

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw S.A.M. Dijksma
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 16 augustus 2016
KENMERK CGM/160816-01
ONDERWERP Advies classificatie cyanobacterie *Anabaena variabilis* ATCC 29413

Geachte mevrouw Dijksma,

Naar aanleiding van een verzoek van de Universiteit van Amsterdam om de *Anabaena variabilis* stam ATCC 29413 op de lijst met apathogene organismen te plaatsen (IG16-217_2.13-000), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de cyanobacterie *Anabaena variabilis* en de plaatsing op bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo. De aanvrager wil de *Anabaena variabilis* stam ATCC 29413 genetisch modifieren. Cyanobacteriën (voorheen blauwalgen genoemd) kunnen onder veel verschillende omstandigheden leven. Het genus *Anabaena* bestaat voornamelijk uit cyanobacteriën die in water voorkomen.

Door het gebruik van moleculaire technieken is nieuwe kennis opgedaan, waaruit blijkt dat aanpassingen van de taxonomie van cyanobacteriën noodzakelijk zijn. Cyanobacteriestammen die voorheen tot dezelfde soort werden gerekend, kunnen hierdoor tot een andere soort of zelfs tot een ander genus gaan behoren. Ook voor de stam *A. variabilis* ATCC 29413 zijn er aanwijzingen dat deze stam tot een ander genus moet worden gerekend. Deze stam lijkt namelijk niet tot het genus *Anabaena*, maar tot het genus *Nostoc* te behoren. Vanwege de onduidelijke en aan verandering onderhevige taxonomie zal de COGEM bij cyanobacteriën vooralsnog uitsluitend stammen classificeren.

A. variabilis ATCC 29413 wordt al lange tijd in het laboratorium gebruikt als modelorganisme. De genoomsequentie van deze stam is gepubliceerd. Er zijn bij de COGEM geen aanwijzingen bekend dat de *A. variabilis* stam ATCC 29413 schadelijk of pathogeen is voor andere organismen.

Gezien het bovenstaande adviseert de COGEM om de *A. variabilis* stam ATCC 29413 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. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

Met het oog op eventuele belangenverstrengelingen is het COGEM lid prof. dr. P.H. van Tienderen niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Classificatie cyanobacterie *Anabaena variabilis* stam ATCC 29413

COGEM advies CGM/160816-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de cyanobacterie *Anabaena variabilis* en over de plaatsing van deze cyanobacterie op bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo. De aanvraag, ingeschreven onder nummer IG 16-217, is ingediend door de Universiteit van Amsterdam. De aanvrager wil de *Anabaena variabilis* stam ATCC 29413 genetisch modificeren.

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.¹ 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 aan minimaal 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.

Opportunistische pathogenen, die uitsluitend ziekte kunnen veroorzaken bij individuen met een verzwakt immuunsysteem, worden in de regel als niet pathogeen beschouwd en kunnen, als aan één van de bovengenoemde voorwaarden van pathogeniteitsklasse 1 is voldaan, op Bijlage 2, lijst A1 geplaatst worden.

3. Bijlage 2, lijst A1

Bijlage 2, lijst A1 is een lijst van micro-organismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant en maakt deel uit van de Regeling ggo. Opname in lijst A1 betekent dat met het betreffende micro-organisme op het laagste inperkingsniveau (ML-I) gewerkt mag worden en ggo's vervaardigd mogen worden die zijn samengesteld uit vectoren en inserties die voorkomen op de A-lijsten (vectoren en inserties die als veilig aangemerkt zijn) zonder dat de gebruiker een risicobeoordeling hoeft uit te voeren.

4. Cyanobacteriën

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 onder extreme omstandigheden aangetroffen, zoals in Arctische gebieden of thermische bronnen. Ook kunnen sommige soorten symbiotische relaties aangaan met andere eukaryotische 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 organismen³, kan algenbloei schadelijke gevolgen hebben voor mens en milieu.

5. Genus *Anabaena*

Het genus *Anabaena* behoort tot de orde *Nostocales*, waaronder ook het genus *Nostoc* behoort, van het fyllum Cyanobacteria. Het zijn cyanobacteriën die in zowel zoet, zout als brak water voorkomen. Er zijn verschillende *Anabaena* soorten (*Anabaena flos-aquae*³, *Anabaena circinalis*³ en *Anabaena lapponica*⁴) en stammen (*Anabaena* sp. WA102⁵ en *Anabaena* sp. AL93⁵) gerapporteerd die toxines produceren. Ook zijn er *Anabaena* stammen gerapporteerd die cytotoxisch zijn voor zoogdiercellen (humane HL-60 en muis 3T3 Swiss cellen), maar het is nog niet bekend welk toxine dit veroorzaakt.⁶

