



Introductie in het milieu

Aanvraagformulier: Micro-organismen

Maart 2019

AANVRAAGFORMULIER INTRODUCTIE IN HET MILIEU: MICRO-ORGANISMEN

Indien u vragen heeft kunt u contact opnemen met Bureau GGO (email: bggo@rivm.nl, telefoon: 030-2742793).

De specifieke persoonsgegevens van de contactpersoon en milieuveiligheidsfunctionaris dienen te worden aangeleverd door middel van de verplichte bijlage 2. In deze bijlage aangeleverde gegevens zullen vertrouwelijk worden behandeld en dus niet aan het publiek kenbaar gemaakt worden uit oogpunt van de Wet bescherming persoonsgegevens.

Het aanvraagformulier omvat vragen die mogelijk niet van toepassing zijn voor uw aanvraag. U wordt vriendelijk verzocht de onderdelen die geen betrekking hebben op de aan te vragen werkzaamheden NIET in uw aanvraag op te nemen.

Aandachtspunten bij indiening van het formulier:

- Literatuur waarnaar verwezen wordt in de aanvraag dient met het aanvraagformulier meegezonden te worden.
- Vertrouwelijke informatie dient als vertrouwelijk gekenmerkt te worden en apart aangeleverd.
- Een ingevuld SNIF B formulier (Engelstalig invullen) dient in Word format elektronisch aangeleverd te worden.

Alle gevraagde gegevens op dit formulier zijn openbaar. Vertrouwelijke informatie dient in een aparte bijlage meegezonden te worden. Informatie over het vertrouwelijk houden van gegevens en op welke wijze dit aangevraagd moet worden vindt u op de website www.ggo-vergunningverlening.nl.

INHOUDSOPGAVE

- 1. ALGEMENE GEGEVENS**
- 2. GEGEVENS OVER HET UITGANGSMICRO-ORGANISME**
- 3. GEGEVENS OVER DE GENETISCHE MODIFICATIE**
- 4. GEGEVENS OVER HET GGM**
- 5. GEGEVENS OVER DE VOORGENOMEN INTRODUCTIE IN HET MILIEU**
- 6. VOORGESTELDE METHODEN VAN OBSERVATIE TIJDENS EN NA EXPERIMENT**
- 7. ANALYSE VAN DE TE VERWACHTEN EFFECTEN VAN HET GGM OP MENS EN MILIEU**

Introductie in het milieu

Aanvraagformulier: Micro-organismen

Maart 2019

INTERNET www.ggo-vergunningverlening.nl.

AFKORTINGEN

GGM	Genetisch gemodificeerd micro-organisme
MVF	Milieuveiligheidsfunctionaris
COGEM	Commissie Genetische Modificatie

1. ALGEMENE GEGEVENS

1.1. AANVRAAG

1.1.1. Titel van de aanvraag:

Antwoord: Productie van organisch zuur met cyanobacteriën

1.1.2. Doel van de introductie in het milieu:

Antwoord: Het op grote schaal groeien en testen van een proces om organisch zuur te produceren met gebruik van specifieke genetisch gemodificeerde cyanobacteriën (GGM). De GG-cyanobacteriën worden gekweekt in een gesloten systeem, de fotobioreactor. Het GGM gebruikt zonlicht om CO₂ om te zetten in waardevolle α-Hydroxy zuren. Om een systeem te testen met een productie capaciteit van 10 ton per jaar is een DEMO ontwerp gemaakt dat beoogd een industriële schaal na te bootsen op kleinere schaal (TRL7). Vanwege het benodigde oppervlak van de DEMO kan dit niet ingeperkt uitgevoerd worden.

1.1.3. Gepland aanvangsjaar:

Antwoord: 2020

1.1.4. Verwacht eindjaar:

Antwoord: 2025

1.1.5. Wilt u informatie vertrouwelijk houden? Zo ja, geef een motivering die concreet aangeeft welke nadelige gevolgen openbaarmaking van deze informatie voor uw concurrentiepositie heeft.

Alle informatie die in de aanvraag en de bijlagen wordt verstrekt kan, voor zover deze niet als vertrouwelijk is aangemerkt, bij de openbare ter inzagelegging van de aanvraag en de (ontwerp) beschikking openbaar worden gemaakt.

Van als vertrouwelijk aangemerkte onderdelen moet een openbare samenvatting worden verstrekt, waarin voldoende informatie staat voor een goed algemeen begrip van de risico-beoordeling.

Informatie over het vertrouwelijk houden van gegevens en op welke wijze dit aangevraagd moet worden vindt u op de website www.ggo-vergunningverlening.nl.

Wij willen informatie over de exacte genetische modificaties van ons GGM vertrouwelijk laten behandelen vanwege patentaanvragen. Daarbij komt dat we deze stam in vele jaren ontwikkeld hebben, maar dat deze met de huidige technieken vrij simpel na te maken valt. In de huidige aanvraag staat naar onze mening voldoende informatie om de risicoanalyse van de stam te kunnen uitvoeren. Een versie van paragraaf 3 staat daarom in een vertrouwelijke bijdrage. De meeste informatie staat echter in dit document.

1.2. KENNISGEVER

1.2.1. Instelling/bedrijf:

Antwoord: Photanol BV

1.2.2. Afdeling/vakgroep:

Antwoord:

1.2.3. Correspondentieadres:

Antwoord: Sciencepark 406

1.2.4. Postcode en plaatsnaam:

Antwoord: 1098 XH Amsterdam

1.2.5. Telefoonnummer:

Antwoord: 020 8884850

1.2.6. faxnummer:

Antwoord:

2. GEGEVENS OVER HET UITGANGSMICRO-ORGANISME

UITGANGSMICRO-ORGANISME

2.0.1. Welk type micro-organisme betreft het?

Antwoord: cyanobacterie

2.0.2. Is het uitgangsmicro-organisme een genetisch gemodificeerd micro-organisme?

NEE, het uitgangsorganisme *Synechocystis* sp. PCC6803 is een zeer goed beschreven organisme. *Synechocystis* PCC 6803 is een cyanobacterie, die dankzij het bezit van fotosystemen in staat is om CO₂ en water te fixeren als koolwaterstofverbindingen. Dit organisme maakt geen toxines en is niet ziekteverwekkend. Het organisme wordt al sinds de jaren '70 gebruikt voor onderzoek naar fotosynthese, en, voor zover bij ons bekend, altijd op ML-I-niveau. Er zijn meer dan 1000 artikelen gepubliceerd over het organisme. Daarbij zijn er nog nooit virulente of anderzijds voor de mens schadelijke eigenschappen gerapporteerd. Het genoom van *Synechocystis* PCC 6803 is ook gesequenced en hierin zijn geen sequenties gevonden die coderen voor schadelijke stoffen of toxines.

2.1. BESCHRIJVING

Gangbare Nederlandse naam:

Antwoord: blauwalg

Volledige wetenschappelijke naam:

Antwoord: *Synechocystis* sp. PCC6803

Familie:

Antwoord: Chroococcales (= orde); er is geen familienaam

Geslacht:

Antwoord: *Synechocystis*

Soort:

Antwoord: *S.* sp. PCC6803

Ondersoort:

Antwoord: GT (glucose-tolerant)

Pathovar:

Antwoord: nvt

Collectienummer:

Antwoord: PCC6803

Commerciële benaming:

Antwoord: nvt

Overige naamsgegevens:

Antwoord: *Aphanocapsa* 6803 (historisch soms zo genoemd)

2.2. GEOGRAFISCHE VERSPREIDING

2.2.1. In welke habitat/ecosysteem komt uitgangsmicro-organisme van nature of oorspronkelijk voor?

Antwoord: *Synechocystis* sp. PCC6803 is oorspronkelijk geïsoleerd uit een zoetwater meer in Oakland, California. De stam is in 1968 in de cyanobacteriële stammencollectie van het Pasteur instituut gedeponeerd, alsmede in de Amerikaanse collectie (stam ATCC 27184) en wordt sindsdien uitgebreid gebruikt in wetenschappelijk onderzoek, onder andere naar fotosynthese. Het geslacht *Synechocystis* vormt een deel van de belangrijkste fytoplanktonische biomassa in de oceaan, en kan dus ook in zoutwater overleven.

2.3. STOFWISSELINGSTYPE, VOORTPLANTING, OVERLEVING EN VERSPREIDING

2.3.1. Wat is het stofwisselingstype?

Antwoord: fotoautotroof

2.3.2. Speelt het uitgangsmicro-organisme een specifieke rol in biologische of geochemische processen in de bodem?

NEE, planktonische cyanobacteriën, zoals *Synechocystis*, hebben met name een belangrijke rol

in de biogeochemische cyclus van zeewater, opname van CO₂ en productie van zuurstof.

2.3.3. Wat is de groeitemperatuur?

Antwoord: mesofiel, groei is optimaal bij 30-35°C

2.3.4. Beschrijving van de voortplantingswijze:

Antwoord: binaire deling

2.3.5. Welke overlevings- en verspreidingsstructuren kan het uitgangsmicro-organisme vormen?

Antwoord: Synechocystis groeit voornamelijk eencellig, en vormt geen cysten of endosporen.

2.3.6. Hoe lang kunnen de overlevings- en verspreidingsstructuren overleven in:

- de natuurlijke/oorspronkelijke habitat?

Antwoord: onbeperkt, uitgroei is afhankelijk van specifieke temperatuur, nutriënt condities en competitie met andere species.

- in het gebied van introductie?

