Muligheder for risikovurdering ved indeslut-tet anvendelse af mikroorganismer udviklet ved hjælp af syntetisk biologi

Fagligt notat fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi

Dato: 26. juni 2023 | **47**

AARHUS
UNIVERSITET
DCE – NATIONALT CENTER FOR MILJØ OG ENERGI

Datablad

	Fagligt notat fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi
Kategori:	Rådgivningsnotat
Titel:	Muligheder for risikovurdering ved indesluttet anvendelse af mikroorganismer udviklet ved hjælp af syntetisk biologi
Forfatter:	Niels Bohse Hendriksen
Institution:	Institut for Miljøvidenskab
Faglig kommentering:	Mariane Schmidt Thøgersen
Kvalitetssikring, DCE:	Kirsten Bang
Rekvirent:	Miljøstyrelsen, Pesticider & Biocider
Bedes citeret:	Niels Bohse Hendriksen. 2023 Risikovurdering ved indesluttet anvendelse af mikroorganismer udviklet ved hjælp af syntetisk biologi. Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi, 28 s. Fagligt notat nr. 47
	Gengivelse tilladt med tydelig kildeangivelse
Sideantal:	28 sider

Indhold

1 Indledning 4

2 Syntetisk biologi 5

3 Risikovurdering af indesluttet anvendelse af genetisk modificerede organismer 8

4 Eksempler fra den syntetiske biologi 13

5 Konklusioner 22

6 Referencer 23

Bilag 1 25

Bilag 2 26

1 Indledning

Fremstilling eller anvendelse af genetisk modificerede organismer er reguleret af "Lov om Miljø og Genteknologi". I denne lov forstås genetisk modificerede organismer som planter, dyr, mikroorganismer, cellekulturer og vira, hvori der forekommer nye sammensætninger af det genetiske materiale, som ikke opstår på naturlig måde. Loven skal medvirke til at værne miljø og natur, så samfundsudviklingen kan ske på et bæredygtigt grundlag i overensstemmelse med etiske værdier og i respekt for menneskers livsvilkår og for bevarelsen af dyre- og plantelivet. Loven skal desuden medvirke til at beskytte menneskets sundhed i forbindelse med genteknologi. Loven er primært baseret på klassisk genmodifikation, hvor oftest få gener indsættes i et plasmid eller i kromosomet af en værtsorganisme. Men nye udviklinger har medført, at de genetiske modifikationer kan være betydeligt mere komplicerede end de klassiske genmodifikationer; en række af disse komplicerede modifikationer går under betegnelsen syntetisk biologi.

2 Syntetisk biologi

Syntetisk biologi er en multidisciplinær samlet betegnelse for videnskaber, som har deres fokus på nye levende systemer og organismer, hvor man ved hjælp af en lang række af forskellige metoder arbejder hen imod at udvikle nye biologiske produkter, udstyr og systemer eller at re-designe eksisterende systemer, som man kender fra naturen. Der findes ikke nogen egentlig generelt accepteret definition af syntetisk biologi. Den syntetiske biologi er dog ofte karakteriseret ved en arbejdsmetode som går under betegnelsen "Design-Build-Test-cyklussen" (DBT). Denne arbejdsmetode består af tre faser ud over en problemformuleringsfase: En designfase, hvor en værtsorganisme udvælges, de relevante molekylære pathways defineres og genetisk modificeres; en byggefase, hvor de forskellige modifikationer samles og afprøves i forskellige kombinationer og en testfase, hvor resultaterne af de forskellige modifikationer og kombinationer testes f.eks. ved kemiske eller andre former for analyser. Efter disse tre faser vil der naturligvis følge en evalueringsfase, hvor det vurderes, hvad man har lært af den gennemførte DBT-cyclus, og hvordan man kommer videre, eventuelt ved hjælp af en ny cyklus. Der er ingen enkelte metoder, der kendetegner den syntetiske biologi, men den er karakteriseret ved at bruge en række forskellige molekylærbiologiske værktøjer, begreber og tilgange, som muliggør de enkelte trin i en DBT-cyklus. I designfasen benytter man sig ofte af en række forskellige avancerede teknikker, såsom: Automatiseret biologisk design, design af gener og proteiner eller hele pathway ved hjælp af computeralgoritmer, nye "software environments" og "machine learning". I byggefasen vil man ofte benytte sig af syntetisk DNA eller RNA, som kan være gener, større genetiske enheder f.eks. pathways eller endog hele organismer, og kan også involvere xenobiologi, hvor der benyttes elementer, som ikke findes naturligt i miljøet f.eks. specifikke nukleotider og aminosyrer, som ikke forekommer naturligt. I testfasen vil man ofte anvende sekventering til at validere, hvorvidt det er en "korrekt" konstruktion, som er opnået og "high-throughput screening"-metoder til at verificere at "konstruktionen" har de forventede egenskaber (1, 2, 3). En række forskellige koncepter, tilgange og værktøjer præsenteres i tabel 1.

Tabel 1 Oversigt over koncepter, tilgange og værktøjer, der anvendes i den syntetiske biologi.

Automated DNA assembly	Metoder til automatiseret DNA-sammensætning arbejder hen imod at facilitere montage af komplekse gen-elementer med en øget præcision og pålidelighed.
Bioprospecting	Bioprospektering er udforskning af naturen for naturligt forekommende organismer, som kan anvendes i forbindelse med produktion af kommercielle produkter primært som en naturlig kilde til små eller større molekyler og biokemisk og genetisk information.
Booting genomes	Refererer til ”opstarten” af syntetiserede genomer i vira eller celler.
Building chromosomes	Kemisk syntese af kromosomer (se DNA synthesis and assembly)
Building genes	Kemisk syntese af gener (se DNA synthesis and assembly)
Building genomes	Kemisk syntese af genomer (se DNA synthesis and assembly)
Codon optimization	Codon-optimering refererer til eksperimentelle procedurer, som er udviklet til at forbedre codon-sammensætningen i et gen uden at forandre aminosyre-sammensætningen i det protein, som genet koder for.
Combinatorial DNA assembly	Combinatorial assembly arbejder hen imod “montage” af alle standardelementer (f.eks. promotorer, gener og terminatorer) i forskellige kombinationer i et enkelt klonings-trin.
CRISPR/Cas9	CRISPR, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, også omtalt under navnet CRISPR-Cas9, betegner en proces, der bruges af adskillige mikroorganismer som en forsvarsmekanisme bl.a. mod virusangreb, hvorved det fremmede genom ødelægges. Cas9 er restriktionsenzymet, der betinger processen. CRISPR bruges nu som “den genetiske schweizerkniv”, fordi det er et meget generelt værktøj til genmodificering.
De novo protein structure prediction	Refererer til en computerbaseret (algoritme) proces, hvorved proteiners tertiære struktur bestemmes ud fra dets primære aminosyresekvens.
Directed evolution	Styret evolution er en efterligning af den naturlige udviklingscyklus i et laboratoriemiljø, hvor der ofte benyttes kunstig mutagenese. Metoden anvendes ofte i proteinteknologien til at styre proteiner eller nukleinsyrer mod et brugerdefineret mål.
DNA synthesis and assembly	Syntese af DNA-oligonukleotider og deres sammensætning til større DNA-enheder (gener, pathways, hele genomer)
Genetic logic	Med udgangspunkt i den logik, der anvendes til konstruktion af logiske netværk i computerprogrammer eller i elektriske netværk, forandres eller introduceres der forbindelser mellem genetiske komponenter, så nye regulatoriske netværk skabes.
Genomics	Genomics er studiet af genomer – en organismes komplette sæt af DNA. Deres struktur, funktion, evolution og mulighederne for at ændre det.
High-throughput screening	Ved High-throughput screening (HTS) er det muligt ved en automatiseret proces at teste et højt antal biologiske eller kemiske forbindelser for en eller flere specifikke egenskaber.
Machine learning	Machine learning, eller automatisk læring, udgør en del af “Artificial intelligence”. I den syntetiske biologi anvendes den specielt i forbindelse med modifikation af celle- og protein-aktiviteter og metaboliske pathways. Machine learning kan anvendes til at forudsige, hvorledes modifikationer vil påvirke et biologisk system
Metagenomics	Metagenomics er studiet af metagenomer. Metagenomer er samtlige nukleotidsekvenser isoleret og analyseret fra en naturlig prøve f.eks. en fæces-, jord- eller vandprøve. Metagenomer anvendes ofte til at studere samfundet af mikroorganismer i prøven og dets egenskaber.
Microbiome engineering	Ved Microbiome engineering forsøges det at forbedre økosystemers funktion ved at manipulere dets mikrobiologiske sammensætning.
Multi-input logic circuits	Arbejder hen mod at udvikle syntetiske logiske porte bestående af specifkke gener, som kan anvendes til en ekstern kontrol af cellefunktioner.
Multiplexed genome editing (MAGE/CRISPR)	Multiplexed genomredigering er en alsidig metode til at modificere en eller flere loci med en meget høj præcision.
Proteomics	Proteomics er studiet af proteomer. Et proteom er et sæt af proteiner produceret af en organisme, en celle eller i en specifik biologisk sammenhæng.
Transcriptomics	Transcriptomics er studiet af transcriptomer, som er det komplette sæt af messenger-RNA i en celle også kaldet cellens ekspressionsprofil, da det udgør et studie af ekspressionsgraden af messenger-RNA i de undersøgte celler.

