

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

DATUM 20 mei 2020
KENMERK CGM/200520-02
ONDERWERP Advies inschaling van werkzaamheden met gg-Grote kroosvaren met gg-cyanobacterie

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 20-087_2.8-000 met de titel 'Azolla transformation' ingediend door de Universiteit Utrecht, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de cyanobacterie *Anabaena azollae* (*Nostoc azollae*), en inschaling van ggo-werkzaamheden met deze cyanobacterie en de waterplant *Azolla filiculoides* (Grote kroosvaren). De aanvrager is voornemens de symbiotische relatie tussen de cyanobacterie en de kroosvaren te onderzoeken.

De drijvende waterplant *A. filiculoides* groeit in sloten en kanalen in gebieden met klei- en laagveen. In Nederland komt *A. filiculoides* vrij algemeen voor in het westen van het land en in het rivierengebied. De kroosvaren plant zich voornamelijk vegetatief voort, maar er kan ook seksuele voortplanting plaatsvinden door de vorming van sporenkapsels.

In bladholtes van *Azolla*-soorten leeft de cyanobacterie *A. azollae*. De cyanobacterie maakt stikstof uit de lucht beschikbaar voor de plant, in ruil daarvoor ontvangt de bacterie voedingsstoffen en biedt de plant de bacterie een beschermde omgeving. *A. azollae* heeft het vermogen om (geheel) zelfstandig te groeien verloren. Er zijn bij de COGEM geen publicaties bekend die *A. azollae* relateren aan pathogeniteit voor mens, dier of plant. Alles in overweging nemende, adviseert de COGEM *A. azollae* als apathogeen in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en op te nemen in Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

De COGEM adviseert om het genetisch modifieren van *A. filiculoides* en *A. azollae*, en de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveau I uit te voeren en daarbij een aantal aanvullende maatregelen in acht te nemen die in het onderhavige advies worden gespecificeerd. Onder de genoemde voorwaarden acht de COGEM de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein.

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

Met het oog op eventuele belangenverstremeling is het COGEM lid dr. H. de Cock niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Pathogeniteitsclassificatie *Anabaena azollae* en inschaling van werkzaamheden met (gg-) *Azolla filiculoides* in associatie met (gg-) *A. azollae*

COGEM advies CGM/200520-02

1. Inleiding

Naar aanleiding van een 2.8 verzoek getiteld ‘Azolla transformation’ ingediend door de Universiteit Utrecht (IG 20-087), is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de cyanobacterie *Anabaena azollae* (*Nostoc azollae*), en inschaling van ggo-werkzaamheden met deze cyanobacterie en de waterplant *Azolla filiculoides* (Grote kroosvaren). De aanvrager is voornemens de symbiotische relatie tussen de cyanobacterie en de kroosvaren te onderzoeken. De werkzaamheden betreffen het genetisch modificeren van de kroosvaren *A. filiculoides* en van de cyanobacterie *A. azollae*, en onderzoek met de verkregen genetisch gemodificeerde (gg-) *A. filiculoides* en gg-*A. azollae*. De aanvrager is voornemens de kortdurende werkzaamheden in een ML-1 werkrimte en het kweken in een PCM-I kweekcel uit te voeren.

2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden 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. Beschrijving van de organismen

3.1 *Azolla filiculoides* (Grote kroosvaren)

Azolla filiculoides (Grote kroosvaren) is een kleine drijvende waterplant (doorsnede tot 5 cm) en is onderdeel van de vlotvarenfamilie (*Salviniaceae*).^{1,3} De plant komt oorspronkelijk uit de warmere delen van Noord- en Zuid-Amerika, maar wordt tegenwoordig in bijna alle werelddelen aangetroffen.⁷ Tot het *Azolla*-geslacht behoren 7 soorten², in Nederland komt alleen de soort *A. filiculoides* voor.⁷ De Grote kroosvaren is een invasieve exoot die voor het eerst is waargenomen in Nederland in 1900.³ *A. filiculoides* staat op de lijst van de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA) van de 16 uitheemse waterplanten die de meeste problemen veroorzaken in of op de oevers van sloten en vaarten.⁴

