

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw S.A.M. Dijkma
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 4 mei 2016
KENMERK CGM/160504-0101
ONDERWERP Advies 'Classificatie twee *Nannochloropsis* algensoorten'

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een adviesvraag over de vergunningaanvraag 'Genetische modificatie van *Nannochloropsis gaditana* en *Nannochloropsis oceanica*' (IG 16-119) deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de classificatie van de twee algensoorten *Nannochloropsis gaditana* en *Nannochloropsis oceanica*. Deze algen maken deel uit van het fytoplankton en komen voor in diverse aquatische milieus. Beide algensoorten bevatten een hoog gehalte aan oliën, waaronder omega 3-vetzuren. Ze staan daarom in de belangstelling voor mogelijke toepassing binnen de voedselindustrie en als biobrandstof.

Voor zover bij de COGEM bekend zijn er binnen de algensoorten *N. gaditana* en *N. oceanica* geen stammen of isolaten die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant. Beide soorten worden al langere tijd in de aquacultuur als voedsel voor zoöplankton gebruikt. Daarnaast wordt al meer dan 14 jaar in laboratoria met deze algen gewerkt. Tot op heden is daarbij nooit melding gemaakt van schadelijke effecten. Ook zijn er bij de COGEM geen aanwijzingen bekend dat de algen toxines produceren.

Op basis van bovenstaande gegevens concludeert de COGEM dat de algensoorten niet geassocieerd zijn met infectie of ziekte van plant, dier of mens, en een historie van veilig gebruik kennen. Zij adviseert daarom *N. gaditana* en *N. oceanica* in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Tevens is zij van mening dat beide algensoorten in aanmerking komen voor plaatsing op Bijlage 2 lijst A1 van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen'.



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

Dit advies is mede tot stand gekomen met inbreng van prof. dr. Klaas J. Hellingwerf, emeritus hoogleraar Algemene Microbiologie (Swammerdam Instituut voor Levenswetenschappen, Universiteit van Amsterdam).

Pathogeniteitsclassificatie algensoorten

Nannochloropsis gaditana* en *Nannochloropsis oceanica

COGEM advies CGM/160504-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd advies uit te brengen over een aanvraag van de Wageningen Universiteit met als titel 'Genetische modificatie van *Nannochloropsis gaditana* en *Nannochloropsis oceanica*'. De aanvrager verzoekt om plaatsing van deze twee algensoorten op Bijlage 2 lijst A1.

Bijlage 2 lijst A1 maakt deel uit van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen' (ggo) en bestaat uit een lijst van micro-organismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant. Opname op Bijlage 2 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). De gebruiker hoeft hiervoor geen risicobeoordeling uit te voeren.

Pathogeniteitsclassificatie Regeling ggo

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie van een micro-organisme de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden de 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.

Algen

Het begrip ‘algen’ is een brede verzamelnaam voor diverse groepen autotrofe organismen die licht (fotosynthese) of anorganische chemische reacties (chemosynthese) als energiebron gebruiken.^{1,2,3} De meeste algen gebruiken fotosynthese als energiebron. Er worden microalgen (fytoplankton) en macroalgen (bijvoorbeeld zeewier) onderscheiden, waarbij weer een onderscheid gemaakt wordt in onder meer groenalgen, roodalgen, kiezelalgen (diatomeeën) en bruinalgen.^{1,2,3} Algen kunnen ééncellig of meercellig zijn en behoren tot de eukaryoten. Hoewel blauwalgen (cyanobacteriën) in de volksmond ook alg worden genoemd, zijn dit in feite prokaryoten en behoren zij tot het bacterierijk.^{1,2} Algen worden voor veel doeleinden toegepast, onder meer in de farmaceutische, voedings- en cosmetische industrie.⁴

Algensoorten *N. gaditana* en *N. oceanica*

Het geslacht *Nannochloropsis* behoort tot het fylum van de Heterokontophyta en de klasse van de Eustigmatophyceae.² *Nannochloropsis* omvat 6 algensoorten, waaronder *N. gaditana* en *N. oceanica*.⁵ In de literatuur wordt *N. gaditana* voor het eerst in 1982 en *N. oceanica* voor het eerst in 2002 beschreven.^{6,7} Beide algensoorten zijn autotroof, ééncellig, bolvormig en geel-groen van kleur. Ze komen als fytoplankton voor in verschillende aquatische milieu's.^{2,7,8}