Whole genome sequencing	Whole genome sequencing (WGS) er en teknik, hvorved det er muligt at bestemme den fulde sekvens af en organismes genom: der skelnes mellem fulde genomer, hvor den fulde sekvens for organismens genom er kendt, og lukkede genomer, hvor ikke blot sekvensen er kendt, men også den indbyrdes rækkefølge af sekvensen på kromosomet og på eventuelle ekstrakromosomale elementer er fastlagt.
Xenobiology	Xenobiologi refererer til kunstig biologi, som endnu ikke er almindeligt kendt i naturen. I praksis handler det om nye biologiske systemer, som adskiller sig fra det generelle dogma i den molekylære biologi om, at alt er bygget ud fra et DNA/RNA-20-aminosyre-system. Det gør xenobiologien ved f.eks. at benytte sig af nukleinsyre-analoger og aminosyrer, som ikke forekommer naturligt i proteiner og derved udfordrer den generelle genetiske kode.

Det område hvor der er udviklet mest umiddelbare muligheder for anvendelse af den syntetiske biologi ligger indenfor "metabolic engineering" af mikroorganismer. Mikrobiel "Metabolic engineering" er defineret som udvikling af nye mikrobielle aktiviteter ved modifikation of enzymatiske forbedringer af cellulære aktiviteter ved modifikation af enzymatiske, transportmæssige, and regulatoriske funktioner af de mikrobielle celler ved hjælp rekombinant DNA technologi "Metabolic engineering" adskiller sig fra den traditionelle genetiske modifikation ved at indebære mere omfattende modifikationer end de enkelte modifikationer som den traditionelle genetiske modifikation har bestået af. "Metabolic engineering" kan sandsynligvis transformere mikroorganismer til at kunne fungere som kemiske "fabrikker" som udfører organisk kemisk syntese (1,2,3)

På trods af, at der ikke findes en generelt accepteret definition af syntetisk biologi, så har EU kommissionens videnskabelige komiteer foreslået en operationel definition, som muliggør risikovurdering og som samtidigt er tilstrækkelig bred til at nye metode udviklinger kan inkluderes. Denne definition lyder: "Syntetisk biologi er anvendelse af naturvidenskab, teknologi og ingeniørarbejde til at facilitere og accelerere design, fremstilling og/eller modifikation af genetisk materiale i levende organismer". (Direkte oversat fra engelsk)(4).

EU-kommisionens videnskabelige komiteer og den europæiske fødevaresikkerhedsautoritet (EFSA) har beskæftiget sig indgående med hvorvidt anvendelse af syntetisk biologi og de udviklede produkter, med udgangspunkt i den ovennævnte definition, kan reguleres ved hjælp af gældende lovgivning (refs). I sær har de haft fokus på risikovurdering af mikroorganismer udviklet ved hjælp den syntetiske biologi skal finde direkte anvendelse i miljøet. I mindre udstrækning er der blevet lagt vægt på deres produktion og anvendelser til produktion i industrien – de såkaldte indesluttede anvendelser Denne rapport beskæftiger sig med denne side af reguleringen (4,5,6,7,8).

3 Risikovurdering af indesluttet anvendelse af genetisk modificerede organismer

Regulering af de indesluttede anvendelser tager udgangspunkt i "Bekendtgørelse om godkendelse af produktion med genetisk modificerede mikroorganismer" (BEK nr. 225 af 19/03/2009) i medfør af lov om miljø og genteknologi, jf. lovbekendtgørelse nr. 811 af 21. juni 2007. Det er lovens formål at "medvirke til at værne om miljø og natur, så samfundsudviklingen kan ske på et bæredygtigt grundlag i overensstemmelse med etiske værdier og i respekt for menneskers livsvilkår og for bevarelsen af dyre- og plantelivet. Loven skal desuden medvirke til at beskytte menneskets sundhed i forbindelse med genteknologi".

Risikovurdering af indesluttede anvendelser af genetisk modificerede mikroorganismer består af en gennemgang og analyse af den tilgængelige videnskabelige information om den specifikke genetisk modificerede mikroorganisme for at vurdere sandsynligheden og farligheden af mulige ugunstige effekter med det formål at bestemme et passende sæt af indeslutnings- og beskyttelses-foranstaltninger, som er proportionale i forhold til risiciene ved den indesluttede aktivitet. Fem overordnede områder indgår i denne risikovurdering (se også figur 1, bilag 1, side 25):

1. Identifikation af biologiske farer.

2. Bestemmelse af risikoklassen for den genetisk modificerede værts-mikroorganisme.

3. Overvejelser i forhold til arten af den indesluttede anvendelse med hensyn til eksponering for potentielle biologiske farer.

4. Tildeling af en risikoklasse til den specifikke indesluttede aktivitet.

5. Implementering af den anbefalede grad af indeslutning.

I forbindelse med identifikationen af biologiske farer og bestemmelse af risikoklassen for den genetisk modificerede vært (ved en vært forstås ifølge lovgivningen den celle eller organisme, hvori det genetiske materiale indføres eller eventuelt fjernes), benyttes de internationalt accepterede fire risikoklasser og lister over mikroorganismer klassificeret ud fra disse, som et udgangspunkt for vurderingen. De fire risikoklasser er defineret som:

Risikoklasse 1: Omfatter mikroorganismer, som med meget stor sandsynlighed ikke forårsager sygdom hos mennesker eller hos dyr af veterinær vigtighed. Altså mikroorganismer med en meget lav sandsynlighed for at forårsage sygdom hos mennesker eller husdyr.

Risikoklasse 2: Omfatter mikroorganismer, som kan forårsage sygdom hos mennesker og dyr, men det er usandsynligt at mikroorganismerne vil udgøre en betydelig fare for arbejdere, samfund, husdyr eller miljø, da der findes effektive behandlingsmetoder og andre beskyttende muligheder, og fordi risikoen for spredning er meget begrænset. Altså mikroorganismer med en moderat individuel risiko og en lav samfundsmæssig risiko.

Risikoklasse 3: Omfatter mikroorganismer, som kan forårsage alvorlig sygdom hos mennesker, men som generelt ikke spredes fra smittede individer til andre. Altså mikroorganismer med en høj individuel risiko, men en lav samfundsmæssig risiko.

Risikoklasse 4: Omfatter mikroorganismer, som sædvanligvis forårsager alvorlige sygdomme hos mennesker eller dyr, og som nemt spredes fra et individ til et andet, direkte eller indirekte. Altså mikroorganismer med en såvel høj individuel som samfundsmæssig risiko.

