

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

DATUM 25 februari 2020
KENMERK CGM/200225-01
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie van de cyanobacteriestam *Anabaena* sp. PCC 7120

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,


Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier getiteld 'Anabaena PCC7120' (IG 20-014_2.13-000), ingediend door de Stichting Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee (NIOZ), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de cyanobacteriestam *Anabaena* sp. PCC 7120, en de plaatsing van deze stam op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo. Cyanobacteriën (voorheen blauwalgen genoemd) zijn fotosynthetiserende bacteriën die onder veel verschillende milieuomstandigheden kunnen leven. Het genus *Anabaena* bestaat uit cyanobacteriën die in water voorkomen, en bevat vertegenwoordigers die toxines kunnen produceren.

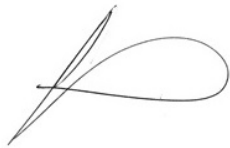
Anabaena sp. PCC 7120 wordt al lange tijd in het laboratorium gebruikt als modelorganisme. Onder stikstofarme condities kan deze stam gespecialiseerde cellen vormen die stikstof kunnen fixeren uit de atmosfeer.

Er zijn bij de COGEM geen aanwijzingen bekend dat *Anabaena* sp. PCC 7120 schadelijk is voor plant, dier of mens. Gezien het bovenstaande adviseert de COGEM om *Anabaena* sp. PCC 7120 in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en op te nemen in 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 cyanobacteriestam

Anabaena sp. PCC 7120

COGEM advies CGM/200225-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van de Stichting Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee (NIOZ) is de COGEM gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de cyanobacteriestam *Anabaena* sp. PCC 7120 (IG 20-014) en over de plaatsing van deze stam op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.¹ Deze bijlage bestaat uit een lijst van gastheerorganismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant. Opname op Bijlage 2, lijst A1 betekent dat onder ML-I laboratoriumcondities met het betreffende micro-organisme genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) vervaardigd mogen worden indien hierbij vectoren worden gebruikt die wél, of inserties die níet, op de A-lijsten staan (respectievelijk 'lijst A2 veilige vectoren' en 'lijst A3 inserties'). Activiteiten met deze ggo's kunnen, zonder dat een aanvrager daar een milieurisicobeoordeling voor hoeft aan te leveren, direct na kennisgeving gestart worden.

2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)

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

3. Cyanobacterien

Cyanobacteriën (voorheen ook wel blauwalgen genoemd) komen voor in zeer uiteenlopende milieus.² Zij kunnen zowel op land als in water voorkomen en worden ook op plaatsen aangetroffen waar extreme omstandigheden heersen, zoals in Arctische gebieden of thermische bronnen. Sommige soorten kunnen symbiotische relaties aangaan met andere eukaryote organismen, zoals diatomeeën en sponzen. Cyanobacteriën produceren het pigment chlorofyl-a en zijn hierdoor tot fotosynthese in staat. Onder bepaalde omstandigheden, bijvoorbeeld bij een verhoogde toevoer van voedingsstoffen of een toename van de temperatuur, kunnen cyanobacteriën zich massaal gaan vermenigvuldigen; een fenomeen dat bekend staat als algenbloei. Omdat sommige cyanobacteriën toxines produceren die schadelijk zijn voor andere organismen,^{3,4,5} kan algenbloei schadelijk zijn voor mens en milieu.

4. Genus *Anabaena*

Het genus *Anabaena* behoort, net als het genus *Nostoc*, tot de orde Nostocales, familie Nostocaceae, van het fylum Cyanobacteria.⁶ *Anabaena* sp. zijn cyanobacteriën die in zowel zoet, zout als brak water voorkomen. Er zijn verschillende *Anabaena* soorten (met name *Anabaena flos-aquae*, *Anabaena circinalis* en *Anabaena lapponica*)^{3,7} en stammen (*Anabaena* sp. WA102 en AL935)⁸ waarvan bekend is dat zij toxines produceren. Ook zijn er *Anabaena* stammen die cytotoxisch zijn voor zoogdiercellen (humane HL-60 en muis 3T3 Swiss cellen), maar het is nog niet bekend welk toxine dit veroorzaakt.⁹

