**1. ALGEMENE GEGEVENS**

**1.1. Aanvraag**

**1.1.1.** Een korte titel die voldoende specifieke informatie geeft voor publicatie van de aanvraag is gewenst. Voorbeeld: veldproef met *Pseudomonaden* die genetisch gemodificeerd zijn ten behoeve van de afbraak van bodemverontreinigingen.

**1.1.2.** In het kort, puntsgewijs, een uitleg over waarom de proef wordt uitgevoerd en welke werkzaamheden hiervoor uitgevoerd gaan worden.

**1.1.3.** Jaar waarin de proeven van start zouden moeten gaan (inocculatie, etc.)

**1.1.4.** Jaar waarin de proeven worden beëindigd, deze datum kan enkele jaren in de toekomst liggen.

**1.2. Kennisgever**

Met de kennisgever wordt de rechtspersoon bedoeld die wettelijk aansprakelijk is voor de proeven. Dit is in de regel het bedrijf of de in­stelling waarbij de veldproeven worden uitgevoerd.

**1.3 Contactpersoon**

Degene waarmee contact opgenomen hoe worden bij vragen omtrent de uitvoering of het inzien van logboeken.

**2. GEGEVENS OVER HET UITGANGSMICRO-ORGANISME**

**2.1. Uitgangsmicro-organisme**

**2.1.1.** Voor het type micro-organisme kan o.a. een keuze worden gemaakt uit de volgende mogelijkheden: viroïd, RNA virus, DNA virus, bacterie, schimmel of een ander organisme (de laatste mogelijkheid toelichten).

**2.1.2.** Indien het uitgangsorganisme reeds genetisch gemodificeerd is moet er een korte toelichting komen waarin de exacte modificatie in het kort beschreven wordt.

**2.2. Beschrijving**

Pathovar vraagt om een nadere beschrijving van een pathogeen micro-organisme. Afhankelijk van het soort pathogeen verandert de naamgeving van de onderverdeling. Daarom dient de aanduiding pathovar, in voorkomende gevallen, ook te worden gelezen als biotype, fysiologisch ras, isolaat, stam etc. Het is de bedoeling een zo duidelijk mogelijke beschrijving van het micro-organisme te geven, meestal is daarbij het geslacht, de soort en het stamnummer voldoende.

**2.3. Geografische verspreiding**

**2.3.1.** Van de geografische herkomst moet aangegeven worden (a) in welke ecosys­teemtypen het aangetroffen wordt (continentaal, atlantisch of mediteraan ecosysteem), (b) in welke natuurlijke habitats: zout water, zoet water, vrijlevend in de bodem, geassocieerd levend met wortelstelsel van planten, geassocieerd levend met blad-/stengelsysteem van planten, geassocieerd met dieren of een andere habitat (met een toelichting). Daarnaast moet aangegeven worden of het betreffende micro-organisme van nature voorkomt in de Nederland. Het kan van belang zijn om te vermelden onder welke omstandigheden de micro-organismen worden toegepast.

**2.4.**  **Stofwisselingstype, voortplanting, overleving en verspreiding**

**2.4.1.** Hier kan een keuze worden gemaakt uit o.a. de volgende stofwissellingstypen: autotroof, heterotroof, fototroof, chemotroof, organotroof, lithotroof, obligaat aeroob, facultatief anaëroob, obligaat anaëroob.

**2.4.2.** Bij deze vraag gaat het om activiteit in: koolstofkringloop (methaanvorming, afbraak biopolymeren zoals cellulose en lignine); stikstofkringloop (symbiontische stikstoffixatie, vrijlevende stikstoffixatie, nitraatreductie, nitrificatie, denitrificatie); fosfor-/fosfaatkringloop; zwavel-/sulfaatkringloop (in de assimilatorische sulfaatreductie, desulfuricatie, dissimilatorische sulfaatreductie, dissimilatorische zwavelreductie) bijv. de ontzwaveling van steenkool; of in kringlopen van metalen of in zgn. suppresieve gronden.

**2.4.3.** Bij dit punt kan o.a. één van de volgende mogelijkheden worden aangegeven: psychrofiel (tot 20 °C), mesofiel (20 - 42 °C), thermotolerant (tot 50 °C), thermofiel (40 - 70 °C), extreem thermofiel (boven de 70 °C) en kan een toelichting worden gegeven ter verduidelijking.

