



Aan de minister van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
Mevrouw dr. J.M. Cramer
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 06 juli 2007
KENMERK CGM/070706-01
ONDERWERP Advies: Veldproef met sensor op basis van genetisch gemodificeerde bacteriën

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van de vergunningaanvraag, getiteld 'Veldproef met sensor op basis van genetisch gemodificeerde bacteriën die toxische stoffen kunnen detecteren in water' van KIWA N.V. te Nieuwegein, en de ontwerpbeschikking die door het Bureau GGO is opgesteld, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de introductie in het milieu van genetisch gemodificeerde *Escherichia coli* K12 (gg-*E. coli* K12) bacteriën, die afgeleid zijn van de verzwakte, apathogene *E. coli* K12 stam. Voor het verbeteren van de bewaking van de drinkwaterkwaliteit wil de aanvrager een nieuw type sensor testen. Deze sensor bevat gg-*E. coli* K12 bacteriën, die bij blootstelling aan schadelijke stoffen licht gaan geven. Door gebruik van deze sensor hoopt de aanvrager niet alleen lagere concentraties van watervervuiling te kunnen detecteren, maar ook andere stoffen dan met huidige sensoren mogelijk is. Doordat de monitoringstations geen ML-I status bezitten, wat voor werkzaamheden met gg-*E. coli* K12 is vereist, heeft de aanvrager een vergunningaanvraag ingediend voor 'introductie in het milieu' van betreffende gg-*E. coli* K12 bacteriën, hoewel hij niet van plan is deze gg-bacteriën daadwerkelijk in het milieu te verspreiden. Met dit doel heeft de aanvrager een aantal inperkende maatregelen voorgesteld en een calamiteitenprocedure opgesteld.

Doordat gg-*E. coli* K12 bacteriën geïmmobiliseerd zijn op de sensors, het een gesloten meetsysteem betreft, het water na afloop ter plekke wordt gedesinfecteerd en door de voorgestelde calamiteitenprocedure acht de COGEM de kans dat de gg-*E. coli* K12 bacteriën vrijkomen verwaarloosbaar klein. Tevens is zij van mening dat de risico's verbonden aan een mogelijke verspreiding in het milieu van deze verzwakte bacteriën zeer gering zijn doordat ze apathogeen zijn, ze zich in het water niet vermenigvuldigen en snel afsterven. De COGEM is daarom van mening dat de risico's bij het uitvoeren van de beschreven experimenten voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

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 large loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

Prof. dr. ir. B.C.J. Zoeteman

Voorzitter COGEM

c.c. Dr. ir. B.P. Loos
Dr. I. van der Leij

Biosensor voor de detectie van watervervuiling

COGEM advies CGM/070706-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een vergunningaanvraag betreffende werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Escherichia coli* K12 (gg-*E. coli* K12) bacteriën. De aanvrager is voornemens een biosensor te ontwikkelen met gg-*E. coli* K12. Deze bacteriën luminesceren bij blootstelling aan toxische stoffen en op grond van deze eigenschap wil de aanvrager een mogelijke vervuiling van rivierwater monitoren. Het specifieke doel van de werkzaamheden is het testen van de gevoeligheid (detectielimiet) van de sensor en het bepalen van de toegevoegde waarde van deze sensor ten opzichte van de huidige detectiemethoden. Dit alles ter verbetering van de kwaliteitsbewaking van het drinkwater in Nederland.

Hoewel de werkzaamheden met de betreffende bacteriën worden uitgevoerd in een gesloten opstelling in een monitoringstation, betreft het hier geen vergunningaanvraag 'onder ingeperkt gebruik', maar 'introductie in het milieu', omdat er in de monitoringstations geen gekwalificeerde laboratoriumruimte aanwezig is en de aanvrager geen Wet Milieubeheervergunning heeft voor het ingeperkt gebruik van genetisch gemodificeerde organismen (ggo's). De aanvrager is echter niet van plan de desbetreffende ggo's in het milieu te brengen en stelt verscheidene maatregelen voor om dit ook daadwerkelijk te voorkomen.