5. *Anabaena* sp. PCC7120

De cyanobacterie *Anabaena* sp. PCC 7120 (ook wel bekend als *Nostoc* sp. PCC 7120, ATCC 27893) wordt voornamelijk in zoetwater aangetroffen. De bacteriestam is oorspronkelijk in Noord-Amerika geïsoleerd en kreeg toen de naam *Nostoc muscorum*. Toen de stam werd overgedragen aan de Pasteur collectie¹⁰ in 1971, is de stam hernoemd als *Anabaena* sp.¹¹ Tegenwoordig worden echter zowel de naam *Anabaena* sp. PCC 7120 als *Nostoc* sp. PCC 7120 gebruikt in de wetenschappelijke literatuur. De stam wordt al lange tijd als modelorganisme gebruikt om stikstoffixatie en celdifferentiatie te bestuderen.^{12,13,14}

Anabaena sp. PCC 7120 vormt lange filamenten, en kan bij lage nitraat- en ammoniumconcentraties in het water gespecialiseerde cellen (heterocysten) vormen die stikstof uit de lucht kunnen fixeren. Ongeveer elke tiende cel in een filament differentieert onder lage stikstof condities in een heterocyst. Deze heterocysten dragen niet bij aan de fotosynthese, en bevatten het zuurstof-labele 'nitrogenase-enzymcomplex' om atmosferisch stikstof te fixeren en door te geven aan andere cellen in het filament. Omdat het nitrogenase-enzymcomplex zuurstof-labele is, wordt opname van zuurstof in de heterocyst

voorkomen door de productie van extracellulaire glycolipiden en een exopolysacharidelaag.^{13,15} Voor de vorming van heterocysten vinden chromosomale herschikkingen plaats.^{13,14,16}

Het genoom van *Anabaena* sp. PCC 7120 bestaat uit het chromosoom (6,4 Mb) en zes plasmiden (in totaal 0,8 Mb).^{17,18} In een in 1995 uitgevoerde studie naar toxinen in *Anabaena* en *Nostoc* isolaten wordt *Anabaena/Nostoc* sp. PCC 7120 aangemerkt als niet-toxische stam.¹¹ De aanvrager heeft met een BLAST analyse gekeken of er overeenkomsten zijn tussen sequenties van een aantal potentiële cyanobacterie toxines^{4,5} en het genoom van *Anabaena* sp. PCC 7120, en concludeert dat *Anabaena* sp. PCC 7120 geen genen voor bekende toxines bevat. Voor één van de toxines, het aplysiatoxine, is echter geen biosynthetisch cluster geïdentificeerd, waardoor hiervoor geen analyse uitgevoerd kon worden. In de gepubliceerde genoomsequentie van *Anabaena* sp. PCC 7120¹⁹ worden enkele genen geannoteerd die coderen voor enzymen die mogelijk betrokken zijn bij de synthese van potentieel schadelijke secundaire metabolieten (zoals microcystine). Echter, productie van microcystine is onwaarschijnlijk, omdat andere genen die vereist zijn voor de productie, lijken te ontbreken. Ook lijken er geen volledige metabole routes voor de productie van andere potentieel schadelijke secundaire metabolieten aanwezig te zijn in *Anabaena* sp. PCC 7120.²⁰

6. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in 2016 geadviseerd over de *Anabaena variabilis* stam ATCC 29413 (=PCC 7937), en deze in pathogeniteitsklasse 1 ingedeeld.²¹ In dat advies is tevens aangegeven dat de COGEM cyanobacteriën uitsluitend op stamniveau classificeert vanwege de onduidelijke en aan verandering onderhevige taxonomie van cyanobacteriën.

7. Classificaties van andere organisaties

De ‘American Type Culture Collection’(ATCC), die haar indeling baseert op pathogeniteit voor de mens, heeft *Anabaena* PCC 7120 (onder de naam *Nostoc* sp. ATCC 27893) ingedeeld op het laagste veiligheidsniveau (‘Biosafety level 1’).²² De Duitse ‘Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin’ (BAUA) die pathogeniteit voor de mens beoordeelt, heeft cyanobacteriën als groep ingedeeld in risicogroep 1, met de melding dat er rekening gehouden dient te worden met toxinevorming door sommige soorten.²³ In de Duitse ‘Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen’ (DSMZ) is *Anabaena* sp. PCC 7120 (onder de naam *Nostoc* sp.) ingedeeld in risicogroep 1.²⁴ Hierbij wordt aangegeven dat er niet uitgesloten kan worden dat deze stam cyanobacteriële toxines produceert die mogelijk schadelijk zijn voor mens en dier. Deze inschaling door buitenlandse instanties geldt als referentie en achtergrondinformatie bij de risicobeoordeling die door de COGEM wordt uitgevoerd.

8. Overweging 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 bacteriën weinig literatuur over apathogeniteit voor handen.

