

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

DATUM 21 april 2020
KENMERK CGM/200421-01
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie van de micro-alg *Tetraselmis striata*

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag van Wageningen Universiteit voor het werken met de mariene micro-alg *Tetraselmis striata* bij de eenheid Bioprocess Engineering, is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van deze algensoort, en de plaatsing hiervan op Lijst A1 van Bijlage 2 van de Regeling ggo (IG 20-082_2.13-000). De COGEM deelt u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de micro-alg *Tetraselmis striata* en de plaatsing van deze soort op Bijlage 2, Lijst A1 van de Regeling ggo. Algen worden voor veel doeleinden toegepast, onder meer in de farmaceutische, voedings- en cosmetische industrie. Soorten uit het genus *Tetraselmis* worden voornamelijk aangetroffen in zee of riviermondingen en kunnen voorkomen als plankton, of leven op de bodem van de zee. Tetraselmissoorten worden veelvuldig gebruikt als voeding in aquacultuur (voor onder andere weekdieren, garnalen en vissen in verschillende ontwikkelingsstadia), als diervoederingsrediënt en als smaakmaker voor zeevruchten.

De COGEM heeft geen aanwijzingen gevonden voor pathogeniteit van *T. striata*. Er wordt al meer dan 20 jaar in laboratoria met deze micro-alg gewerkt, zonder dat er melding is gemaakt van mogelijke pathogeniteit. 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 *T. striata* 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
Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's
DG Milieu en Internationaal

Pathogeniteitsclassificatie van de micro-alg *Tetraselmis striata*

COGEM advies CGM/200421-01

Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van Wageningen Universiteit, eenheid Bioprocess Engineering, (IG 20-082) is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de algensoort *Tetraselmis striata*, en de plaatsing hiervan 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 laboratoriumcondities 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 oenschouw 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

Het begrip ‘algen’ is een brede verzamelnaam voor diverse groepen autotrofe organismen die licht (fotosynthese) of anorganische chemische reacties (chemosynthese) als energiebron gebruiken.^{2,3,4} Zij vormen geen monofyletische groep, en zijn daardoor lastig als groep te definiëren.⁵ De meeste algen gebruiken fotosynthese als energiebron. Algen kunnen éencellig of meercellig zijn, en behoren tot de eukaryoten.² Er worden micro-algen (bijvoorbeeld fytoplankton) en macro-algen (bijvoorbeeld zeewier) onderscheiden. Blauwalgen (cyanobacteriën) worden in de volksmond ook algen genoemd, maar zijn fotosynthetiserende prokaryoten en behoren tot het bacterierijk.^{2,3} Algen worden voor veel doeleinden toegepast, onder meer in de farmaceutische, voedings- en cosmetische industrie.⁶

Tetraselmis striata

De algensoort *T. striata* behoort tot het genus *Tetraselmis* (familie *Chlorodendraceae*, orde *Chlorodendrales*, fylum *Chlorophyta*). De algen uit dit genus zijn eencellige, eukaryote flagellaten en hebben een diameter tussen de 6 en 10 µm.⁷ Zij bevatten 4 flagellen die in paren gerangschikt zijn aan de voorzijde van het organisme. Het organisme is omhuld door schubben (‘scales’), en ook de flagellen zijn bedekt met haarvormige en pentagonale schubben. De schubben rondom de cel zijn gefuseerd en vormen een soort dunne celwand, ook wel ‘theca’ genoemd.^{8,9} *Tetraselmis* algen bevatten in het algemeen één chloroplast.¹⁰ Deze micro-algen kunnen zich asexueel vermeerderen, seksuele reproductie is nooit waargenomen.^{8,10} Soorten uit dit genus worden voornamelijk aangetroffen in zee of estuaria (riviermondingen) en kunnen voorkomen als plankton (zwevend), of zijn bentisch (leven op de zeebodem).^{10,11} Van enkele soorten, met name *Tetraselmis convolutae*, is beschreven dat zij voor kunnen komen als endosymbionten in Metozoa zoals platwormen.^{8,10}

Het genus *Tetraselmis* omvat ongeveer 26 soorten, waaronder soorten die voorheen geclassificeerd werden onder de genera *Platymonas*, *Prasinocladus* en *Aulacochlamys*.¹⁰ Oorspronkelijk werden soorten onderscheiden op basis van eigenschappen die zichtbaar waren met lichtmicroscopie (zoals celgrootte en vorm), maar deze eigenschappen bleken zeer variabel en daarom niet geschikt voor soortidentificatie. Later is met elektronenmicroscopie onderscheid gemaakt tussen soorten op basis van ultrastructuur; er is namelijk een grote diversiteit in de ultrastructuur van de schubben binnen en tussen genera van deze flagellaten.^{9,10} Tegenwoordig kunnen soorten met behulp van DNA sequentieanalyse van elkaar onderscheiden worden.^{10,12}