N. gaditana en *N. oceanica* bevatten een relatief hoog gehalte aan oliën en meervoudig onverzadigde vetzuren waaronder het eicosapentaeen-zuur (EPA), een omega 3-vetzuur. Binnen de aquacultuur worden de algensoorten als voedsel gebruikt bij de kweek van raderdijtjes (zoöplankton).^{9,10,11,12,13} In 2011 is er voor *N. gaditana* in de Europese Unie een aanvraag voor toepassing als ‘novel food’ ingediend.¹⁴ Deze toepassing is nog in afwachting van toekenning. *N. oceanica* wordt vanwege zijn hoge oliegehalte als een bron voor biobrandstof beschouwd.^{15,16,17}

De genoomsequenties van beide algensoorten zijn in kaart gebracht.^{18,19,20,21}

Eerder afgegeven gerelateerde COGEM adviezen

De COGEM heeft in het verleden verschillende malen geadviseerd over werkzaamheden met gg-algen. De algen *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlamydomonas moewusii*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella kessleri*, *Chlorella saccharophila*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella zofingienensis*, *Dunaliella bardawil*, *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloris* sp. UTEX 1999, *Neochloris oleoabundans*, *Parietochloris incisa*, *Phaeodactylum tricornerutum*, *Porphyridium cruentum* en *Scenedesmus obliquus* werden door de COGEM beschouwd als apathogeen voor mens, dier of plant. Zij heeft deze algensoorten ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.^{22,23,24}

Overwegingen 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 mogelijk moeilijk worden opgemerkt als zij niet erg uitgesproken van aard zijn en er niet gericht naar wordt gezocht. Anderzijds zijn veruit de meeste micro-organismen apathogeen. Daarom worden micro-organismen bij afwezigheid van expliciete aanwijzingen voor pathogeniteit bij langdurig gebruik als apathogeen beschouwd.

Volgens het Ministerie van Milieu van British Columbia (Canada) zijn er binnen de algensoorten *N. gaditana* en *N. oceanica* geen isolaten of stammen bekend die toxisch zijn voor mens, dier of plant.²⁵ Daarnaast wordt met beide algensoorten al meer dan 14 jaar in laboratoria gewerkt. Ook worden beide soorten al langere tijd in aquacultures gekweekt. Voor zover bij de COGEM bekend is er nooit melding gemaakt van pathogeniteit of schadelijke effecten.

De genoomsequenties van *N. gaditana* en *N. oceanica* zijn in kaart gebracht. Hoewel voor *N. gaditana* is beschreven dat zij beschikt over sequenties die een bepaalde mate van overeenkomst vertonen met genen die bij toxineproductie betrokken zijn,²¹ is uit de literatuur tot nu toe niet gebleken dat de algensoorten daadwerkelijk toxinegenen bevatten of toxines tot expressie brengen.^{18,19,20} Voedingsstudies bij ratten met de verwante algensoort *Nannochloropsis oculata* hebben geen toxische effecten laten zien.^{26,27}

Op basis van bovenstaande gegevens is de COGEM van mening dat *N. gaditana* en *N. oceanica* niet pathogeen zijn voor mens, dier en plant, en een historie van veilig gebruik kennen. Zij adviseert *N. gaditana* en *N. oceanica* daarom in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Tevens is zij van mening dat beide algensoorten in aanmerking komen voor plaatsing op Bijlage 2 lijst A1 van Regeling GGO.

