

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

DATUM 20 januari 2021
KENMERK CGM/210120-03
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie van de micro-alg *Penium margaritaceum*

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,


Naar aanleiding van een vergunningaanvraag van Wageningen Universiteit en Research (IG 20-300_2.13-000) is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de zoetwater micro-alg *Penium margaritaceum*, en de plaatsing hiervan op Lijst A1 van Bijlage 2 van de Regeling ggo. De COGEM deelt u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de micro-alg *Penium margaritaceum*, en de plaatsing hiervan op Lijst A1 van Bijlage 2 van de Regeling ggo.

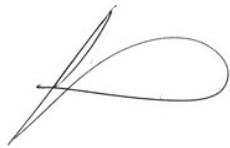
Algen worden voor veel doeleinden toegepast, onder meer in de farmaceutische, voedings- en cosmetische industrie. *P. margaritaceum* is de typesoort binnen dit genus en wordt als modelorganisme gebruikt voor onderzoek naar celwandontwikkeling, het secretoom en stressrespons.

De COGEM heeft geen aanwijzingen gevonden voor pathogeniteit van *P. margaritaceum*. Er wordt al meer dan 15 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 *P. margaritaceum* 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. Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's,
DG Milieu en Internationaal
Dr. J. Westra, Hoofd Bureau GGO
Dr. C.P.E. van Rijn, Bureau GGO

Pathogeniteitsclassificatie van de micro-alg *Penium margaritaceum*

COGEM advies CGM/210120-03

Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van Wageningen Universiteit en Research (IG 20-300), is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de algensoort *Penium margaritaceum*, 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 níet, 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 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.

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 ééncellig 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

Penium margaritaceum

De eukaryote algensoort *P. margaritaceum* behoort tot de klasse Zygnematophyceae en het genus *Penium* (familie Piniaceae, orde Desmidiales).^{7,8} De Zygnematophyceae wordt beschouwd als de meest recente gemeenschappelijke voorouder van algen en landplanten.^{9,10,11} Het genus *Penium* omvat meer dan dertig soorten.⁷ Alle soorten uit dit genus worden aangetroffen in zoetwater.⁷ Algen uit dit genus zijn cilindervormige unicellulaire ‘desmids’.¹² Deze algen bestaan uit twee identieke semi-cellen die beide een chloroplast bevatten en 125-225 µm lang en 17 µm breed zijn.^{9,13} Tussen deze semi-cellen in bevindt zich de nucleus.^{9,13} Deze micro-algen vermeerderen zich voornamelijk door seksuele reproductie waarbij conjugatie optreedt.^{9,14} In mindere mate reproduceren zij zich door oögamie.¹⁰

P. margaritaceum is de typesoort van het genus *Penium* en wordt als modelorganisme gebruikt voor studies naar celwandontwikkeling.^{Error! Bookmark not defined.15,16,19} De celwand van *P. margaritaceum* is in opbouw vergelijkbaar met de complexe celwand van landplanten en scheidt slijmerige polysacchariden uit.^{17,18} Vanwege het eerder genoemde gemeenschappelijke voorouderschap van planten en algen wordt *P. margaritaceum* vaak bestudeerd om inzicht te krijgen in landplantevolucie.^{13,19} Verder wordt veel onderzoek gedaan naar het secretoom,^{15,20,21} de extracellulaire polysacchariden (EPS) secretie^{12,22} en de abiotische stress respons¹⁰ van *P. margaritaceum*. Het gebruik van genetische modificatie technieken in *P. margaritaceum* is ook beschreven.⁹ De genomsequentie van *P. margaritaceum* is bepaald.⁹

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over algen die tot het geslacht *Penium* behoren. Het genus wordt ook niet genoemd in een COGEM onderzoeksrapport over de milieurisicobeoordeling bij genetische modificatie van (industriële relevante) algen.²³ De COGEM heeft in het verleden vaker geadviseerd over de pathogeniteitsklasse van verschillende soorten micro-algen, en alle ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.^{24,25,26,27,28,29}

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 anderszins moeilijk worden opgemerkt als zij niet erg uitgesproken van aard zijn en er niet gericht naar wordt gezocht. Anderszijds 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 *P. margaritaceum* komt voor in zoetwater, en behoort tot een genus met meer dan dertig soorten. Bij de COGEM zijn geen publicaties bekend waaruit blijkt dat één van deze soorten binnen het genus *Penium* pathogene of toxische componenten produceert. *P. margaritaceum* is het meest bekend binnen dit genus omdat het als modelorganisme in onderzoek naar celwandontwikkeling, het secretoom en stressrespons gebruikt wordt.