6. Problemen naamgeving cyanobacteriën

Door het gebruik van moleculaire methoden zijn de inzichten over de taxonomie van cyanobacteriën recent sterk gewijzigd. Hierdoor kunnen cyanobacteriestammen die tot eenzelfde soort werden gerekend tot een andere soort of zelfs een ander genus gaan behoren. Veranderingen in de naamgeving

van soorten en stammen worden echter maar langzaam doorgevoerd.^{7,8} In Duitsland is vanwege de onduidelijke en aan verandering onderhevige naamgeving besloten om cyanobacteriesoorten niet op te nemen in de Duitse lijst met prokaryoten en hun risicogroepen.⁹

7. *Anabaena variabilis* ATCC 29413

Anabaena variabilis stam ATCC 29413 (=IUCC1444 =PCC7937¹⁰) is door R.G. Tischer in 1964 geïsoleerd uit de rivier de Mississippi en werd oorspronkelijk *Anabaena flos-aquae* genoemd. Ook voor deze *A. variabilis* stam zijn er problemen met de naamgeving. Op basis van een recente studie (2014) zijn er aanwijzingen dat *A. variabilis* ATCC 29413 mogelijk verkeerd ingedeeld is en niet tot het genus *Anabaena*, maar tot het genus *Nostoc* behoort.¹⁰

A. variabilis ATCC 29413 is een modelorganisme voor onderzoek naar fotosynthese en stikstof-fixatie. De genomsequentie van *A. variabilis* ATCC 29413 is bekend. In 2014 is de sequentie van het chromosomale DNA gepubliceerd¹⁰ en in 2016 zijn ook de sequenties van vier plasmiden gepubliceerd.^{11,12,13,14} Al sinds de jaren zeventig van de vorige eeuw wordt er met deze stam gewerkt.^{15,16,17} ATCC 29413 vormt lange filamenten die bestaan uit cellen van ca. 3-5 µm lang. *A. variabilis* ATCC 29413 kan gespecialiseerde cellen vormen die onder ongunstige omstandigheden kunnen overleven (zogenaamde akineten). Onder stikstofarme omstandigheden worden er gespecialiseerde cellen gevormd waarin stikstof kan worden gefixeerd (heterocysten). Stikstof-fixatie gebeurt door drie specifieke nitrogenases die onder verschillende omstandigheden geproduceerd kunnen worden.

Er zijn geen aanwijzingen dat *A. variabilis* ATCC29413 pathogeen is voor andere organismen. De ‘American Type Culture Collection’(ATCC), die haar indeling baseert op pathogeniteit voor de mens, heeft *A. variabilis* ATCC 29413 ingedeeld op het laagste veiligheidsniveau (‘Biosafety level 1’).

Zoals vrijwel alle prokaryoten bevat *A. variabilis* ATCC 29413 wel de genetische informatie voor een toxine-antitoxine (TA) systeem. TA systemen reguleren de groei en sterfte van bacteriën binnen een populatie.¹⁸ De genen die coderen voor het toxine en antitoxine van een TA systeem liggen direct naast elkaar en kunnen zelfs gedeeltelijk overlappen.¹⁹ De toxines van een TA systeem zijn stabiele eiwitten die essentiële cellulaire processen, zoals translatie en replicatie, remmen in bacteriële cellen.²⁰ De antitoxines zijn instabiele eiwitten die een complex vormen met het toxine en de werking van het toxine tegen gaan.²¹ Onder stressvolle omstandigheden, zoals wanneer er onvoldoende voedingsstoffen zijn, worden er minder toxines en antitoxines geproduceerd. De in de cel aanwezige antitoxines worden als eerste afgebroken, waardoor de toxines de groei van de bacteriepopulatie kunnen beperken of zorgen voor celsterfte in een populatie. Hierdoor zijn er minder voedingsstoffen nodig, of komen er meer voedingsstoffen vrij uit de dode cellen en neemt de overlevingskans van de totale populatie toe.²² Er zijn, voor zover bij de COGEM bekend, geen aanwijzingen dat de toxines van een TA systeem schadelijk zijn voor andere organismen.

8. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over stammen die tot het geslacht *Anabaena* of *Nostoc* behoren. Er is wel eerder door de COGEM geadviseerd over de pathogeniteitsklasse van twee cyanobacteriestammen uit een andere orde (*Chroococcales*), namelijk *Synechocystis* sp. stam PCC 6803²³ en *Synechococcus* sp. stam PCC 7002.²⁴ De COGEM achtte zowel *Synechocystis* sp. stam PCC 6803 als *Synechococcus* sp. stam PCC 7002 niet pathogeen voor andere organismen.

9. Overweging en advies

9.1 Classificatie van cyanobacteriën

Uit nieuwe gegevens die de laatste decennia beschikbaar zijn gekomen, blijkt dat aanpassingen in de taxonomie van cyanobacteriën noodzakelijk zijn.²⁵ Cyanobacteriestammen die voorheen tot dezelfde soort werden gerekend, kunnen door deze laatste inzichten tot een andere soort of zelfs een ander genus gaan behoren.

