



ChatGPT/DALL-E von OpenAI

Anwendungen von gentechnisch veränderten Mikroorganismen außerhalb geschlossener Systeme

Übersichtsstudie im Auftrag der
Eidgenössische Ethikkommission
für die Biotechnologie im Ausserhumanbereich (EKAH)

Benno Vogel
(www.bennovogel.eu)

Winterthur/Berlin, Dezember 2024

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

1. Einleitung	1
2. Produkt-übergreifende Aspekte	2
2.1 Konzepte und Strategien für die Nutzung von GVM	2
2.1.1 Lebende GV-Bakterien für Anwendungen an Mensch und Tier	2
2.1.2 Paratransgenese	3
2.1.3 dsRNA-bildende GVM	3
2.1.4 Nutzung von GV-Phagen	3
2.1.5 CRISPR/Cas-basierte Mittel gegen Bakterien	4
2.1.6 Gentechnische Veränderung von Bakterien in situ	4
2.1.7 Ausbreitungsfähige GV-Viren	5
2.1.8 Konsortien	5
2.1.9 GVM mit genetischem Biocontainment	5
2.1.10 Design von GVM mit Künstlicher Intelligenz	6
2.1.11 Gene Drives	7
2.1.12 Xenobionten, Minimalzellen und Synthetische Genome	7
2.2 Regulatorische Aspekte	7
2.2.1 Risikoabschätzung und -bewertung	8
2.2.2 Geschlossene Freisetzungen	8
2.2.3 Antibiotikaresistenzgene	8
2.2.4 Monitoring nach unbewilligten GVM	9
3. Humanarzneimittel	9
3.1 Lebende Biotherapeutika	11
3.2 Therapien mit GV-Phagen	12
3.3 CRISPR/Cas-basierte Antibiotika	13
3.4 Mittel für in situ-Gentechnik	14
4. Tierarzneimittel	15
4.1 Lebende Biotherapeutika	15
4.2 Mittel mit dsRNA-bildenden GVM	17
4.2.1 Aquakultur	17
4.2.2 Imkerei	18
4.3 Impfstoffe mit selbstausbreitenden GV-Viren	18
4.4 mRNA-Impfstoffe	19
4.5 DNA-basierte Mittel	21
5. Lebensmittel	23
5.1 Starterkulturen mit Hefen	23
5.2 Starterkulturen mit Milchsäurebakterien	25
5.3 Nahrungsergänzungsmittel	26
5.4 Herkunftsnachweis mit GVM	27

6. Futtermittel	27
6.1 Einzellerprotein – GVM als Eiweißquelle.....	28
6.1.1 GV-Stämme für SCP-Gewinnung.....	28
6.1.2 GV-Futtermittel als Nebenprodukt.....	29
6.2 Futtermittelzusatzstoffe.....	29
6.2.1 Schutz vor pathogenen Mikroorganismen.....	30
6.2.2 Wachstumssteigerung.....	30
6.2.3 Nährstoffverwertung.....	30
6.2.4 Siliermittel.....	31
6.2.5 Methandreduktion.....	31
7. Pflanzenschutzmittel	32
7.1 Mittel mit dsRNA-bildenden GVM.....	35
7.1.1 Strategien mit nicht-vermehrungsfähigen GVM.....	36
7.1.2 dsRNA-bildende GVM in Firmen-Pipelines.....	36
7.2 GVM als Lieferanten von Sekundärmetaboliten.....	37
7.3 Bakterizide mit GV-Phagen.....	38
7.4 Pflanzenschutz mit in situ-Genomeditierung.....	39
7.5 CRISPR/Cas-basierte Bakterizide.....	39
7.6 Erhöhung der Stresstoleranz.....	40
7.7 Entschärfung humanpathogener Biokontrollstämmen.....	40
7.8 GVM gegen Mykotoxine.....	41
7.9 Avirulente GV-Stämme pflanzenpathogener Pilze.....	42
8. Düngemittel	42
8.1 Stickstofffixierende GVM.....	43
8.2 Phosphor-lösende GVM.....	46
8.3 GVM als Destruenten.....	46
8.4 GVM gegen abiotischen Stress.....	47
8.5 CAPME-Technik.....	48
8.6 Dünger aus Biomasse inaktiverter GVM.....	48
9. Kohlenstoffsequestrierung	49
10. GVM-vermittelte Traits für Pflanzen	50
10.1 Plasmid-vermittelte Traits.....	51
10.2 Viren-vermittelte Traits.....	51
10.3 HEGAAAs.....	51
10.4 mRNA-vermittelte Traits.....	52
11. Biozide	52
11.1 Mittel gegen Stechmücken.....	52
11.2 Mittel für Artenschutz.....	54
11.3 Mittel gegen invasive Arten.....	54
11.4 Korrosionsschutzmittel.....	54
11.5 Immunokontrazeption – Mittel zur Kontrolle von Wildtierbeständen.....	55