Geef indien mogelijk ook een indicatie van de generatietijd (introductie-ecosysteem en/of het natuurlijke ecosysteem).

**2.4.4.** -

**2.4.5.** Bij het beantwoorden van deze vraag kunnen o.a. de volgende overlevings- en verspreidingsstructuren worden genoemd: endosporen, cysten, sclerotia, ongeslachtelijke en geslachtelijk schimmelsporen, overige (met een toelichting) of geen enkele.

**2.4.6.** -

**2.5. Genetische elementen**

Onder dit kopje dient informatie gegeven te worden over de mogelijkheden die het uitgangsorganisme bezit voor overdracht van genetisch materiaal op andere micro-organismen.

**2.6.**  **Biologische inperking**

**2.6.1.** Biologische inperking beschrijft de bijzondere eigenschappen van een organisme die de overleving en/of de verspreiding van dat organisme in het milieu beperken. Bijvoorbeeld deficiënties in metabolisme of beperkingen om succesvol te conjugeren of anderszins genetisch materiaal uit te wisselen.

**2.6.2.** In deze vraag gaat het om of het uitgangsorganisme genetisch materiaal kan overdragen op andere organismen of van andere organismen kan worden ontvangen, langs welke weg dan ook.

**2.7. Pathogene en schadelijke eigenschappen**

**2.7.1.**

**2.7.1.1.** Indien het antwoord ja is, dient het pathogene karakter aangegeven te worden (evt. door literatuurreferenties).

**-** Hiervoor kan de classificering in de lijst voor indeling van pathogenen in de Richtlijnen van de COGEM gebruikt worden.

- De EG-Richtlijnen waar in de vraag naar wordt verwezen zijn:

Richtlijn 90/679/EEG inzake de bescherming van de werknemers tegen de risico's van blootstelling aan biologische agentia op het werk;

Richtlijn 77/93/EEG inzake de beschermende maatregelen tegen het binnenbrengen op het grondgebied van de lidstaten van micro-organismen, die schadelijk zijn voor planten en/of plantaardige producten;

Richtlijnen 64/432/EEG, 64/433/EEG, 71/118/EEG, 82/894/EEG, 90/426/EEG, 91/67/EEG, 91/68/EEG, 91/69/EEG 90/424/EEG inzake de gezondheid van dieren en dierlijke producten.

**-** Besteed in de beschrijving, voor zover relevant, aandacht aan: gastheerbereik, infectiviteit, infectieweg, infectieuse dosis, virulentie, virulentiefactoren, allergene eigenschappen, vermogen tot het koloniseren van andere organismen, overlevingskans buiten de gastheer, antibioticaresistentie, bestaan er geschikte therapieën tegen het pathogeen, veroorzaakt het micro-organisme persistente of latente infecties. Hierbij hoeft geen rekening te worden gehouden met niet-immuuncompetente mensen of dieren.

**2.7.1.2.** Indien het antwoord nee is, dient het niet-pathogene karakter onderbouwd te worden (evt. door literatuurreferenties).

**2.7.2.** Aangegeven dient te worden of naast de pathogene eigenschappen zoals hierboven beschreven het micro-organisme andere eigenschappen bezit die nadelig, c.q. schadelijk zijn. Daarbij dient van de schadelijke eigenschappen te worden aangegeven op welke wijze en voor wie of welke organismen deze eigenschappen gevolgen kunnen hebben.

**2.7.3.** Geef aan op welke wijze en onder welke omstandigheden de organismen worden gebruikt om andere (micro-)organismen te bestrijden. Geef daarbij een korte beschrijving van het mechanisme waarvan daarbij gebruik wordt gemaakt.

**2.8. Symbiotische** **relaties**

Voorbeeld: *Rhizobium* met vlinderbloemigen. Een korte beschrijving wat deze symbiotische relatie inhoud.

**2.9. Detectie- en identificatietechnieken**

**2.9.1.** Naast een beschrijving van de technieken dient ook aangegeven te worden wat de gevoeligheid, betrouwbaarheid en specificiteit van de gemelde technieken is.