Het is een eenjarige plant, in de winter sterft het merendeel van de vegetatie af, maar er zijn altijd wel een paar planten die op een beschutte plek overwinteren.^{5,6,7} Op dit moment komt *A. filiculoides* vrij algemeen voor in het westen en het rivierengebied van Nederland, maar is zeldzaam tot zeer zeldzaam in de rest van het land.⁷

Grote kroosvaren drijft op open, ondiep, voedselrijk tot zeer voedselrijk, neutraal tot licht alkalisch, zoet of zwak brak, stilstaand of zeer zwak stromend water boven een bodem van klei of laagveen.⁷ Vanaf de zomer vermeerderen de plantjes zich snel en gaan tegen elkaar omhoog groeien. Hele sloten kunnen dan overdekt raken met een centimeters dikke laag van plantjes (matvorming).^{5,6} Het groeioppervlak van de Grote kroosvaren kan in 7-10 dagen verdubbelen.^{3,8}

Door de zeer dichte matten krijgen andere waterplanten onvoldoende licht en sterven zij af. Hierdoor wordt er in de waterkolom geen zuurstof meer gevormd. Bovendien wordt door de *Azolla*-matten de opname van zuurstof uit de lucht onmogelijk gemaakt. Tezamen leidt dit tot zuurstofgebrek in het water, wat nadelig is voor vissen en andere waterdieren. De plant kan roosters bij gemalen verstoppert en de doorstroming ernstig hinderen.^{3,8}

De volwassen plant (sporofyt) heeft horizontale vertakte stengels, waaraan wortels loodrecht omlaag in het water hangen.⁶ Aan de bovenkant van de stengels zitten schubvormige bladeren die dakpansgewijs in twee rijen zijn ingeplant. De bladeren van de plant zijn opgebouwd uit twee lobben. De onderste bladlob is vliezig en ligt op het water. De bovenste bladlob steekt omhoog en is stomp. Deze bladlob is blauwachtig groen van kleur en kleurt in de herfst rood. De bovenste bladlob heeft binnenin het blad een holte, waarin zich de cyanobacterie *Anabaena azollae* (*Nostoc azollae*) bevindt (zie paragraaf 3.2). Deze cyanobacterie kan stikstof uit de lucht binden. Wanneer de planten in het najaar afsterven, komt er een grote hoeveelheid stikstof vrij.^{6,14}

A. filiculoides plant zich voornamelijk vegetatief voort. Stengelfragmenten of kleine planten die meedrijven met het water kunnen eenvoudig uitgroeien tot nieuwe planten.^{3,9,14} Naast vegetatieve vermeerdering van *A. filiculoides*, kan er ook seksuele voortplanting plaatsvinden door het vormen van sporenkapsels.^{6,9,14} De plant verspreidt zich doordat stengelfragmenten, kleine plantjes of sporen(kapsels) met het water meedrijven, ook dieren en watervogels en knaagdieren dragen bij aan de verspreiding doordat fragmenten blijven haken in de vacht of veren.^{3,10}

De sporenkapsels bevinden op de onderste lob van het eerste blad van iedere zijstengel van de plant.⁶ In het algemeen zijn de sporenkapsels bestand tegen externe stressfactoren zoals droogte en temperaturen onder het vriespunt.^{11,12} De sporenkapsels bestaan uit één sorus (sporangienhoopje) die omgeven is door een dekvliesje. In de sporenkapsels worden sporen gevormd die in de herfst rijp zijn.⁶

A. filiculoides is een heterospor en produceert twee verschillende soorten sporen in twee verschillende soorten sporenkapsels (sporangia).^{6,9} In een megasporangium (1 mm) komt één vrouwelijke megaspore tot ontwikkeling. In een microsporangium (2 mm) ontwikkelen zich massulae (weefselklompjes), waarin telkens 64 zeer kleine (mannelijke) microsporen zijn ingebed.^{5,6}

De mannelijke en vrouwelijke haploïde gametofyten ontwikkelen zich binnenin het sporenkapsel en breken bij rijpheid door de sporewand heen. De vrouwelijke megaspore groeit uit tot een prothallium (voorkiem) dat aan de bovenkant uit de sporewand treedt en daar een archegonium (structuur die vrouwelijke gameten produceert) vormt. De vrijgekomen megaspore met het prothallium drijft op het water.^{6,9}