11.6 Desinfektionsmittel.....	55
12. Biosensoren	56
13. Lebende Diagnostika	58
14. Bioremediation	59
14.1 Bioremediation mit in situ-Gentechnik.....	60
15. Mikroalgenzucht.....	60
16. Kosmetika	62
17. Herstellung von Biotreibstoffen.....	63
18. Schul- und Freizeitbereich	65
19. Lebende Materialien	67
Literatur	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Humanarzneimittel, die GVM enthalten und in der EU und der Schweiz zugelassen sind. ..	10
Tabelle 2: Tierimpfstoffe, die GVM enthalten und in der EU und der Schweiz zugelassen sind.	16
Tabelle 3: Plasmid-basierte Tierarzneimittel mit Zulassungen	22
Tabelle 4: GVM, die in einigen Ländern im Lebensmittelbereich verkehrsfähig sind.....	24
Tabelle 5: GVM, die als Pflanzenschutzmittel zugelassen wurden.	32
Tabelle 6: Gentechnische Veränderungen bei Biokontrollorganismen, die in der EU und der Schweiz als Pflanzenschutzmittel zugelassen sind	33
Tabelle 7: Kommerziell erhältliche Biosensoren mit GVM	58
Tabelle 8: Kommerziell erhältliche GV-Hefen für die Bioethanolherstellung.....	64
Tabelle 9: Beispiele von im Online-Handel erhältlichen Gentechnik-Experimentierkits.....	66

Zusammenfassung

Im Auftrag der Eidgenössische Ethikkommission für die Biotechnologie im Ausserhumanbereich (EKAH) wurde eine Literatur- und Internetrecherche zu Anwendungen von gentechnisch veränderten Mikroorganismen (GVM) außerhalb geschlossener Systeme durchgeführt. Der dazu vorliegende Bericht zeigt folgendes Bild:

In der EU und der Schweiz sind gegenwärtig allein in der Human- und Veterinärmedizin Produkte mit GVM zugelassen. In den beiden Bereichen werden vor allem GV-Viren und selten auch GV-Bakterien und rekombinante Plasmide als Impfstoffe verwendet.

Weltweit gibt es auch in anderen Bereichen Produkte: GVM sind als Lebens-, Futter-, Pflanzenschutz- und Düngemittel, als Starterkultur für die Bioethanolherstellung, als Biosensoren sowie als Experimentierkits für den Schul- und Freizeitbereich auf dem Markt erhältlich.

Weltweit entwickeln Startups, kleinere und mittlere Betriebe und Konzerne derzeit weitere Produkte mit GVM – sowohl für die oben genannten Bereiche als auch für Biozide, Kosmetika, Diagnostika oder Mittel für die Bioremediation. Für die Entwicklung dieser Produkte werden Viren, Bakterien, Pilze, Mikroalgen und auch Plasmide eingesetzt.

Bei der Entwicklung von Produkten mit GVM kommt eine Reihe verschiedener Konzepte und Strategien zum Einsatz. Dazu gehören CRISPR/Cas-basierte Bakterizide, die Paratransgenese, die Nutzung von dsRNA-bildenden GVM, der Einsatz von GV-Phagen und Mittel mit selbstausbreitenden GV-Viren. Zudem werden Methoden entwickelt, um Bakterien direkt in der Umwelt gentechnisch verändern zu können.