**2.9.2.** Naast een beschrijving van de technieken dient ook aangegeven te worden wat de gevoeligheid, betrouwbaarheid en specificiteit van de gemelde technieken is.

**3. GEGEVENS OVER DE GENETISCHE MODIFICATIE**

**3.1. Algemene gegevens over de genetische modificatie**

**3.1.1.** Voor het type genetische modificatie kan men kiezen uit: insertie van genetisch materiaal, plaatsgerichte mutagenese/baseverandering, deletie van genetisch materiaal, celfusie of protoplastfusie of anderszins. Indien sprake is van deletie van genetisch materiaal kunnen de vragen onder 3.2 worden overgeslagen. Geef in geval de modificatie een deletie betreft aan wat is gedeleteerd door de vragen bij 3.3 te lezen als gaande over de deletie in plaats van de insertie.

**3.1.2.** Voor de methode die is gebruikt voor de introductie van het genetische materiaal in het micro-organisme kan o.a. worden gekozen uit: transformatie, DNA elektroporatie, micro‑injectie, micro‑encapsulatie, macro‑injectie, schieten met een particle gun, of een andere manier (met toelichting).

**3.2. Vectoren**

**3.2.1.** Vectoren zijn stukken autonoom replicerend DNA (of RNA) die worden gebruikt voor de over­dracht van genetische informatie naar cellen. In deze vraag wordt informatie verlangd over de vectoren die zijn gebruikt voor de uiteindelijke constructie van het GGM.

**3.2.2.** In het antwoord aangeven of de vector stabiel is geïntegreerd of dat deze vrij in de cel voorkomt.

**3.2.3.** Voor de vector kan o.a. uit de volgende reeks worden gekozen: plasmide (smal gastheerbereik, breed gastheerbereik), bacteriofaag, virus, cosmide, fagemide, transposon, overige (toelichten).

**3.2.4.** -

**3.2.5.** Indien het antwoord Ja is dan aangeven op basis waarvan de fenotypen te onderscheiden zijn, bijv. antibioticaresistentie of resistentie tegen zware metalen etc.

**3.2.6.** De gevraagde referentie mag ook dezelfde vector betreffen maar met een andere insertie dan degene vermeld in 3.3.

**3.2.7.**

**3.2.8.** Indien Ja, dan dient te worden aangegeven welke eigenschappen zijn veranderd, bijv. verandering van startpunt van replicatie (ori) kan tot gevolg hebben dat de host range is veranderd in een brede host range, een ander selectiemarkergen, etc. Alle veranderingen in de vector(en) dienen te worden aan­gegeven.

**3.2.9.** Voeg aan de beschrijving van de vector ter verduidelijking een schematische weergave toe. Geef daarin ook de onderlinge afstanden van de onderdelen aan. Besteed bij het beschrijven van de vector aandacht aan:

- startpunten van replicatie ("ori's");

- merkergenen, open leesramen, regulerende sequenties (zoals promotoren, terminatoren, enhancers, introns, targetting signalen) of sequenties die genetische stabiliteit beïnvloeden (zoals transposons of transposonuiteinden etc.;

- de grootte en de functies van de gecodeerde eiwitten;

- onbekende sequenties die op de vector voorkomen;

In specifieke gevallen dienen de volgende gegevens te worden vermeld:

bij een plasmide als vector:

\* is het mobiliseerbaar; zo ja, welke genen zijn daarvoor verantwoordelijk en wat is de mobilisatiefrequentie;

\* is het zelfoverdraagbaar; zo ja, met welke frequentie;

bij bacteriofaag als vector:

\* is de -faag getemperd of lytisch;

\* is de -faag transducerend;

bij een DNA of RNA virus als vector:

\* kan het virus zichzelf vermeerderen in het uitgangsmicro-organisme;

\* bevat de vector minder dan 2/3 van een virusgenoom;

\* is een helperfunctie aanwezig;

bij een retrovirus als vector

\* is het virus amfotroop/ecotroop

**3.3. Insertie**

Insertie is al het genetische materiaal dat aan het genetische materiaal van het uitgangsmicro-organisme wordt of is toegevoegd.

