

Aan de Staatssecretaris van  
Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening  
en Milieubeheer  
De heer drs. P.L.B.A. van Geel  
Postbus 30945  
2500 GX Den Haag

Uw kenmerk

Uw brief van

Kenmerk

Datum

CGM/050215-04

15 februari 2005

Onderwerp

Afdoding van gg-insecten

Geachte heer Van Geel,

Bij werkzaamheden met genetisch gemodificeerde insecten moet restmateriaal na afloop gesteriliseerd worden. Naar Bureau GGO is gebleken, is op grond van nieuwe inzichten en praktijken de vraag gerezen of bestaande voorschriften kunnen worden vereenvoudigd. Bureau GGO heeft de COGEM daarop mondeling verzocht hierover te adviseren. De COGEM adviseert als volgt.

**Samenvatting:**

In het verleden heeft de COGEM verscheidene malen geadviseerd over de afdoding, via sterilisatie en/of bevriezing, van genetisch gemodificeerde *Drosophila melanogaster* op werkkleding, besmette materialen en afval. In de praktijk blijkt echter verwarring te kunnen ontstaan over de correcte procedures voor afdoding. De COGEM verduidelijkt en actualiseert met dit advies de voorschriften die gehanteerd dienen te worden.

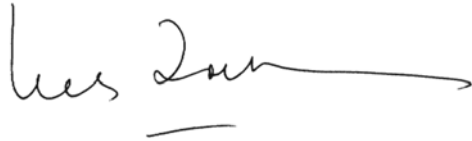
De COGEM is van mening dat sterilisatie door autoclaveren overbodig is wanneer het bekend is dat bevriezing effectief is voor het afdoden van insecten. *D. melanogaster* blijkt slechts in beperkte mate bestand te zijn tegen lage temperaturen. De COGEM adviseert daarom deze insecten op werkkleding en materialen te doden door middel van bevriezing gedurende 10 uur bij -20°C. Additionele sterilisatie is in dit geval overbodig.

Voor handelingen met andere genetisch gemodificeerde insectensoorten is de COGEM van mening dat bevriezing van kleding en materialen, ter immobilisatie van insecten voorafgaand aan verplaatsing van het D-I verblijf naar de autoclaaf, gevolgd moet worden door sterilisatie tot dat per insectensoort experimenteel bewezen is dat bevriezing alleen een effectieve afdodingsmethode is.

Door het uitvoeren van de aanvullende voorschriften is de veiligheid van mens en milieu gewaarborgd.

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'B.C.J. Zoeteman', with a horizontal line underneath.

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

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

*Dit COGEM advies is tot stand gekomen dankzij de adviezen van de subcommissie Landbouw van de COGEM en in overleg met Dr. W.J. de Kogel, Plant Research International te Wageningen, Dr. K. Cook, Drosophila Stock Center, Indiana University, Bloomington, USA en E.C. Dams, Breukhoven B.V. te Capelle aan de IJssel.*

## **Titel: Afdoding van genetisch gemodificeerde insecten**

**COGEM advies: CGM/050215-04**

### **Inleiding**

In het verleden heeft de COGEM verscheidene malen geadviseerd over de afdoding, via bevriezing of sterilisatie, van genetisch gemodificeerde (gg) *Drosophila melanogaster* op werkkleding, besmette materialen en afval. Uit de praktijk zijn bij Bureau GGO signalen ontvangen waaruit blijkt dat er eventueel verwarring kan ontstaan over de correcte procedures voor afdoding. Ook zijn er recente aanwijzingen gekomen dat met een eenvoudige afdodingsprocedure voor *D. melanogaster* kan worden volstaan. De COGEM wil door middel van dit advies duidelijk maken welke voorschriften gehanteerd dienen te worden en de onderliggende onderbouwing verduidelijken.

Werkzaamheden met gg-insecten worden conform de Regeling GGO ingeschaald op inperkingsniveau D-I (1). Dit betekent dat een dergelijk dierverblijf ingericht is op het voorkomen van het ontsnappen van de daarin gehouden dieren. In een D-I verblijf worden de insecten in kooien, dan wel kweekcontainers, gehouden. Om te voorkomen dat insecten ontsnappen tijdens handelingen buiten de kooi, worden ze verdoofd door afkoeling of met behulp van CO<sub>2</sub>. Ondanks de immobilisatie bestaat de mogelijkheid dat besmetting van de werkkleding plaatsvindt waardoor het insect het D-I verblijf zou kunnen verlaten.

