

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 14 oktober 2014

KENMERK CGM/141014-01

ONDERWERP Aanbieding onderzoeksrapport '*Bacillus thuringiensis* toxins: their mode of action and the potential for interaction between them'

Geachte mevrouw Mansveld,

Bij de toelatingsprocedure van teelt van genetisch gemodificeerde (gg-)gewassen, vormt de beoordeling op het mogelijk optreden van schadelijke effecten in het veld op andere organismen een belangrijk onderdeel van de milieurisicoanalyse. Dit speelt vooral een rol bij de beoordeling van insectenresistente gg-gewassen.

Bij het merendeel van dergelijke gg-gewassen wordt de resistentie bewerkstelligd door genen van de bacterie *Bacillus thuringiensis* (Bt) in te brengen. Deze Bt-genen brengen toxines tot expressie die in staat zijn bepaalde voor het gewas schadelijke insecten, zogenoemde doelwitorganismen, te doden. Aandachtspunt bij de risicobeoordeling is de inschatting van eventuele schadelijke effecten op organismen waartegen het toxine niet gericht is, de zogenoemde niet-doelwitorganismen.

In de afgelopen jaren is veel ervaring opgedaan met de milieurisicobeoordeling van gg-gewassen die één Bt-gen tot expressie brengen. Het gebeurt echter steeds vaker dat er meerdere Bt-genen in een gg-plant worden ingebouwd. Doordat eiwitten elkaar kunnen beïnvloeden, kan het op voorhand niet uitgesloten worden dat het werkingsspectrum van een Bt-toxine verandert wanneer er andere Bt-toxines in de plant aanwezig zijn.

In het geval van bijvoorbeeld synergie tussen toxines, kunnen effecten bij lagere doses optreden dan men op grond van de experimenten die met de afzonderlijke Bt-eiwitten zijn uitgevoerd, zou verwachten. Ook zou de specificiteit van de Bt eiwitten mogelijk kunnen veranderen wanneer er meerdere Bt eiwitten aanwezig zijn, met als gevolg dat niet-



doelwitorganismen, die van oorsprong ongevoelig zijn voor de afzonderlijke toxines, wel gevoelig worden voor de combinatie van toxines.

Als het toxische effect van een combinatie van Bt-toxines anders is dan de (gewogen) som van de effecten van ieder van die eiwitten afzonderlijk, kan niet volstaan worden met een experimentele opzet, waarbij een eventueel effect op niet-doelwitorganismen onderzocht wordt door deze organismen alleen aan de afzonderlijke Bt eiwitten bloot te stellen.

Om een beter inzicht te verkrijgen hoe bij de milieurisicobeoordeling van de mogelijke nadelige effecten op niet-doelwitorganismen om moet worden gegaan met de inbouw van meerdere Bt-genen in één gg-plant, heeft de COGEM twee onderzoeksopdrachten laten uitvoeren. Hierbij waren de onderzoeksvragen geformuleerd of 1) bepaalde combinaties van verschillende Bt-toxines in staat zijn om, en zo ja in welke mate, elkaars werking te beïnvloeden, 2) het mogelijk is om, bijvoorbeeld op basis van het werkingsmechanisme van een Bt-toxine, te voorspellen of interacties tussen Bt-toxines zullen optreden, en 3) welk type van experimenten of gegevens noodzakelijk zijn om eventuele effecten op niet-doelwitorganismen te kunnen beoordelen.

Bij de eerste onderzoeksopdracht, uitgevoerd door dr. N. van der Hoeven, werkzaam bij 'ECOΣTAT' (Statistical Consultancy in Ecology, Ecotoxicology and Agricultural Research), is een biochemische en toxicologische invalshoek gevolgd om de eerste deelvragen te beantwoorden. In het bijgevoegde onderzoeksrapport, getiteld '*Bacillus thuringiensis* toxins: their mode of action and the potential for interaction between them', wordt ingegaan op de verschillende groepen van Bt-toxines, hun mogelijke werkingsmechanismen en de in de wetenschappelijk literatuur aanwezige gegevens over toxiciteit van en interacties tussen Bt-toxines.