**3.3.1.** Opbouw insertie

Bij de beschrijving van de opbouw van de insertie dienen alle onderdelen die uiteindelijk in het uitgangsmicro-organisme terechtkomen te worden aangegeven (ook onderdelen van de vector):

- promotor-, terminator-, enhancersequenties, etc.

- transposons of transposonuiteinde sequenties, etc.

- open leesramen: geef de functie van de gecodeerde eiwitten (vermeld waar relevant de EC nummers) en de herkomst van het gen (het organisme waaruit het gen is geïsoleerd wordt het donororganisme genoemd).

Beschrijf de insertie schematisch:

Voorbeeld: transposon insertie in het genoom van een micro-organisme: de volgorde van de samenstellende delen vanaf de rechter inverted repeat tot en met de linker inverted repeat

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| insertie | herkomst | functie | donor nr. |
| IS50 | Tn 5 transposon *E. coli* | overbrengen insertie naar micro-organisme | 1 |
| Ptac | *E. coli* | promoter van lac operon: start transcriptie, constitutieve expressie,enhancer voor meer expressie | 1 |
| NPTII | transposon Tn5 uit *E. coli* | kanamycine resistentie | 1 |
| IS50 | transposon Tn5 uit *E. coli* | overbrengen insertie naar micro-organisme | 1 |

**3.3.2.** Geef een opsomming van alle gebruikte donororganismen gekoppeld aan de codering zoals vermeld in 3.3.1 en een opsomming van de relevante eigenschappen van deze organismen (b.v. pathogeniteit). Geef daarbij ook aan wat de graad van verwantschap is tussen het donor-organisme en het uitgangsmicro-organisme.

**3.3.3.** Worden er al dan niet genen in het uitgangsmicro-organisme ingebracht die er van nature ook al in voorkomen? In geval er sprake is van terugzetten van een homoloog gen (self-cloning) is het expressieniveau en de expressieplaats van belang bij de risicobeoordeling.

**3.3.4.** Geef hier aan of bij de constructie van de insertie stukken DNA zijn ingebouwd (om welke reden dan ook) waarvan de sequentie onbekend is en/of waarvan de producten of functies onbekend zijn. Licht het antwoord toe. **N.B.** Bedenk dat wanneer GGM uit deze aanvraag voor veldexperimenten ooit zal worden aangemeld voor een marktintroductie in de EG dat het van cruciaal belang is dat de sequentie (en daarmee ook van eventuele open leesramen) van de gehele insertie zoals deze in GGM voorkomt bekend is.

**3.3.5.** -

**3.3.6.** -

**3.3.7.** -

**3.3.8.** Bij deze vraag dient ook te worden aangegeven of de insertie onder meer codeert voor een product dat op zichzelf niet schadelijk is, maar dat wel schadelijke effecten heeft bijvoorbeeld doordat het een eveneens onschadelijk product omzet in een schadelijk product of omdat het de mogelijkheid biedt aan de cel om een schadelijk product binnen te halen.

**3.3.9.** -

**3.3.10.** Verificatie van de genetische stabiliteit en de factoren die daarop van invloed zijn.

**4. GEGEVENS OVER HET GGM**

**4.1. Geschiedenis**

**4.1.1.** Het is van belang informatie te geven over voorgaande experimenten. Geef hier een beschrijving van de re­sultaten van de (eventuele diverse) introducties in het milieu van deze GGM's. Vermeld daarbij tevens::

- het ingeperkt gebruik vergunningnummer waaronder het GGM is vervaardigd, indien het GGM in Nederland is gemaakt;

- de eerdere introductie in het milieu vergunningnummers, indien het een introductie betreft van GGM's waarmee in Nederland al eerder veldproeven zijn uitgevoerd;

- het summary notification information format (SNIF) nummer waaronder de introductie van dit GGM eerder in Brussel is gemeld, indien het GGM al in het milieu is geïntroduceerd in één van de andere EG-lidstaten.

**4.2. Eigenschappen**

De veranderingen van het GGM ten opzichte van de uitgangssoort dient nogmaals in de risico-analyse bij onderdeel 7 te worden geëvalueerd.

**4.2.1.** Bij de nieuwe eigenschappen van het GGM dienen zowel beoogde als niet-beoogde nieuwe eigen­schappen te worden vermeld.