Disse risikoklasser er direkte relateret til den klassificering af produktion med genetisk modificerede mikroorganismer, som er angivet i Bekendtgørelse om godkendelse af produktion med genetisk modificerede mikroorganismer" (BEK nr. 225 af 19/03/2009), som definerer de fire klasser. I bekendtgørelsen findes der også en nærmere beskrivelse af, hvad de fire niveauer af indeslutning indebærer:

Indeslutningsklasse:

Klasse 1: Produktion, som ikke indebærer nogen risiko eller kun en ubetydelig risiko, dvs. produktion, hvor niveau 1-indeslutning er tilstrækkelig (se bilag 2, side 26) til at beskytte menneskers sundhed og miljøet.

Klasse 2: Produktion, som indebærer lav risiko, dvs. produktion, hvor niveau 2-indeslutning er tilstrækkelig (se bilag 2) til at beskytte menneskers sundhed og miljøet.

Klasse 3: Produktion, som indebærer moderat risiko, dvs. produktion, hvor niveau 3-indeslutning er tilstrækkelig (se bilag 2) til at beskytte menneskers sundhed og miljøet.

Klasse 4: Produktion, som indebærer høj risiko, dvs. produktion, hvor niveau 4-indeslutning er tilstrækkelig (se bilag 2) til at beskytte menneskers sundhed og miljøet.

Imidlertid er det ikke altid muligt at anvende disse lister over alle mikroorganismer, da mange mikroorganismer endnu ikke er klassificeret. Desuden kompliceres klassificeringen af, at klassificering og dermed identifikation af mikroorganismer har ændret sig dramatisk inden for de seneste år på grund af den store udvikling, der er sket inden for DNA- og RNA-sekventeringsteknikker og det dermed forbundne øgede kendskab til mikroorganismers slægtskabsforhold (12). Der findes dog andre hjælpemidler til at tildele en mikroorganisme en risikoklasse.

Et vigtigt princip i den mikrobiologiske risikovurdering er det såkaldte familiaritets-princip, som oprindeligt blev introduceret i forbindelse med vurdering af genetisk modificerede mikroorganismer af OECD. Ifølge dette princip skal den mikrobiologiske risikovurdering baseres på mikroorganismen og dens egenskaber, specielt dem som har betydning i den konkrete anvendelse, miljøet hvortil mikroorganismen bliver introduceret og interaktionerne mellem mikroorganismen og miljøet, og den mulige anvendelse af mikroorganismen. Kendskab og erfaring med disse grundelementer udgør familiariteten med det, der skal risikovurderes. Familiaritet udgør ikke i sig selv en sikker-

hed, men udgør en viden, som kan anvendes i den mikrobiologiske risikovurdering. Familiariteten kan øges ved at indhente mere viden om såvel mikroorganismen, miljøet som interaktionerne mellem organismer og miljø.

En række mikroorganismer har af EFSA fået en status som kaldes QPS (Qualified Presumption of Safety – en kvalificeret antagelse omkring sikkerhed). Mikroorganismer med denne status kan anvendes uden, at de skal gennemgå en fuld risikovurdering. Denne status er baseret på en ide om, at der generelt findes grupper af mikroorganismer, som har været anvendt gennem mange år, uden de har forårsaget kendte problemer, og at der for disse mikroorganismer findes en tilstrækkelig generel viden til at vurdere deres sikkerhed. Mikroorganismerne har fået QPS status efter, at en gruppe af eksperter udpeget af EFSA har gennemgået den tilgængelige viden om dem og vurderet, hvorvidt denne viden var tilstrækkelig til at vurdere deres sikkerhed. I denne vurdering er der specielt blevet lagt vægt på (1) mikroorganismernes taksonomi og hvorvidt denne entydigt kan afgøre organismernes tilknytning til den gruppe af organismer, som får denne status, (2) familiariteten med gruppen og om der med udgangspunkt i den findes tilstrækkelig viden til, at der kan opnås en konklusion vedrørende deres sikkerhed, (3) om der findes kendte mikroorganismer med patogene (sygdomsfremkaldende) egenskaber indenfor gruppen, og i det tilfælde, at der gør, om disse er tilstrækkeligt kendt mht. deres virulens eller toksiske egenskaber til at udelukke patogene stammer fra at få denne status og (4) på hvilken måde de anvendes, og hvorvidt denne anvendelse fører til forekomst i miljøet. Et lignende system findes i USA under betegnelsen GRAS (Generally Recognized As Safe).

Mange mikroorganismer, som anvendes i industrien til produktion af forskellige produkter - det kan være i fødevarer eller i den farmaceutiske eller den kemiske industri - er det man kalder biologisk indesluttede. Det betyder, at de har egenskaber, som måske gør dem ekstra velegnede til produktionen, men som gør dem uegnede til at overleve og dele sig ude i miljøet. Det kan skyldes, at de har helt specielle vækstkrav, for eksempel krav om forskellige aminosyrer eller specifikke vitaminer, eller at de ikke kan danne overlevelsesstadier som forskellige former for sporer. Det betyder, at sådanne mikroorganismer oftest vil være sikre i forhold til de begrænsede udledninger, der kan ske fra produktionen.

For at foretage en fuld miljømæssig mikrobiologisk risikovurdering af en specifik mikroorganisme er det naturligvis nødvendigt at indhente de tilstrækkelige oplysninger til at gennemføre vurderingen. Emnerne og omfanget af oplysninger vil afhænge af den enkelte mikroorganisme, samt måden hvorpå og hvorfor den spredes til miljøet. Emnerne vil dog i de fleste tilfælde omfatte mikroorganismens systematiske placering og beslægtethed med nærtstående organismer, dens naturlige forekomst i miljøet, dens overlevelse, mulige vækst og dens muligheder for spredning. Desuden vil det for mange organismer være vigtigt at kende til organismens aktivitet over for mål-organismer, dvs. sige organismer som organismen er beregnet til at være aktiv overfor, effekter på ikke-mål-organismer, altså organismer som den ikke er beregnet til at være aktiv overfor og mulige interaktioner med andre mikroorganismer.

I denne forbindelse er det også vigtigt at få viden om de mekanismer som mikroorganismen betjener sig af i forhold til dens aktivitet over for andre organismer. For andre mikroorganismer vil det være vigtigt at indhente oplysninger om deres effekter på mobilisering og fastlæggelse af næringsstoffer. Det vil desuden for de allerfleste organismer være nødvendigt at finde viden

om deres mulige sygdomsfremkaldende egenskaber over for mennesker, husdyr og afgrøder. Det er også afgørende at få viden om spredningen til miljøet, såsom dens omfang, dens tidsmæssighed og måden hvorpå den spredes. Med udgangspunkt i denne familiaritet med mikroorganismen og spredningens karakter kan farer identificeres og karakteriseres, og med viden om mikroorganismens overlevelse og mulige vækst samt om spredningens omfang og tidsmæssighed vil eksponeringen kunne vurderes og de eventuelle risici karakteriseres. (10,11,12,13,14)

Inden for de seneste ti år er det nærmest blevet en standard at fuld-genomsekventere mikroorganismer. Det betyder, at der for mange almindelige arter af mikroorganismer, specielt bakterier, findes mange forskellige stammer, som er fuldt sekventerede, og hvor data er nemt tilgængelige fra offentlige databaser. Der eksisterer et stort hidtil uudnyttet potentiale for at anvende disse sekventeringsdata i den mikrobiologiske risikovurdering ikke mindst i forhold til fareidentifikationen. Den potentielle anvendelse vil gøre det muligt at basere en del af fareidentifikationen på sammenligninger mellem mange stammer inden for den samme art på genom- og protein-niveau, i forhold til variationer mellem stammer med hensyn til de egenskaber, som er specielt centrale i forhold til en anvendelse af den specifikke mikroorganisme og i forhold til mikroorganismens eventuelle virulens. Andre data af denne karakter baseret på metoder som transscriptomics, proteomics og metagenomics vil i de kommende år også komme til at spille en afgørende rolle i den mikrobiologiske risikovurdering (10). For mange mikroorganismer udviklet ved hjælp af syntetisk biologi vil resultater baseret på disse teknologier være tilgængelige.