Er wordt al enige tijd onderzoek gedaan naar *T. striata*, zoals naar optimale groeicondities,¹¹ naar structurele compositie (zoals onderzoek naar membraaneiwwitten,⁹ of naar de theca en ‘scales’^{13,14}) en productiecapaciteit.^{15,16,17} Ook is beschreven dat *T. striata* een mutualistische interactie aan kan gaan met twee bacteriesoorten, waarbij aanwezigheid van deze bacteriën de productiecapaciteit van *T. striata* verbeterden, zonder melding van schadelijke effecten door co-cultivering.¹⁸ Van *T. striata* is het genoom gepubliceerd.⁷ *Tetraselmis*soorten, waaronder *Tetraselmis chunii*, *Tetraselmis suecica*, en *Tetraselmis tetrahele*, worden veelvuldig gebruikt als voeding in aquacultuur (voor onder andere

weekdieren, garnalen en vissen in verschillende ontwikkelingsstadia), maar ook als voedselingrediënt voor diervoeder en als smaakmaker voor zeevruchten.^{19,20,21,22,23} *T. chuii* is daarnaast toegestaan voor verkoop als ‘novel food’ en wordt ook wel onder de naam TetraSOD® als voedingssupplement (in gedroogde vorm) verkocht, dat geschikt is voor humane consumptie.^{19,24}

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over algen die tot het geslacht *Tetraselmis* behoren. Het genus wordt wel genoemd in een COGEM onderzoeksrapport over de milieurisicobeoordeling bij genetische modificatie van (industriële relevante) algen.²⁵ Hierbij zijn algen behorende tot het genus *Tetraselmis* niet als pathogeen of als producent van toxines aangemerkt. De COGEM heeft in het verleden vaker geadviseerd over de pathogeniteitsklasse van verschillende soorten micro-algen, en allen ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.^{26,27,28,29,30}

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 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.

De micro-alg *T. striata* komt voor in het aquatische milieu, en behoort tot een genus waarin vertegenwoordigers zitten die veelvuldig gebruikt worden in de aquacultuur als voedsel, en nutritionele eigenschappen hebben. Eén soort uit het genus, *T. chuii*, is als ‘novel food’ op de Europese markt toegelaten. Van deze soort is tevens een veiligheidsbeoordeling gepubliceerd, waarbij uit een voedingsstudie in ratten is gebleken dat consumptie van gedroogde *T. chuii* veilig is, en ook voor mensen geschikt is.³¹ Van een ander *Tetraselmis* isolaat (*Tetraselmis* sp. CTP4) is eveneens een toxicologische evaluatie uitgevoerd, waaruit blijkt dat er geen pathogene of toxische componenten geproduceerd worden door dit isolaat.³² In een onderzoeksrapport over micro-algen voor de (dier)voeder industrie in Europa is eveneens een risicobeoordeling opgenomen van verschillende industriële relevante micro-algen. Hierin wordt verwezen naar het COGEM onderzoeksrapport²⁵ en is aangegeven dat er voor algen uit het genus *Tetraselmis* geen toxines bekend zijn.³³