De massulae met de mannelijke microsporen bezitten ankervormige uitsteeksels (glochidia), waarmee ze zich aan de drijvende vrouwelijke megasporen kunnen vasthechten en kunnen binnendringen. Daarna kunnen de mannelijke gametofyt, gevormd door een miniem prothallium, binnen de microsporen de vrouwelijke gameten in het archegonium bevruchten.^{6,9} Het exosporium (de buitenste laag) van de sporen heeft een dunne wand en bevruchting vindt daarom in het water plaats.¹³

Na de bevruchting ontstaat een zygote die uitgroeit tot een sporofyt (een volwassen plant). Dit is de dominante diploïde levensfase van *A. filiculoides*.^{6,9} Zodra er 1 à 2 blaadjes zijn gevormd stijgen de planten op naar het wateroppervlak en groeien verder uit. Sporulatie wordt geïnduceerd door matvorming van *Azolla* sporofyten en vindt in gematigde streken plaats tussen de maanden mei en november.^{5,11}

3.2 Anabaena azollae (Nostoc azollae)

De kroosvaren *A. filiculoides* (zie paragraaf 3.1) leeft, net als andere *Azolla*-soorten, in symbiose met de cyanobacterie *A. azollae*.¹⁴ De classificatie en fylogenie van deze cyanobiont is omstreken en deze bacterie staat bekend onder de namen *A. azollae*, *Nostoc azollae*, *Anabaena variabilis* status *azollae* en *Trichormus azollae*.¹⁵ De cyanobiont, vanaf hier *A. azollae* genoemd, behoort tot de orde Nostocales, familie *Nostocaceae*, van het fyllum Cyanobacteria.¹⁶

Cyanobacteriën (voorheen ook wel blauwalgen genoemd) komen voor in zeer uiteenlopende milieus.¹⁷ Cyanobacteriën produceren het pigment chlorofyl-a en zijn hierdoor in staat tot fotosynthese.

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. Sommige cyanobacteriën produceren toxines die schadelijk zijn voor andere organismen,^{18,19,20} en kunnen bij algenbloei schadelijk zijn voor mens en milieu.

A. azollae leeft (extracellulair) als endofyt in gespecialiseerde bladholtes van *Azolla*-soorten.^{14,21} *A. azollae* vormt heterocysten, gespecialiseerde cellen waarin stikstof uit de lucht kan worden gefixeerd, wat vervolgens beschikbaar wordt gemaakt voor de plant. Hierdoor kan de kroosvaren zich snel vegetatief vermenigvuldigen. De cyanobacterie ondervindt voordeel van de symbiose doordat het verzekerd is van een constante aanvoer van voedingsstoffen en in een beschermde omgeving kan groeien.^{14,21,22,24}

A. azollae is gedurende de hele levenscyclus geassocieerd met de varen en wordt verticaal in de sporenkapsels naar de volgende generatie van de plant overgedragen.^{14,23,24} *A. azollae* heeft het vermogen om (geheel) autonoom te groeien verloren.^{24,25} Er zijn duidelijke patronen van co-specialisatie tussen de cyanobiont en de *Azolla* gastheersoort geïdentificeerd.²⁶ Het genoom van *A. azollae* is 5,4 Mb groot en bestaat uit één chromosoom en twee plasmiden.²⁴ Het genoom van *A. azollae* vertoont duidelijke tekenen van genoom reductie, met meerdere huishoudgenen die zijn verloren of gepseudogeniseerd (31% van het genoom bestaat uit pseudogenen).²⁴

4. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens genetisch gemodificeerde (gg-) *A. filiculoides* en gg-*A. azollae* te genereren om de symbiotische relatie tussen de Grote kroosvaren en de cyanobacterie te onderzoeken. De werkzaamheden die in de onderhavige vergunningaanvraag worden beschreven kunnen verdeeld worden in vier handelingen:

1. Genetische modificatie van de cyanobacterie *A. azollae* (met behulp van gg-*Escherichia coli*)
2. Genetische modificatie van de kroosvaren *A. filiculoides* (met behulp van gg-*Rhizobium radiobacter*)
3. Testen van het effect van oligonucleotiden op het metabolisme van de gg-kroosvaren
4. Kweken van al dan niet genetisch gemodificeerde *A. filiculoides* planten in associatie al dan niet genetisch gemodificeerde *A. azollae*

Hieronder worden de werkzaamheden nader toegelicht.