Hvis det ikke er muligt at klassificere mikroorganismen ved hjælp af ovenfor nævnte metoder, er det nødvendigt at foretage en konkret vurdering af mikroorganismen baseret på viden angående:

- Dens mulighed for at forårsage sygdom eller infektion og hvor alvorlige disse kan være.
- Dens mulige værter (mennesker – husdyr).
- Dens potentielle overlevelse og spredning i samfundet og miljøet.
- Mulighederne for at forebygge og behandle i forhold til mikroorganismen.

I forhold til den genetisk modificerede mikroorganisme skal man ved risikovurderingen tage udgangspunkt i det ændrede DNAs identitet, oprindelse, lokalisering, funktion og ekspressions-niveau. Med udgangspunkt i denne viden skal det så vurderes om den genetisk modificerede mikroorganisme har ændrede egenskaber i forhold til værtsorganismen med hensyn til sundhedsaspekter og miljøhensyn, og hvorvidt dette medfører en ændring af klassificeringen.

Når man skal vurdere sandsynligheden for, at den modificerede organisme kan forårsage en fare, så skal man ikke kun tage hensyn til risikofaktorerne, der er forbundet til organismen, men også faktorer som er forbundet med den indesluttede aktivitet. Disse faktorer er for eksempel: omfanget af aktiviteten, produktionsmængderne (volumen og koncentration) og potentialet for dannelse af aerosoler (små, luftbårne partikler eller dråber).

I den endelige vurdering tages der udgangspunkt i værts mikroorganismens egenskaber, det genetiske materiale, der er ændret og dets egenskaber i den

genetisk modificerede mikroorganisme og den indesluttede aktivitets karakteristika i en afsluttende risikovurdering. Denne vurdering fører så til en tildeling af risikoklasse til den specifikke indesluttede produktionsaktivitet. Denne klasse vil ofte være den samme som den oprindelige mikroorganismes risikoklasse, men den kan også være lavere eller højere.

Risikoklassen for den indesluttede produktionsaktivitet definerer den anbefalede grad af dens indeslutning. Hver grad af indeslutning indebærer en række tekniske krav, specifikt udstyr og arbejdsgange, og andre beskyttelsesforanstaltninger, som er nærmere specificeret i ovennævnte bekendtgørelse.

4 Eksempler fra den syntetiske biologi

I det følgende vil ni forskellige eksempler på genetisk modificerede mikroorganismer udviklet inden for den syntetiske biologi blive gennemgået med henblik på en vurdering af, hvorvidt den nuværende lovgivning vedrørende indesluttet anvendelse af genetisk modificerede mikroorganismer er anvendelig i forhold til den syntetiske biologi. Eksemplerne er udvalgt ud fra, at de repræsenterer nogle vidt forskellige eksempler inden for den syntetiske biologi, som samtidigt er vurderet til at være eksempler på modificerede organismer, som vil skulle produceres ved en indesluttet produktion inden for de nærmeste år set i en international sammenhæng (8,9,13).

EKSEMPEL 1. Less is more: Toward a genome-reduced cell factory for "difficult Proteins". Suárez, R.A., Stülke, J. og van Dijl, J.M. I ACS Synthetic Biology 8. 99-108, 2019.

Formål: Formålet med eksemplet er at undersøge om en stamme af Bacillus subtilis 168 med et reduceret genom er velegnet som vært for produktion af proteiner, som det ellers er vanskeligt at producere ved fermentering. Resultaterne viser, at stammen med et reduceret genom gør det muligt at producere heterologe proteiner, som ikke kan produceres af udgangsstammen. Dette synes især at skyldes en forøget translation og en reduceret proteolyse af de heterologe proteiner.

Værtsorganisme: Værtsorganismen er *Bacillus subtilis* 168, en *B. subtilis*-stamme som er blandt de mest studerede gram-positive bakterier og typeorganismen inden for studier af bakterier fra slægten *Bacillus*.

B. subtilis er en klasse 1 mikroorganisme (19), den er blandt de ti mikroorganismer, som er fået såkaldt "Industrial large-scale practice" (GILSP)-status i Danmark (specielt asporogene stammer), og EFSA har givet den QPS-status under forudsætning af, at den specifikke stamme ikke har et toksigent potentiale forårsaget af surfactin, som kan have en ikke-specific toksicitet over for celler ved at påvirke celle-membranen.

B. subtilis 168: Den fulde lukkede genomsekvens er kendt, og en TYGS-analyse bekræfter artsbestemmelsen (20).

Vurdering: Det vurderes, at *B. subtilis* 168 kan henføres til risikoklasse 1 ud fra såvel Risikoklasse klassificeringen, som dens GILSP og QPS-status (stammen producerer ikke surfactin).

Genetisk modifikation: De genetiske modifikationer består dels af reduktion af genomets størrelse fra 4.22 Mb til 2.76 Mb opnået ved hjælp af en række deletions-trin (*B. subtilis* PG10), dels af indsættelse af gener for forskellige heterologe proteiner i *amyE* på kromosomet, som er under kontrol af et inducerbart høj-niveau ekspressionssystem. Sekretion af det heterologe protein bliver drevet af signalpeptidet på xylanase genet *xynA*, som er fusioneret med det heterologe protein-kodende gen.

B. subtilis PG10: Den fulde lukkede genom-sekvens er kendt, og også her bekræfter en TYGS-analyse artsbestemmelsen.

Vurdering: Det vurderes, at disse modifikationer ikke ændrer klassifikationen af mikroorganismen fra risikoklasse 1. Dette skyldes, at det er meget lidt sandsynligt, at modifikationerne vil påvirke stammens muligheder for at forårsage sygdom og dens evne til at overleve i miljøet

Indesluttet anvendelse: I fremtiden er det sandsynligt, at *B. subtilis*-stammer med modifikationer som beskrevet i dette eksempel, vil finde anvendelse til produktion af proteiner, som det ellers en vanskeligt at producere ved fermentering.

Vurdering: En endelig vurdering af klassificering af en indesluttet anvendelse kan kun gennemføres i forbindelse med en konkret ansøgning om produktion.

Regulering af indesluttet anvendelse: "Bekendtgørelse om godkendelse af produktion med genetisk modificerede mikroorganismer" kan anvendes til regulering af dette eksempel uden problemer.

Udsætning: Den genetisk modificerede organisme beskrevet i dette eksempel vil blive brugt til indesluttet produktion.

EKSEMPEL 2. Combating antimicrobial resistance with new-to-nature lanthipeptides created by genetic code expansion. Karbalaei-Heidari, H.R. og Reza, H. Frontiers in Microbiology 11, 590522, 2020.

Formål: Produktion af nye lantipeptider (post-translationelt modificerede peptider) med egenskaber som er forskellige fra de egenskaber, som kan produceres ved hjælp af naturlig evolution, for at forbedre deres farmaceutiske egenskaber, så de opnår et potentiale for terapeutiske anvendelser.

Værtsorganisme: Ingen specifik værtsorganisme er angivet, men det fremgår, at der som udgangspunkt vil blive anvendt bakterier af risikoklasse 1.

Vurdering: Afhængig af den specifikke værtsorganisme

Genetisk modifikation: Den genetiske modifikation betyder, at ikke-kanoniske aminosyrer (aminosyrer som ikke er blandt de 20 naturligt forekommende) indsættes i kendte lantipeptider, som værtsorganismen er modificeret til at producere under proteintranslationen. Dette resulterer i lantipeptider med nye egenskaber, som kan betyde en forøgelse af den antimikrobielle aktivitet. Indbygningen af de "nye" aminosyrer kan foregå enten ved stop-codon repression, en proces hvor et ribosom ikke terminerer proteinsyntesen ved et stop-codon og derfor muliggør inkorporering af en ny aminosyre, eller ved selektivt tryk-inkorporering, hvor man benytter auxotrofe værts-stammer, som mangler en essentiel aminosyre. I stedet tilsætter man forskellige strukturelt og kemisk lignende aminosyre-analoger, der så i stedet bliver genkendt af de korresponderende tRNA-syntetaser og derfor blive inkorporeret i peptidet.

