

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

DATUM 28 september 2020
KENMERK CGM/200928-01
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) *Tetraselmis striata* Virus-N1 (TsV-N1)

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier 'Classification of the construction of recombinant microalgae *Tetraselmis striata* using the infecting virus TsV-N1' (IG 20-168_2.8-000), ingediend door Wageningen University & Research deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van ggo-werkzaamheden met *Tetraselmis striata* Virus-N1 (TsV-N1) in combinatie met de micro-alg *Tetraselmis striata*. De aanvrager is voornemens *T. striata* genetisch te modificeren door deze micro-alg te infecteren met een genetisch gemodificeerde (gg-) TsV-N1. De aanvrager wil met deze experimenten het infectiemechanisme van TsV-N1 bestuderen.

TsV-N1 is voor het eerst beschreven in 2007. Het virus is geïsoleerd uit een Noors fjord en de Zwarte Zee. De gastheer van TsV-N1, de micro-alg *T. striata*, maakt onderdeel uit van het aquatisch milieu. Het virus TsV-N1 is afhankelijk van zijn gastheer *T. striata* om nieuwe virusdeeltjes te kunnen vormen. De eerste 24 uur na infectie is TsV-N1 latent aanwezig in *T. striata*, vijf dagen na infectie vindt lysis van *T. striata* plaats en komen er nieuwe virusdeeltjes vrij. De assemblage van TsV-N1 virusdeeltjes vindt in zijn geheel plaats in de celkern van de gastheer.

Mede gezien de eigenschappen van TsV-N1 en *T. striata* en het feit dat het aquatische organismen zijn, adviseert de COGEM de voorgenomen ggo-werkzaamheden op inperkingsniveau I in te schalen en stemt zij in met de door de aanvrager voorgestelde aanvullende maatregelen. 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

Inschaling van ggo-werkzaamheden met *Tetraselmis striata* Virus-N1 (TsV-N1) en de micro-alg *Tetraselmis striata*

COGEM advies CGM/200928-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van Wageningen University & Research (IG 20-168) is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van ggo-werkzaamheden met *Tetraselmis striata* Virus-N1 (TsV-N1) in combinatie met de micro-alg *Tetraselmis striata*. De aanvrager verzoekt werkzaamheden, waarbij *Tetraselmis striata* genetisch gemodificeerd wordt door deze micro-alg te infecteren met een genetisch gemodificeerde (gg-) TsV-N1 (die een fluorescerend marker gen tot expressie brengt), op ML-I niveau uit te mogen voeren. De aanvrager is voornemens met deze experimenten het infectiemechanisme van TsV-N1 te bestuderen.

2. Beschrijving van de organismen

2.1 *Tetraselmis striata* Virus-N1 (TsV-N1)

Tetraselmis striata Virus-N1 (TsV-N1) is een micro-alg (eukaryotisch fytoplankton) infecterend virus met een dubbelstrengs DNA (dsDNA) genoom.⁷ In de literatuur is beschreven dat TsV-N1 geïsoleerd is uit een Noors fjord en de Zwarte Zee.^{1,2,7} TsV-N1 is voor het eerst geïsoleerd en beschreven in 2007 onder de naam TvV (*Tetraselmis viridis* infecterend).⁷ Nadere genetische karakterisering heeft de gastheer geïdentificeerd als zijnde de micro-alg *Tetraselmis striata* (familie *Chlorodendraceae*, fyllum *Chlorophyta*) in plaats van *T. viridis*. De naam van het virus is om deze reden gewijzigd van TvV in TsV.⁷

Micro-algen infecterende virussen zijn overwegend gastheerspecifiek en infecteren een enkele soort of bepaalde stammen binnen een soort (intraspecies specifiek).^{3,7} Pagarete *et al.* (2015) heeft met behulp van een infectiviteitsassay het gastheerbereik van TsV-N1 bestudeerd en naast *T. striata* zeven andere *Chlorophyta* algenstammen getest op gevoeligheid voor TsV-N1 infectie.⁷ Hieruit kwam naar voren dat met uitzondering van *T. striata* de onderzochte *Chlorophyta* soorten resistent zijn voor TsV-N1 infectie.⁷ Een studie van Stepanova (2016) toont aan dat TsV ook de micro-alg *Dunaliella viridis* (familie *Dunaliellaceae*, fyllum *Chlorophyta*) kan infecteren.¹

