

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

DATUM 21 augustus 2015
KENMERK CGM/150821-01
ONDERWERP Advies classificatie van cyanobacterie *Synechococcus* sp. stam PCC7002

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG15-235 “kleinschalige kweekexperimenten met genetisch gemodificeerde *Synechococcus* PC7002” van Wageningen UR deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsklasse en de mogelijke plaatsing van *Synechococcus* sp. stam PCC7002 op bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo. De aanvrager is voornemens om kanamycineresistentie te introduceren in deze stam en vervolgens kleinschalige kweekexperimenten uit te voeren. De COGEM is ook gevraagd om over de inschaling van deze werkzaamheden te adviseren.

Synechococcus sp. stam PCC7002 is een cyanobacterie die al sinds 1968 wordt gebruikt voor wetenschappelijk onderzoek en een lange historie van veilig gebruik kent. De volledige genomesequentie van deze stam is bekend en er zijn geen aanwijzingen dat deze stam toxines produceert die schadelijk zijn voor andere organismen of dat deze stam pathogeen is voor andere organismen.

De COGEM adviseert daarom om *Synechococcus* sp. stam PCC7002 in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en op te nemen in Bijlage 2 lijst A1 van de Regeling ggo.

Vanwege het apathogene karakter van de stam acht de COGEM de risico's voor mens en milieu bij de voorgenoemde laboratoriumwerkzaamheden op ML-I inperkingsniveau verwaarloosbaar klein.



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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke.

Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

Classificatie van cyanobacterie *Synechococcus* sp. stam PCC7002

COGEM advies CGM/150821-01

Inleiding

Naar aanleiding van de vergunningaanvraag “kleinschalige kweekexperimenten met genetisch gemodificeerde *Synechococcus* PC7002” van Wageningen UR is de COGEM gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsklasse en de mogelijke plaatsing van deze stam op bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

De aanvrager wil kanamycineresistentie introduceren in *Synechococcus* sp. stam PCC7002 en vervolgens kleinschalige kweekexperimenten uitvoeren. De COGEM is ook gevraagd om te adviseren op welk inperkingsniveau deze werkzaamheden uitgevoerd kunnen worden.

Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (Regeling ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu ogenschouw genomen. Daartoe worden in de Regeling ggo 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. Iedere pathogeniteitsklasse is gekoppeld aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met ggo's van die klasse.

Apathogene micro-organismen worden ingedeeld in **pathogeniteitsklasse 1**. Dergelijke micro-organismen dienen minimaal aan één van de volgende criteria te voldoen:

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

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

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

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

Bijlage 2 lijst A1

Bijlage 2 lijst A1 maakt deel uit van de Regeling ggo en bestaat uit een lijst van micro-organismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant. Opname in Lijst A1 betekent dat met het betreffende micro-organisme onder ML-1 laboratoriumcondities ggo's vervaardigd mogen worden die zijn samengesteld uit vectoren en inserties die voorkomen op de A-lijsten (veilige vectoren en inserties) zonder dat de gebruiker een risicobeoordeling hoeft uit te voeren.

Eerdere COGEM adviezen

Een andere soort uit hetzelfde genus (*Synechococcus elongatus*) staat sinds 1998 onder diens oude naam *Anacystis nidulans* vermeld op de lijst met apathogene micro-organismen in de Regeling ggo.^{1,2} In 2011 heeft de COGEM positief geadviseerd over grootschalige productie met cyanobacterie *Synechocystis* sp. stam PCC 6803 op MI-I niveau.³

Kenmerken van *Synechococcus* sp.