Er zijn bij de COGEM geen publicaties bekend waarin *T. striata* als mogelijke ziekteverwekker wordt aangeduid. Er wordt al lange tijd, meer dan 20 jaar, onderzoek gedaan met deze algensoort. Voor zover bij de COGEM bekend is er nooit melding gemaakt van pathogeniteit of schadelijke effecten. Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat *T. striata* 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 *T. striata* 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/> (bezocht: 8 april 2020)
2. Sadava D *et al.* (2014). In 'Life: The science of biology. 10th Edition. Ed. Sinauer Associates Inc, Sunderland, MA, USA
3. Graham LE *et al.* (2009). Photosynthetic Stramenopiles II. In: Algae, second edition. Ed. Cummings B, San Francisco
4. Patterson DJ. Algae: Protists with chloroplasts. Tree of life project. http://tolweb.org/accessory/Algae: Protists with Chloroplasts?acc_id=52 (bezocht: 9 april 2020)
5. Handbook of Microalgal Culture. Applied Phycology and Biotechnology (2013). Eds. Richmond A & Hu Q
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. Steadman Tyler CR *et al.* (2019). High-quality draft genome sequence of the green alga *Tetraselmis striata* (Chlorophyta) generated from pacbio sequencing. *Microbiol. Resour. Announc.* 8. pii: e00780-19. doi: 10.1128/MRA.00780-19.
8. Borowitzka MA (2018). Biology of Microalgae. In: *Microalgae in Health and Disease Prevention*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00003-7>
9. Gödel S *et al.* (2000). Flagellar membrane proteins of *Tetraselmis striata* Butcher (Chlorophyta). *Protist* 151: 147-159
10. Arora M *et al.* (2013). *Tetraselmis indica* (Chlorodendrophyceae, Chlorophyta), a new species isolated from salt pans in Goa, India. *Eur. J. Phycol.* 48: 61-78
11. Imamoglu E *et al.* (2015). Process optimization and modeling for the cultivation of *Nannochloropsis* sp. and *Tetraselmis striata* via response surface methodology. *J. Phycol.* 51: 442-453
12. Lee HJ & Hur B (2009). Genetic relationships among multiple strains of the genus *Tetraselmis* based on partial 18S rDNA sequences. *Algae* 24: 205-212
13. Becker D *et al.* (1990). Isolation, purification, and characterization of flagellar scales from the green flagellate *Tetraselmis striata* (Prasinophyceae). *Protoplasma* 156: 103-112
14. Becker B *et al.* (1989). Identification of 3-deoxy-manno-2-octulosonic acid, 3-deoxy-5-O-methyl-manno-2-octulosonic acid and 3-deoxy-lyxo-2-heptulosaric acid in the cell wall (theca) of the green alga *Tetraselmis striata* Butcher (Prasinophyceae). *Eur. J. Biochem.* 182: 153-160
15. He M *et al.* (2012). Isolation of wild microalgae from natural water bodies for high hydrogen producing strains. *Int. J. Hydrogen Energy* 37: 4046-4056
16. Patidar SK *et al.* (2018). *Pelagibaca bermudensis* promotes biofuel competence of *Tetraselmis striata* in a broad range of abiotic stressors: dynamics of quorum-sensing precursors and strategic improvement in lipid productivity. *Biotechnol. Biofuels.* 11: 102

17. Boopathy AB *et al.* (2020). Biomass and lipid production potential of an Indian marine algal isolate *Tetraselmis striata* BBRR1. *Energies* 13, 3421
18. Park J *et al.* (2017). Phycospheric native bacteria *Pelagibaca bermudensis* and *Stappia* sp. ameliorate biomass productivity of *Tetraselmis striata* (KCTC1432BP) in co-cultivation system through mutualistic interaction. *Front Plant Sci.* 8:289
19. Garcíá JL *et al.* (2017). Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. *Microb. Biotechnol.* 10: 1017-1024
20. Rahman NA *et al.* (2017). *Tetraselmis chuii* biomass as a potential feed additive to improve survival and oxidative stress status of Pacific white-leg shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Int. Aquat. Res.* 9: 235-247
21. Roy SS & Pal R (2015). Microalgae in aquaculture: a review with special references to nutritional value and fish dietetics. *Proc. Zool. Soc.* 68: 1-8
22. Caporgno MP & Mathys A (2018). Trends in microalgae incorporation into innovative food products with potential health benefits. *Front. Nutr.* 5:58 doi: 10.3389/fnut.2018.00058
23. Hemaiswarya S *et al.* (2011). Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 1737-1746
24. Authorisation of extension of use of freeze-dried microalgae *Tetraselmis chuii* to include their use in food supplements (2017). https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/novel-food_authorisation_2017_auth-letter_tetraselmis-chuii_accosan_en.pdf (bezocht: 9 april 2020)
25. Enzing C *et al.* (2012). Algae and genetic modification. Research, production and risks. COGEM onderzoeksrapport CGM 2012-05
26. COGEM (1999). Advies kennisgeving GGO 99-019. COGEM advies CGM/990429-09
27. COGEM (2001). Advies kennisgeving GGO 99-019/2. COGEM advies CGM/011214-03
28. COGEM (2011). Classificatie van negen algensoorten. COGEM advies CGM/110706-01
29. COGEM (2016). Pathogeniteitsclassificatie algensoorten *Nannochloropsis gaditana* en *Nannochloropsis oceanica*. COGEM advies CGM/160504-01
30. COGEM (2020). Pathogeniteitsclassificatie van de micro-alg *Aurantiochytrium limacinum*. COGEM advies CGM/200128-02
31. Mantecón L *et al.* (2019). Safety assessment of a lyophilized biomass of *Tetraselmis chuii* (TetraSOD®) in a 90 day feeding study. *Food Chem. Toxicol.* 133: 110810
32. Pereira H *et al.* (2019). Nutritional potential and toxicological evaluation of *Tetraselmis* sp. CTP4 microalgal biomass produced in industrial photobioreactors. *Molecules* 24: 3192
33. Enzing C *et al.* (2014). Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. JCR Scientific and Policy reports. Report EUR 26255 EN