1: Genetische modificatie van cyanobacterie *A. azollae* (in associatie met *A. filiculoides*)

De aanvrager is voornemens de cyanobacterie *A. azollae* door middel van conjugatie met gg-*E. coli* genetisch te modificeren in een ML-I werkrimte. Dit gebeurt in aanwezigheid van *A. filiculoides* planten, omdat *A. azollae* niet zonder de plant kan overleven. Met betrekking tot de gebruikte methode en de plasmiden die de aanvrager voornemens is toe te passen wordt in de vergunningaanvraag verwezen naar een artikel van Masukawa *et al.* (2012).²⁷ In dit artikel wordt een triparentale genoverdracht methode beschreven waarbij een helper plasmide (pRL623) en een conjugatieve plasmide (RP4) worden gebruikt om een *Anabaena* stam genetisch te modificeren.

Voor de genetische modificatie van *A. azollae* wordt de gg-*E. coli* 12 uur in afgesloten buizen geïncubeerd met sporenkapsels van *A. filiculoides* of met de toppen ('shoot apices') van vegetatief groeiende *A. filiculoides*. Vervolgens wordt er gewassen met vloeibaar medium. Daarna wordt het plantmateriaal van *A. filiculoides* overgebracht naar selectief mineraal medium (zonder koolstofbron voor heterotrofe *E. coli*, en met antibiotica), en wordt *A. filiculoides* met gg-*A. azollae* geselecteerd. Uit het plantmateriaal kunnen vervolgens sporofyten van *A. filiculoides* met daarin aanwezige gg-*A. azollae* regenereren.

2: Genetische modificatie van *A. filiculoides* planten (in associatie met symbiont *A. azollae*)

De aanvrager is voornemens *A. filiculoides* planten genetisch te modificeren door middel van dipinoculatie met gg-*R. radiobacter* (onc-) in een ML-I werkruimte. Hiervoor worden wildtype sporenkapsels en sporofyten met de cyanobacterie verzameld. De sporofyten van *A. filiculoides* worden met enzymen behandeld om de celwand te degraderen. In een veiligheidskabinet klasse II worden de sporofyten en sporenkapsels in afgesloten buizen ondergedompeld in een gg-*R. radiobacter* suspensie. Daarna wordt er met vloeibaar medium gewassen in een veiligheidskabinet klasse II. Vervolgens worden de sporofyten en sporenkapsels opgekweekt in een gesloten groeicontainer met selectief mineraal medium (zonder stikstofbron voor heterotrofe *R. radiobacter*), die in een plastic bak geplaatst worden.

3: Het testen van oligonucleotiden voor hun effect op het metabolisme van de gg-kroosvaren

De aanvrager is voornemens in een ML-I werkruimte het effect van verschillende oligonucleotiden ('small interfering' RNA's, 'single guide' RNA's, microRNA's) op het metabolisme van de Grote kroosvaren te onderzoeken. Hierbij worden gg-*A. filiculoides* planten of delen van de planten ondergedompeld in een oplossing met 'antisense' nucleotiden.

4: Kweken van (gg-) *A. filiculoides* kroosvaren in associatie met (gg-) *A. azollae*

De aanvrager is voornemens de al dan niet genetisch gemodificeerde *A. filiculoides* waterplanten in associatie met al dan niet genetisch gemodificeerde cyanobacterie te kweken in een PCM-I kweekcel. De (gg-)kroosvaren met (gg-)cyanobacteriën bevinden zich in gesloten containers, die in een plastic bak geplaatst worden. Het volume per cultuur is 500 ml en het totale volume van alle culturen is 4 L.

Samenvattend is de aanvrager voornemens de kortdurende werkzaamheden (onderdelen 1 t/m 3) in een ML-1 werkruimte en het kweken (onderdeel 4) in een PCM-I kweekcel uit te voeren.