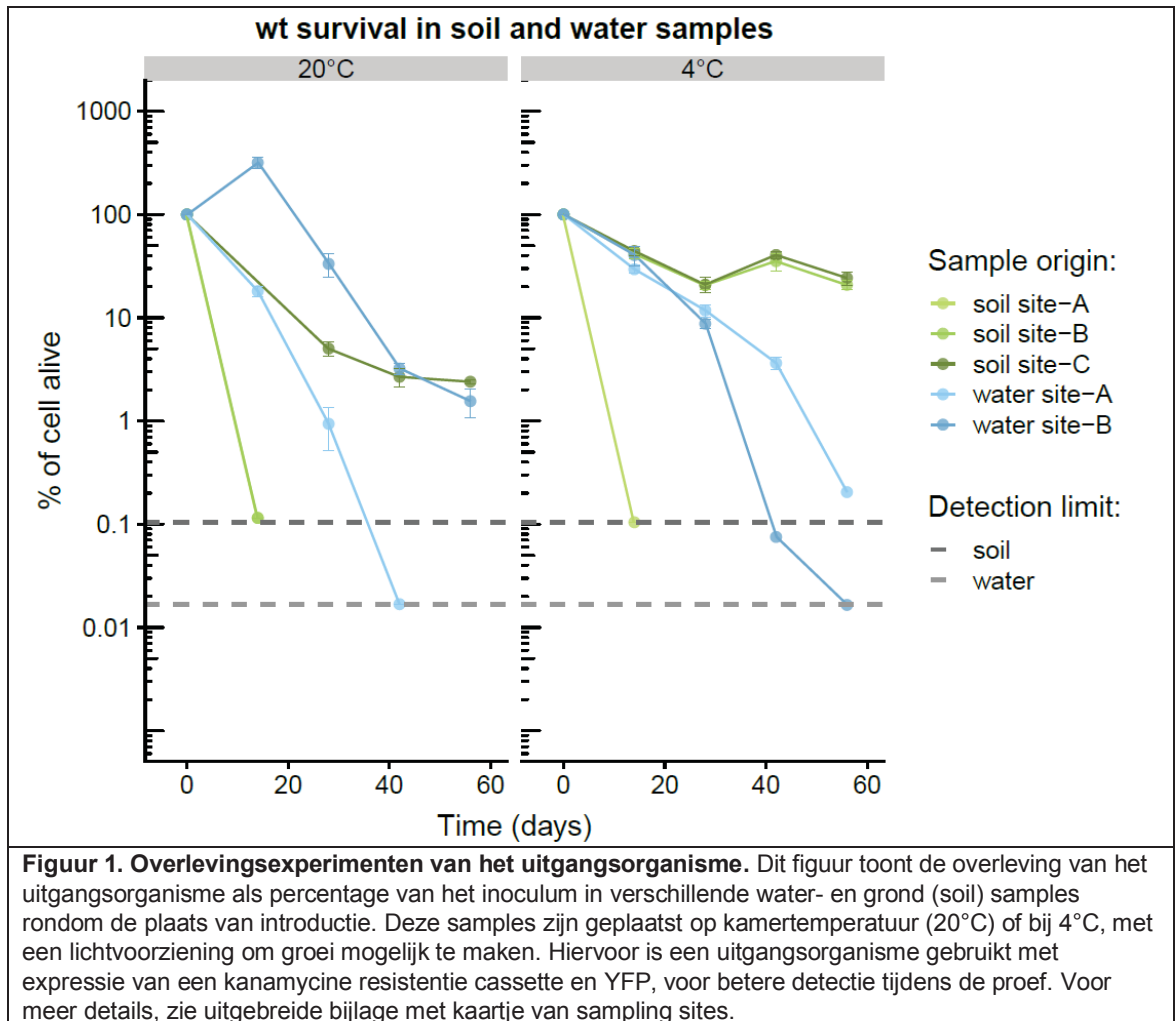
Antwoord: in bijlage overlevingsexperimenten staat een uitgebreide beschrijving van de overleving van het uitgangsorganisme op verschillende sites rondom het gebied van introductie. Een samenvatting hiervan staat weergegeven in Figuur 1. De initiële cel concentratie (hier weergegeven als 100%) is berekend om een catastrofale gebeurtenis na te bootsen waarbij het volume van de gehele installatie bij hoge cel dichtheid en in korte tijd in de omgeving wordt geloosd. Hierbij wordt geen rekening gehouden met verdunning in een groot wateroppervlak ofwel in de grond vanwege regenval.

Het overlevingspercentage van het uitgangsorganisme in de bodem en het water van de introductiesite vertoont een algemene daling in de tijd, zowel bij 20 °C als bij 4 °C. Verschillen kunnen worden gevonden tussen twee monsters van dezelfde oorsprong (bijv. Bodemsite A en plaats C) die alleen kunnen worden verklaard door een verschil in de lokale micro-organismen. De resultaten in geautoclaveerde monsters (zie bijlage), waarbij de lokale micro-organismen factor wordt geëlimineerd, vertonen een meer homogene respons. Hier zien we dat het uitgangsorganisme in sommige gevallen in staat is tot uitgroei, met name bij watersample A, op 20°C. Na deze uitgroei zien we echter weer een afname in het aantal levensvatbare bacteriën, vergelijkbaar met de andere samples.

De verwachting is dat uitgroei en overleving van het uitgangsorganisme op de plaats van introductie afhankelijk zal zijn van de aanwezige lokale micro-organismen en van de weersomstandigheden (temperatuur, neerslag ...). Er kan echter een ruwe schatting worden gegeven van het aantal dagen voordat er geen levensvatbaar organisme meer wordt aangetroffen door het middelen van alle sites voor elke voorwaarde in tabel 1.

<i>Conditie</i>	<i>Linear regression</i>	<i>R²</i>	<i>Dagen dat geen levende cellen meer aangetroffen worden</i>
<i>Soil 20°C</i>	$Y = 168053e^{-0.041x}$	0.35	293
<i>Soil 4°C</i>	$Y = 1E7e^{-0.041x}$	0.74	393
<i>Water 20°C</i>	$Y = 4E6e^{-0.108x}$	0.93	141
<i>Water 4°C</i>	$Y = 2E6e^{-0.118x}$	0.97	123

Tabel 1. Verwacht aantal dagen om geen levensvatbaar uitgangsorganisme in de samples te detecteren.



2.3.7. Biotische en abiotische factoren die van bepalende invloed zijn op voortplanting, overleving en verspreiding:

Antwoord: belangrijke factoren zijn temperatuur, licht, nitraat/fosfaat beschikbaarheid en CO₂ beschikbaarheid.

2.4. GENETISCHE ELEMENTEN

2.4.1. Bevat het uitgangsmicro-organisme mobiliseerbare genetische elementen? JA.

De uitgangstam *Synechocystis* PCC6803 bevat, naast genomisch DNA, zeven verschillende plasmides: vier zijn groot (pSYSM: 120 kb, pSYSX: 106 kb, pSYSA: 103 kb, and pSYSG: 44 kb), en drie zijn klein (pCA2.4: 2.4 kb, pCB2.4: 2.3 kb, and pCC5.2: 5.2 kb). Sequenties voor deze plasmides zijn te vinden op Genbank. Er zijn bij ons geen gevallen bekend van uitwisseling van deze plasmides.

2.4.2. Met welke frequentie treedt mobilisatie op?

Antwoord: onbekend, maar aangezien deze plasmides niet conjugatief zijn, is de kans op mobilisatie niet groot. Als voorbeeld: genom analyse van een gerelateerde species *Synechocystis* PCC6714 laat zien dat overeenkomsten op het genoom vrij groot zijn tussen deze stam en onze uitgangsmicroorganisme, maar juist op de plasmides zijn de overeenkomsten veel kleiner. Bovendien heeft PCC6714 ook niet de kleine plasmides pSYSG, pCC5.2, pCA2.4, en pCB2.4 (Kopf et al., 2014).

2.4.3. Bevat het uitgangsmicro-organisme zelfoverdraagbare elementen?

JA

In het genoom zijn zeer veel kleine insertie-sequentie-achtige elementen vastgesteld, die niet meer een volledig transposase vormen. Slechts 26 genetische transposable elementen lijken functioneel en zijn van verschillende klassen. Aangezien er voorbeelden zijn van inversies die in het genoom hebben plaatsgevonden op de plek van deze IS-achtige elementen, lijken ze wel functioneel (Ikeuchi and Tabata, 2001).

2.4.4. Met welke frequentie treedt overdracht op?

Antwoord: onbekend, maar het zou regelmatig kunnen zijn.

2.4.5. Wat is het gastheerbereik van die elementen?

Antwoord: onbekend

2.4.6. Tot welke incompatibiliteitsklasse behoren die elementen?

Antwoord: onbekend

2.4.7. Dragen de elementen resistentie genen?

Antwoord: nee

2.4.8. Dragen de elementen conjugatieve transposons?

Antwoord: nee

2.5. BIOLOGISCHE INPERKING

2.5.1. Kan het uitgangsmicro-organisme erfelijk materiaal uitwisselen met andere organismen?

Antwoord:

Er zijn verschillende vormen van uitwisselen van erfelijk materiaal. Enerzijds is er DNA-overdracht van andere micro-organismen naar het uitgangsorganisme. We weten dat *Synechocystis* PCC6803 goed in staat is tot het opnemen van DNA uit de omgeving via een Type IV-pilin structuur (Wendt and Pakrasi, 2019). Ook kan *Synechocystis* PCC6803 plasmide DNA opnemen via conjugatie. Er zijn echter weinig replicons die functioneel zijn in *Synechocystis*. Anderzijds is er de uitwisseling van ons uitgangsorganisme naar andere micro-organismen, DNA-donatie. Naar ons weten is er weinig bekend over DNA-donatie. Er zijn geen studies bekend over DNA-overdracht van plasmides van *Synechocystis* PCC6803 naar andere organismen. Een recente studie van DNA-overdracht bij een andere cyanobacterie *Thermosynechococcus elongatus* BP1 liet zien dat spontane DNA-donatie mogelijk was naar een organisme zoals *Escherichia coli*. In deze studie ging het echter om plasmide DNA met een bekende replicatie origin (pUC) voor *E. coli* (Nguyen et al., 2019). Dit plasmide kan niet repliceren in ons uitgangsorganisme *Synechocystis* en daarom achten wij de kans dat dit met ons uitgangsorganisme zou gebeuren onmogelijk. We controleren de aanwezigheid van dit plasmide altijd met PCR en hebben we het nog nooit kunnen aantonen in onze stammen.