Het genus *Synechococcus* behoort tot de orde Chroococcales van het fyllum Cyanobacteria (blauwalgen). Het genus is niet goed gedefinieerd (polyfyletisch). Uit diverse fylogenetische analyses blijkt dat de huidige taxonomische indeling waarschijnlijk niet correct is.^{4,5}

Synechococcus bacteriën zijn ca. 0,4-6 µm groot en kunnen pseudo-filamenten vormen.⁵ Ze komen wereldwijd voor in zowel zoet als zout water en van de Noordpool tot de tropen.⁴ *Synechococcus* soorten kunnen fotosynthetiseren en zijn belangrijk organismen aan het begin van de voedselketen in oceanen.⁵ Ze worden in het marine milieu in grote aantallen (500 tot 1,5 miljoen cellen per ml)⁶ aangetroffen.

Synechococcus is beschreven als veroorzaker van algenbloei in kustwateren.⁶ Bij algenbloei neemt het aantal algen snel toe. Wanneer de algen afsterven en worden afgebroken, ontstaan zuurstofloze omstandigheden waardoor ook andere organismen kunnen afsterven. Sommige blauwalgen produceren toxinen die schadelijk zijn voor andere organismen. Ook voor sommige *Synechococcus* stammen is gerapporteerd dat zij stoffen produceren die schadelijk zijn voor muizen,⁷ menselijke rode bloedcellen,⁸ pekelkreeftjes, mosselen en zee-egels.⁹

Bij onderzoek naar een dodelijke ziekte onder koralen in de Golf van Napels bleken cyanobacteriële infecties schade aan het weefsel van zacht koraal (*Eunicella cavolini* en *Eunicella singularis*) te veroorzaken. *Synechococcus* sp. werd samen met andere cyanobacteriën (o.a. *Arthrospira* sp.) in het zieke weefsel aangetroffen.¹⁰ De veroorzaker van de ziekte is niet bekend. Het is wel bekend dat koraal bij een stijging van de temperatuur van het zeewater vatbaarder wordt voor ongelimiteerde groei van bacteriën die normaal gesproken goedaardig zijn.¹⁰

Naast vrij voorkomende *Synechococcus* soorten, zijn er ook *Synechococcus* soorten die voorkomen als symbiont. *Synechococcus spongiarum* maakt deel uit van het gezonde weefsel van sponzen en produceert voedingsstoffen voor een grote verscheidenheid aan sponssoorten.¹¹ Bij weefsel van zieke

sponzen (o.a. bij *Carteriospongia foliascens* en *Aplysina cauliformis*) vindt een verschuiving plaats in de aanwezige micro-organismen en neemt het aandeel *S. spongiarum* af.^{12,13}

***Synechococcus* sp. stam PCC7002**

Synechococcus sp. stam PCC7002 werd in 1961 geïsoleerd uit modder afkomstig van een viskwekerij in Puerto Rico¹⁴ en kan in water met zeer uiteenlopende zoutconcentraties groeien.¹⁵ *Synechococcus* sp. stam PCC7002 is ook bekend als *Synechococcus* sp. PCC7002 PR-6, *Synechococcus* sp. ATCC27264 en werd eerder *Agmenellum quadruplicatum* genoemd.

PCC7002 is eencellig, maar vormt korte filamenten van twee tot vier cellen bij de optimale groeitemperatuur (38°C). Deze stam is één van de snelst groeiende cyanobacteriën en kan zeer goed tegen hoge lichtintensiteiten.¹⁵ Al sinds 1968 wordt *Synechococcus* sp. stam PCC7002 gebruikt als modelorganisme voor onderzoek naar fotosynthese en onderzoek naar de fysiologie en het metabolisme van cyanobacteriën.^{16,17,18}

In 2008 is de volledige genomsequentie van deze stam gepubliceerd.¹⁹ Het genoom bevat twee sequenties die coderen voor ‘addiction module toxins’. ‘Addiction modules’ zorgen ervoor dat plasmiden of andere extrachromosomale elementen in bacteriële cellen aanwezig blijven. Ze bestaan uit een instabiel antitoxine dat snel wordt afgebroken en een stabielere toxine. Wanneer het plasmide (of het extrachromosomale element) bij de celdeling niet wordt overgedragen, verdwijnt het antitoxine uit de dochtercel, waarna het toxine de cel vervolgens dood.²⁰

Classificaties andere beoordelende instanties

De ‘American Type Culture Collection’ (ATCC) die haar indeling louter baseert op pathogeniteit voor de mens, heeft werkzaamheden met *Synechococcus* sp. PCC 7002 [PR-6] (ATCC 27264) ingedeeld in het laagste veiligheidsniveau ‘biosafety level 1’.²¹ In Nieuw-Zeeland is deze stam door de Environmental Protection Authority geclassificeerd als een ‘category 1’ organisme.²² In deze categorie worden organismen ingedeeld die apathogeen zijn voor mens, dier, plant en schimmel.