Vurdering: Der er på nuværende tidspunkt ikke tilstrækkelig viden, der gør det muligt at vurdere, hvorvidt sådanne modifikationer vil ændre risikoklasse-klassificeringen af mikroorganismen, da der ikke er tilstrækkelig viden i forhold til xenobiologi til at gennemføre denne vurdering

Indesluttet anvendelse: Engang i fremtiden er det sandsynligt, at bakteriestammer med modifikationer som beskrevet i dette eksempel vil finde anvendelse til produktion af nye antibiotika med ikke-kanoniske aminosyrer ved fermentering.

Vurdering: En endelig vurdering af klassificering af en indesluttet anvendelse kan kun gennemføres i forbindelse med en konkret ansøgning om produktion og en øget viden i forhold til risikovurdering af xenobiologi.

Regulering af indesluttet anvendelse: "Bekendtgørelse om godkendelse af produktion med genetisk modificerede mikroorganismer" vil sandsynligvis kunne anvendes til regulering af dette eksempel.

Udsætning: Den genetiske modificering beskrevet i dette eksempel vil blive brugt til indesluttet produktion.

EKSEMPEL 3. Improvement of the quality of soy sauce by reducing enzyme activity in *Aspergillus oryzae.* Ding, C., Meng, M., Jiang, Y. og Hou, L. Food Chemistry 292, 81-89, 2019.

Formål: Udvikling af en *Aspergillus oryzae*-stamme som giver et større udbytte og et højere indhold af vigtige smagskomponenter i soyasovs.

Værtsorganisme: Værtsorganismen *Aspergillus oryzae* er en skimmelsvamp som i et par tusinde år i Kina og Japan er blevet anvendt til fremstilling af soyasauce, miso, saké og koji. Den er desuden i adskillige år blevet anvendt til industriel produktion af enzymer. Den specifikke værtsstamme benævnes *A. oryzae* 3.042, en stamme som bliver anvendt til soyasovs fermentering. Stammen danner mono-nukleare sporer.

Aspergillus oryzae er en klasse 2 mikroorganisme (DSMZ), den er blandt de ti mikroorganismer, som er fået GIPLSP-status i Danmark (specielt asporogene stammer), derimod har EFSA ikke givet den QPS-status, da skimmelsvampe ikke er omfattet af organismer, som kan opnå denne status.

A. oryzae 3.042's fulde genomsekvens er kendt.

Vurdering: Det vurderes, at *A. oryzae* 3.042 kan henføres til risikoklasse 2 ud fra Risikoklasse-klassificeringen, og fordi den kan producere sporer.

Genetisk modifikation: Genet, som koder for den regulatoriske promotor CreA (også fra *A. oryzae* 3.042), er blevet indsat i kromosom VII. Udtryk af dette regulatoriske protein påvirker generelt metabolismen, begrænser udtrykket af cellulaser og pektinaser og øger arten og mængden af smagskomponenter, specielt alkoholer og estre, i soyasovs ved fermentering.

Vurdering: Det vurderes, at disse modifikationer ikke ændrer klassifikationen af mikroorganismen fra risikoklasse 2. Dette skyldes, (1) at organismen ikke er blevet modificeret med nye egenskaber og (2) at det er meget lidt sandsynligt, at modifikationerne vil ændre stammens muligheder for at forårsage sygdom og dens evne til at overleve i miljøet.

Indesluttet anvendelse: I fremtiden er det sandsynligt, at *A. oryzae*-stammer med modifikationer som beskrevet i dette eksempel, vil finde anvendelse til produktion af soyasovs.

Vurdering: En endelig vurdering af klassificering af en indesluttet anvendelse kan kun gennemføres i forbindelse med en konkret ansøgning om produktion.

Regulering af indesluttet anvendelse: "Bekendtgørelse om godkendelse af produktion med genetisk modificerede mikroorganismer" kan anvendes til regulering af dette eksempel uden problemer.

Udsætning: Soyasovs indeholder ikke aktiv *A. oryzae*, da de er blevet inaktiveret i det færdige produkt, så de bliver ikke udsat.

EKSEMPEL 4. The industrial yeast *Pichia pastoris* is converted from a heterotroph into an autotroph capable of growth on CO_2. Gassler, Y., Sauer,, M., Gasserm B., Egermeier, M.,Troyer, C., Causon, T., Hann, S., Mattanovich, D., og Steiger, M.G. Nature Biotechnology 38, 210-216, 2020.

Formål: Formålet er at omdanne en heterotrof mikroorganisme til en autotrof som er i stand til at vokse på CO_2. Det betyder, at mikroorganismen potentielt set kan optage og lagre CO_2 og anvende dette til produktion af organiske forbindelser og enzymer.

Værtsorganisme: Værtsorganismen er *Pichia pastoris* (nu re-klassificeret som *Komagataella phaffii*); en methylotrof gær som er almindelig anvendt i den biokemiske forskning og i den bioteknologiske industri.

Komagataella phaffii er en klasse 1 mikroorganisme (DSMZ), og EFSA har givet den QPS-status.

Værtstammen *P. pastoris* CBS7434 fulde genomsekvens er kendt. Fylogenetiske analyser viser, at stammen skal henføres *K. phaffii*.

Vurdering: Det vurderes, at *P. pastoris* CBS7434 kan henføres til risikoklasse 1 ud fra såvel Risikoklasse-klassificeringen såvel som dens QPS-status, da dette også gælder *K. phaffii*.

Genetisk modifikation: De genetiske modifikationer, hvor der er blevet indsat otte heterologe gener og fjernet tre native gener, har medført, at metanolmetabolisme "pathwayen" er blevet omdannet til en CO_2-fikserings-"pathway", som minder om Calvin-Benson-Bassham cyklus (en proces bestående af en række kemiske reaktioner, der foregår i grønkornene hos de organismer, som har fotosyntese). Den resulterende stamme kan vokse kontinuerligt med CO_2 som den eneste kulstofkilde.

Vurdering: Det er ikke muligt med den eksisterende viden at vurdere, hvorvidt de genetiske modifikationer ændrer klassifikationen af organismen. Dette skyldes, at det ikke er muligt at vurdere, hvorvidt modifikationerne vil ændre organismens evne til at overleve og være aktiv i såvel miljøet som i mennesker. Dette vil kræve at der gennemføres eksperimenter til belysning af problemstillingerne.

Indesluttet anvendelse: I fremtiden er det sandsynligt, at *K. pastoris*-stammer med modifikationer, som beskrevet i dette eksempel, vil finde anvendelse i indesluttet bioteknologisk produktion.

Vurdering: En vurdering af klassificering af en indesluttet anvendelse kan kun gennemføres i forbindelse med en konkret ansøgning om produktion, hvor de ovennævnte spørgsmål vedrørende overlevelse og aktivitet er blevet afklaret.

Regulering af indesluttet anvendelse: "Bekendtgørelse om godkendelse af produktion med genetisk modificerede mikroorganismer" kan anvendes til regulering af dette eksempel uden problemer.

Udsætning: De genetiske modificeringer beskrevet i dette eksempel vil blive brugt til indesluttet produktion.

EKSEMPEL 5. Toolboxes for cyanobacteria: Recent advances and future direction. Sun, T., Li, S., Song, X., Diao, J. og Chen, L. Biotechnology Advances 36, 1293-1307, 2018.

Formål: Udvikling af cyanobakterier som autotrofe chassiser til produktion af brændstoffer og kemikalier direkte fra CO_2.

Værtsorganisme: Cyanobakterier som f.eks. *Synechocystis* spp. og *Anabaena* spp er autotrofe mikroorganismer, som får deres energi gennem fotosyntese. De er almindeligt kendt som blågrønalger, men er en gruppe af bakterier.

Cyanobakterier er ikke omfattet af Risikogruppe klassificeringen af bakterier og er heller ikke omfattet af QPS. Nogle cyanobakterier producerer humane toksiner.