Verder kan horizontale gentransfer plaatsvinden via transformatie. Dit is een wijdverbreid fenomeen bij prokaryoten en dit is ook het geval bij cyanobacteriën. Het is o.a. bestudeerd via fylogenetische analyse van verschillende genomen van cyanobacteriën met andere bacteriën. Hierin werd geconcludeerd dat allerlei soorten genen uitgewisseld kunnen worden via horizontale genoverdracht, maar dat de kans dat uitwisseling plaatsvindt tussen cyanobacteriën is veel groter dan tussen cyanobacteriën en andere bacteriën (Zhaxybayeva et al., 2006). Wij achten de kans dat sequenties die geïntegreerd zijn in het genoom uitwisselen klein, want er moet een aantal barrières overwonnen worden (vreemd DNA wordt vaak geknipt, en er moet homologe recombinatie plaatsvinden om het DNA in de nieuwe host te repliceren).

2.5.2. Is het uitgangsmicro-organisme biologisch ingeperkt?

NEE

Licht toe:

Antwoord: het wildtype organisme is in principe gewoon in staat te groeien in oppervlaktewater. Dit is ook duidelijk te zien in de overlevingsproeven die uitgevoerd zijn met het uitgangsorganisme in water- en grond-samples (figuur 1).

2.6. PATHOGENE EN SCHADELIJKE EIGENSCHAPPEN

2.6.1. Is het uitgangsmicro-organisme een pathogeen?

NEE, *Synechocystis* sp. PCC6803 maakt geen toxines of andere ziekteverwekkende stoffen. Ook is ondanks zeer lange gebruik in het lab nooit iets schadelijks over dit organisme gemeld. Het

volledig genoom van *Synechocystis* sp. PCC6803 is reeds in 1996 gesequenced. Uit de sequenties blijkt dat er geen genetische informatie aanwezig is die codeert voor toxines.

2.6.1.1. Zo ja, geef aan,

- **De klasse van pathogeniteit volgens de COGEM Richtlijnen?**

Antwoord: n.v.t.

- **Is het uitgangsmicro-organisme op basis van de huidige EG-richtlijnen tot bescherming van de gezondheid van mensen, dieren, planten en hun producten in een bepaalde categorie ingedeeld?**

NVT

- **Beschrijving van de pathogene eigenschappen van het uitgangsmicro-organisme:**

Antwoord: n.v.t.

2.6.1.2. Zo nee, waaruit blijkt het niet-pathogene karakter:

Antwoord: *Synechocystis* sp. PCC6803 maakt geen toxines of andere ziekteverwekkende stoffen. Ook is ondanks zeer lange gebruik in het lab nooit iets schadelijks over dit organisme gemeld. Het volledig genoom van *Synechocystis* sp. PCC6803 is al in 1996 gesequenced. Uit de sequenties blijkt dat er geen genetische informatie aanwezig is die codeert voor toxines.

2.6.2. Is het uitgangsmicro-organisme anderszins dan bedoeld onder 2.7.1 schadelijk? NEE

2.6.3. Wordt het uitgangsmicro-organisme gebruikt bij de bestrijding van andere organismen? NEE

2.7. SYMBIOTISCHE RELATIES

2.7.1. Heeft het uitgangsmicro-organisme symbiotische relaties?

NEE, er zijn geen symbiotische relaties met het uitgangsorganisme bekend.

2.8. DETECTIE- EN IDENTIFICATIETECHNIKEN

2.8.1. Beschrijving van (detectie-)technieken, waarmee het uitgangsmicro-organisme in het milieu aangetoond kan worden:

Antwoord: Het uitgangsorganisme kan worden aangetoond in het milieu door middel van specifiek ontworpen PCR met specifieke primers voor het organisme.

2.8.2. Beschrijving van (identificatie-)technieken, waarmee het uitgangsmicro-organisme onderscheiden kan worden van verwante micro-organismen:

Antwoord: door middel van PCR met specifieke primers voor het organisme kan het onderscheiden worden van verwante micro-organismen.

3. GEGEVENS OVER DE GENETISCHE MODIFICATIE

3.1. ALGEMENE GEGEVENS OVER DE GENETISCHE MODIFICATIE

3.1.1. Welk type genetische modificatie is gebruikt?

Antwoord: insertie in het genoom en deletie van specifieke genen.

3.1.2. Welke methode is gebruikt voor de insertie in het uitgangsmicro-organisme?

Antwoord: transformatie, gecombineerd met homologe recombinatie

3.1.3. Wat is het beoogde resultaat van de genetische modificatie?

Antwoord: productie van glycolzuur door ons GG-cyanobacterie op basis van CO₂ en licht, met als enige bijproduct zuurstof. Glycolzuur wordt momenteel vooral chemisch geproduceerd, waarbij giftige stoffen vrijkomen. Dit organische zuur wordt gebruikt in de cosmetica, voor huidverzorging. Daarnaast is het te vinden als conserveringsmiddel in voedingsmiddelen, als additief in polymeren en inkt en in toiletreinigingsmiddelen.

3.2. VECTOREN

3.2.1. Is bij de genetische modificatie gebruik gemaakt van een vector?

JA, er wordt een vector gebruikt maar deze kan niet repliceren in het organisme. Deze vector dient slechts als tijdelijke stap om DNA te verkrijgen voor homologe recombinatie. De vector is na het verkrijgen van de genetisch modificatie aantoonbaar niet aanwezig meer.

3.2.2. Is de vector geheel of gedeeltelijk aanwezig in het GGM?

NEE, slechts het deel wat gerecombineerd is met het genoom is aanwezig in het GGM

3.2.3. Welk type vector is gebruikt?

Antwoord: pBluescript 2+ of pUC18

3.2.4. Wat is het gastheerbereik van de vector?

Antwoord: replicatie in E. coli, niet in gastheer

3.2.5. Bevat de vector sequenties die selectie of identificatie op basis van het fenotype mogelijk maken?

NEE, er zijn geen fenotypische elementen in de vector aanwezig.

3.2.6. Bevat de vector mobiliseerbare of zelfoverdraagbare genetische elementen? NEE, alle elementen zijn bekend en deze zijn niet mobiliseerbaar of zelfoverdraagbaar.

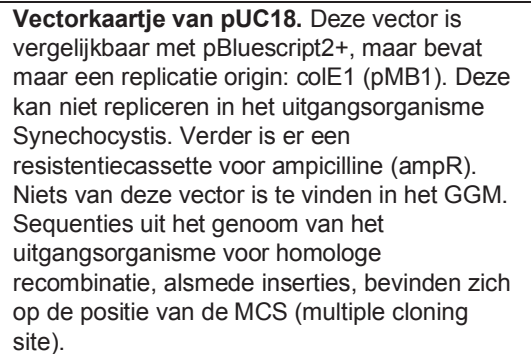
3.2.7. Referenties over deze vector en de op de vector aanwezige sequenties:

Antwoord: <https://www.addgene.org/vector-database/1946/>

pBluescript 2+ bevat een pMB1 (colE1/pUC) ori, welke goed kan repliceren met hoog aantal kopieën in E. coli, maar niet in ons uitgangsgenorganisme Synechocystis. Verder is er een f1 ori aanwezig en een ampicilline resistentie cassette (AmpR). Een vectorkaart staat hieronder. Deze sequenties zijn allen na genetische modificatie aantoonbaar niet meer aanwezig in het GGM; dit wordt gecontroleerd met PCR.

<https://www.addgene.org/50004/>

pUC18 bevat een pMB1 (colE1/pUC) ori, welke goed kan repliceren met hoog aantal kopieën in E. coli, maar niet in ons uitgangsgenorganisme Synechocystis. Verder is er een ampicilline resistentie cassette (AmpR) aanwezig. Een vectorkaart staat hieronder. Deze sequenties zijn allen na genetische modificatie aantoonbaar niet meer aanwezig in het GGM; dit wordt gecontroleerd met PCR.