De meeste dsDNA virussen die algen infecteren, behoren binnen de monofyletische groep van de ‘Nucleocytoplasmic Large dsDNA virussen’ (NCLDV) tot de familie *Phycodnaviridae*. De NCLDV groep omvat tenminste acht virusfamilies van eukaryotische virussen met grote DNA genomen (van 100 kilobasen (kb) tot meer dan 2,5 megabasen).^{4,5,7}

TsV-N1 is taxonomisch (nog) niet ingedeeld door de ‘International Committee on Taxonomy of Viruses’ (ICTV). De eigenschappen van TsV-N1 verschillen sterk van andere bekende algenvirussen. Pagarete *et al.* (2015) laat zien dat TsV-N1 fylogenetisch gezien te onderscheiden is van de *Phycodnaviridae*.⁷ De diameter van TsV-N1 is 60 nm, kleiner dan het kleinste phycodnavirus (100 nm

in diameter).⁷ En sequentie-analyse (waarbij 86% van het TsV-N1 genoom is geanalyseerd) heeft uitgewezen dat het genoom van TsV-N1 (~31 kb) voor ‘maar’ 33 ‘open reading frames’ (ORF’s) codeert, terwijl phycodnavirussen omvangrijke dsDNA genomen bezitten (van 100 tot 560 kbp) die coderen voor 100 of meer eiwitten.^{6,7} De vermeende functie van 8 van de 33 TsV-N1 ORF’s kon worden geïdentificeerd; het merendeel codeert voor eiwitten die betrokken zijn bij de verschillende stadia van het virale replicatieproces.⁷

Vrijwel alle virussen die eukaryotische algen infecteren zijn lytisch en een infectie leidt tot de dood van de gastheer.^{3,7} Nadat TsV-N1 zijn gastheer *T. striata* heeft geïnfecteerd, is het virus 1 tot 24 uur latent aanwezig. Vijf dagen na TsV-N1 infectie is viraal-geïnduceerde lysis van *T. striata* culturen duidelijk waarneembaar.⁷ Uit elke geïnfecteerde cel komen rond de 4×10^4 nieuwe virusdeeltjes vrij (de zogenaamde ‘burst size’). De assemblage van TsV-N1 virusdeeltjes vindt in zijn geheel plaats in de celkern van de gastheer.⁷

2.2 Micro-alg *Tetraselmis striata*

De gastheer van TsV-N1, de algensoort *T. striata*, behoort tot het genus *Tetraselmis* (familie *Chlorodendraceae*, orde *Chlorodendrales*, fylum *Chlorophyta*). Tot dusverre zijn ongeveer 26 soorten beschreven.¹³ 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).^{13,8,9}

De algen uit dit genus zijn eencellige, eukaryote flagellaten en hebben een diameter tussen de 6 en 10 μm .¹⁰ Zij bezitten 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.^{11,12} *Tetraselmis* algen bevatten in het algemeen één chloroplast.¹³ Deze micro-algen kunnen zich asexueel vermeerderen, seksuele reproductie is nooit waargenomen.^{11,13}

Er wordt al enige tijd onderzoek gedaan naar *T. striata*, zoals naar de optimale groeicondities,⁸ structurele compositie (zoals onderzoek naar membraaneiwitten,¹² of naar de theca en ‘scales’^{14,15}) en productiecapaciteit.^{16,17,18} 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 de co-cultivering.¹⁹ Van *T. striata* is het genoom gepubliceerd.¹⁰ *Tetraselmis*soorten worden veelvuldig gebruikt als voeding in aquacultuur (voor onder andere weekdieren, garnalen en vissen in verschillende ontwikkelingsstadia), maar ook als voedselingsrediënt voor diervoeder en als smaakmaker voor zeevruchten.^{9,20,21,22,23,24}

3. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over TsV-N1, recent heeft zij de micro-alg *T. striata* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.⁹

4. Overweging en advies

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van ggo-werkzaamheden met *Tetraselmis striata* Virus-N1 (TsV-N1) in combinatie met de micro-alg *Tetraselmis striata*. De aanvrager verzoekt werkzaamheden waarbij *T. striata* genetisch gemodificeerd wordt door deze micro-alg te infecteren met een gg-TsV-N1 (die een fluorescerend marker gen tot expressie brengt), op ML-I niveau uit te mogen voeren.