Vurdering: Cyanobakterier kan ikke umiddelbart henføres til en risikogruppe. Det er nødvendigt, at der gennemføres en "case-by-case"-vurdering af den enkelte organisme.

Genetisk modifikation: Værktøjer til genetisk modifikation af cyanobakterier er ikke så godt udviklet som for mange andre bakteriegrupper. Imidlertid er en række værktøjer under udvikling, som snart vil gøre det muligt at udvikle nye cyanobakterie-stammer med ændrede egenskaber ved hjælp af syntetisk biologi til f.eks. biosyntese af nye organiske forbindelser og brændstoffer direkte fra CO_2.

Vurdering: Kan ikke gennemføres før mere konkrete eksempler kendes.

Indesluttet anvendelse: Cyanobakterier modificeret ud fra den syntetiske biologi vil i løbet af nogle år blive anvendt i den indesluttede produktion.

Vurdering: Kan ikke gennemføres før mere konkrete eksempler kendes.

Regulering af indesluttet anvendelse: "Bekendtgørelse om godkendelse af produktion med genetisk modificerede mikroorganismer" kan anvendes til regulering af genetisk modificerede cyanobakterier, men det kræver, at de er blevet risikogruppeklassificerede.

Udsætning: Cyanobakterier modificeret ud fra den syntetiske biologi vil primært blive anvendt til indesluttet bioteknologisk produktion.

EKSEMPEL 6. Development of CRISPR interference (CRISPRi) platform for metabolic engineering of *Leuconostoc citreum* and its application for engineering riboflavin biosynthesis. Son, J., Jang, S.H., Cha, J.W. og Jeong, K.J. International Journal of Molecular Sciences 21, 5614, 2020.

Formål: Formålet er at udvikle et CRISPR interference system til at modificere udtrykket af bioaktive forbindelser i *L. citreum*. Det udviklede system anvendes til at modificere produktionen af riboflavin, som er et vandopløseligt vitamin.

Værtsorganisme: Værtsorganismen er *Leuconostoc citreum*, som er en heterofermentativ (fermentering der producerer mere end et produkt, f.eks. såvel alkohol som mælkesyre) mælkesyrebakterie, som ofte anvendes til fermentering af fødevarer f.eks. ost og sauerkraut.

Leuconostoc citreum CB2567 er en klasse 1 mikroorganisme (DSMZ) og EFSA har givet den QPS-status.

Værtstammen *L. citreum* CBS2567 fulde genomsekvens er kendt og en TYGS-analyse bekræfter artsbestemmelsen.

Vurdering: Det vurderes, at *L. citreum* CBS2567 kan henføres til risikoklasse 1 ud fra såvel Risikoklasse klassificeringen, som dens QPS-status.

Genetisk modifikation: Et nyudviklet CRISPR interference system anvendes til at nedregulere udtrykket af to gener involveret i produktionen af riboflavin. Systemet førte ikke til reduceret vækst, men medførte en nedregulering af gener, der hæmmer produktionen af riboflavin, hvilket ledte til en øget produktion af riboflavin. En samtidig co-expression af riboflavin *rib* operonen medførte endvidere, at produktionen af riboflavin blev øget 1.5 gang i forhold til udgangsstammen

Vurdering: Det vurderes, at disse modifikationer ikke ændrer klassifikationen af mikroorganismen fra risikoklasse 1. Dette skyldes, at det er meget lidt sandsynligt, at modifikationerne vil påvirke stammens muligheder for at forårsage sygdom og dens evne til at overleve i miljøet

Indesluttet anvendelse: I fremtiden er det sandsynligt, at stammen *L. citreum* med modifikationer som beskrevet i dette eksempel, vil finde anvendelse til produktion af bioaktive forbindelser.

Vurdering: En endelig vurdering af klassificering af en indesluttet anvendelse af kan kun gennemføres i forbindelse med en konkret ansøgning om produktion.

Regulering af indesluttet anvendelse: "Bekendtgørelse om godkendelse af produktion med genetisk modificerede mikroorganismer" kan anvendes til regulering af dette eksempel uden problemer.

Udsætning: Den genetisk modificerede organisme beskrevet i dette eksempel vil blive brugt til indesluttet produktion.

EKSEMPEL 7. Metabolic engineering of Lactococcus lactis for high level accumulation of glutathione and S-adenosyl-L-methionine. Xu, C., Shi, Z., Shao, J., Yu. C. og Xu, Z. World Journal of Microbiology and Biotechnology 35, 185, 2019.

Formål: Formålet er at udvikle en probiotisk bakterie, *Lactococcus lactis*, til at producere gluthation og S-adenosyl methionin - to lever-beskyttende faktorer som beskytter mod forskellige leverskader og -sygdomme. Bakterien har samtidigt en øget evne til at kolonisere tarmen.

Værtsorganisme: Værtsorganismen er *Lactococcus lactis*, som er en mælkesyrebakterie, der ofte anvendes som starterkultur i mejeri-sektoren f.eks. til produktion af surmælk og ymer.

Lactococcus lactis er en klasse 1 mikroorganisme (DSMZ), den er blandt de ti mikroorganismer, som har fået GILSP-status i Danmark, og EFSA har givet den QPS-status

L. lactis NZ9000 fulde genomsekvens er kendt, og en TYGS-analyse bekræfter arts-bestemmelsen.

Vurdering: Det vurderes, at *L. lactis* NZ9000 kan henføres til risikoklasse 1 ud fra såvel Risikoklasse-klassificeringen som dens GILSP og QPS-status.

Genetisk modifikation: De genetiske modifikationer blev gennemført ved at konstruere adskillige inducérbare vektorer, som blev introduceret til værtsorganismen og dermed muliggjorde optimering af det lineære dosis-respons forhold mellem inducer og ekspressionsgraden af de indsatte protein-gener. De indsatte gener er nøglegenerne til produktion af gluthation og S-adenosyl-methionin samt en adhesions-faktor indsat på en sådan måde, at der sker co-ekspression af generne. Generne er klonet fra *Lactiplantobacillus plantarum*, en risikoklasse 1 mikroorganisme.

Vurdering: Det vurderes, at disse modifikationer sandsynligvis ændrer klassifikationen af mikroorganismen til risikoklasse 2. Dette skyldes primært, at modifikationen forbedrer værtsorganismens evne til at kolonisere tarmen.

Indesluttet anvendelse: I fremtiden er det muligt, at *L. lactis*-stammer med modifikationer som beskrevet i dette eksempel, vil blive produceret til anvendelse som probiotika.

Vurdering: En endelig vurdering af klassificering af en indesluttet anvendelse kan kun gennemføres i forbindelse med en konkret ansøgning om produktion.

Regulering af indesluttet anvendelse: "Bekendtgørelse om godkendelse af produktion med genetisk modificerede mikroorganismer" kan anvendes til regulering af dette eksempel.

Udsætning: Produktet fra den indesluttede produktion vil skulle anvendes som et humant probiotika. Denne anvendelse er at betragte som en udsætning og skal derfor også reguleres af udsætningsdirektivet.

EKSEMPEL 8. Reprogramming bacteriophage host range through structure-guided design of chimeric receptor binding proteins. Dunne. M., Rupf, B., Tala, M., Qabrati,X., Ernst, P., Shen, Y., Sumrall, E., Heeb, L., Plückthun, A., Loessner, M.J. og Kilcher, S. Cell Reports 29, 1336-1350, 2019.

Formål: Formålet er at udvikle bakteriofager (vira) med et øget værts-spektrum til kontrol af forskellige serovarer (varianter) af den patogene bakterie *Listeria monocytogenes*.

Værtsorganisme: Organismen er en *L. monocytogenes* fagPSA WT, som kan lysere nogle specifikke stammer af denne bakterieart.

Bakteriofager er ikke omfattet af en risikogruppeklassificering og er heller ikke omfattet af QPS.

Vurdering: Bakteriofager kan ikke umiddelbart henføres til en risikogruppe. Det er nødvendigt, at der gennemføres en "case-by-case"-vurdering af den enkelte bakteriofag.