Bij de bovenstaande werkzaamheden is de aanvrager voornemens de volgende voorzorgsmaatregelen te treffen:

- De al dan niet genetisch gemodificeerde *A. filiculoides* waterplanten in associatie met de al dan niet genetisch gemodificeerde cyanobacterie bevinden zich in gesloten containers, die in een plastic bak geplaatst worden;
- Het genetisch modificeren en wassen van de waterplanten vindt plaats in een veiligheidskabinet klasse II.

5. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over de kroosvaren *A. filiculoides*. Wel heeft zij in het verleden geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde planten van de kroossoorten *Lemna gibba*, *Lemna minor*, *Spirodela polyrhiza*, *Spirodela punctata* en *Wolffia globosa*.²⁸ De COGEM adviseerde bij werkzaamheden met gg-planten van deze vijf kroossoorten maatregelen om insectenbestuiving en windbestuiving, en verspreiding van kroos, zaden en reproductieve plantendelen te voorkomen. Dit betekende onder andere dat morsen van het water uit de kweekbakken waar het kroos in gekweekt werd, voorkomen diende te worden evenals het (onbedoeld) afvoeren van kweekwater door de gootsteen. De COGEM benadrukte daarom het belang van het inactiveren/autoclaveren van biologisch afval met reproductieve plantendelen (waaronder het kweekwater). De COGEM concludeerde dat er geen risico's voor mens en milieu waren indien de werkzaamheden met deze kroossoorten op inperkingsniveau PC-I plaatsvonden met als aanvullende maatregel dat bloei in afgesloten bakken plaats diende te vinden.²⁸

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over de cyanobacterie *A. azollae*. In tweede eerdere adviezen heeft de COGEM geadviseerd om twee stammen die tot het geslacht *Anabaena* behoren, *Anabaena variabilis* stam ATCC 29413 (=PCC 7937) en *Anabaena* sp. PCC 7120, in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en op te nemen in Bijlage 2 lijst A1 van de Regeling ggo.^{29,30}

6. Overweging en advies

6.1. Classificatie *A. azollae*

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.

Er zijn bij de COGEM geen publicaties bekend die *A. azollae* relateren aan pathogeniteit voor mens, dier of plant. Gezien de leefwijze van deze cyanobacterie acht de COGEM het ook niet aannemelijk dat zij pathogeen is voor mens, dier of plant. *A. azollae* is een symbiont van kroosvarens van het geslacht *Azolla*. De genoomsequentie van *A. azollae* is geanalyseerd en er zijn geen sequenties die wijzen op toxine-productie of virulentiefactoren.²⁴ Alles in overweging nemende, adviseert de COGEM *A. azollae* (*N. azollae*) als apathogeen in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en op te nemen in Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

6.2 Inschaling werkzaamheden

Bij werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) onder 'Ingeperkt Gebruik' dienen maatregelen genomen te worden om ontsnapping naar het milieu te voorkomen. De benodigde maatregelen worden bepaald door de aard van de gebruikte organismen en de inrichtings- en werkvoorschriften behorende bij het inperkingsniveau van de werkruimte.

De cyanobacterie *A. azollae* kan niet overleven in afwezigheid van de kroosvaren *A. filiculoides*. Dit betekent dat bij de voorgenomen werkzaamheden rekening gehouden moet worden met zowel de aanwezigheid van al dan niet genetisch gemodificeerde *A. azollae* als al dan niet genetisch gemodificeerde *A. filiculoides*.

A. filiculoides plant zich voornamelijk vegetatief voort, maar er kan ook seksuele voortplanting plaatsvinden door het vormen sporenkapsels waarin vrouwelijke megasporen of mannelijke microsporen worden geproduceerd. De plant verspreidt zich doordat stengelfragmenten, kleine plantjes of sporen(kapsels) met het water meedrijven. Op basis van de biologische eigenschappen van *A. filiculoides*, wijst de COGEM op het belang van het voorkomen van uitsleep van vegetatieve en generatieve voortplantingsstructuren (sporenkapsels, microsporen, macrosporen, diploïde zygote e.d.) van gg-*A. filiculoides* vanuit de werkruimte naar het milieu bij de voorgenomen werkzaamheden.