Er wordt al lange tijd, meer dan 15 jaar, onderzoek gedaan met deze algensoort. Voor zover bij de COGEM bekend, is er nooit melding gemaakt van pathogeniteit of schadelijke effecten van *P. margaritaceum*. Ook in IOC-UNESCO's lijst van schadelijke micro-algen is *P. margaritaceum* afwezig.³⁰

Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat *P. margaritaceum* apathogeen is, en adviseert zij de micro-alg in deze pathogeniteitsklasse 1 in te delen. Tevens is zij van oordeel dat *P. margaritaceum* 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: 14 januari 2021)
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. Cunnings 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. Guiry MD (2013). Taxonomy and nomenclature of the Conjugatophyceae (= Zygnematophyceae). *Algae*, 28(1), 1-29.
8. Catalogue of Life (2006). Annual checklist; taxonomic tree. www.catalogueoflife.org (bezocht op: 12 januari 2021).
9. Jiao C *et al.* (2020). The *Penium margaritaceum* Genome: Hallmarks of the Origins of Land Plants. *Cell*.
10. Sørensen, I *et al.* (2014). Stable transformation and reverse genetic analysis of *Penium margaritaceum*: a platform for studies of charophyte green algae, the immediate ancestors of land plants. *The Plant Journal*, 77, 339-351.
11. Cheng S *et al.* (2019). Genomes of subaerial Zygnematophyceae provide insights into land plant evolution. *Cell*, 179, 1057-1067.
12. Domozych DS *et al.* (2020). Endomembrane architecture and dynamics during secretion of the extracellular matrix of the unicellular charophyte, *Penium margaritaceum*. *J. Exp. Bot.* 71: 3323-3339
13. Rydahl *et al.* (2015). *Penium margaritaceum* as a model organism for cell wall analysis of expanding plant cells. In *Plant Cell Expansion* (pp. 1-21). Humana Press, New York, NY.
14. Tsuchikane Y *et al.* (2011). Conjugation processes of *Penium margaritaceum* (Zygnemophyceae, Charophyta). *Phycological research*, 59, 74-82.
15. Domozych DS *et al.* (2014). Pectin metabolism and assembly in the cell wall of the charophyte green alga *Penium margaritaceum*. *Plant. Physiol.* 165, 105-118.
16. Becker B & Marin B. (2009). Streptophyte algae and the origin of embryophytes. *Ann. Bot.*, 103, 999-1004.
17. Domozych DS *et al.* (2007). The structure and function of charophycean cell walls. I Pectins of *Penium margaritaceum*. *Protoplasma* 239, 99-115
18. Sørensen I *et al.* (2011). The charophycean green algae provide insights into the early origins of plant cell walls. *Plant J.* 68, 201-211.
19. Domozych DS *et al.* (2011). Cell Wall Growth and Modulation Dynamics in a Model Unicellular Green Alga--*Penium margaritaceum*: Live Cell Labeling with Monoclonal Antibodies. *J. of Bot.*, 2011.
20. Domozych D *et al.* (2016). Charophytes: evolutionary giants and emerging model organisms. *Front. Plant. Sci.*, 7, 1470.
21. Ruiz-May E *et al.* (2018). The secretome and N-glycosylation profiles of the charophycean green alga, *Penium margaritaceum*, resemble those of embryophytes. *J. Proteomes*, 6, 14.
22. Domozych DS *et al.* (2005). The extracellular polymeric substance of the green alga *Penium margaritaceum* and its role in biofilm formation. *Biofilms*, 2, 129.
23. Enzing C *et al.* (2012). Algae and genetic modification. Research, production and risks. COGEM onderzoeksrapport CGM 2012-05
24. COGEM (1999). Advies kennisgeving GGO 99-019. COGEM advies CGM/990429-09
25. COGEM (2001). Advies kennisgeving GGO 99-019/2. COGEM advies CGM/011214-03
26. COGEM (2011). Classificatie van negen algensoorten. COGEM advies CGM/110706-01

27. COGEM (2016). Pathogeniteitsclassificatie algensoorten *Nannochloropsis gaditana* en *Nannochloropsis oceanica*. COGEM advies CGM/160504-01
28. COGEM (2020). Pathogeniteitsclassificatie van de micro-alg *Aurantiochytrium limacinum*. COGEM advies CGM/200128-02
29. COGEM (2020). Pathogeniteitsclassificatie van de micro-alg *Tetraselmis striata*. COGEM advies CGM/2000421-01
30. IOC-UNESCO. Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae
<http://www.marinespecies.org/hab/> (bezocht: 12 januari 2021)