Genetisk modifikation: Bakteriofagen er modificeret og re-programmeret ved en kombination af struktur og kunstig intelligens-baseret design af et kimært receptor-bindende protein, som er i stand til specifikt at interagere med et bredere spektrum af *Listeria*-serovarer end vildtypen af bakteriofagen. Bakteriofagen er efterfølgende blevet modificeret med den genetiske kode for det kimære receptor-bindende protein.

Vurdering: Det er ikke muligt med den eksisterende viden at vurdere, hvorvidt de genetiske modifikationer vil ændre den case-by-case gennemførte klassifikation af organismen. Dette skyldes, at det ikke er muligt at vurdere, hvorvidt modifikationerne vil ændre bakteriofagens evne til at overleve og være aktiv i såvel miljøet som i mennesker. Dette vil kræve, at der gennemføres eksperimenter til belysning af problemstillingerne.

Indesluttet anvendelse; Bakteriofager kan produceres med specifikke bakterier som værter under indesluttede omstændigheder.

Vurdering: En endelig vurdering af klassificering af en indesluttet anvendelse af kan kun gennemføres i forbindelse med en konkret ansøgning om produktion.

Regulering af indesluttet anvendelse: "Bekendtgørelse om godkendelse af produktion med genetisk modificerede mikroorganismer" kan anvendes til regulering af modificerede bakteriofager, men det kræver, at der er sket en risikogruppe-klassificering af såvel bakteriofag-vildtypen som den modificerede bakteriofag.

Udsætning: Produktet fra den indesluttede produktion vil skulle anvendes til kontrol af patogene bakterier i tarmen hos mennesker. Denne anvendelse er at betragte som en udsætning og skal derfor også reguleres af udsætningsdirektivet.

EKSEMPEL 9. Engineered root bacteria release plant-available phosphate from phytate. Shulse, C.N., Chovatia, M., Agosto, C., Wang, G., Hamilton, M., Deutsch, S., Yoshikoni, Y. og Blow, M.J. Applied and Environmental Microbiology 85, e01210-19, 2019.

Formål: Formålet er at undersøge mulighederne for at frigøre opløseligt fosfat fra naturlige kilder, som findes i jord. Til dette formål blev en række fylogenetisk forskellige phytase-gener identificeret og undersøgt i forhold til deres fosfat-opløsende egenskaber og deres evne til at stimulere plantevækst

Værtsorganismer: Tre rod-koloniserende bakterier (*Pseudomonas simiae*, *Pseudomonas putida* og *Ralstonia* spp.) blev anvendt i eksperimenterne.

De er alle tre klasse 2 mikroorganismer (DSMZ), ingen af dem har QPS-status.

Vurdering: En endelig klassificering af de tre bakterier er ikke mulig før en entydig identifikation og deres specifikke anvendelse foreligger.

Genetisk modifikation: Med udgangspunkt i de forskellige phytasers aminosyresekvens er codon-optimerede gener for ekspression i proteobakterier blevet syntetiseret og integreret ved konjugation i et modificeret locus i de tre bakteriers genomer.

Vurdering: Kan ikke gennemføres før mere konkrete enkelte eksempler kendes.

Indesluttet anvendelse: De specifikke bakterier vil kunne produceres under indesluttede omstændigheder.

Vurdering: En endelig vurdering af klassificering af en indesluttet anvendelse kan kun gennemføres i forbindelse med en konkret ansøgning om produktion.

Regulering af indesluttet anvendelse: "Bekendtgørelse om godkendelse af produktion med genetisk modificerede mikroorganismer" kan anvendes til regulering af modificerede bakterier, men det kræver, at der er sket en risikogruppe-klassificering af såvel vildtyperne som de modificerede bakterier.

Udsætning: De modificerede bakterier fra den indesluttede produktion vil skulle anvendes som bio-stimulanter i landbrugsjord. Denne anvendelse er en udsætning af en genetisk modificeret organisme og skal derfor også reguleres af udsætningsdirektivet.

5 Konklusioner

Det er den overordnede konklusion, at "Bekendtgørelse om godkendelse af produktion med genetisk modificerede mikroorganismer" vil kunne finde anvendelse ved risikovurdering af indesluttede anvendelser af den syntetiske biologi. Der er dog også udfordringer forbundet med denne anvendelse, idet en række mikroorganismer ikke umiddelbart kan henføres til en risikogruppe. Det gælder f.eks. cyanobakterier og bakteriofager. Desuden gælder det for nogle typer af modifikationer, at det ikke med udgangspunkt i den eksisterende viden om risici kan vurderes, om modifikationerne medfører ændring af klassifikation f.eks. i forhold til xenobiologi, og i tilfælde hvor modifikationerne medfører store ændringer af mikroorganismen f.eks. ved at gøre den autotrof. Desuden er der mikroorganismer, der er udviklet til indesluttet produktion, som skal finde anvendelse i miljøet. Ved vurdering af mulige udledninger fra produktionen til miljøet bør organismernes anvendelse i miljøet tages med i den indesluttede klassificering.

De gennemgåede eksempler er valgt, så de er centrale i forhold indesluttet anvendelse, og hvor eksemplerne har sandsynlighed for at føre til anvendelser inden for de nærmeste år. Mulighederne med den syntetiske biologi, som sandsynligvis ikke eller muligvis først på længere sigt vil finde anvendelse til indesluttet produktion, er ikke medtaget. Sådanne eksempler ville kunne være "mikroorganismer" med et fuldt syntetiseret genom udviklet med udgangspunkt i genomet fra et antal kendte genomer, eller patogene mikroorganismer også med et syntetiseret genom f.eks. baseret "historiske" epidemier; sådanne anvendelser vil kræve helt selvstændige og case-specifikke risikovurderinger (1,2,3).

En side af den syntetiske biologi, som ikke er omtalt her, er celle-frie produktionsplatforme, som nu kan udgøre et alternativ til de traditionelle celle-baserede platforme til produktion af proteiner og mindre molekyler. Disse platforme kan bruges til at producere f.eks. proteiner ud fra en eller flere genetiske skabeloner under tilstedeværelse af aminosyrer, nukleotider, enzymer og de rette kemiske omstændigheder, men uden tilstedeværelse af mikroorganismer. Denne side af den syntetiske biologi er ikke omfattet af genlovgivningen, da den ikke involverer aktive organismer, hvilket dog ikke nødvendigvis betyder, at risikovurdering ikke kan være påkrævet (1,2).

Med udgangspunkt i ovenstående er der på en række områder, hvor ny viden og erfaring ville være særdeles nyttig i forhold til risikovurdering af indesluttet anvendelse af mikroorganismer.

- Viden til klassifikation af mikroorganismer som ikke allerede er klassificerede, som f.eks. bakteriofager, cyanobakterier og en lang række mikroorganismer, som kan isoleres fra miljøet.
- Erfaring i anvendelse af fuld genomsekventering i risikovurdering.
- Viden vedrørende "omfattende" modifikationers betydning for mikroorganismens overlevelse og aktivitet i miljøet.
- Viden og erfaring i forhold til risikovurdering af "xenobiologi".
- Udvikling af risikovurderingsværktøjer af "nye syntetiserede mikroorganismer".