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil kanamycineresistentie introduceren in *Synechococcus* sp. stam PCC7002 en vervolgens kleinschalige kweekexperimenten uitvoeren.

Overweging en advies

Het genus *Synechococcus* bestaat uit een grote verscheidenheid aan organismen en is niet goed gedefinieerd. Het omvat soorten zoals *S. spongiarum* die in symbiose samenleven met sponzen, maar bevat ook soorten die voorkomen als vrij levende eencellige. *Synechococcus* sp. stam PCC7002 is niet nauw verwant aan de meeste andere soorten binnen het genus.^{4,5,10}

Voor sommige *Synechococcus* stammen is gerapporteerd dat ze mogelijk schadelijke effecten hebben op muizen,⁷ menselijke rode bloedcellen,⁸ pekelkreeftjes, mosselen en zee-egels,⁹ maar hierbij is geen toxine-productie aangetoond. Ook zijn er geen aanwijzingen dat deze stammen ziekteverwekkers zijn. In ziek weefsel van zachte koralen (*Eunicella cavolini* en *Eunicella singularis*) werd *Synechococcus* sp. samen met andere cyanobacteriën (o.a. *Arthrospira* sp.) aangetroffen.¹⁰ De

veroorzaker van deze koraalziekte is niet bekend en de geïsoleerde stammen zijn slechts verre verwanten van *Synechococcus* sp. stam PCC7002.²³

Synechococcus sp. stam PCC7002 is een modelorganisme dat al sinds 1968 wordt gebruikt en een lange historie van veilig gebruik kent. In 2008 is de volledige genomsequentie van deze stam gepubliceerd. Er zijn geen aanwijzingen dat deze stam toxinen produceert die schadelijk zijn voor andere organismen. Ook zijn er geen aanwijzingen dat *Synechococcus* sp. stam PCC7002 pathogeen is voor andere organismen. De COGEM adviseert daarom om *Synechococcus* sp. stam PCC7002 in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en op te nemen in Bijlage 2 lijst A1 van de Regeling ggo.

Vanwege het apathogene karakter van deze stam acht zij de risico's voor mens en milieu bij de voorgenomen laboratoriumwerkzaamheden met genetisch gemodificeerde lijnen van *Synechococcus* sp. stam PCC7002 verwaarloosbaar klein. De COGEM adviseert daarom deze werkzaamheden in te schalen op ML-I inperkingsniveau.

