. European Commission> Health and Consumers>CosIng; 30 juni 2011;
<http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details&id=87347>

22. Wang B and Lan CQ (2011). Biomass production and nitrogen and phosphorus removal by the green alga *Neochloris oleoabundans* in simulated waste water and secondary municipal wastewater effluent. *Biosource Technology* 102: 5369-5644
23. Bigognoa C *et al.* (2002). Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry* 60: 497–503
24. European Commission> Health and Consumers>CosIng; 30 juni 2011;
<http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details&id=59191>
25. Skrede A *et al.* (2011). Evaluation of microalgae as sources of digestible nutrients for monogastric animals. *J. of Animal and Feed Sciences*. 20: 131-142
26. Zentrale Kommission fur die Biologische Sicherheit (ZKBS).
http://www.bvl.bund.de/DE/06_Gentechnik/02_Verbraucher/05_Institutionen_fuer_biologische_Sicherheit/02_ZKBS/gentechnik_zkbs_node.html en
http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06_Gentechnik/register_datenbanken/organismenliste.pdf?__blob=publicationFile&v=4
27. European Commission> Health and Consumers>CosIng; 30 juni 2011;
<http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details&id=79426>
28. Becker EW (1984). Biotechnology and exploitation of the green alga *Scenedesmus Obliquus* in India. *Biomass* 4: 1-19
29. Mandal S and Mallick N. (2011) Waste Utilization and Biodiesel Production by the Green Microalga *Scenedesmus obliquus*
30. COGEM (1999). Biotechnologie in lagere planten. COGEM advies CGM/990429-09
31. COGEM (2001). Biotechnologie in lagere planten. COGEM advies CGM/011214-03