Van de tweede onderzoeksopdracht, waarbij de onderzoeksvragen meer vanuit het perspectief van de ggo-milieurisicobeoordeling zijn benaderd, zal het bijbehorende rapport later dit jaar verschijnen.

Op basis van de bevindingen van deze onderzoeksopdrachten, en op basis van een internationale workshop over de interacties van combinaties van Bt-toxines op niet-doelwitorganismen, die zij op 15 oktober 2014 organiseert, is de COGEM van plan een advies op te stellen over de risicobeoordeling van de teelt van insectenresistente gg-gewassen die meerdere Bt toxinegenen tot expressie brengen. Dit advies zal u eind 2014 aangeboden worden.

Belangrijke punten uit bijgevoegd eerste onderzoeksrapport

Het onderzoeksrapport is opgedeeld in twee delen. Het eerste deel geeft een uitvoerige beschrijving van het brede scala aan Bt-toxines en hun eigenschappen. Het tweede deel van



het rapport gaat in op de toxiciteit van de Bt-eiwitten en de mogelijke interacties tussen Bt-toxines.

Bevindingen eerste deel van het rapport: overzicht en eigenschappen van Bt-toxines

Bt-toxines kunnen in twee groepen worden ingedeeld: de toxines die in de vorm van eiwitkristallen aanwezig zijn in de sporen van *B. thuringensis* (Cry- en Cyt-toxines), en de toxines die tijdens de groeifase aanwezig zijn in de bacteriecel (de Vip-toxines). Een verdere differentiatie op indeling is gebaseerd op het toxische werkingsmechanisme en de driedimensionale eiwitstructuur. In totaal worden er 7 Bt toxinegroepen onderscheiden. De meest voorkomende groep van Bt-toxines, en het meest toegepast in gg-gewassen, betreft de 'drie domein kristalvormende toxines' ofwel 3D-Cry toxines. In het rapport wordt opgemerkt dat de nomenclatuur van Bt-toxines niet altijd eenduidig is omdat naamgeving en groepsindeling soms door elkaar heen lopen.

De meeste Bt-toxines zijn werkzaam op het larvale stadium van bepaalde insectensoorten en grijpen aan op cellen van het darmkanaal. Sommige Bt-toxines zijn daarnaast werkzaam tegen bepaalde nematoden. Enkele Bt-toxines zijn alleen werkzaam tegen nematoden.

De schadelijke werking van Bt-toxines is gebaseerd op de specifieke binding van het eiwit aan celmembraanreceptoren. De werking van de 3D-Cry toxines is nog niet exact bekend. Er zijn twee verschillende moleculaire modellen beschreven, het 'sequential binding' model en het 'signalling pathway' model. Volgens het rapport is het niet mogelijk om aan de hand van deze modellen voorspellingen te doen over eventuele interacties tussen Bt-toxines.

In het rapport wordt opgemerkt dat er in de literatuur veel toxiciteitsgegevens van Bt-eiwitten voor verschillende doelwitorganismen bekend zijn, maar dat het vergelijken van deze gegevens lastig is. De schadelijke effecten zijn op verschillende wijzen gemeten (onder meer aan de hand van mortaliteit, gewichtsverlies of groeiremming). Daarnaast worden de effectieve doses in verschillende eenheden weergegeven.

De toxiciteitsgegevens van individuele Bt-eiwitten is publiek toegankelijk op de website van 'The Natural Resources Canada, Canadian Forest Service'. Op deze website worden per afzonderlijk toxine 1938 gegevens voor 184 verschillende diersoorten beschreven, waarvan 10 verschillende niet-doelwitorganismen.