6 Referencer

(1) Advances in Synthetic Biology and Biosafety Governance,Jing Li, Huimiao Zhao, Lanxin Zheng and Wenlin An, 2021, Front. Bioeng. Bio-technol., Sec. Biosafety and Biosecurity| https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.598087

(2) Applications, challenges, and needs for employing synthetic biology beyond the lab Sierra M. Brooks & Hal S. Alper, 2021 Nature com-munications 12: 1390, https://www.nature.com/articles/s41467-021-21740-0

(3) Biodefense in the Age of Synthetic Biology, National Acade-mies of Sciences, Engineering, and Medicine; Division on Earth and Life Studies; Board on Life Sciences; Board on Chemical Sciences and Technolo-gy; Committee on Strategies for Identifying and Addressing Potential Bio-defense Vulnerabilities Posed by Synthetic Biology. Washington (DC): Na-tional Academies Press (US); 2018

(4) SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks), SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), SCHER (Scientific Committee on Health and Environmental Risks), 2014. Opinion on Synthetic Biology I Definition, 67 pp. European Commission. Available online: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr_o_044.pdf

(5) SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks), SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), SCHER (Scientific Committee on Health and Environmental Risks), 2015a. Opinion on Synthetic Biology II – Risk assessment methodologies and safe-ty aspects, 65 pp. European Commission. Available online: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr_o_048.pdf

(6) SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks), SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), SCHER (Scientific Committee on Health and Environmental Risks), 2015b Final opinion on synthetic biology III – Risks to the environment and biodi-versity related to synthetic biology and research priorities in the field of synthetic biology, 64 pp. European Commission. Available online: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr_o_050.pdfSBN-13: 978-0-309-46518-2ISBN-10: 0-309-46518

(7) Evaluation of existing guidelines for their adequacy for the food and feed risk assessment of microorganisms obtained through syn-thetic biology. EFSA Journal 20, Issue8, 2022, e07479 https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7479

(8) EFSA Scientific Committee, More S, Bampidis V, Benford D, Bragard C, Halldorsson T, Hernández-Jerez A, Hougaard Bennekou S, Koutsoumanis K, Machera K, Naegeli H, Nielsen SS, Schlatter J, Schrenk D, Silano V, Turck D, Younes M, Glandorf B, Herman L, Tebbe C, Vlak J, Aguilera J, Schoonjans R and Cocconcelli PS, 2020. Scientific opinion on the evaluation of existing guidelines for their adequacy for the microbial char-acterisation and

environmental risk assessment of microorganisms ob-tained through synthetic biology. EFSA Journal 2020; 18(10):6263, 50 pp. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6263

(9) EFSA GMO Panel (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms), 2011. Scientific Opinion on Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use. EFSA Journal 2011;9(6):2193, 54 pp. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2193

(10) EFSA (European Food Safety Authority), 2021. EFSA statement on the requirements for whole genome sequence analysis of microorgan-isms intentionally used in the food chain. EFSA Journal 2021;19(7):6506, 14 pp. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6506

(11) EFSA (European Food Safety Authority), 2007. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. EFSA Journal 2007; 5(12): 587, 16 pp. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2007.587

(12) Microbial biostimulants - the need for clarification in EU regulation Hendriksen, N.B 2022 Trends Microbiol

(13) . 2022 Apr;30(4):311-313. doi: 10.1016/j.tim.2022.01.008.

(14) Horizon Scan of Synthetic Biology Developments for Microorganisms with application in the Agri-Food Sector, 2020, Cécile J.B. van der Vlugt https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2020.EN-1664

(15) OECD (Organisation for Economic Co-operation and Devel-opment), 1993. Safety Considerations for Biotechnology—Scale-up of mi-cro-organisms as biofertilizers, 63 pp https://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/Safety-considerations-scale-up-of-micro-organisms-as-biofertilizers.pdf

(16) -Eksempler på risikoanalyse af værtsorganismer, 1991. Miljø-styrelsen, Miljøprojekt 182 https://www2.mst.dk/Udgiv/publikationer/1991/87-503-9503-3/pdf/87-503-9503-3.pdf

(17) Model til risikoanalyse af værtsorganismer, 1991, Miljøstyrel-sen, Miljøprojekt 181, https://www2.mst.dk/Udgiv/publikationer/1991/87-503-9502-5/pdf/87-503-9502-5.pdf

(18) Miljørisiko analyse, Fremsyn, klarsyn og oplyst miljøbeslutning, 2020. Miljøbiblioteket 8, Aarhus Universitetsforlag.

(19) https://www.dsmz.de/collection/catalogue/microorganisms/catalogue

(20) https://www.dsmz.de/services/online-tools/tygs

Bilag 1

Figur 1: Biologisk risikovurdering af indesluttet produktion med genetisk modificerede mikroorganismer

Bilag 2

Skemaet anviser de normale minimumskrav og foranstaltninger, der er nødvendige for hvert enkelt indeslutningsniveau. Fra: Bekendtgørelse om godkendelse af produktion med genetisk modificerede mikroorganismer (BEK nr 225 af 19/03/2009)

Specifikationer		Indeslutningsniveauer			
		1	2	3	4
GENERELT					
1	Levedygtige mikroorganismer bør indesluttes i et system, som adskiller processen fra miljøet (lukket system)	Eventuelt	Ja	Ja	Ja
2	Kontrol med udsugningsgasser fra det lukkede system	Nej	Ja, udslip reduceres mest muligt	Ja, udslip forhindres	Ja, udslip forhindres
3	Kontrol med aerosoler under prøveindsamling, tilførsel af materiale til et lukket system eller overførsel af materiale til et andet lukket system	Eventuelt	Ja, udslip reduceres mest muligt	Ja, udslip forhindres	Ja, udslip forhindres
4	Inaktivering af store mængder kulturvæsker inden fjernelse fra det lukkede system	Eventuelt	Ja, ved validerede metoder	Ja. ved validerede metoder	Ja, ved validerede metoder
5	Forseglinger bør udformes, så udslip reduceres mest muligt eller forhindres	Ingen specifikke krav	Udslip reduceres mest muligt	Udslip forhindres	Udslip forhindres
6	Det kontrollerede område bør udformes, så det ved udledning kan rumme hele indholdet af det lukkede system	Eventuelt	Eventuelt	Ja	Ja
7	Det kontrollerede område skal kunne forsegles for at muliggøre desinfektion	Nej	Eventuelt	Eventuelt	Ja
UDSTYR					
8	Adgang via luftsluse	Nej	Nej	Eventuelt	Ja
9	Overfladerne skal være resistente over for syrer, alkalier, opløsningsmidler, desinfektionsmidler, dekontamineringsagenser samt lette at rense	Ja, (eventuelt bord)	Ja, (eventuelt bord	Ja, (eventuelt bord, gulv)	Ja, (eventuelt bord, gulv, loft, vægge)
10	Særlige foranstaltninger til at sikre tilstrækkelig udluftning af det kontrollerede område, så luftkontaminering reduceres mest muligt	Eventuelt	Eventuelt	Eventuelt	Ja
11	Det kontrollerede område skal have undertryk i forhold til den umiddelbare omgivelse	Nej	Nej	Eventuelt	Ja
12	Luftind- og udsugning fra det kontrollerede område skal være HEPA-filtreret	Nej	Nej	Ja, (luftudsugning, valgfrit for luftindsugning)	Ja, (luftind- og udsugning)

ARBEJDSSYSTEM					
13	**Lukkede systemer skal være beliggende inden for et kontrolleret område**	**Nej**	**Eventuelt**	**Ja**	**Ja**
14	**Kun adgang for specielt udpeget personale**	**Nej**	**Ja**	**Ja**	**Ja**
15	**Skilte om biologiske risici**	**Nej**	**Ja**	**Ja**	**Ja**
16	**Personalet skal tage brusebad inden de forlader det kontrollerede område**	**Nej**	**Nej**	**Eventuelt**	**Ja**
17	**Personalet skal bære beskyttelsesbeklædning**	**Ja,(arbejdsbeklædning)**	**Ja,(arbejdsbeklædning)**	**Ja**	**Fuldstændig omklædning inden udgang og indgang**
AFFALD					
18	**Inaktivering af genetisk modificerede mikroorganismer i spildevand fra håndvaske og brusere eller lignende spildevand**	**Nej**	**Nej**	**Eventuelt**	**Ja**
19	**Inaktivering af genetisk modificerede mikroorganismer i kontamineret materiale og affald, herunder processpildevand inden endelig udledning**	**Eventuelt**	**Ja, med validerede metoder**	**Ja, med validerede metoder**	**Ja, med validerede metoder**

I skemaet betyder »eventuelt«, at brugeren kan gennemføre, disse foranstaltninger på grundlag af den konkrete vurdering. Myndighederne kan også, efter den konkrete vurdering, stille krav om, at de foranstaltninger, der i skemaet er angivet som »eventuelle« skal anvendes.