**4.2.2.** GGM's kunnen direct betrokken zijn bij de bestrijding van andere organismen. In het antwoord op deze vraag zijn uitdrukkelijk zowel de doelorganismen als de eventuele niet-doelorganismen waarop toch een effect is waar te nemen van belang en dienen hier te worden beschreven.

**4.2.3.** Hier kunnen zowel moleculair biologische technieken, zoals southern blots en PCR's, worden ver­meld, als ook fenotypische karakteriseringsmethoden.

**4.3. Verschillen**

Hier gaat het om registratie van alle verschillen tussen de uitgangsmicro-organisme en het GGM. Geef waar nodig een toelichting.

**5. GEGEVENS OVER DE VOORGENOMEN INTRODUCTIE IN HET MILIEU**

**5.1. Locatie**

**5.1.1.** Het aantal plaatsen waar een experiment wordt aangelegd/uitgevoerd

**5.1.2.** De gemeente(s) en de provincie(s) waarin de werkzaamheden zullen worden uitgevoerd dienen hier te worden aangegeven. Eventueel kan in de beschrijving van voorgenomen werkzaamheden de locaties van een bezoekadres voorzien te worden. Vermeld de eventuele nabijheid van beschermde gebieden of woonwijken die in de nabijheid van de proeflocatie liggen.

**5.1.3.**  **Indien het een veldproef betreft:** Maximale omvang van het feitelijke introductiegebied geeft het maximale aantal m2 aan waar GGM's worden inge­bracht **per locatie**. De omvang kan oplopen tot het aangegeven maximum gedurende de looptijd van de beschikking. Ook het totale oppervlak moet hier vermeld worden.

**In andere gevallen:** een andere maat geven bijvoorbeeld maximaal volume dat gebruikt wordt.

**5.1.4.**  **Indien het een veldproef betreft:** Maximale omvang van het introductiegebied in ruime zin geeft in m2 aan wat de grootte is van het gebied **per locatie** waar activiteiten in het kader van de introductie zullen plaatsvinden: bijvoorbeeld inclusief buffer­rijen om het eigenlijke proefveld heen. De omvang kan oplopen tot het aangegeven maximum gedurende de looptijd van de beschikking.

**5.2. Habitat/ecosysteem**

Indien het ecosysteem verschilt van het ecosysteem dat normaliter wordt bezet voor het uitgangsmicro-organisme licht dan het antwoord toe.

**5.3. Introductiemethode en -omvang**

**5.3.1.** Bij de beantwoording van deze vraag gaat het om een beschrijving van de voorbereidende werkzaamheden, hoe gewoon ook, die worden uitgevoerd voordat de GGM's kunnen worden toegepast.

**5.3.2. -**

**5.3.3.** Een beschrijving van de handelingen die uitgevoerd worden voor het uitvoeren van de proef.

**5.4. Inperkingen**

**5.4.1.** Onder inperking van het experiment wordt verstaan eventuele fysische/chemische/biologische barrières, die beogen het verspreiden van GGM's te beperken.

**5.4.2.** Geef hier een specificatie van de maatregelen die genomen worden om verspreiding van het GGM te voorkomen, bijvoorbeeld: desinfectie schoeisel, autoclaveren besmet materiaal etc.

**5.4.3.** -

**5.4.4.** Hierbij kan gedacht worden aan waarschuwingsborden, gaas om het object, afgesloten toegangsdeuren etc.

**5.5. Vervoer**

Omdat het voorkomt dat GGM's moet worden tijdens de experimenten is het van belang om in de aanvraag te beschrijven hoe zal worden vervoerd, daarmee wordt bij de vergunningverlening direct het vervoer naar een andere locatie waarvoor de vergunning van kracht is geregeld.

**5.6. Voedings- en/of consumptie-experimenten**

Indien het antwoord JA is geef dan een beschrijving van de voorgenomen experimenten.

**5.7.**  **Na afloop van het experiment**

**5.7.1.** Een voorstel voor hoe het introductiegebied na afloop van het experiment behandeld gaat worden (hergebruik, ontsmetting, braakleggen, etc.).

**5.7.2.** Een voorstel voor hoe het levensvatbare materiaal na afloop van het experiment behandeld gaat worden. Beschrijf hier tevens de maatregelen die in het geval van noodsituaties genomen dienen te worden.