Bevindingen tweede deel van het rapport: interacties tussen Bt-toxines

Indien Bt-toxines in mengsels voorkomen, kunnen er drie mogelijk optredende effecten worden onderscheiden: synergisme, antagonisme en additiviteit. Bij het additieve effect beïnvloeden de toxines in het mengsel elkaars werking niet. Het totale toxische effect wordt bepaald door de som van het effect van de afzonderlijke toxines (bij effect-additie) of de som van de relatieve concentraties van de afzonderlijke toxines (bij concentratie-additie). Bij



antagonisme en synergisme vindt er remming of juist versterking van de toxische effecten plaats.

Het rapport geeft aan dat de mogelijkheid op synergie tussen Bt-toxines het grootst is in de fase van binding van het toxine aan de celmembraanreceptoren, en bij de eventueel optredende membraanperforatie en porievorming. In de literatuur zijn voor bijna 80 Bt-toxine paren data beschikbaar over de gecombineerde werking van Bt-toxines. Er zijn echter nauwelijks gegevens te vinden over interacties tussen Bt toxines in niet-doelwitorganismen.

Het onderzoeksrapport beschrijft twee rekenmodellen waarmee de mengseltoxiciteit van Bt-toxines met een additief effect voor een bepaald (gevoelig) doelwitorganisme op voorhand berekend kan worden, namelijk het effect-additiemodel en het concentratie-additiemodel. Voor de rekenmodellen dienen voor elk toxine afzonderlijk de toxiciteitsdosis voor het betreffende doelwitorganisme bekend te zijn, en het gehalte van elk van de toxines in het mengsel.

Met behulp van deze rekenmodellen kan bepaald worden of toxines elkaars werking beïnvloeden (versterken of tegenwerken). Indien een experimenteel bepaalde effectieve dosis van een mengsel van Bt-toxines anders is dan de via het rekenmodel berekende waarde, betekent dit dat de toxines elkaars werking hebben beïnvloed. In dat geval kan de synergiefactor berekend worden.

Als de toxines elkaars werking hebben versterkt (synergisme), is de verhouding tussen de via het model berekende toxiciteitsdosis ten opzichte van de experimenteel gevonden toxiciteitsdosis, de zogenaamde synergiefactor, groter dan 1. Als de toxines elkaars werking hebben tegengewerkt (antagonisme), is deze synergiefactor kleiner dan 1. Als de toxines elkaars werking niet hebben beïnvloed en er geen interactie heeft plaatsgevonden, zijn de berekende en gemeten waarde aan elkaar gelijk, en is de synergiefactor gelijk aan 1. In dit geval is er sprake geweest van een additief effect.

De onderzoekster heeft in de literatuur gezocht naar bruikbare gegevens waarmee synergiefactoren van verschillende combinaties van Bt-toxines voor diverse (niet-) doelwitorganismen berekend kunnen worden. Hiertoe heeft zij studies gezocht waarbij zowel de toxiciteit voor afzonderlijke toxines, als de toxiciteit van mengsels van die toxines voor hetzelfde (niet-)doelwitorganisme is bepaald. Een 50-tal studies bleek hiervoor bruikbaar. Het merendeel van deze studies is uitgevoerd op doelwitorganismen. Slechts een beperkt aantal studies is uitgevoerd op twee soorten niet-doelwitorganismen (een nematode en een muggensoort).

Op basis van de berekeningen stelt het rapport dat ongeveer de helft van deze studies laat zien dat Bt-toxines elkaars werking beïnvloeden. Voor slechts een klein aantal van deze



studies betreft het antagonisme (in het rapport gedefinieerd als een synergiefactor van minder dan 0,5).

Het merendeel van de interacties blijkt een vorm van synergisme te betreffen, in het rapport gedefinieerd als zwak (een synergiefactor van meer dan 2 maar kleiner dan 10) tot zeer sterk (een synergiefactor van meer dan 50). Synergiefactoren hoger dan 50 blijken vooral voor te komen bij studies waarbij voor de toxiciteitsbepalingen een specifieke stam van een gevoelig doelwitorganisme is gebruikt, die resistent is voor één van de in het mengsel aanwezige toxines. De combinatie van twee toxines blijkt in die gevallen te leiden tot doorbreking van de resistentie.