De COGEM heeft in het verleden geadviseerd (CGM/001016-01) over aanvullende inrichtingsvoorschriften, algemene werkvoorschriften en procedures bij werkzaamheden met gg-insecten.

### **Eerder advies**

In het hierboven genoemde COGEM advies worden onder andere procedures vermeld met betrekking tot de afdoding van gg-insecten op werkkleding, besmette materialen en afval na afloop van de werkzaamheden.

Destijds heeft de COGEM geadviseerd dat werkkleding voor het verlaten van het verblijf gedurende 10 uur opgeslagen dient te worden bij -20°C. Op deze manier wordt een extra veiligheid gecreëerd voor het geval werkkleding eventueel besmet zou zijn geraakt.

Verder wordt geadviseerd om besmette materialen en afval minimaal 10 uur te ontsmetten door bevriezing bij -20°C. Hierna vindt sterilisatie, door middel van autoclaveren, plaats.

Vanwege de hierboven genoemde voorschriften is in de praktijk bij het werken met genetisch gemodificeerde *D.melanogaster* enige verwarring ontstaan omdat niet expliciet is aangegeven of de sterilisatieprocedure na invriezing ook een vereiste is voor werkkleding. Tevens zijn er onduidelijkheden over het nut van sterilisatie van besmette materialen en afval na de afdodingsstap door bevroering. In bijgaand advies wordt hier op basis van recente literatuur nader op ingegaan.

### **Achtergrondinformatie**

De aanvullende maatregelen die beschreven staan in het COGEM advies worden sindsdien gehanteerd in beschikkingen betreffende handelingen met gg-insecten in een D-I verblijf.

De eerder beschreven problematiek speelt hoofdzakelijk een rol bij werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *D. melanogaster*. In de toekomst kan dit probleem zich echter ook voordoen bij handelingen met andere gg-insecten. Ook voor deze insecten is het belangrijk dat de juiste voorschriften betreffende het afdoden bekend zijn. De voorschriften dienen volledige mortaliteit van de insecten als uitgangspunt te hebben.

De effectiviteit van bevroering hangt af van een aantal factoren. Het soort insect en het ontwikkelingsstadium kunnen mede bepalend zijn voor de mate van koudetolerantie. Verscheidene insectensoorten kennen naast geslachtelijk voortplanting ook ongeslachtelijk voortplanting. De meeste insecten leggen eitjes en enkele soorten zijn levendbarend (waaronder de tsetsee vlieg, *Glossina austeni*) (2). Gedurende de ontwikkeling tot een volwassen insect worden een aantal ontwikkelingsstadia doorlopen. Onderscheid kan gemaakt worden tussen de stadia: ei, larve, pop en volwassen insect. Het ontwikkelingsstadium waarin het insect zich bevindt kan een rol spelen bij de mate van koudetolerantie. De eitjes van de kever *Callosobruchus maculatus* zijn bijvoorbeeld minder gevoelig voor een lage temperatuur dan de volwassen kever (3). Bovendien is een insect in diapause (soort rustperiode) over het algemeen minder gevoelig voor lage temperaturen (4).

Verder speelt het soort insect een belangrijke rol. Er bestaan grote variaties tussen de insectensoorten wat betreft de koudetolerantie (4). Er zijn insectensoorten bekend die langdurig (weken tot maanden) een temperatuur onder  $-20^{\circ}\text{C}$  kunnen overleven, zoals de larven van de galvlieg *Eurosta solidaginis* (6).

De koudetolerantie van insecten wordt onder andere bepaald door het zogenaamde “supercooling point” (SCP). Het SCP wordt gedefinieerd als de temperatuur waarbij spontaan ijsvorming optreedt in de lichaamsvloeistoffen van het insect. Het SCP kan sterk uiteenlopen voor de verschillende insecten. Er zijn voorbeelden bekend van insecten met een SCP van  $-4^{\circ}\text{C}$ , zoals de larven van de kever *Hydromedion sparsutum* (5). In tegenstelling tot dit hoge SCP bezit de galwesp *Diplolepis spinosa* een SCP

van  $-40^{\circ}\text{C}$  (7). Het SCP wordt gezien als een minimum temperatuur, in de praktijk hangt de werkelijke letale temperatuur af van verschillende factoren. Hierbij kan gedacht worden aan onder andere de omgevingstemperatuur vóór bevriezing, de snelheid van de temperatuurdaling, de luchtvochtigheid en de fitness van het insect (4;5).

Musea hebben vaak te maken met een groot aantal verschillende schadelijke insecten in hun collectie. Om de artefacten te beschermen worden insecten afgedood door middel van bevriezing. De eventueel aanwezige insectensoorten kunnen echter zeer divers zijn wat betreft de koudetolerantie. Dit heeft tot gevolg gehad dat musea richtlijnen hebben opgesteld waarbij als vuistregel één week bevriezing bij  $-20^{\circ}\text{C}$  gehanteerd wordt om insecten te doden (8).

Naast het soort insect en het ontwikkelingsstadium zijn de temperatuur, de snelheid en de duur van de bevriezing belangrijk bij een effectieve afdoding. In het algemeen geldt dat hoe lager de temperatuur is bij bevriezing, hoe sneller 100% mortaliteit verkregen wordt. Voor het doden van insecten blijkt een temperatuur tussen  $-30^{\circ}\text{C}$  en  $-40^{\circ}\text{C}$  optimaal te zijn (8). Wanneer de temperatuur niet snel genoeg daalt, kunnen bepaalde insectensoorten aanpassingen vertonen die bevriezing tegengaan. De insecten kunnen dan langer overleven bij een lage temperatuur. Een langzame temperatuurdaling, zoals deze in de natuur optreedt, komt overeen met een daling van  $0.05\text{-}0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (4;9;10). Deze mate van afkoeling stelt een insect in staat om zich enigszins aan te passen aan de nieuwe omstandigheden. In een  $-70^{\circ}\text{C}$  vriezer daalt de temperatuur ongeveer  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  en in een “rapid freezer” zelfs  $0.5^{\circ}\text{C}/\text{s}$ . Gezien de snelle temperatuurdaling in diepvriezers is de kans dat insecten zich kunnen aanpassen aan de lage temperatuur klein (9). Hierbij wordt gewezen op de hoeveelheid en het formaat van de te bevroren materialen. De temperatuur van het opgeslagen materiaal daalt geleidelijk in de vriezer. Het oppervlak zal als eerste de gewenste temperatuur bereiken, vervolgens zal er een temperatuurgradiënt ontstaan in de richting van de kern van het materiaal. Vooral in de kern zullen insecten dus het langst leven omdat de gewenste temperatuur daar pas later bereikt wordt (3).

### **Overweging en advies**

Hoewel tot nu toe voornamelijk werkzaamheden worden uitgevoerd met genetisch gemodificeerde *D. melanogaster*, kunnen in de toekomst ook andere insecten gebruikt gaan worden. In eerste instantie zal hieronder worden ingegaan op de afdoding van *D. melanogaster*; vervolgens wordt besproken hoe moet worden omgegaan met de inactivatie van andere insectensoorten.

### *Drosophila melanogaster*

*D. melanogaster* plant zich geslachtelijk voort en de ontwikkeling verloopt via de eerder beschreven stadia. Dit houdt in dat eitjes 24 uur na het leggen uitkomen, waarna de larven drie vervellingsstadia doorlopen in 6 dagen. Vervolgens verpoppen de larven zich en 11 dagen na het leggen van de eitjes heeft zich een volwassen fruitvlieg ontwikkeld. Deze is na circa 8 uur vruchtbaar (11;12).

Insecten die voorkomen in streken waar de omgeving relatief warm is, zullen in het algemeen niet beschikken over een hoge mate van koudetolerantie (8). Ondanks dat fruitvliegen een SCP bezitten van  $-20^{\circ}\text{C}$  is deze, uit tropische en gematigde streken afkomstige vlieg, niet in staat om lang te overleven bij een temperatuur onder  $0^{\circ}\text{C}$  (13;14).

Uit literatuur betreffende koudetolerantie van fruitvliegen blijkt dat bijna 100% mortaliteit optreedt wanneer deze gedurende één uur bij  $-7^{\circ}\text{C}$  worden geplaatst (10). Tevens blijkt dat de vliegen zich enigszins kunnen aanpassen aan koude omstandigheden wanneer de temperatuur langzaam, zoals in de natuur, daalt ( $0.05-0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ). De vliegen zijn onder deze omstandigheden beter in staat te overleven bij  $-7^{\circ}\text{C}$  dan wanneer de temperatuur  $0.5-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  daalt (daling in een diepvriezer). Tevens zijn de vliegen beter bestand tegen een lage temperatuur wanneer ze voorafgaand aan de vriesperiode 30 minuten bij  $5^{\circ}\text{C}$  gekoeld worden (9;14).

Eitjes, larven en poppen van *D. melanogaster* kunnen zich ook aanpassen aan lage temperaturen wanneer deze eerst gekoeld worden (14). Daarnaast is voor 15 uur oude *Drosophila* eitjes aangetoond dat 50% mortaliteit optreedt na één uur opslag bij  $-15^{\circ}\text{C}$ . Bovendien zijn eitjes van 3 en 6 uur oud gevoeliger voor lage temperaturen dan oudere eitjes. Larven en poppen overleven 2 uur bevroering bij  $-5^{\circ}\text{C}$ , respectievelijk  $-8^{\circ}\text{C}$ , niet (14;15).

Wanneer *D. melanogaster* volledig gedood wordt door bevroering, is sterilisatie van materialen en kleding overbodig. In het algemeen wordt gesteld dat bevroering gedurende 15 minuten bij  $-20^{\circ}\text{C}$  afdoende is om afdoding van vliegen te bewerkstelligen. Echter, de geraadpleegde deskundigen wijzen erop dat het niet is uitgesloten dat vliegen deze korte vriesperiode kunnen overleven.

Gezien de gegevens betreffende de mortaliteit van *D. melanogaster* bij een lage temperatuur, adviseert de COGEM vernietiging van de insecten door bevroering bij  $-20^{\circ}\text{C}$  gedurende minimaal 10 uur. Deze vriesperiode is een veelvoud van de voorgestelde periode zodat dit ruim voldoende is om volledige mortaliteit te verkrijgen. Voor afdoding van *D. melanogaster* is het niet nodig om materialen en kleding te steriliseren na een dergelijke vriesperiode.

### Overige insecten

Naast de veelvuldig gebruikte *D. melanogaster* worden enkele andere gg-insectensoorten slechts in beperkte mate gebruikt bij werkzaamheden. Het is niet mogelijk om voor andere insecten een algemene richtlijn op te stellen betreffende de afdoding door bevriezing. De klasse der insecten is namelijk zeer groot en bevat uiteenlopende insecten, welke een verschillende overlevingskans hebben bij lage temperaturen. Er bestaan insecten die pas na een langdurige vriesperiode (enkele weken) gedood worden. Tevens is van veel insectensoorten onvoldoende literatuur beschikbaar betreffende de afdoding. Daarom is de COGEM van mening dat afdoding van insecten van geval tot geval beoordeeld moet worden. Totdat experimenteel bewezen is dat afdoding door middel van bevriezing voldoende is om 100% mortaliteit te verkrijgen, adviseert de COGEM om zowel werkkleding als besmette materialen en afval te bevriezen en tevens te steriliseren door middel van autoclaveren. De bevriezingsstap dient ter immobilisatie van de eventueel aanwezige insecten voorafgaand aan de verplaatsing vanuit het D-I verblijf naar de autoclaaf. De vriesperiode dient minimaal 1 uur plaats te hebben bij  $-20^{\circ}\text{C}$ . Het betreft hier een arbitraire periode waardoor ontsnapping van eventueel niet-geïmmobiliseerde insecten voorkomen moet worden. Daarom dienen werkkleding en materialen in het D-I verblijf verpakt te worden in goed afgesloten zakken of containers, alvorens opslag in de vriezer plaats vindt.

De COGEM wijst op het belang van een deugdelijke verdoving tijdens handelingen door middel van afkoeling of door  $\text{CO}_2$ . Hiermee wordt voorkomen dat insecten zich kunnen nestelen in kleding of zich kunnen verspreiden buiten het dierverblijf.

Concluderend adviseert de COGEM dat na werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *D. melanogaster* een bevriezing van minimaal 10 uur bij  $-20^{\circ}\text{C}$  ruim voldoende is om de eventueel aanwezige insecten (in alle levensstadia) op kleding en materialen te doden. Additionele sterilisatie is bij deze insectensoort overbodig.

Voor overige gg-insectensoorten is de COGEM van mening dat door de verscheidenheid aan insecten en door een gebrek aan literatuur betreffende koudegevoeligheid, geen algemene richtlijn opgesteld kan worden. Voor deze insecten zal bevriezing (minimaal 1 uur bij  $-20^{\circ}\text{C}$  waarbij werkkleding en materialen verpakt zijn in afgesloten zakken of containers) van kleding en materialen gevolgd moeten worden door sterilisatie totdat per insectensoort experimenteel bewezen is dat bevriezing een effectieve afdodingsmethode is.

Door het uitvoeren van de aanvullende voorschriften acht de COGEM de veiligheid van mens en milieu gewaarborgd.

## Referenties

1. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerd organismen. Mei 2004.
2. Huebner, E., Tobe S.S. and Davey K.G. (1975). Structural and functional dynamics of oogenesis in *Glossina austeni*: vitellogenesis with special reference to the follicular epithelium. *Tissue Cell* **7(3)**: 535-58.
3. Johnson, J.A. and Valero, K.A. (2003). Use of commercial freezers to control cowpea weevil, *Callosobruchus maculatur* (Coleopter: *Bruchidea*), in organic garbanzo beans. *J Econ Entomol* **96(6)**: 1952-7.
4. Hallman, G.J. and Denlinger, D.L. (1998). Temperature sensitivity in insects and application in integrated pest management. Westview Press, Boulder.
5. Bale, J.S. (2002). Insects and low temperatures: from molecular to distributions and abundance. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **357**: 849-862.
6. Irwin, J.T. and Lee Jr. R.E. (2003). Cold winter microenvironments conserve energy and improve overwintering survival and potential fecundity of the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis*. *OIKOS* **100**: 71-78.
7. Williams, J.B., Shorthouse, J.D. and Lee Jr. R.E. (2002). Extreme resistance to desiccation and microclimate-related differences in cold-hardiness of gall wasps (Hymenoptera: Cynipidae) overwintering on roses in southern Canada. *J. Exp. Biol.* **205**: 2115-2124.
8. Canadian Conservation Institute Notes 3/3 (1997). Controlling insect pests with low temperature. Canadian heritage, Ottawa.
9. Kelty, J.D. and Lee Jr. R.E. (1999). Induction of rapid cold hardening by cooling at ecologically relevant rates in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* **45(8)**: 719-726.
10. Kelty, J.D. and Lee Jr. R.E. (2001). Rapid cold-hardening of *Drosophila melanogaster* (diptera: *drosophilidae*) during ecologically based thermoperiodic cycles. *J Exp Biol* **204**: 1659-1666.
11. Fuyama, Y. (1986). Genetics of parthenogenesis in *Drosophila melanogaster*. I. The modes of diploidization in the gynogenesis induced by a male-sterile mutant, *ms(3)K81*. *Genetics* **112**: 237-248.
12. An introduction to *Drosophila melanogaster*, University of Arizona. Internet: <http://biology.arizona.edu/sciconn/lessons2/Geiger/intro.htm>
13. Bochdanovits Z. (2003). Some like it hot, the evolution and genetics of temperature dependent body size in *Drosophila melanogaster*. Proefschrift, Universiteit Utrecht.
14. Czajka, M.C. and Lee Jr. R.E. (1990). A rapid cold-hardening response protecting against cold shock injury in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* **148**: 245-54.
15. Mazur, P., Schneider, U. and Mahowald, A.P. (1992). Characteristics and kinetics of subzero chilling injury in *Drosophila* embryos. *Cryobiology* **29(1)**: 39-68.