Gastheer

De *E. coli* bacterie behoort tot de familie van *Enterobacteriaceae*. Het organisme komt van nature vooral voor in de darm van warmbloedige dieren, maar door verspreiding van dierlijke mest en lozing van rioolwater komt *E. coli* eigenlijk overal voor in het milieu.

De *E. coli* K12 stam is in 1922 geïsoleerd uit een difteriepatiënt. Door uitvoerige mutagenese en door langdurig gebruik van *E. coli* K12 in laboratoria zijn er varianten ontstaan die alle bekende virulente genen hebben verloren. *E. coli* K12 maakt geen toxines, adhesiefactoren of invasiefactoren en bevat geen ijzer-transportstelsel. Doordat *E. coli* K12-afgeleiden een defectieve vorm van lipopolysaccharide in het membraan hebben, waaraan geen O-antigen polysaccharide zijketens zitten, is de bacterie niet in staat om aan de mucosa van de darm te binden. Deze stam kan de menselijke darm hierdoor niet meer koloniseren, waardoor zelfs de inname van grote hoeveelheden van dit organisme geen effect heeft op de normale darmflora (5, 12 en 13). De bacteriestam wordt al sinds 1944 veelvuldig gebruikt in het onderwijs, onderzoek en in industriële settings, maar heeft in deze periode nog nooit geleid tot ziektegevallen (5 en 13). Door de specifieke eigenschappen en het langdurige en veilige gebruik van *E. coli* K12 wordt

deze stam als niet-pathogeen beschouwd en is daardoor opgenomen in de lijst van micro-organismen, waarmee veilig gewerkt kan worden onder ML-I niveau (Bijlage I van de Regeling GGO (4)).

Vector

De aanvrager is voornemens *E. coli* K12 te transformeren met pUCD615 (10). Deze vector bevat weliswaar een zogenaamde *bom*-site, die als basis dient voor mobilisatie, maar geen zogenaamde *tra*-functies die noodzakelijk zijn voor de transfer van DNA. Hierdoor is er op pUCD615 geen sprake van zelfoverdraagbare genetische elementen. Op het betreffende plasmide zijn twee antibioticum resistentiegenen aanwezig, te weten *amp^R* en *nptII*. Beide genen komen wijdverbreid voor in de natuur en bieden resistentie tegen respectievelijk ampicilline en kanamycine. Het in pUC615 aanwezige *luxCDABE* gen is afkomstig uit *Vibrio fischeri*. Dit is een niet-pathogene luminescerende zeebacterie die in symbiose leeft met verscheidene vissen en inktvissen (11). Het *luxCDABE* gen codeert voor een vijftal eiwitten, *luxA*, -B, -C, -D en -E. De eiwitten *luxC*, -D en -E katalyseren de omzetting van vetzuren naar vetaldehyden. Deze aldehyden worden vervolgens geoxideerd door de *luxA* en -B eiwitten, waarbij blauw licht vrijkomt. Het *luxCDABE* gen is veelvuldig gebruikt als marker gen in verschillende micro-organismen, waaronder *E. coli* (3, 6, 8 en 9).

Insert

De inserts die afzonderlijk in pUCD615 worden gekloneerd zijn een vijftal promotoren, *grpE*, *katG*, *recA*, *micF* en *fabA*. De promotor *grpE* reageert op eiwit beschadigers en algemene stressfactoren. De promotoren *katG* en *micF* reageren beide op oxidanten. De promotor *recA* reageert op genotoxische stoffen en promotor *fabA* wordt geactiveerd door membraanbeschadigers en algemene stressfactoren. Deze promotoren zijn allen afkomstig van *E. coli* en dus reeds aanwezig in de te gebruiken bacteriestam *E. coli* K12.

Voorgenomen werkzaamheden

Voor de te testen sensor worden *E. coli* K12 bacteriën getransformeerd met het plasmide pUCD615 waarin respectievelijk de promotor *grpE*, *katG*, *recA*, *micF* of *fabA* is gekloneerd. Er worden dus vijf verschillende ggo's vervaardigd, waarbij de expressie van *lux* eiwitten wordt gereguleerd door verschillende groepen van toxische stoffen. Iedere transformant heeft dus zijn eigen luminescentieprofiel dat afhankelijk is van het type vervuiling dat in het rivierwater aanwezig is.