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 micro-alg *T. striata* maakt onderdeel uit van het aquatisch milieu. Het virus TsV-N1 is afhankelijk van de aanwezigheid van zijn gastheer *T. striata* om nieuwe virusdeeltjes te kunnen vormen. De eerste 24 uur na infectie is TsV-N1 latent aanwezig, vijf dagen na infectie vindt lysis van *T. striata* plaats en komen er nieuwe virusdeeltjes vrij. De assemblage van TsV-N1 virusdeeltjes vindt in zijn geheel plaats in de celkern van de gastheer.

Sommige algensoorten behorende tot het genus *Tetraselmis* kennen tijdens hun levenscyclus een cyste-stadium. Deze cysten zijn in het algemeen goed bestand tegen uitdroging en daardoor lastig te inactiveren. Een geschikte methode voor inactivatie is bijvoorbeeld autoclaving. De COGEM merkt op dat zij niet kan uitsluiten dat *T. striata* eveneens tijdens zijn levenscyclus cysten kan vormen.

Tijdens de voorgenomen werkzaamheden kan materiaal (waaronder kweekbakken en kweekmedium) besmet raken met gg-TsV-N1 en (mogelijk met cysten van) gg-*T. striata*. Conform de standaardwerkvoorschriften die gelden voor inperkingsniveau I dient materiaal dat in aanraking is geweest met gg-TsV-N1 en gg-*T. striata* geïnactiveerd of gedesinfecteerd te worden voordat het gewassen, hergebruikt of als afval wordt afgevoerd.²⁵ De aanvrager is voornemens tijdens de voorgenomen werkzaamheden handschoenen te dragen, handelingen uit te voeren in een veiligheidsklasse II kabinet en al het gegenereerde afval met behulp van autoclaving te inactiveren.

Alles in ogenschouw nemende, waaronder de eigenschappen van TsV-N1 en *T. striata* en het feit dat het aquatische organismen zijn, adviseert de COGEM de voorgenomen ggo-werkzaamheden op inperkingsniveau I in te schalen en stemt zij in met de door de aanvrager voorgestelde aanvullende maatregelen. Onder de genoemde voorwaarden acht de COGEM de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Stepanova OA (2016). Black Sea algal viruses. Russ. J. Mar. Biol. 42: 123-127
2. Gregory AC *et al.* (2019). Marine DNA Viral Macro- and Microdiversity from Pole to Pole. Cell. 177: 1109-1123
3. Short SM (2012). The ecology of viruses that infect eukaryotic algae. Environ. Microbiol. 14: 2253-2271

4. Koonin EV & Yutin N (2019). Evolution of the Large Nucleocytoplasmic DNA Viruses of Eukaryotes and Convergent Origins of Viral Gigantism. *Adv. Virus Res.* 103: 167-202
5. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). ICTV 9th Report (2011). Phycodnaviridae. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/123/phycodnaviridae
6. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). ICTV 9th Report (2011). Phycodnaviridae. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/123/phycodnaviridae
7. Pagarete A *et al.* (2015). Tsv-N1: A Novel DNA Algal Virus that Infects *Tetraselmis striata*. *Viruses*. 7: 3937-3953
8. 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
9. COGEM (2020). Pathogeniteitsclassificatie van de micro-alg *Tetraselmis striata*. COGEM advies CGM/200421-01
10. 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
11. 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>
12. Gödel S *et al.* (2000). Flagellar membrane proteins of *Tetraselmis striata* Butcher (Chlorophyta). *Protist* 151: 147-159
13. 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
14. Becker D *et al.* (1990). Isolation, purification, and characterization of flagellar scales from the green flagellate *Tetraselmis striata* (Prasinophyceae). *Protoplasma* 156: 103-112
15. 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
16. 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
17. 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
18. Boopathy AB *et al.* (2020). Biomass and lipid production potential of an Indian marine algal isolate *Tetraselmis striata* BBRR1. *Energies* 13, 3421
19. 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
20. Garcíá JL *et al.* (2017). Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. *Microb. Biotechnol.* 10: 1017-1024

21. 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
22. 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
23. 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
24. Hemaiswarya S *et al.* (2011). Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 1737-1746
25. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013.
<https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/> (bezocht: 18 september 2020)