De onderzoekster heeft voor verschillende combinaties van Bt-toxinegroepen per combinatie de berekende synergiefactoren geanalyseerd. Ze komt tot de conclusie dat combinaties van 3D-Cry toxinen, of combinaties waarbij één van de toxines een 3D-Cry toxine betreft, vermoedelijk geen synergisme (synergiefactor van minder dan 2) of hooguit zwak synergisme vertonen (synergiefactor tussen de 2 en 10).

Overwegingen van de COGEM bij het rapport

De COGEM is van mening dat het rapport een handig overzicht biedt van alle tot nu toe beschreven Bt-toxines. Het rapport is een waardevol naslagwerk voor het terugvinden van hun toxiciteitsgegevens.

Op basis van de in het rapport aangeleverde gegevens, signaleert de COGEM dat er in de literatuur relatief weinig toxiciteitsgegevens van Bt-toxines voor niet-doelwitorganismen bekend zijn. Ook zijn er geen gegevens over interactieve effecten van Bt-toxine mengsels bij niet-doelwitorganismen bekend.

Op basis van de door de onderzoekster uitgevoerde berekeningen concludeert de COGEM dat antagonisme bij Bt-toxines relatief zeldzaam is, en dat synergisme voorkomt. Er zijn zeer hoge synergiefactoren gerapporteerd, maar deze zijn uitsluitend aangetroffen bij organismen resistent tegen, of relatief ongevoelig voor, één van de in de combinatie aanwezige Bt-toxines.

In het onderzoeksrapport wordt gesteld dat bij combinaties van en met zogenaamde 3D-Cry toxines er hoogstens sprake is van zwak synergisme (synergiefactor tussen de 2 en 10).

3D-Cry toxines worden veelvuldig in gg-planten ingebouwd. De COGEM stelt dat een toename in toxiciteit met een factor 10 ernstige milieueffecten met zich mee kan brengen en daarom niet als zwak synergistisch gedefinieerd behoort te worden. Zij acht de definiëring van een synergiefactor tussen de 2 en 5 als zwak, beter op zijn plaats.

De COGEM merkt verder op dat uit het onderzoeksrapport blijkt dat bepaalde combinaties van 3D-Cry eiwitten, voor het ene soort organisme een antagonistisch effect vertonen terwijl



zij voor een ander organisme juist een synergistisch effect vertonen. Dit betekent dat gegevens verkregen bij de ene soort niet geëxtrapoleerd kunnen worden naar andere soorten. Op basis hiervan signaleert de COGEM dat waargenomen interacties van combinaties van Bt-toxines op een bepaald doelwitorganisme derhalve niet automatisch geëxtrapoleerd kunnen worden naar niet-doelwitorganismen.

Samenvattend ziet de COGEM, op basis van het onderzoeksrapport en de bovenstaande overwegingen, vooralsnog geen aanleiding om haar eerdere standpunt, dat bij de milieuriscobeoordeling van gg-gewassen waarin combinaties van Bt-genen voorkomen, het noodzakelijk is dat studies naar effecten op niet-doelwitorganismen niet alleen met de afzonderlijke Bt-toxines, maar óók met mengsels van die Bt-toxines moeten worden uitgevoerd, te herzien. Tevens dienen deze experimenten uitgevoerd te worden met niet-doelwitorganismen.

De bevindingen van bijgevoegd rapport en de overwegingen van de COGEM hierbij, zullen besproken worden tijdens de internationale workshop over de milieuriscobeoordeling van gg-gewassen met meerdere Bt-genen die de COGEM op 14 oktober organiseert.

Hoogachtend,

Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM