

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 28 januari 2020
KENMERK CGM/200128-02
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie van *Aurantiochytrium limacinum*

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een verzoek van Purac Biochem B.V. om *Aurantiochytrium limacinum* op Lijst A1 van Bijlage 2 van de Regeling ggo te plaatsen (IG 20-003_2.13-000), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de micro-alg *Aurantiochytrium limacinum* en de plaatsing van deze soort op Bijlage 2, Lijst A1 van de Regeling ggo.

A. limacinum komt als fytoplankton in het aquatische milieu voor, in het bijzonder in gebieden waar mangroves groeien. De algensoort bevat een hoog gehalte aan meervoudig onverzadigde vetzuren. Er wordt daarom veel onderzoek naar de micro-alg gedaan, onder meer voor mogelijke toepassingen binnen de voedselindustrie. Bij verschillende diersoorten is onderzoek gedaan naar het gebruik van de alg als voedingssupplement. Tot op heden is daarbij nooit over schadelijke effecten gepubliceerd.

De COGEM heeft geen aanwijzingen gevonden voor pathogeniteit van *A. limacinum*. Er wordt al meer dan 20 jaar in laboratoria met deze micro-alg gewerkt. Op basis van deze gegevens concludeert de COGEM dat de algensoort niet geassocieerd is met infectie of ziekte van plant, dier of mens, en een historie van veilig gebruik kent. Zij adviseert daarom *A. limacinum* in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en op te nemen op Bijlage 2, Lijst A1 van de Regeling ggo.



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

Hoogachtend,

Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW

Pathogeniteitsclassificatie van de micro-alg *Aurantiochytrium limacinum*

COGEM advies CGM/200128-02

Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van Purac Biochem B.V. (IG 20-003) is de COGEM gevraagd om advies uit te brengen over de pathogeniteitsklasse van de micro-alg *Aurantiochytrium limacinum*, en de plaatsing van deze micro-alg op Lijst A1 van Bijlage 2 van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen' (Regeling ggo).¹ Deze bijlage bestaat uit een lijst van micro-organismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant. Opname op Bijlage 2, lijst A1 betekent dat onder ML-I laboratorium-condities met het betreffende micro-organisme ggo's vervaardigd mogen worden indien hierbij vectoren worden gebruikt die wél, of inserties die niet, op de A-lijsten staan (lijst A2 veilige vectoren en lijst A3 inserties).

Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden de risico's voor mens en milieu in ogeschouw 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.

Algen

De Thraustochytriden, waartoe *A. limacinum* behoort, worden in het algemeen als algen bestempeld, maar in de wetenschappelijke literatuur zijn er verschillen in inzicht of de Thraustochytriden taxonomisch gezien daadwerkelijk tot de algen behoren.² In dit advies wordt *A. limacinum* als een micro-alg beschouwd.

Het begrip ‘algen’ is een brede verzamelnaam voor diverse groepen autotrofe organismen die licht (fotosynthese) of anorganische chemische reacties (chemosynthese) als energiebron gebruiken.^{3,4,5} De meeste algen gebruiken fotosynthese als energiebron. Algen kunnen ééncellig of meercellig zijn, en behoren tot de eukaryoten.³ Er worden micro-algen en macro-algen onderscheiden. Algen worden voor veel doeleinden toegepast, onder meer in de farmaceutische, voedings- en cosmetische industrie.⁶

Aurantiochytrium limacinum

A. limacinum is voor het eerst in 1998 als *Schizothytrium limacinum* beschreven en in 2007 op basis van 18S rRNA analyse, microscopische analyse, en analyses op de samenstelling van vetzuren en pigmenten, hernoemd tot *A. limacinum*.^{7,8} Het is een eencellig eukaryotisch heterotroof micro-organisme dat in de zee voorkomt, in het bijzonder in mangrove habitats, waar het een rol speelt bij de afbraak van afgevalen mangrove bladeren.^{7,8,9,10} *A. limacinum* werd eerst beschouwd als een schimmel, maar tegenwoordig is de soort in de klasse van de Labyrinthulea, orde Thraustochytrida, familie Traustochytriidae ingedeeld.¹¹

A. limacinum vormt verschillende oranjekleurige pigmenten (carotenoïden).^{8,11} De cellen bevatten één of meerdere kernen.¹⁰ De optimale groeitemperatuur bevindt zich tussen de 16 en 23 °C.¹¹ Onder gunstige leefomstandigheden reproduceert de soort zich vegetatief door middel van binaire deling, waarbij groepjes van maximaal 16-32 cellen ontstaan.^{8,10} Wanneer stikstof- en fosforbronnen opraken, starten de cellen met de vorming van triacylglycerolen (TAG's) die zich in de cellen ophopen.¹⁰ Deze TAG's zijn rijk aan meervoudig onverzadigde vetzuren (poly unsaturated fatty acids, PUFA's).¹²

Tijdens ongunstige leefomstandigheden vormen de cellen zoösporen.¹⁰ Deze ontstaan uit zogenaamde 'sporangia' en bezitten twee flagellen, waarmee zij zich naar een andere leefomgeving kunnen verplaatsen.^{8,10} Sommige *A. limacinum* isolaten zijn in staat amoëbe-achtige cellen te vormen (cellen met schijnvoetjes), waaruit eveneens zoösporen kunnen ontstaan.^{8,11}

In de stofwisseling van mens en dier spelen PUFA's een belangrijke rol. Micro-algensoorten, waaronder soorten die behoren tot het geslacht *Schizochytrium*, waartoe *A. limacinum* vroeger behoorde, staan daarom in de belangstelling om binnen de voedselindustrie als voedingssupplement toe te passen. Algenolie geïsoleerd uit verschillende *Schizochytrium* soorten is inmiddels als 'novel food' op de Europese markt toegelaten.¹³ *A. limacinum* bevat een relatief hoog gehalte aan meervoudig onverzadigde vetzuren, onder meer docosahexaëenzuur (DHA).^{11,14} Onderzocht wordt of de micro-alg als voedingssupplement aan het voer van onder meer varkens, kippen, koeien en honden toegevoegd kan worden.^{11,14,15,16,17,18}

Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over algen die tot het geslacht *Aurantiochytrium* of *Schizochytrium* behoren. Zij heeft in het verleden verschillende malen geadviseerd over de pathogeniteitsklasse-indeling van micro-algen, en allen ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.^{19,20,21,22}

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 anderszins 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.

A. limacinum is een micro-alg die voorkomt in het aquatische milieu, in het bijzonder in mangrove habitats. De soort speelt een rol bij de afbraak van plantmateriaal.^{7,10}

Er zijn bij de COGEM geen publicaties bekend waarin *A. limacinum* als mogelijke ziekteverwekker wordt aangeduid. Met de algensoort wordt al meer dan 20 jaar in laboratoria gewerkt. Voor zover bij de COGEM bekend is er nooit melding gemaakt van pathogeniteit of schadelijke effecten. Voedingsstudies bij onder meer varkens, kippen, rundvee en honden hebben geen toxische effecten laten zien.^{14,15,16,17,18} Ook wordt de soort niet als plantpathogeen genoemd in verschillende 'online databases' met informatie over micro-organismen die ziekten bij planten veroorzaken.^{23,24}

Op basis van bovenstaande gegevens, is de COGEM van oordeel dat *A. limacinum* voldoet aan de criteria a en b van pathogeniteitsklasse 1, en adviseert zij de micro-alg in deze klasse in te delen. Tevens is zij van oordeel dat *A. limacinum* in aanmerking komt voor plaatsing op Lijst A1 van Bijlage 2 van de Regeling ggo.

Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2015). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/> (bezoekt: 14 januari 2020)
2. Leyland B *et al.* (2017). Are Thraustochytrids algae? Fungal Biol. 121: 835-840
3. Sadava D *et al.* (2014). In 'Life: The science of biology. 10th Edition. Ed. Sinauer Associates Inc, Sunderland, MA, USA

4. Graham LE *et al.* (2009). Photosynthetic Stramenopiles II. In: Algae, second edition. Ed. Cummings B, San Francisco
5. Patterson DJ. Algae: Protists with chloroplasts. Tree of life project.
http://tolweb.org/accessory/Algae: Protists with Chloroplasts?acc_id=52 (bezoekt: 20 januari 2020)
6. Stengel DB *et al.* (2011). Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Advances* 29: 483-501
7. Honda D *et al.* (1998). *Schizochytrium limacinum* sp. nov., a new thraustochytrid from a mangrove area in the west Pacific Ocean. Published online by Cambridge University Press. pp. 439-448
8. Yokoyama R & Honda, D (2007). Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium* sensu lato based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium*. *Mycoscience*. 48(4):199-211
9. Huang J *et al.* (2003). Grouping the newly isolated docosahexanoic fatty acid profile and comparative analysis of 18S rRNA genes. *Mar. Biotechnol.* 5: 450-457
10. Dellerio Y *et al.* (2019). Ecophysiology and lipid dynamics of a eukaryotic mangrove decomposer. *Environm. Microbiol.* 20: 3057-3068
11. Fossier Marchan L *et al.* (2018). Taxonomy, ecology and biotechnological applications of Thraustochytrids: A review. *Biotechnol. Adv.* 36: 26-46
12. Aassen IM *et al.* (2016). Thraustochytrids as production organisms for docosahexaenoic acid (DHA), squalene, and carotenoids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100: 4309-4321
13. European Commission. Summary of applications and notifications.
https://ec.europa.eu/food/safety/novel_food/authorisations/summary-applications-and-notifications_en (bezoekt: 20 januari 2020)
14. Moran CA *et al.* (2018). Effects of a DHA-rich unextracted microalgae as a dietary supplement on performance, carcass traits and meat fatty acid profile in growing-finishing pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* DOI: 10.1111/jpn.12911
15. Moran CA *et al.* (2017). The effect of dietary supplementation with *Aurantiochytrium limacinum* on lactating dairy cows in terms of animal health, productivity and milk composition. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* DOI: 10:1111/jpn.12827
16. Moran CA *et al.* (2018). Tolerance of Broilers to Dietary Supplementation with High Levels of the DHA-Rich Microalga, *Aurantiochytrium Limacinum*: Effects on health and productivity. *Animals* 8, 180; DOI: 10.3390/am8100180
17. Keegan JD *et al.* (2019). Docosahexaenoic acid included in layer feed as an unextracted *Aurantiochytrium limacinum* biomass is efficiently transferred to eggs when provided in mash or pellet form. *J. Appl. Poult. Res.* 28: 1069-1077
18. Menezes-Souza *et al.* (2019). Microalgae *Schizochytrium* sp, as a source of docosahexaenoic acid (DMA): Effects on diet digestibility, oxidation and palatability and on immunity and inflammatory Indices in dogs. *Anim. Sci. J.* DOI: 10.1111/asj.13294
19. COGEM (1999). Advies kennisgeving GGO 99-019. COGEM advies CGM/990429-09
20. COGEM (2001). Advies kennisgeving GGO 99-019/2. COGEM advies CGM/011214-03
21. COGEM (2011). Classificatie van negen algensoorten. COGEM advies CGM/110706-01

22. COGEM (2016). Pathogeniteitsclassificatie algensoorten *Nannochloropsis gaditana* en *Nannochloropsis oceanica*. COGEM advies CGM/160504-01
23. Animal and Plant health Inspection Service (APHIS). www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome (bezocht: 20 januari 2020)
24. Plant-Host Interactions, PHI-base. <http://www.phi-base.org/> (bezocht: 20 januari 2020)