**5.7.3.** Alle vormen van restproducten van genetisch gemodificeerd materiaal opsommen die ontstaan bij alle handelingen.

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

Onder dit punt wordt gevraagd naar voorstellen die door de aanvrager als noodzakelijk voor het veilig uitvoeren van het experiment worden beschouwd.

**6.1. GGM identificatie**

Geef in het antwoord op deze vraag aan hoe het micro-organisme kan worden geïdentificeerd. Voor grootschalige introducties en voor marktaanvragen moet duidelijk zijn waar eventuele integratie in het genoom heeft plaatsgevonden en hoe dit GGM is te onderscheiden van elk ander micro-organisme.

**6.2.**  **Effecten op habitat/ecosysteem**

Hier kunnen methoden worden gemeld waarmee negatieve dan wel positieve effecten van het GGM op (micro-)organismen die in de nabijheid van het GGM leven kunnen worden bestudeerd.

**6.3. Observatie oppervlak**

**Indien het een veldproef betreft:** Oppervlakte van het observatiegebied dient te worden aangegeven in m2 en kan niet kleiner zijn dan de oppervlakte van het introductiegebied.

**6.4. Observatieduur**

Observatieduur dient minimaal even lang te zijn als de duur van het experiment waarin GGM's in het milieu worden gebracht.

**6.5. Observatiefrequentie**

**6.6. Voorgestelde maatregelen in geval van niet-beoogde gebeurtenissen**

Geef hierbij aan hoe er gehandeld dient te worden in het geval niet-beoogde gebeurtenissen plaatsvinden. Dit met het oog op het voorkomen van verspreiding van het GGM. Geef hier ook een inventarisatie van welke niet-beoogde gebeurtenissen tot deze werkzaamheden aanleiding geven.

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

Een vergunning op grond van de Wet milieugevaarlijke stoffen kan slechts worden geweigerd in het belang van de bescherming van mens en milieu. De vraag of er factoren zijn die zich tegen verlening van een vergunning voor de introductie in het milieu van genetisch gemodificeerde organismen verzetten, wordt beantwoord op grond van een beoordeling van de mogelijke risico's verbonden aan de voor vergunning voorgedragen werkzaamheden.

Bij de analyse en beschouwing van de eigenschappen van het genetisch gemodificeerde organisme en de wijze waarop het wordt toegepast staan twee vragen centraal:

1. Zijn er redenen om aan te nemen dat **het genetisch gemodificeerde organisme** of zijn nakomelingen vanwege de genetische modificatie schadelijk zal zijn voor mens of milieu?

2. Kan het ingebrachte genetische materiaal van het genetisch gemodificeerde organisme worden overgedragen naar **andere organismen**, en zijn er redenen om aan te nemen dat die als een resultaat daarvan schadelijk zullen zijn voor mens of milieu?

Deze vragen zijn niet in hun algemeenheid te beantwoorden. Daarom is in de risico-analyse en de daaropvolgende risicobeoordeling een gedetailleerde structuur aangebracht op basis van internationale wetenschappelijke consensus. Achtereenvolgens worden beschouwd:

- de relevante eigenschappen van het uitgangsorganisme,

- de ingebrachte genetische eigenschappen,

- de eigenschappen van het genetisch gemodificeerde organisme zelf, voor zover deze bekend zijn uit eerdere proefnemingen,

- de werkzaamheden met het genetisch gemodificeerde organisme.

De aanvraagformulieren voor vergunningen voor de introductie in het milieu van genetisch gemodificeerde organismen zijn volgens deze structuur opgezet. Met het invullen van hoofdstuk één tot en met zes van het aanvraagformulier wordt door de aanvrager een overzicht gegeven van de voor de risicobeoordeling relevante aspecten.

**Op deze plek in het formulier (hoofdstuk zeven) moet een evaluatie worden gegeven van de aard en de omvang van alle eventuele effecten die gerelateerd zijn aan de modificatie. Daarbij dient met name aandacht te worden besteed aan de aspecten zoals vermeld onder punt 4.3. van het formulier. Deze synthese van alle informatie zoals deze tot op dit punt in het formulier is verwerkt dient uit te monden in een volledige risico-analyse.**