De aanvrager immobiliseert de bacteriën op glasvezels met behulp van calciumalginaat. Het calciumalginaat vormt een matrix op de glasvezel waarin de bacteriën worden ingesloten (8). Vervolgens wordt de glasvezel aan een photodetector

gekoppeld en in een zogenaamde blootstellingskamer gehangen, zodat watermonsters (van enkele milliliters) batchgewijs langs de bacteriën kunnen worden geleid. Productie van licht door de ggo's kan hierdoor gemeten worden en worden gerelateerd aan het soort en de mate van vervuiling in het rivierwater.

Na de meting wordt het water verzameld in een afvalvat dat via een gesloten systeem gekoppeld is aan de blootstellingskamer, zodat bacteriën in principe niet vrij kunnen komen. Het afvalvat is geplaatst in een ondoorlaatbare bak en het opgevangen water wordt elke dag ter plekke in de monitoringstations gedesinfecteerd met een desinfectiemiddel. *E. coli*-K12 bacteriën zijn eenvoudig te inactiveren door een chemisch desinfectiemiddel toe te voegen of door de bacteriën te autoclavieren. Overigens is niet omschreven op welke wijze de desinfectie zal plaatsvinden. De COGEM kan op dit punt derhalve geen kwalitatief oordeel uitspreken. De gebruikte fibers worden na gebruik vervoerd naar het laboratorium, en worden aldaar gedesinfecteerd. Het vervoer van de ggo's en het desinfecteren van de fibers buiten de monitoringstations vallen niet onder deze vergunning.

Overwegingen en advies

De COGEM is gevraagd advies uit te brengen over de risico's voor mens en milieu van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *E. coli* K12 bacteriën. De COGEM merkt op dat het risico van de voorgestelde activiteiten klein is. Onder ingeperkt gebruik zouden deze werkzaamheden daarom in het laagste niveau van inperking vallen (ML-I niveau). Door de afwezigheid van ML-I laboratoria in de monitoringstations van de aanvrager, betreft het hier echter geen aanvraag voor een vergunning 'ingeperkt gebruik' maar een aanvraag voor een vergunning 'introductie in het milieu'. De aanvrager geeft aan de betreffende ggo's niet daadwerkelijk in het milieu te willen brengen en stelt enkele maatregelen voor om verspreiding van ggo's tijdens de werkzaamheden te voorkomen.

Door de immobilisatie van de ggo's op de sensor, de beperkte fitness van *E. coli* K12 en gegevens uit publicaties over dergelijke sensoren, is de COGEM van mening dat als er geen of slechts zeer beperkte hoeveelheden vitale bacteriën in de blootstellingskamer zullen kunnen vrijkomen (8). Bovendien wordt al het water dat mogelijkwijs in aanraking is gekomen met de ggo's via een gesloten systeem naar een afvalvat afgevoerd, dat ter plekke wordt gedesinfecteerd. Hierdoor acht de COGEM het zeer onwaarschijnlijk dat de gg-bacteriën in het milieu worden geïntroduceerd.

Ook indien door onvoorziene omstandigheden de gg-bacteriën alsnog in het milieu terecht komen, acht de COGEM het risico voor mens en milieu zeer klein. *E. coli*-K12 bacteriën zijn apathogene micro-organismen. Ondanks veelvuldig en jarenlang gebruik van *E. coli* K12 zijn er geen ongevallen bekend als gevolg van het gebruik van deze bacteriestam. Dit wordt voornamelijk veroorzaakt doordat deze stam niet in staat is de

darm te koloniseren. In het geval van verspreiding in het milieu wijst een Duitse studie met natuurlijk water uit dat zelfs hoge concentraties *E. coli* K12 bacteriën maar zeer korte periode overleven. Ze worden opgegeten door aquatische organismen als flagellanten, *K. cochlearis* en de watervlo *Daphnia* en ze zijn nauwelijks in staat te repliceren. In twee weken was de concentratie bacteriën, die was toegevoegd aan het water van een meer 100.000 maal afgenomen tot een niet detecteerbaar niveau (1).