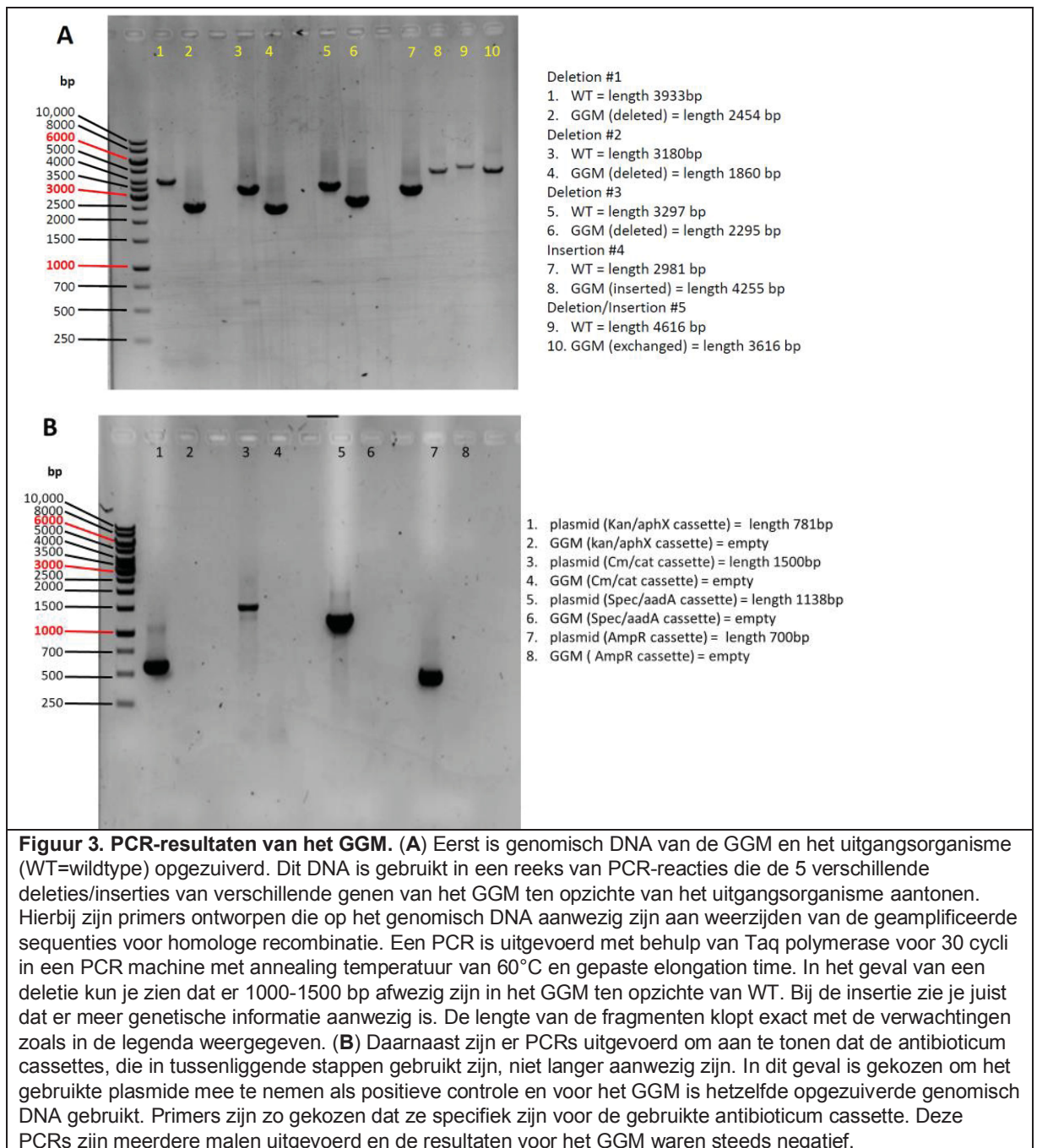


Een bewerkte versie van de pBSK2+, waarop homologe sequenties geïntegreerd zijn voor homologe recombinatie staat beschreven in (van der Woude et al., 2016).

- 3.2.8. Zijn er bij de constructie van de vector eigenschappen van de vector veranderd?** JA, er worden sequenties geïntroduceerd die in het genoom van de gastheer aanwezig zijn. Hierdoor is de vector bruikbaar voor homologe recombinatie in gastheer op een specifieke locatie in het genoom. Dit wordt onder andere gebruikt voor deletie van genetische informatie.
- 3.2.9. Gedetailleerde beschrijving van de vector:**

Antwoord: Er zijn 5 verschillende vectoren gebruikt, die allen pBluescript 2+ of pUC als basis hebben. 4 van deze vectoren hadden als doel de deletie van genetische informatie, en 1 leidt tot disruptie van een gen. Dit vindt plaats door amplificatie en insertie in bovenstaande vector van 1000bp upstream en 1000bp downstream van het geselecteerde gen, waardoor homologe recombinatie kan plaatsvinden. Dit resulteert in 5 vectoren die zich allen op een ander gen in het genoom richten. Twee van de vectoren zijn gebruikt voor insertie van een specifiek gen. Het geïnserteerde gen in vector #4 betreft een phosphatase, het geïnserteerde gen in vector #5 betreft een carboxylase. Deletie en insertie zijn sequentieel toegepast via de gepubliceerde methode (Cheah et al., 2013). Deze methode bestaat uit twee stappen. Eerst wordt door middel van homologe recombinatie op de gewenste genomische locatie een construct geïntroduceerd. Dit construct maakt gebruik van nikkel-induceerbare expressie van mazF, een algemene eiwitsyntheseremmer, als een counter-selectiemarker. Introductie wordt gefaciliteerd met een

antibioticum resistentiemarker voor respectievelijk kanamycine (Aminoglycoside 3'-phosphotransferase (aphX), vanuit het *E. coli* transposon Tn903, geamplificeerd uit vector pPSBA2KS), chloramphenicol (chloramphenicol acetyltransferase (cat) uit vector pBR325) of spectinomycin (aadA uit vector pZS4). In een tweede stap wordt door counterselectie op nikkel het construct en de antibioticum resistentie marker weer verwijderd door middel van homologe recombinatie. De resulterende stam is uitgebreid gecontroleerd met PCR. De inserties zijn ook gesequencend om vast te stellen dat deze exact zo zijn als beoogd. Controle met PCR laat zien dat de genen in de GGM succesvol zijn verwijderd. Zie hiervoor figuur 3 hieronder. Daarnaast voeren we een controle uit om aan te tonen dat de resistentiecassettes en de pBluescript 2+ niet langer aanwezig zijn. Dit is ook bevestigd met whole-genome-sequencing van het GGM, waarbij ook aangetoond is dat alleen de beoogde mutaties in het GGM aanwezig zijn.



3.3. DE INSERTIE/DELETIE

3.3.1. Beschrijving van de opbouw van de insertie:

Antwoord: Het geïnserteerde gen in vector #4 betreft een phosphatase, het geïnserteerde gen in vector #5 betreft een carboxylase. Zie ook de confidentiële bijlage;

3.3.2. Beschrijving van de donor-organismen en hun relevante eigenschappen:

Antwoord: donororganismen staan op doorzoekbare bijlage 2, lijst A1 van regeling GGO, wat betekent dat deze niet pathogeen zijn.

3.3.3. Codeert de in te brengen sequentie voor een of meer genproducten die functioneel homolog zijn met van nature in de uitgangsmicro-organisme voorkomende genproducten?

JA, de sequenties coderen voor metabole enzymen die ook van nature in het uitgangsgenorganisme aanwezig zijn. De metabole activiteit van de geïnserteerde enzymen is iets anders dan in het uitgangsgenorganisme

3.3.4. Wat is de beoogde functie van elk der samenstellende delen van de insertie in het GGM?

Antwoord: de phosphatase en de carboxylase functioneren in het metabolisme bij het produceren van het beoogde organisch zuur, glycolaat, door onze GGM. Deleties zijn gericht op verminderde katabolisme van dit organisch zuur.

3.3.5. Wat is het niveau van expressie?

Antwoord: expressie niveau van de geïnserteerde genen is relatief hoog

3.3.6. Bevat de insertie sequenties waarvan de producten of functies onbekend zijn? NEE, het betreft bekende metabole enzymen die uitgebreid beschreven zijn in de literatuur.

3.3.7. Bevat de insertie sequenties coderend voor toxinen en/of allergenen?

NEE, het betreft bekende metabole enzymen, die geen rol hebben bij het maken van toxinen en/of allergenen

3.3.8. Bevat de insertie sequenties coderend voor andere schadelijke stoffen?

NEE, het betreft bekende metabole enzymen, die geen rol hebben bij het maken van andere schadelijke stoffen.

3.3.9. Plaats van de insertie in het GGM:

Antwoord: zoals hierboven beschreven zijn er twee inserties; deze vinden plaats op specifieke posities in het genoom van het GGM. In vector #4 betreft dit een neutrale site (disruptie van een gen zonder specifieke functie) en in vector #5 wordt een gen verwijderd wat een negatief effect heeft op de groei van de GGM.

3.3.10. Is het geïntroduceerde DNA stabiel in het GGM aanwezig?

JA, het is geïntroduceerd in het genoom van de GGM en dit is getest met PCR.

4. GEGEVENS OVER HET GGM

4.1. GESCHIEDENIS

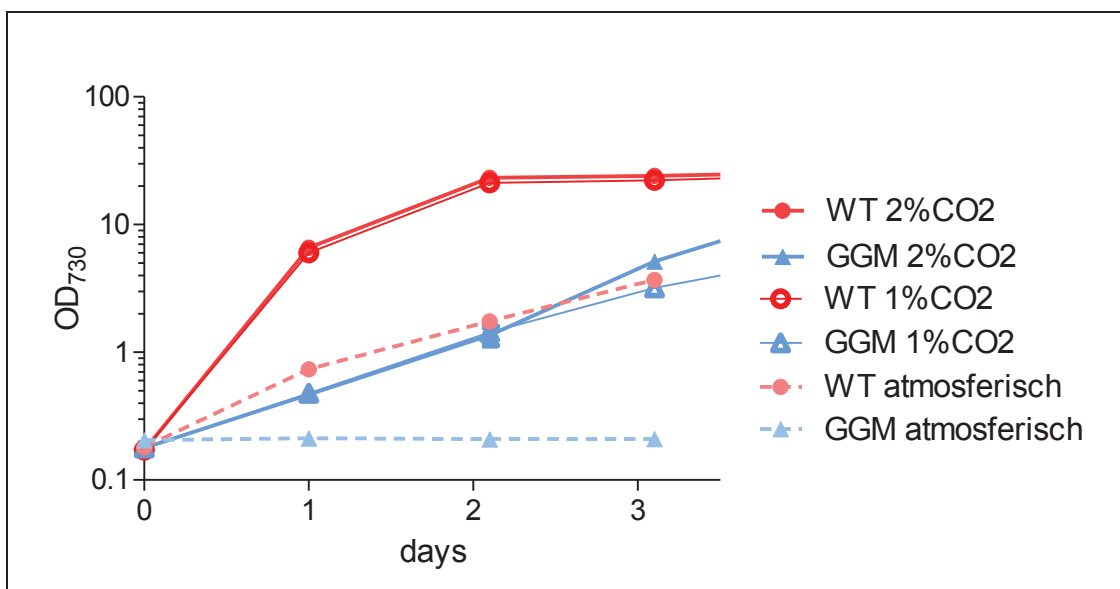
4.1.1. Geschiedenis van voorgaande werkzaamheden verricht met de genetisch gemodificeerde micro-organismen?