Referenties

1. Minister van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer (1998). Regeling genetisch gemodificeerde organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze regeling. Staatscourant nr. 108
2. Staatssecretaris van Infrastructuur en Milieu (2014). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. Bijlage 2, behorende bij artikel 21 van de Regeling ggo milieubeheer 2013. Lijst A1. Gastheerorganismen behorende bij combinatie A.
wetten.nl/BWBR0035072/Bijlage2/geldigheidsdatum_11-08-2015 (bezoekt: 11 augustus 2015)
3. COGEM (2011). Grootschalige productie van melkzuur door genetisch gemodificeerde cyanobacteriën in een kweekstelsel voor eenmalig gebruik. COGEM advies CGM/110418-03
4. Robertson BR *et al.* (2001). Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51: 861-871
5. Dvořák P *et al.* (2014). *Synechococcus*: 3 billion years of global dominance. *Mol Ecol.* 23: 5538-5551
6. Beardall J (2008). Blooms of *Synechococcus*. An analysis of the problem worldwide and possible causative factors in relation to nuisance blooms in the Gippsland Lakes.
http://gcb.vic.gov.au/staging/wp-content/uploads/2014/04/Synechococcus_Report_2008.pdf (bezoekt: 12 augustus 2015)
7. Martins R *et al.* (2005). Toxicity of culturable cyanobacteria strains isolated from the Portuguese coast. *Toxicon.* 46: 454-464
8. Pagliara P & Caroppo C (2011). Cytotoxic and antimetabolic activities in aqueous extracts of eight cyanobacterial strains isolated from the marine sponge *Petrosia ficiformis*. *Toxicon.* 57: 889-896
9. Martins R *et al.* (2007). Toxicity assessment of crude and partially purified extracts of marine *Synechocystis* and *Synechococcus* cyanobacterial strains in marine invertebrates. *Toxicon.* 50: 791-799
10. Carella F *et al.* (2014). Gorgonian disease outbreak in the Gulf of Naples: pathology reveals cyanobacterial infection linked to elevated sea temperatures. *Dis Aquat Organ.* 111: 69-80
11. Erwin PM & Thacker RW (2008). Cryptic diversity of the symbiotic cyanobacterium *Synechococcus spongiarum* among sponge hosts. *Mol Ecol.* 17: 2937-2947

12. Gao Z-M *et al.* (2014). Pyrosequencing reveals the microbial communities in the red sea sponge *Carteriospongia foliascens* and their impressive shifts in abnormal tissues. *Microb Ecol.* 68: 621-632
13. Olson JB *et al.* (2013). Molecular community profiling reveals impacts of time, space and disease status on the bacterial community associated with the Caribbean sponge *Aplysina cauliformis*. *FEMS Microbiol Ecol.* 87: 268-279
14. Universal Protein Resource: Proteomes - *Synechococcus* sp. (strain ATCC 27264 / PCC 7002 / PR-6) (*Agmenellum quadruplicatum*) <http://www.uniprot.org/proteomes/UP000001688> (bezocht: 12 augustus 2015)
15. Ludwig M & Bryant DA (2012). *Synechococcus* sp. strain PCC7002 transcriptome: acclimation to temperature, salinity, oxidative stress and mixotrophic growth conditions. *Front Microbiol.* 3:354
16. Van Baalen C (1968). The effects of ultraviolet irradiation on a coccoid blue-green alga: survival, photosynthesis and photoreactivation. *Plant Physiol.* 43: 1689-1695
17. Stevens SE & Porter RD (1980). Transformation in *Agmenellum quadruplicatum*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 77(10): 6052-6056
18. Webb R & Punnett T (1989). Characterization of a *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 spontaneous mutant strain defective in accumulation of photosystem II core chlorophyll-protein complexes. *J Bacteriol.* 171(4): 2262-2264
19. Li T *et al.* (2008). *Synechococcus* sp. PCC 7002, complete genome. NCBI website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP000951> (bezocht: 10 augustus 2015)
20. Engelberg-Kulka H & Glaser G (1999). Addition modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. *Annu Rev Microbiol.* 53:43-70
21. ATCC – *Synechococcus* sp. (ATCC® 27264TM) General information <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/27264.aspx> (bezocht: 13 augustus 2015)
22. Environmental Protection Authority New Zealand – Decision - Institutional biological safety committee decision form to develop low-risk genetically modified organisms in containment under section 42A of the hazardous substances and new organisms (HSNO) act. Application code GMD02100 http://www.epa.govt.nz/search-databases/HSNO%20Application%20Register%20Documents/GMD02100_GMD02100%20decision%20s67A%20-%20July%202012.pdf (bezocht: 13 augustus 2015)
23. Fuller NJ *et al.* (2003). Clade-specific 16S ribosomal DNA oligonucleotides reveal the predominance of a single marine *Synechococcus* clade throughout a stratified water column in the red sea. *Appl Environ Microbiol.* 69(5): 2430-2443