In zake de aanwezigheid van resistentie tegen kanamycine en ampicilline in het betreffende ggo verwacht de COGEM geen nadelige effecten van de ggo's op niet-doelwitorganismen, aangezien deze resistentiegenen reeds wijdverbreid voorkomen in de natuur (2). Overigens merkt de COGEM op dat indien het hier een daadwerkelijke introductie in het milieu zou betreffen, in plaats van de voorgenomen ingeperkte werkzaamheden, de verspreiding van antibioticum resistentiegenen op maatschappelijke bezwaren kan stuiten.

De zogenaamde *luxCDABE* genen zijn afkomstig uit een niet-pathogene zeebacterie. Tevens zijn deze markergenen in een aantal verschillende organismen tot expressie gebracht zonder zichtbaar schadelijke effecten te sorteren (3, 6 en 9). Aangezien er geen redenen zijn om aan te nemen dat de *lux* eiwitten de pathogeniteit of fitness van *E. coli* K12 bacteriën kunnen verhogen, acht de COGEM het risico van deze eiwitten voor mens en milieu zeer gering.

Aangezien het volume van de watermonsters slechts enkele milliliters bedraagt, wordt er per uur circa 50 milliliter afvalwater opgevangen in het afvalvat. In het geval van een calamiteit is de hoeveelheid afvalwater dus beperkt en wordt opgevangen door de ondoorlaatbare bak waarin het afvalvat is geplaatst. Tevens heeft de aanvrager aangegeven dat bij een calamiteit het weggelekte water zal worden opgenomen en gesteriliseerd en de mogelijk besmette oppervlakken met alcohol zullen worden ontsmet. Door deze maatregelen is de COGEM van mening dat ook in geval van onvoorziene gebeurtenissen het risico voor mens en milieu verwaarloosbaar klein is.

Concluderend is de COGEM van mening, dat de beschreven werkzaamheden met gg-*E. coli* K12 onder de voorgestelde aanvullende voorschriften een verwaarloosbaar klein risico vormen voor mens en milieu.

Referenties

1. Brettar, I. en Höfle, M.G. (1992) Influence of ecosystematic factors on survival of *Escherichia coli* after large-scale release into lake water mesocosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2201-2210
2. EFSA. (2004) Opinion of the scientific panel on genetically modified organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants.

3. Ferguson, Y., Glover, L.A., McGillivray, D.M. en Prosser, J.I. (1995) Survival and activity of *lux*-marked *Aeromonas salmonicida* in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3494-3498
4. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen (2004)
5. Kuhnert, P. & Frey, J. (1996) Identificatuioin and monitoring of *Escherichia coli* K-12 safety strains. Tools for safety assessment www.bats.ch/bats/publikationen/1996-1_e.coli/96-1_e-coli_k12.php?lang_select=de (06-07-'07)
6. Lee, J.H., Song, C.H., Kim, B.C., Gu, M.B. (2006) Application of a multi-channel system for continuous monitoring and an early warning system. *Water Science & Technol.* **53**:341-346
7. Nealson, K.H., Platt, T. and Hastings, J.W. (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.* **104**:313-322
8. Polyak, B., Bassis, E., Novodvoretz, A., Belkin, S., en Marks, R.S. (2000) Optical fiber bioluminescent whole-cell microbial biosensors to genotoxicants. *Water Science and Technology* **42**:305-311
9. Rattray, E.A.S., Prosser, J.I., Killham, K. en Glover, L.A. (1990) Luminescence-based non-extractive technique in situ detection of *Escherichia coli* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:3368-3374
10. Rogowsky, P.M., Close, T.J., Chimera, J.A., Shaw, J.J. en Kado, C.I. (1987) Regulation of the *vir* genes of *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiC58. *J. Bacteriol.* **169**:5101-5112
11. Ruby, E.G., Urbanowski, M., Campbell, J. *et al.* (2005) Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: A symbiotic bacterium with pathogenic congeners. *PNAS* **102**: 3004-3009
12. Smith, H.W. (1975) Survival of orally administered *E. coli* K12 in alimentary tract of human. *Nature* **255**:500-502
13. TSCA (1997) *Escherichia coli* K-12 derivatives final risk assessment www.epa.gov/oppt/biotech/pubs/fra/fra004.htm (06-07-'07)