JA, het GGM is uitgebreid getest in het lab op groei en productiviteit. Het GGM is vervaardigd en getest onder vergunning IG-17-009. Daarnaast hebben we overlevingsproeven uitgevoerd om aan te tonen hoe goed het GGM buiten het gesloten systeem kan overleven. Het GGM kan niet uitgroeien wanneer dit in contact komt met de buitenlucht (i.e. 0.04% CO₂ bevattende lucht). Dit staat uitgebreid beschreven in de bijlage "Survival Report".

4.2. EIGENSCHAPPEN VAN HET GGM

4.2.1. Beschrijving van de nieuwe eigenschappen van het GGM:

Antwoord: het GGM is in staat om glycolzuur te produceren. Hiernaast is het GGM niet langer in staat om te groeien bij atmosferische CO₂ niveaus en heeft dus verhoogde CO₂ niveaus nodig om uit te groeien. In onderstaande figuur staat de groei van het GGM ten opzichte van wildtype bij verschillende CO₂ concentraties, om dit te illustreren. Hierbij is duidelijk dat de GGM alleen kan uitgroeien bij CO₂ concentraties van 1 of 2% en niet bij atmosferische CO₂. Ook groeit het GGM bij alle condities minder goed dan het uitgangsgenotype (WT).



Figuur 4. Groei van het GGM bij verschillende CO₂ concentraties. Het uitgangsgenotype (WT) en het GGM zijn gegroeid in een schudincubator met licht en de volgende CO₂ concentraties: atmosferisch (0,037%), 1% en 2%. Er moet gesteld worden dat alleen de eerstgenoemde concentratie buiten de reactor gevonden kan worden en hierbij is groei van het GGM niet mogelijk.

4.2.2. Wordt het GGM gebruikt bij de bestrijding van andere (micro-)organismen? NEE, het GGM wordt gegroeid in bioreactor.

4.2.2.1. Effecten op doel-organismen?

Antwoord: NVT

4.2.2.2. Effecten op niet doel-organismen?

Antwoord: NVT

4.2.3. Beschrijving van de technieken waarmee het GGM van het uitgangsmicro-organisme kan worden onderscheiden:

Antwoord: PCR met primers die specifiek zijn voor een van de inserties in het GGM. Zie ook resultaten in figuur 3 hierboven.

4.3. VERSCHILLEN VAN HET GGM TEN OPZICHTE VAN HET UITGANGSMICRO-ORGANISME

4.3.1. Voortplantingswijze en/of -duur?

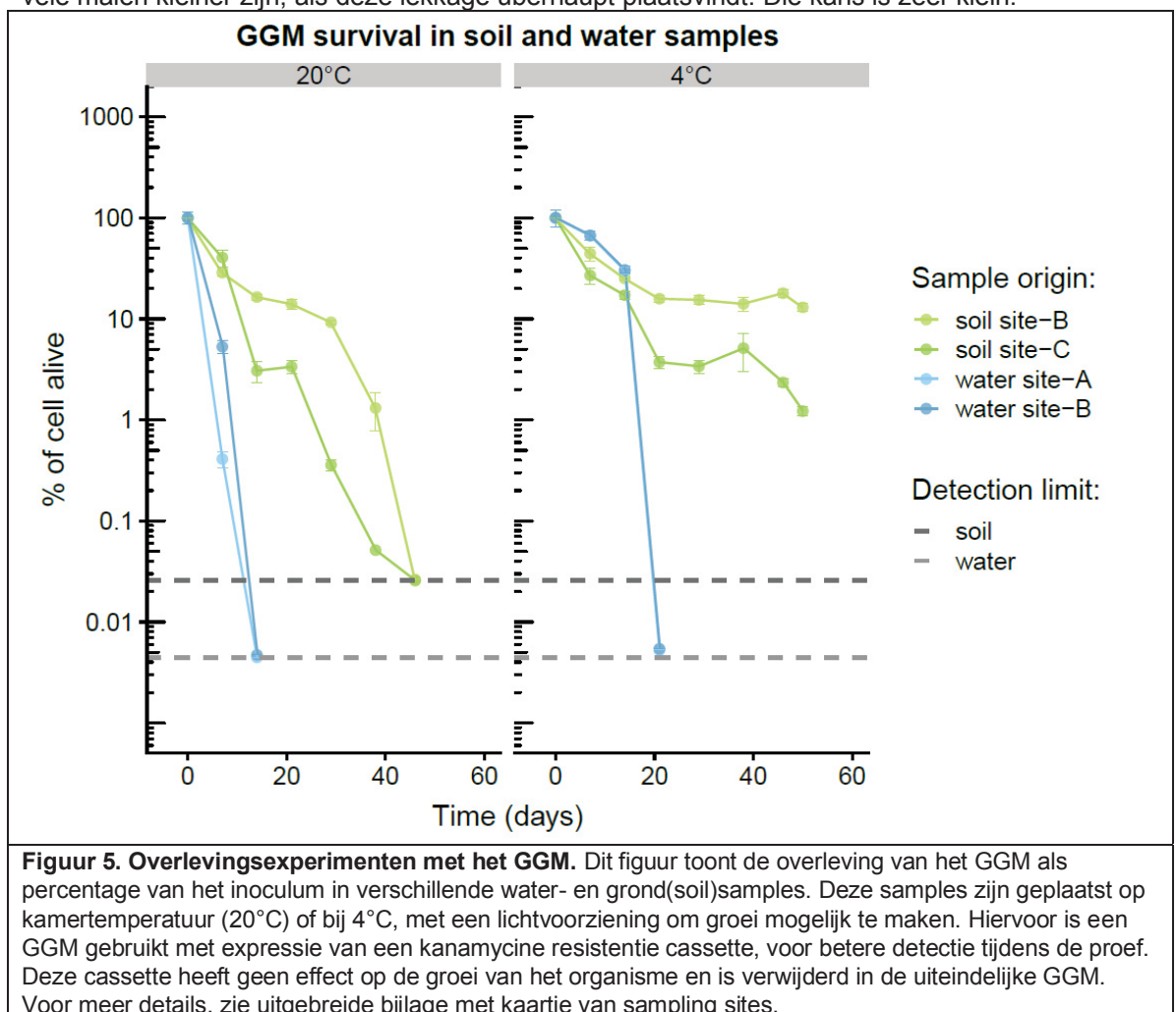
JA, groeisnelheid is beperkt en zeer afhankelijk van de concentratie van CO₂. Alleen bij CO₂ concentraties van > 500x hoger dan normale atmosferische concentraties is de groeisnelheid vergelijkbaar met het uitgangsgenotype. In de standaard CO₂ concentratie zoals deze in de atmosfeer gemeten is (0,037% CO₂) kan het GGM niet uitgroeien. Deze eigenschap van het GGM werd ook beschreven als een risico mitigatie strategie in (Gressel et al., 2013).

4.3.2. Overlevings- en verspreidingsstructuren?

NEE, hetzelfde als uitgangsgenotype

4.3.3. Overlevingsduur van de overlevings- en verspreidingsstructuren?

We hebben de overleving van de GGM getest in verschillende samples van de locatie van introductie. Deze staan uitgebreid beschreven in de bijlage "Survival Report", maar een samenvatting hiervan staat in figuur 5. Inoculatie heeft plaatsgevonden met een zeer groot aantal bacteriën, uitgaande van lekkage van het totale systeem in een 200m radius (50x), niet rekening houdend met verdunning in het water. In werkelijkheid zal de hoeveelheid lekkage van bacteriën vele malen kleiner zijn, als deze lekkage überhaupt plaatsvindt. Die kans is zeer klein.



Het overlevingsexperiment voor het GGM is twee keer uitgevoerd, omdat tijdens het eerste experiment technische problemen ondervonden werden met het voorzien van voldoende CO₂ om plaat tellingen mogelijk te maken. Hierdoor zagen we bij de eerste sampling punten (tot dag 45) geen enkele levensvatbare GGM op de plaat. Pas bij een CO₂ concentraties die 130x zo hoog was als atmosferisch konden we GGM-bacteriën tellen op de platen. Deze condities hebben we aangehouden bij het vervolg van het experiment en bij de herhaling, waarvan de data in Figuur 5 staan. Hieruit wordt duidelijk dat het GGM in de watersamples binnen korte tijd (15-20 dagen)

onder detectieniveau verdwijnt, iets sneller bij 20°C dan bij 4°C. In de grondsamples overleeft het GGM zo'n 40-50 dagen bij 20°C. Bij 4°C persisteert het GGM iets langer, maar aangezien geen uitgroei mogelijk is neemt de hoeveelheid levensvatbare bacteriën langzaam af. Uitgaande van dit inoculum zal er ongeveer 290 dagen nodig zijn om geen levensvatbare cel meer te detecteren (tabel 2). Vergelijking met tabel 1 laat zien dat de kans dat de afname van GGM in de omgeving veel sterker is dan bij het uitgangsgenorganisme. Hierbij moet ook gesteld worden dat er 5x meer GGM geïnoculeerd is dan uitgangsgenorganisme (zie bijlage).

Conditie	Linear regression	R ²	Estimated days to reach 1 cell alive
Soil 20°C	$Y = 1E7e^{-0.157x}$	0.90	100
Soil 4°C	$Y = 4E6e^{-0.043x}$	0.75	289
Water 20°C	$Y = 7E6e^{-0.714x}$	0.97	6
Water 4°C	$Y = 2E7e^{-0.433x}$	0.70	15

Tabel 2. Verwacht aantal dagen om geen levensvatbare GGM in de samples te detecteren.

4.3.4. **Verspreidingswijze?**

JA, aangezien het GGM niet kan uitgroeien onder atmosferische CO₂, kan deze ook niet vergelijkbaar verspreiden zoals het uitgangsgenorganisme. Aangezien gebruik gemaakt wordt van een vloeistofkerende lekbak kan het GGM in de grond of het lokale water terecht komen. Ook in dat geval zal het GGM niet kunnen overleven. Zie hiervoor ook figuur 5

4.3.5. **Biologische inperking?**

JA, GGM is niet in staat tot uitgroei bij CO₂ concentraties zoals deze in de natuur voorkomen. Dit betekent dat de GGM biologisch ingeperkt is buiten de bioreactor.

4.3.6. **Mobiliseerbare elementen?**

NEE, vergelijkbaar met uitgangsgenorganisme

4.3.7. **Antibioticaresistenties?**

NEE, antibiotica resistentie cassettes zijn slechts gebruikt als een eerste stap voor insertie, maar zijn nadien verwijderd volgens gepubliceerde methode (Cheah et al., 2013). Dit wordt uitgebreid gecontroleerd met PCR.

Zo ja, geef aan waarvoor de betreffende antibiotica worden gebruikt:

Antwoord:

4.3.8. **Overige resistenties?**

NEE, er zijn geen overige resistenties aanwezig.

4.3.9. **Competitieve eigenschappen?**

NEE, de GGM heeft competitief een duidelijk nadeel ten opzichte van het uitgangsgenorganisme

4.3.10. **Pathogeniteit?**

NEE, de GGM is niet pathogeen, net als uitgangsgenorganisme.

4.3.11. **Productie van toxische/allergene stoffen?**

NEE, de GGM produceert geen toxische of allergene stoffen, net als uitgangsgenorganisme.

4.3.12. **Productie andere schadelijke stoffen?**

NEE, de GGM produceert geen schadelijke stoffen, net als uitgangsgenorganisme.

4.3.13. **Bijdrage aan geochemische processen?**

ONBEKEND, maar de verwachting is dat het minder is dan het uitgangsgenorganisme, omdat het GGM niet kan uitgroeien.

4.3.14. **Nuttige eigenschappen?**

JA, namelijk productie van specifiek product zolang de GGM zich in de bioreactor bevindt. Hierbuiten kan de GGM niet uitgroeien.

4.3.15. **Zijn er verschillen van de GGM ten opzichte van het uitgangsmicro-organisme anders dan hierboven genoemd?**

NEE.

5. GEGEVENS OVER DE VOORGENOMEN INTRODUCTIE IN HET MILIEU

e GGM bevindt zich in een bioreactor (ingeperkt systeem), en dit systeem blijft ook ingeperkt bij monsternamen en GGM centrifugatie. Op deze schaal is inperking echter niet meer 100% te garanderen, en daarom kiezen we het vergunningstraject "introductie in het milieu". Het blijft echter zo dat de kans op feitelijk introductie in het milieu zeer klein is. Zoals hieronder aangegeven wordt de reactor geplaatst in een vloeistofkerende bak op een terrein met asfalt,

5.1. LOCATIE

5.1.1. Hoeveel locaties worden voor de introductie gebruikt?

De reactor wordt op 1 locatie gebouwd.

5.1.2. In welke gemeenten/provincies liggen deze locaties?

Antwoord: Provincie Groningen, gemeente Delfzijl, in het industriegebied Chemiepark Delfzijl;

5.1.3. Maximale jaarlijkse omvang van het introductiegebied per locatie en de totale maximale omvang verspreid over de locaties:

Antwoord: het gaat om één locatie. Op de locatie staat 1 groot systeem wat fungeert als een enkele fotobioreactor met een maximaal totaal volume van 75 m³. Het systeem bestaat uit 300 aparte thin film plastic buizen van elk 5 cm breed die naast elkaar gelegd zijn (totale breedte is 15 meter).

5.1.4. Maximale jaarlijkse omvang van het introductiegebied in ruime zin:

Antwoord: het gebied waarop de bioreactor en alle bijkomende apparatuur geplaatst wordt is ongeveer een halve hectare (5000m²) groot. De helft van dit gebied (=2500m²) wordt ongeveer in beslag genomen door bioreactor. Daarbij komt dat het gebied omgeven is door een hekwerk van een industrieterrein.

5.2. HABITAT/ECOSYSTEEM

5.2.1. Verschilt het habitat/ecosysteem van het introductiegebied van dat waarin de uitgangsmicro-organisme gewoonlijk wordt gebruikt of aangetroffen?

JA, het GGM wordt gegroeid in een reactor met specifieke (hoge) CO₂- en nutriënten-condities en lage zuurstofconcentraties. Deze specifieke condities zijn essentieel voor groei en overleving van het organisme. Deze condities zijn anders dan het natuurlijke ecosysteem. Bij lekkage van de fotobioreactor zou het GGM in het natuurlijke ecosysteem terecht komen en op basis van overlevingsexperimenten uitgevoerd onder natuurlijke condities kan worden geconcludeerd dat de kans op uitgroei van het GGM zeer beperkt is.

5.3. INTRODUCTIEMETHODE EN -OMVANG

Het proces vindt plaats in een fotobioreactor (PBR), dit is een transparante gesloten reactor waar de cellen in water rondcirculeren. De fotobioreactor in de outdoor pilot zal in totaal een volume van maximaal 75 m³ hebben. De reactor wordt in een vloeistofkerende bak geplaatst die het totale volume van desbetreffende reactor kan opvangen. Een afvoerput kan gecontroleerd open worden gezet om afvoer van het regenwater naar het riool mogelijk te maken. De pH van deze lekbak wordt continu gemonitord. Bij lekkage zal de pH van de vloeistof in de lekbak stijgen (omdat de pH van het medium in de fotobioreactor hoger is dan van regenwater) en zal er automatisch een alarmsignaal verstuurd worden naar de dienstdoende operator. Er is altijd een operator op oproepdienst beschikbaar. Deze zal bij het afgaan van het alarm ter plekke de situatie bekijken en in geval van lekkage zorg dragen dat het GGM geconcentreerd wordt afgevoerd naar een IBC.. Dit stelt ons in staat om regenwater gecontroleerd af te kunnen voeren en dient als extra maatregel om het GGM te kunnen inperken. Afvoer van regenwater is geregeld door een systeem wat open/dicht gezet kan worden voor afvoer naar het riool.

De gebruikte thin-film reactor is een low-cost reactor gemaakt van flexibel transparant plastic. Ze zullen met elkaar worden vergeleken vanuit economisch oogpunt en productiviteit. Ook zal de robuustheid van de reactor in de buitenlucht nauwlettend worden gevolgd.



Figuur 6. Impressie van gebied en reactor De bioreactor wordt gebouwd op een industrieterrein Zoals op de foto te zien is ligt hier asfalt. Het terrein is omgeven door een hek. Daarbuiten ligt een dijk. Dit gebied is niet toegankelijk voor onbevoegden. Als lekkage van het systeem zou plaatsvinden, belandt het GGM op de 2 mM PE laag op de grond. Het GGM zal in die condities niet overleven. De bioreactor bestaat uit thin-film plastic (A) aangesloten op een "header" (C) via koppelingen aangegeven in (B). Dit systeem staat groei toe van het GGM met een goede verdeling van de vloeistofstroom.

5.3.1. Handelingen vóór de introductie:

Antwoord: het gebied wordt voorbereid en er worden bioreactoren op gebouwd, samen met de connecties en randapparatuur. Dan wordt het bioreactor systeem gevuld met water en uitgebreid getest op lekkage. Na deze toetsing, zal de bioreactor gevuld worden met het uitgangsgenoom voor de eerste testen van de bioreactor. Na succesvol verlopen proeven zal de bioreactor gevuld worden met het GGM.

5.3.2. Hoeveel GGM's worden geïntroduceerd?

Antwoord: Het maximaal volume van de PBR is 75m³. Bij een eventuele lekkage wordt het GGM opgevangen in de vloeistofkerende lekbak van 460 m³.

5.3.3. Methode gebruikt voor de introductie:

Antwoord: De GGM wordt gekweekt in een inoculatiereactor (onder MI-I), en deze biomassa zal worden gebruikt om het bioreactorsysteem te inoculeren. Dit zal plaatsvinden in gesloten systemen, ook om contaminatie met andere micro-organismen te voorkomen. Dit wordt verder gewaarborgd door stringente inoculatieprocedures en specifieke groeiomstandigheden.

5.4. INPERKINGEN

5.4.1. Is het experiment waarin introductie van GGM's in het milieu plaatsvindt ingeperkt? Zo ja, op welke wijze vindt inperking plaats?

JA. De GGM's zitten in een bioreactor. Deze bioreactor is momenteel al >3 maanden getest in ProDock Amsterdam en gedurende deze tijd heeft geen lekkage opgetreden. De condities waaraan de reactor is blootgesteld op ProDock variëerden van zeer warme dagen met >30°C en

veel zonlicht, tot onweer met stevige hagelbuien.

Het kan echter niet uitgesloten worden dat de fotobioreactor toch een lek zal vertonen. Indien er lekkage plaats vindt zal het GGM gecontroleerd afgevoerd worden met behulp van de vloeistofkerende bak die onder de bioreactor ligt gemaakt van 2 mm polyethyleen met een totale opslag capaciteit van 460 m³ (>6 maal totale volume van het systeem). Alleen bij zeer grote lekkage in combinatie met zeer extreme regenval (>30 cm) is het mogelijk dat het GGM buiten de vloeistofkerende bak terecht komt. Het GGM kan dan ook in het oppervlaktewater terecht komen en via de bodem buiten de omheining van het terrein terecht komen en door uitspoeling in het omliggende water terecht komen. Het GGM kan hier echter niet uitgroeien vanwege de natuurlijke biologische inperking van het GGM dat alleen bij hoge CO₂ concentraties kan groeien.