Anabaena sp. (*Nostoc* sp.) PCC 7120 is een cyanobacterie die met name voorkomt in zoet water en gebruik maakt van fotosynthese. De genomsequentie van deze stam is bekend, inclusief de sequentie van de zes plasmiden die deze stam bevat. Op basis van de genomsequentie lijkt productie van potentieel schadelijke secundaire metabolieten door deze stam onwaarschijnlijk. De stam wordt veelvuldig gebruikt voor onderzoek en heeft een historie van veilig gebruik. Er zijn geen aanwijzingen dat deze stam ziekte kan veroorzaken bij plant, dier of mens.

Gezien het bovenstaande adviseert de COGEM om *Anabaena* sp. PCC 7120 in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en op te nemen in Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

Referenties

1. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013.
<https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072> (bezoekt: 12 februari 2020)
2. Mazard S *et al.* (2016). Tiny microbes with a big impact: The role of cyanobacteria and their metabolites in shaping our future. *Mar. Drugs* 17: 14
3. Cyanosite for research on cyanobacteria. <http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/cyanotox/toxiccyanos.html> (bezoekt: 12 februari 2020)
4. Sivonen K & Jones G (1999). Chapter 3: Cyanobacterial toxins. In: Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. World Health Organisation (WHO), Ed. Choris I & Bartram J
5. Dittmann E *et al.* (2013). Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiol. Rev.* 37: 23–43
6. List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN). Classification of Cyanobacteria. <http://www.bacterio.net/-classifcyano.html> (bezoekt: 12 feb 2020)
7. Moreira C *et al.* (2013). Phylogeny and biogeography of cyanobacteria and their produced toxins. *Mar. Drugs* 11: 4350-4369
8. Brown NM *et al.* (2016). Structural and functional analysis of the finished genome of the recently isolated toxic *Anabaena* sp. WA102. *BMC Genomics* 17: 457
9. Surakka A *et al.* (2005). Benthic cyanobacteria from the Baltic sea contain cytotoxic *Anabaena*, *Nodularia*, and *Nostoc* strains and apoptosis-inducing *Phormidium* strain. *Environ. Toxicol.* 20: 25-92
10. Institut Pasteur. Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur, Microorganism biobank catalogue. Strain: PCC 7120 *Nostoc* <https://catalogue-crbip.pasteur.fr/resultatRecherche.xhtml> (bezoekt: 19 februari 2020)
11. Rouhiainen L *et al.* (1995). Characterization of toxin-producing cyanobacteria by using an oligonucleotide probe containing a tandemly repeated heptamer. *J. Bacteriol.* 177: 6021-6026
12. Shvarev D & Maldener I (2019). Roles of DevBCA-like ABC transporters in the physiology of *Anabaena* sp. PCC 7120. *Int. J. Med. Microbiol.* 309: 325-330
13. Videau P & Cozy LM (2019). *Anabaena* sp. strain PCC 7120: Laboratory maintenance, cultivation, and heterocyst induction. *Curr. Protoc. Microbiol.* 52: e71

14. Golden JW *et al.* (1988). Deletion of a 55-kilobase-pair DNA element from the chromosome during heterocyst differentiation of *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 170: 5034-5041
15. Kumar K *et al.* (2010). Cyanobacterial heterocysts. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2: a000315
16. Carrasco CD *et al.* (2005). Heterocyst-specific excision of the *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 *hupL* element requires *xisC*. *J. Bacteriol.* 187: 6031-6038
17. Kaneko T *et al.* (2001). Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res.* 8: 205-213; 227-53
18. Golden JW & Yoon HS. Heterocyst development in *Anabaena*. *Curr Opin Microbiol.* 6: 557-563
19. National Center for Biotechnology Information (NCBI) Nucleotide database. *Nostoc* sp. PCC 7120 DNA, complete genome. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/BA000019.2> (bezoekt: 17 februari 2020)
20. KEGG Biosynthesis of secondary metabolites – *Nostoc* sp. PCC 7120. https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ana01110 (bezoekt: 18 februari 2020)
21. COGEM (2016). Classificatie cyanobacterie *Anabaena variabilis* stam ATCC 29413. COGEM advies CGM/160816-01
22. American Type Culture Collection (ATCC). *Nostoc* sp. (ATCC 27893). Strain Designation: PCC 712. https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/27893.aspx?geo_country=nl (bezoekt: 12 februari 2020)
23. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAUA; 2015). Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe: Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen (TRBA 466). https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/pdf/TRBA-466.pdf?__blob=publicationFile&v=6 (bezoekt: 12 februari 2020)
24. DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH. *Nostoc* sp. (DSM 107007, ATCC 27893, PCC 7120). <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-107007> (bezoekt: 12 februari 2020)