De COGEM adviseert om de werkzaamheden met (gg-) *A. filiculoides* in associatie met (gg-) *A. azollae* op inperkingsniveau I (ML-I dan wel PCM-I) uit te voeren. De COGEM adviseert bij de voorgenomen werkzaamheden de volgende aanvullende maatregelen en werkvoorschriften te hanteren:

- De al dan niet genetisch gemodificeerde *A. filiculoides* waterplanten in associatie met de al dan niet genetisch gemodificeerde cyanobacterie bevinden zich in gesloten containers, die in een plastic bak geplaatst worden;
- Het genetisch modificeren en wassen van de waterplanten dienen uitgevoerd te worden in een veiligheidskabinet klasse II.

In het vloeibare kweekmedium kunnen vegetatieve en generatieve structuren (sporenkapsels, microsporen, macrosporen, diploïde zygote, e.d.) van (gg-) *A. filiculoides*, en mogelijk ook (gg-) *A. azollae* cyanobacteriën aanwezig zijn. De COGEM wijst erop dat de generatieve structuren van gg-*A. filiculoides* klein en niet waarneembaar met het blote oog zijn. Conform de standaardwerkvoorschriften die gelden voor inperkingsniveau I dient al het biologische afval (waaronder het kweekmedium en plantenresten) geïnactiveerd te worden voordat het de inrichting verlaat. Het kweekmedium zou bijvoorbeeld geïnactiveerd kunnen worden door dit te autoclaveren. Verder dient materiaal (bijv. groeicontainers) dat in aanraking is geweest met genetisch gemodificeerde organismen geïnactiveerd of gedesinfecteerd te worden voordat het wordt gewassen, hergebruikt of als afval afgevoerd.³¹

De COGEM acht het risico voor mens en milieu verwaarloosbaar klein wanneer de voorgenomen werkzaamheden op het hierboven genoemde inperkingsniveau en met inachtneming van de vermelde aanvullende voorschriften worden uitgevoerd.

6.3 Aanvullende opmerking

De COGEM merkt op, dat op basis van de informatie in de onderhavige vergunningaanvraag niet exact valt op te maken welke plasmiden de aanvrager voornemens is te gebruiken bij het genetisch modificeren van de cyanobacterie *A. azollae*. In het 2.8 verzoek heeft de aanvrager een lijst met de te

gebruiken plasmiden aangeleverd, maar voor de gebruikte methode en plasmiden refereert de aanvrager naar een artikel van Masukawa *et al.* (2012).²⁷ Hierin staat het plasmide RP4 genoemd, de COGEM wijst er op dat dit plasmide niet vermeld staat op 'Bijlage 2 lijst A2 van veilige vectoren'.³¹ Bij het genetische modificeren van *A. azollae*, is het mogelijk dat dit plasmide naar de gg-*A. azollae* overgedragen zou kunnen komen. Het RP4 plasmide kan mogelijk in gg-*A. azollae* repliceren, waardoor het genmobiliserend vermogen in gg-*A. azollae* wordt verhoogd. Dit heeft echter geen effect op het inperkingsniveau, omdat de genomen maatregelen verspreiding van de gg-bacteriën (met of zonder RP4 plasmide) voorkomen.