5.4.2. Methoden om verspreiding van GGM's te voorkomen:

Antwoord: groei in ingeperkte bioreactoren

5.4.3. Verwachte duur van de aanwezigheid van de geïntroduceerde genetisch gemodificeerde micro-organismen op het proefobject:

Antwoord: ongeveer 5 jaar verwacht gebruik in het ingeperkte systeem.

5.4.4. Methoden om betreding van het gebied door onbevoegden te voorkomen:

Antwoord: het gebied ligt op een industrieterrein dat omgeven is door een hek en de toegang wordt gecontroleerd.

5.4.5. Methoden om de toegang van andere organismen tot het gebied te voorkomen:

Antwoord: Het gebied is geasfalteerd, en de GGM's zitten in een reactor. In principe kunnen er geen andere organismen in de reactor komen. Op het terrein kunnen alleen geautoriseerde [bevoegde] mensen komen na gecontroleerde toegang.

5.5. VERVOER

5.5.1. Is vervoer van de GGM's noodzakelijk?

Ja, eventueel vervoer zal conform ADR plaatsvinden

5.5.2. Beschrijf de wijze van vervoeren, indien afwijkend van Bijlage 2 van het Besluit GGO

5.5.2.1. Hoe worden de GGM's verpakt?

Antwoord: in een afgesloten container, omgeven door een afgesloten breukvast vat, conform de vereisten van de ADR

5.5.2.2. Hoe vindt het vervoer plaats?

Antwoord: conform de ADR

5.6. VOEDINGS- EN/OF CONSUMPTIE-EXPERIMENTEN

Worden de GGM's gebruikt in consumptie-experimenten? Zo ja, geef een beschrijving.
NEE

5.7. NA AFLOOP VAN HET EXPERIMENT

5.7.1. Behandeling van het introductiegebied na afloop van het experiment:

Antwoord: in principe is het introductiegebied vrij van GGO. De GGO in de bioreactor worden afgedood middels een gevalideerde methode. Elke batch wordt getest op afdoding alvorens afvoering in het milieu. Deze gegevens worden verzameld in een logboek.

5.7.2. Behandeling van de GGM's na afloop van het experiment:

Antwoord: de GGMS worden gedurende en na afloop van het experiment afgedood met een chloorhoudend, een oxidatief of een sterk alkalisch inactivans. Dit is een gevalideerde methode om cyanobacteriën af te doden.

5.7.3. Soort en hoeveelheid geproduceerd afval:

Antwoord: afval zal met name bestaan uit afgedode GGMS, maar aangezien deze geconcentreerd worden (via centrifugatie of filtratie) zal het om een beperkt volume gaan. Per jaar verwachten we ongeveer 10 m³ geconcentreerd GGM-afval te produceren en <500 m³ water zonder GGM.

5.7.4. Beschrijving van de voorgestelde afvalverwerking:

Antwoord: de GGMS worden gedurende en na afloop van het experiment afgedood met een chloorhoudend, een oxidatief of een sterk alkalisch inactivans. Dit is een gevalideerde methode

voor afdoding van dit GGM, die ook gebruikt wordt in ons ingeperkt gebruik faciliteit. Elke batch wordt getest op afdoding voordat het wordt afgevoerd. Deze gegevens worden verzameld in een logboek. Hierna wordt het volgens richtlijnen naar het riool afgevoerd worden. Mocht toch blijken dat, na monsternamen en analyse van levende GGM concentratie, dat afvoer via het riool niet mogelijk is dan zal het afval worden verwerkt in de lokale zuiveringsvoorziening of door een externe partij.

6. VOORGESTELDE METHODEN VAN OBSERVATIE TIJDENS EN NA AFLOOP VAN HET EXPERIMENT

6.1. Met welke methoden kan het GGM worden geïdentificeerd?

Antwoord: er kan een PCR uitgevoerd worden specifiek voor een van de integraties in het GGM. Zie hiervoor ook figuur 2 hierboven. Dit is voor zover bij Photanol bekend de meest sensitieve methode

6.2. Met welke methoden kunnen effecten van het GGM op habitat/ecosysteem worden bepaald?

Antwoord: aangezien de GGM in principe in de bioreactor blijft, zal uitgebreide monitoring van omliggende locaties niet strikt noodzakelijk zijn. Daarbij komt dat uitgroei van het GGM niet mogelijk is doordat deze niet kan groeien bij ambiënte CO₂ en O₂ concentraties.

6.3. Wat is de oppervlakte van het gebied waarin het GGM en de effecten van dat GGM op habitat/ecosysteem worden geobserveerd?

Antwoord:

De plastic tubes waarin de cyanobacteriën gekweekt worden hebben een oppervlakte van 100 * 25 meter. Er zal tot 25 meter buiten dit gebied bemonsterd worden. Dit gebied bestaat voornamelijk uit asfalt, dus door uitdrogen zal de overleving minimaal of zelfs onmogelijk zijn.

6.4. Observatieduur:

Antwoord: De observatie duur zal gelijklopen met de duur van de DEMO. Deze is momenteel gepland tot 1 augustus 2022.

6.5. Observatiefrequentie:

Antwoord: Er zal het eerste half jaar standaard elke maand een PCR-analyse op 10 plaatsen rondom de site uitgevoerd worden om de robuustheid van het systeem te testen. Doel is gegevens verzamelen. Als hierbij altijd negatieve resultaten gevonden wordt de frequentie verlaagd tot elke 3 maanden, en na een jaar tot elke 6 maanden. Indien er een incident (drukverlies/volumeverlies) optreedt zal eerst geprobeerd worden uitstroom van het GGM in het milieu zoveel mogelijk te beperken waarna binnen 24 uur een PCR-analyse uitgevoerd zal worden rondom de site van het incident om te controleren in welke mate het GGM in het milieu terecht gekomen is. Hierbij moet gesteld worden dat door de aanwezigheid van asfalt in een brede strook rondom de bioreactor de kans op lekkage naar de bodem of oppervlaktewater zeer klein is.

6.6. Voorgestelde werkwijze in geval van niet-beoogde gebeurtenissen, om de risico's voor mens en milieu te beperken:

Antwoord:

Het GGM kan niet in ambiente condities (20.95% O₂ en 0.04% CO₂) uitgroeien. Desalniettemin zal tijdens een niet-beoogde gebeurtenis zal zoveel mogelijk worden geprobeerd om introductie van het GGM in het milieu te beperken door de volgende acties:

1. Stopzetten van de vloeistofstroom in de lekkende buis waardoor verder introductie beperkt wordt
2. Zo goed als mogelijk verzamelen van de gelekte vloeistof dmv een waterstofzuiger
3. Afdoding van het GGM in de verzamelde vloeistof door gevalideerde methode, additie van 0.06% hypochloriet
4. Binnen 24 uur monitoring van de mogelijke site van introductie met behulp van PCR-analyse. Deze analyse wordt wekelijks uitgevoerd totdat het GGM tweemaal achter elkaar niet (meer) gedetecteerd wordt in alle monsters.

7. ANALYSE VAN DE TE VERWACHTEN EFFECTEN VAN HET GGM OP MENS EN MILIEU

7.1. Geef naar aanleiding van de voorgaande vragen een samenvattende analyse van de te verwachten effecten van het GGM op mens en milieu:

Antwoord:

Het risico voor mogelijke milieueffecten van het GGM wordt zeer laag geacht, gebaseerd op de volgende punten. Het bioreactorsysteem is ontworpen en wordt gebruikt als een inperkend. Lekkage kan alleen in uitzonderlijke gevallen optreden. Mocht er echter lekkage plaatsvinden, dan is het organisme niet in staat om uit te groeien, omdat het GGM hogere CO₂ concentratie nodig heeft dan standaard atmosferische waarden. Het GGM kan niet uitgroeien onder CO₂ concentraties zoals deze in de natuur gevonden worden. Aangezien geen uitgroei mogelijk is, is de kans dat het GGM persistent en invasief wordt nagenoeg nihil. Met overlevingsproeven in water- en grondsamples uit de omgeving van de faciliteit, is ook bevestigd dat uitgroei niet plaatsvindt, in tegenstelling tot het uitgangsgenorganisme. Deze resultaten lieten ook zien dat het in grondsamples een tijdje kan duren voordat het GGM volledig niet meer levensvatbaar is, maar het zal nooit uitgroeien, tenzij het weer terug in de reactor geplaatst wordt. Er kan dus nooit sprake zijn van persistente en invasieve groei in het natuurlijke ecosysteem rondom de faciliteit. Daarom zijn er ook geen effecten te verwachten op biogeochemische processen.

Aangezien het GGM zich in de bioreactor bevindt, is er weinig contact met andere soorten (micro)organismen. Het voorkomen van groei van ongewenste andere organismen in de reactor wordt verder gewaarborgd door chemische sterilisatie en toepassing van stringente inoculatieprocedures en specifieke groeiomstandigheden. Door deze inperking is de kans bijzonder klein dat er selectieve voor- of nadelen op het GGM worden overgedragen van andere (micro)organismen. Ditzelfde geldt voor gen-overdracht op andere soorten, omdat het GGM niet met andere soorten in aanraking komt. Mocht dit contact, in het geval van lekkage, wel plaatsvinden, dan is de kans dat het GGM de ingebrachte genen overdraagt zeer klein, aangezien deze het GGM een selectief nadeel geven. Ingebrachte genen zijn ook onschadelijk, vergelijkbaar met genen die ook in het uitgangsgenorganisme voorkomen en komen als zodanig ook in de natuur voor. Het GGM bevat ook geen mogelijk schadelijke genen (genen betrokken bij antibiotica, virulentie of sporulatie). Er zijn geen effecten te verwachten op de gezondheid van mensen of dieren van interactie met het GGM. Zowel de GGM als het uitgangsgenorganisme heeft geen toxines of ziekteverwekkende eigenschappen. Daarom is de verwachting er geen effect is van het GGM op mens en milieu.