Vanwege deze onduidelijkheden adviseert de COGEM om geen cyanobacteriesoorten op de lijsten met pathogeniteitsclassificaties te vermelden. Zolang de onduidelijkheden m.b.t. de naamgeving en taxonomie van cyanobacteriën voortduren, zal zij daarom bij cyanobacteriën uitsluitend stammen classificeren.

9.2 Classificatie *Anabaena variabilis* ATCC29413

De aanvrager wil werkzaamheden uitvoeren met *Anabaena variabilis* ATCC 29413. Zoals hierboven vermeld, heeft de COGEM besloten om in het geval van cyanobacteriën uitsluitend nog stammen te classificeren.

ATCC 29413 is in 1964 geïsoleerd uit de rivier de Mississippi. De genoomsequentie van ATCC 29413 is bekend, inclusief de sequentie van de vier plasmiden die deze stam bevat. Uit een door de COGEM uitgevoerde analyse van de genoomsequentie zijn geen aanwijzingen naar voren gekomen dat het genoom codeert voor genen die zijn betrokken bij de biosynthese van bekende cyanotoxines. De stam is veelvuldig gebruikt voor onderzoek en heeft een historie van veilig gebruik. Er zijn geen aanwijzingen dat deze stam ziekten kan veroorzaken en ook op basis van de genoomsequentie van deze stam is er geen reden om te veronderstellen dat deze stam schadelijk zou kunnen zijn voor andere organismen. Gezien het bovenstaande adviseert de COGEM om *Anabaena variabilis* stam ATCC 29413 in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en op te nemen in Bijlage 2 lijst A1 van de Regeling ggo.

Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2014). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <http://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2016-07-01> (bezocht: 14 juli 2016)
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.

- www-cyanosite.bio.purdue.edu/cyanotox/toxiccyanos.html (bezocht: 2 augustus 2016)
4. Moreira C *et al.* (2013). Phylogeny and biogeography of cyanobacteria and their produced toxins. *Mar. Drugs* 11: 4350-4369
 5. 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
 6. 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
 7. Komárek J *et al.* (2014). Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* 86: 295–335
 8. Komárek J (2016). Review of the cyanobacterial genera implying planktic species after recent taxonomic revisions according to polyphasic methods: state as of 2014. *Hydrobiologia* 764: 259-270
 9. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAUA; 2015). Einstufung von Prokaryonten in Risikogruppen (TRBA 466). www.baua.de/de/Themen-von-A-Z/Biologische-Arbeitsstoffe/TRBA/TRBA-466.html (bezocht: 4 augustus)
 10. Thiel T *et al.* (2014). Complete genome sequence of *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *Stand. Genomic Sci.* 9: 562-573
 11. National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2016). *A. variabilis* ATCC 29413 plasmide A: www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP000119.1 (bezocht: 4 augustus 2016)
 12. National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2016). *A. variabilis* ATCC 29413 plasmide B: www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP000120.1 (bezocht: 4 augustus 2016)
 13. National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2016). *A. variabilis* ATCC 29413 plasmide C: www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP000121.1 (bezocht: 4 augustus 2016)
 14. National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2016). *A. variabilis* ATCC 29413 plasmide D: www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KC733807.1 (bezocht: 4 augustus 2016)
 15. Currier TC *et al.* (1977). Isolation and preliminary characterization of auxotrophs of a filamentous cyanobacterium. *J. Bacteriol.* 129: 1556-1562.
 16. Haury JF & Wolk CP (1978). Classes of *Anabaena variabilis* mutants with oxygen-sensitive nitrogenase activity. *J. Bacteriol.* 136: 688-692
 17. Peterson RB & Wolk CP (1978). High recovery of nitrogenase activity and of ⁵⁵Fe-labeled nitrogenase in heterocysts isolated from *Anabaena variabilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 6271-6275
 18. Gerdes K *et al.* (2005). Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 371-382.
 19. Pandey DP & Gerdes K (2005). Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* 33: 966-976
 20. Hayes F (2003). Toxins-antitoxins: Plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* 301: 1496-1499.
 21. Fernández-García L *et al.* (2016). Toxin-antitoxin systems in clinical pathogens. *Toxins*. 8

22. Ramisetty BC *et al.* (2015). mazEF-mediated programmed cell death in bacteria: "what is this?". Crit. Rev. Microbiol. 41: 89-100.
23. COGEM (2011). Grootschalige productie van melkzuur door gg-cyanobacteriën in een kweekstelsel voor eenmalig gebruik. COGEM advies CGM/110418-03
24. COGEM (2015). Classificatie van cyanobacterie *Synechococcus* sp. stam PCC7002. COGEM advies CGM/150821-01
25. Rajaniemi P *et al.* (2005). Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 11-26