Referenties

1. Soortenbank.nl. Grote kroosvaren (*Azolla filiculoides*). http://www.soortenbank.nl/soorten.php?soortengroep=flora_nl_v2&id=211&menuentry=soorten (bezocht :11 mei 2020)
2. The Plant list. A working list of all plant species. *Azolla*. <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/P/Salviniaceae/Azolla/> (bezocht: 20 mei 2020)
3. Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit. Grote kroosvaren. *Azolla filiculoides*. <https://www.nvwa.nl/documenten/plant/planten-in-de-natuur/exoten/risicobeoordelingen/grote-kroosvaren-azolla-filiculoides> (bezocht: 11 mei 2020)
4. Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit. Overzicht soorten invasieve waterplanten. <https://www.nvwa.nl/onderwerpen/invasieve-exoten/invasieve-planten/invasieve-oever--en-waterplanten/overzicht-soorten-invasieve-waterplanten> (bezocht: 14 mei 2020)
5. Janes (1998a). Growth and Survival of *Azolla filiculoides* in Britain. I. Vegetative Reproduction. New Phytol. 367-375
6. Weeda EJ *et al.* (1999). Nederlandse Oecologische Flora. Wilde planten en hun relaties. Kroosvarenfamilie/Azollaceae. KNNV-uitgeverij / IVN.
7. FLORON verspreidingsatlas Vaatplanten. *Azolla filiculoides* Lam. Grote kroosvaren. <https://www.verspreidingsatlas.nl/0128#> (bezocht :11 mei 2020)
8. Q-Bank factsheet. *Azolla filluculides* Lam. Grote kroosvaren. https://q-bankplants.eu/Factsheets/Azolla_filiculoides_NL.pdf (bezocht: 11 mei 2020)
9. Azolla: Gametophyte and Phylogeny | Botany <http://www.biologydiscussion.com/pteridophytes/azolla-gametophyte-and-phylogeny-botany/73913> (bezocht: 13 mei 2020)
10. CABI. Invasive Species Compendium. *Azolla filiculoides* (water fern) <https://www.cabi.org/isc/datasheet/8119#tomeansOfMovementAndDispersal> (bezocht: 14 mei 2020)
11. Becking JH (1987). Endophyte transmission and activity in the *Anabaena-Azolla* association. Plant and Soil 100: 183-212
12. Janes R (1998b). Growth and survival of *Azolla filiculoides* in Britain. II. Sexual reproduction. New Phytol. 377-384
13. Mahabalé TS (1968). Spores and pollen grains of water plants and their dispersal. Rev. Palaeobot Palynol. 7: 285-296

14. Peters GA & Meeks JC (1989). The *Azolla-Anabaena* symbiosis: basic biology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 193–210.
15. Pereira AL & Vasconcelos V (2014). Classification and phylogeny of the cyanobiont *Anabaena azollae* Strasburger: an answered question? *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64: 1830-1840
16. List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN). Classification of Cyanobacteria. <http://www.bacterio.net/-classifcyano.html> (bezocht: 14 mei 2020)
17. 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
18. Cyanosite for research on cyanobacteria. <http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/cyanotox/toxiccyanos.html> (bezocht: 13 mei 2020)
19. 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
20. Dittmann E *et al.* (2013). Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiol. Rev.* 37: 23–43
21. Dijkhuizen LW *et al.* (2018). Is there foul play in the leaf pocket? The metagenome of floating fern *Azolla* reveals endophytes that do not fix N₂ but may denitrify. *New Phytol.* 217: 453-466
22. Parente T *et al.* (2017). Culture of the cyanobiont *Anabaena azollae* Strasburger: Is it possible? *Austin Biol.* 2: 1023
23. Zheng W *et al.* (2009). Cellular responses in the cyanobacterial symbiont during its vertical transfer between plant generations in the *Azolla microphylla* symbiosis. *New Phytol.* 181: 53-61
24. Ran L *et al.* (2010). Genome erosion in a nitrogen-fixing vertically transmitted endosymbiotic multicellular cyanobacterium. *PLoS One.* 5: e11486
25. Tang LF *et al.* (1990). Limited Multiplication of Symbiotic Cyanobacteria of *Azolla* spp. on Artificial Media. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 36-23-3636
26. Li FW *et al.* (2018). Fern genomes elucidate land plant evolution and cyanobacterial symbioses. *Nat. Plants* 4: 460-472
27. Masukawa H *et al.* (2012). Characterization of carotenogenesis genes in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Methods Mol. Biol.*
28. COGEM (2008). Werkzaamheden met vijf genetisch gemodificeerde kroossoorten. COGEM advies CGM/080710-02
29. COGEM (2016). Classificatie cyanobacterie *Anabaena variabilis* stam ATCC 29413. COGEM advies CGM/160816-01
30. COGEM (2020). Pathogeniteitsclassificatie van de cyanobacteriestam *Anabaena* sp. PCC 7120. COGEM advies CGM/200225-01
31. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/> (bezocht: 13 mei 2020)