Dit is de centrale vraag van de aanvraag!

Geef naar aanleiding van de voorgaande vragen een uitgebreide analyse van de te verwachten effecten van het GGM op mens en milieu, waarbij Bijlage II van de Richtlijn 2001/18/EC van de Europese Commissie wordt gevolgd. Bij de analyse dienen zowel directe, indirecte, onmiddellijke en vertraagde effecten van het GGM op mens en milieu in beschouwing te worden genomen.

De risicoanalyse moet worden uitgevoerd voor ieder GGO waarop deze aanvraag betrekking heeft individueel, en indien relevant ook voor combinaties van de GGM's.

In de risicoanalyse moeten de effecten van de GGM's in beschouwing worden genomen die voortvloeien uit interacties van de GGM's onderling en in het/de milieu(s) waarin zij door de in de aanvraag beschreven introductie terecht (kunnen) komen; het gaat hierbij om effecten die betrekking hebben op de veiligheid van mens en milieu. In Bijlage II van dit formulier staan aspecten beschreven die in ieder geval in beschouwing genomen moeten worden.

Een risicoanalyse omvat de volgende onderdelen, die in de aangegeven volgorde volledig moeten worden behandeld:

- 1. inventarisatie van de mogelijke negatieve effecten die kunnen optreden;*
- 2. een schatting van de kans of de mogelijkheid dat deze effecten daadwerkelijk optreden;*
- 3. op basis van 1 en 2: een evaluatie van de risico's, en een inschatting van de ernst van die risico's. Bij de inschatting van de ernst kan een vergelijking worden gemaakt met de ernst die wordt*

toegekend aan vergelijkbare risico's, bijvoorbeeld in vergelijkbare situaties waarbij effecten optreden met niet-GGM's ('baseline principe').

4. *indien in 3 de conclusie wordt getrokken dat het risico te hoog is, moet worden nagegaan welke risicobeheersingsmaatregelen kunnen worden toegepast om de risico's doelmatig terug te dringen;*
5. *eindconclusie van de risicoanalyse waarin wordt aangegeven welke risicobeheersingsmaatregelen zullen worden toegepast, en een conclusie wordt getrokken over de aanvaardbaarheid van de risico's, bij toepassing van de beschreven risicobeheersingsmaatregelen.*

Referenties

Cheah, Y.E., Albers, S.C., and Peebles, C.A.M. (2013). A novel counter-selection method for markerless genetic modification in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnol. Prog.* 29, 23–30.

Gressel, J., van der Vlugt, C.J.B., and Bergmans, H.E.N. (2013). Environmental risks of large scale cultivation of microalgae: Mitigation of spills. *Algal Res.* 2, 286–298.

Ikeuchi, M., and Tabata, S. (2001). *Synechocystis* sp. PCC 6803 - a useful tool in the study of the genetics of cyanobacteria. *Photosynth. Res.* 70, 73–83.

Kopf, M., Klähn, S., Pade, N., Weingärtner, C., Hagemann, M., Voß, B., and Hess, W.R. (2014). Comparative genome analysis of the closely related *Synechocystis* strains PCC 6714 and PCC 6803. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes* 21, 255–266.

Nguyen, T.H., Barnes, C.L., Agola, J.P., Sherazi, S., Greene, L.H., and Lee, J.W. (2019). Demonstration of horizontal gene transfer from genetically engineered *Thermosynechococcus elongatus* BP1 to wild-type *E. coli* DH5α. *Gene* 704, 49–58.

Wendt, K.E., and Pakrasi, H.B. (2019). Genomics Approaches to Deciphering Natural Transformation in Cyanobacteria. *Front. Microbiol.* 10, 1259.

van der Woude, A.D., Perez Gallego, R., Vreugdenhil, A., Puthan Veetil, V., Chroumpi, T., and Hellingwerf, K.J. (2016). Genetic engineering of *Synechocystis* PCC6803 for the photoautotrophic production of the sweetener erythritol. *Microb. Cell Factories* 15, 60.

Zhaxybayeva, O., Gogarten, J.P., Charlebois, R.L., Doolittle, W.F., and Papke, R.T. (2006). Phylogenetic analyses of cyanobacterial genomes: Quantification of horizontal gene transfer events. *Genome Res.* 16, 1099–1108.

BIJLAGE 1 *In Bijlage II, onder D1 van de Richtlijn worden een aantal punten opgesomd die, waar passend, dienen als basis voor de conclusies over de mogelijke milieueffecten van de voorgenomen introductie van de GGM's in het milieu. Al deze punten moeten in de conclusies van de risicobeoordeling in beschouwing worden genomen.*

Conclusies over mogelijke milieueffecten

Het risico voor mogelijke milieueffecten is zeer laag, gebaseerd op de volgende punten:

1. Waarschijnlijkheid dat het GGM in natuurlijke habitats persistent en invasief wordt onder de omstandigheden van de voorgestelde introductie(s).

Het GGM kan niet uitgroeien onder CO₂ concentraties zoals deze in de natuur gevonden worden. Aangezien geen uitgroei mogelijk is, is de kans dat het GGM persistent en invasief wordt nagenoeg nihil.

2. Selectieve voordelen of nadelen die op het GGM worden overgedragen en de waarschijnlijkheid dat zulks geschiedt onder de omstandigheden van de voorgestelde introductie(s).

De GGM bevindt zich in een bioreactor en de kans dat er selectieve voor- of nadelen op het GGM worden overgedragen is dus zeer klein, aangezien er geen contact is met andere organismen. Het weghouden van andere organismen uit de reactor wordt verder gewaarborgd door chemische sterilisatie en toepassing van stringente inoculatieprocedures en specifieke groeicondities. Daarbij komt de er belangrijke genetische informatie verwijderd is uit het GGM op 5 verschillende plekken in het genoom, wat het GGM een selectief nadeel geeft.

3. Kans op genoverdracht op andere soorten onder de omstandigheden van de voorgestelde introductie van het GGM en selectieve voordelen of nadelen die op deze soorten worden overgedragen.

De GGM bevindt zich in een bioreactor en de kans dat er genoverdracht van het GGM plaatsvindt, is dus zeer klein, aangezien er geen contact is met andere organismen. Mocht dit contact, in het geval van lekkage, wel plaatsvinden, dan is de kans dat het GGM de ingebrachte genen overdraagt zeer klein, aangezien deze het GGM een selectief nadeel geven. Ingebrachte genen zijn ook onschadelijk, vergelijkbaar met genen die ook in het uitgangsorganisme voorkomen en komen als zodanig ook in de natuur voor. Het GGM bevat ook geen mogelijk schadelijke genen (genen betrokken bij antibiotica, virulentie of sporulatie).

4. Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde milieueffecten van de directe en indirecte interacties tussen het GGM en niet-doelwitorganismen (indien van toepassing).

De GGM bevindt zich in een bioreactor en de kans dat er interactie met het GGM plaatsvindt, is dus zeer klein, aangezien er geen contact is met andere organismen. Mocht dit contact, in het geval van lekkage, wel plaatsvinden, dan is de kans op mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde milieueffecten zeer klein, aangezien het GGM niet kan uitgroeien. Ingebrachte genen zijn ook onschadelijk, vergelijkbaar met genen die ook in het uitgangsorganisme voorkomen en komen als zodanig ook in de natuur voor. Het GGM bevat ook geen mogelijk schadelijke genen (genen betrokken bij antibiotica, virulentie of sporulatie).

5. Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde milieueffecten van de directe en indirecte interacties tussen het GGO en niet-doelwitorganismen, inclusief de effecten op de populatie van concurrenten, prooien, gastheren, symbionten, predatoren, parasieten en ziekteverwekkers.

De GGM kan niet uitgroeien en we verwachten daarom geen milieueffecten.

6. **Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde effecten op de menselijke gezondheid van mogelijke directe en indirecte interacties tussen het GGO en personen die werken met, in contact komen met of in de nabijheid komen van de GGM-introductie(s).**

Er zijn geen effecten te verwachten op de menselijke gezondheid van interactie met het GGM. Zowel de GGM als het uitgangsorganisme heeft geen toxines of ziekteverwekkende eigenschappen.

7. **Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde effecten op de gezondheid van dieren en effecten op de voeder/voedselketen van consumptie van het GGM en alle daarvan afgeleide producten indien deze voor diervoeder bestemd zijn.**

Er zijn geen effecten te verwachten op de gezondheid van dieren bij interactie met het GGM. Zowel de GGM als het uitgangsorganisme heeft geen toxines of ziekteverwekkende eigenschappen. De GGM is niet voor diervoeder bestemd.

8. **Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde effecten op biogeochemische processen die veroorzaakt worden door mogelijke directe en indirecte interacties tussen het GGM en doelwit- en niet-doelwitorganismen in de nabijheid van de GGM-introductie(s).**

Er zijn geen effecten te verwachten op biogeochemische processen. De GGM zit in een bioreactor en de kans dat deze vrijkomt in het natuurlijke ecosysteem is zeer klein. Als dit wel zou gebeuren, dan hebben we laten zien dat de GGM niet kan uitgroeien en dat de levensvatbare populatie in de tijd afneemt.

9. **Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde, directe en indirecte milieueffecten van de specifieke technieken die voor het beheer van de GGM's worden gebruikt, indien deze verschillen van de voor niet-GGM's gebruikte technieken.**

Niet van toepassing