Referenties

1. Sadava D *et al.* (2014). In 'Life: The science of biology. 10th Edition. Ed. Sinauer Associates Inc, Sunderland, MA, USA
2. Graham LE *et al.* (2009). Photosynthetic Stramenopiles II. In: Algae, second edition. Ed. Cummings B, San Francisco
3. Patterson DJ. Algae: Protists with chloroplasts. Tree of life project.
http://tolweb.org/accessory/Algae:_Protists_with_Chloroplasts?acc_id=52 (bezocht: 25 april 2016)
4. Stengel DB *et al.* (2011). Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Advances* 29: 483-501

5. Bongiovani N *et al.* (2014). Molecular and phylogenetic identification of an oil-producing strain of *Nannochloropsis oceanica* (Eustigmatophyceae) isolated from the southwestern Atlantic coast (Argentina). *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 49: 615-623
6. Lubian LM (1982). *Nannochloropsis gaditana* sp. no, una nueva Eustigmatophyceae marina. *Lazaroa* 4: 287-293
7. Suda S *et al.* (2002). Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanica* sp. nov. (Eustigmatophyceae). *Phycologia* 41: 273-279
8. Fawley KP & Fawley MW (2007). Observations on the diversity and ecology of freshwater *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), with descriptions of new taxa. *Protist* 158: 325-336
9. Ferreira M *et al.* (2009). Enriching rotifers with 'premium' microalgae *Nannochloropsis gaditana*. *Marine Biotechnology* 11: 585-595
10. Simionato D *et al.* (2011). Acclimation of *Nannochloropsis gaditana* to different illumination regimes: Effects on lipids accumulation. *Bioresource Technol.* 102: 6026 - 6032
11. Cabrera T *et al.* (2005). Effects of microalgae and salinity on the growth of three types of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *J. Fish Sci. Technol.* 8: 70-75.
12. Kobayashi T *et al.* (2005). Fatty acid composition of the L-type rotifer *Brachionus plicatilis* produced by a continuous culture system under the provision of high density *Nannochloropsis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 71, 328-334
13. Hee Bae J & Hur SB (2011). Development of economical fertilizer-based media for mass culturing of *Nannochloropsis oceanica*. *Fish Aquat. Sci.* 14: 317-322
14. European Commission. Novel food authorisations. http://ec.europa.eu/food/safety/docs/novel-food_applications-status_en.pdf (bezoekt: 26 april 2016)
15. Dong HP *et al.* (2013). Responses of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 to long-term nitrogen starvation and recovery. *Plant Physiol.* 162: 1110-1126
16. Pal D *et al.* (2013). Growth, lipid production and metabolic adjustments in the euryhaline Eustigmatophyte *Nannochloropsis oceanica* CCALA 804 in response to osmotic downshift. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 97: 8291-8306
17. Solovchenko A *et al.* (2014). Interactive effects of salinity, high light, and nitrogen starvation of fatty acid and carotenoids profiles in *Nannochloropsis oceanica* CCALA 804. *Eur. J. Lipid Science Technol.* 116: 635-644
18. Pan K *et al.* (2011). Nuclear monoploidy and asexual propagation of *Nannochloropsis oceanica* (Eustigmatophyceae) as revealed by its genome sequence. *J. Phycol.* 47: 1425-1432
19. Vieler A *et al.* (2012). Genome, functional gene annotation, and nuclear transformation of the heterokont oleaginous alga *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779. *PLOS Genetics* 8: e1003064
20. Wang D *et al.* (2014). *Nannochloropsis* genomes reveal evolution of microalgal oleaginous traits. *PLOS Genetics* 10: e1004094
21. Cribi genomics. *Nannochloropsis* genome portal. www.nannochloropsis.org/index.php (bezoekt 28 april 2016)
22. COGEM (1999). Advies kennisgeving GGO 99-019. COGEM advies CGM/990429-09
23. COGEM (2001). Advies kennisgeving GGO 99-019/2. COGEM advies CGM/011214-03

24. COGEM (2011). Classificatie van negen algensoorten. COGEM advies CGM/110706-01
25. Government of British Columbia. Aquatic pathogens: Algae.
www.env.gov.bc.ca/wat/wq/reference/toxicalgae.html (bezocht: 26 april 2015)
26. Kafaie S *et al.* (2012). Acute and sub-chronic toxicological assessment of *Nannochloropsis oculata* in rats. African J. Agricult. Res. 7: 1220-1225
27. Kagan ML & Matulka RA (015). Safety assessment of the microalgae *Nannochloropsis oculata*. Toxicology reports 2: 617-623