Produkte mit GVM werden für eine Vielfalt möglicher Einsatzorte entwickelt – so etwa für Haut, Mund und Darm von Tieren und Menschen, für Ackerböden, für Wurzeln, Blätter und Interzellularräumen von Pflanzen oder für Betonwände, Schiffsrümpfe, Krankenhausbetten und Vorgärten von Wohnsiedlungen. GVM werden zudem auch für Einsätze in Gewässern und Naturschutzgebieten entwickelt und somit für Lebensräume, die in der Schweiz besonders vor GVO zu schützen sind.

Produkte mit GVM werden sehr unterschiedliche Risikoprofile aufweisen. Die bestehenden Vorschriften und Leitlinien für die Risikoabschätzung und -bewertung von GVM sind an die neuen Entwicklungen anzupassen. Einige Produkte, bei denen die GVM in Kapseln, Geräten und anderen Materialien eingeschlossen sein werden, verwischen die regulatorischen Grenzen zwischen Umgang in geschlossenen Systemen und Umgang in der Umwelt.

1. Einleitung

Außerhalb von Forschungslaboren und Produktionsanlagen spielten Anwendungen von gentechnisch veränderten Mikroorganismen (GVM) bisher kaum eine Rolle. Ausnahmen sind die Human- und Tiermedizin, die Biotreibstoffherstellung sowie der Schul- und Freizeitbereich, wo seit längerem mehrere Produkte mit GVM auf dem Weltmarkt erhältlich sind. Jetzt ändert sich das und seit kurzem sind auch im Lebens- und Futtermittelbereich sowie bei Pflanzenschutz- und Düngemitteln Produkte mit GVM auf dem Markt verfügbar. Da Forschung, kleinere und mittlere Betriebe sowie Konzerne derzeit eine ganze Reihe neuer GVM entwickeln, werden weitere Produkte folgen – sowohl in den bereits genannten Bereichen als auch bei Bioziden, Kosmetika, Diagnostika oder Mitteln für die Bioremediation.

In der Schweiz sind GVM derzeit allein in der Human- und Tiermedizin für Anwendungen außerhalb geschlossener Systeme zugelassen. Im Zuge der weltweiten Forschungs- und Entwicklungs- (F&E) Tätigkeiten ist davon auszugehen, dass in Zukunft auch hierzulande in mehreren Bereichen Produkte mit GVM zum Inverkehrbringen beantragt werden und dass darunter auch Produkte sein werden, deren Anwendung gesellschaftlich kontrovers bewertet wird.

Auftrag und Umsetzung

Um sich auf die anstehenden Debatten und Bewertungen von Anwendungen von GVM außerhalb geschlossener Systeme vorzubereiten, hat die Eidgenössische Ethikkommission für die Biotechnologie im Ausserhumanbereich (EKAH) zwei Übersichtsstudien in Auftrag gegeben – eine zu Anwendungen von GVM in der Landwirtschaft und eine zu Anwendungen von GVM in anderen Umweltbereichen.

Mittels Literatur- und Internetrecherchen sind dazu jeweils der Stand der Kommerzialisierung sowie aktuelle Entwicklungen von GVM ermittelt worden. Die Ergebnisse der Recherchen sind im vorliegenden Bericht dargestellt – und zwar weitgehend in einer Produktart-bezogenen Gliederung. Die Darstellung der Ergebnisse in einem einzelnen Bericht und nach Produktart gegliedert bot sich an, weil einerseits Anwendungen von GVM außerhalb geschlossener Systeme oft nicht nur dem Gentechnikrecht sondern auch produktrechtlichen Vorschriften unterliegen und andererseits einzelne Produktarten sowohl in der Landwirtschaft als auch in anderen Umweltbereichen einsetzbar sind. So betreffen etwa GVM-basierte Tierarznei- und Futtermittel nicht nur landwirtschaftliche Nutztiere sondern auch Haustiere, Pflanzenschutzmittel wiederum kommen nicht allein in der Landwirtschaft, sondern auch in der Forstwirtschaft zum Einsatz und mit Mitteln der Bioremediation lassen sich nicht nur Ackerböden sondern auch andere Umweltmedien sanieren.

Behandelte GVM

Der Bericht behandelt Mikroorganismen, die mit herkömmlichen gentechnischen Verfahren oder mit sogenannten neuen genomischen Techniken wie CRISPR/Cas hergestellt worden sind und nach geltendem Recht in der Schweiz als gentechnisch veränder-

te Organismus (GVO) gelten. Eine Ausnahme sind selbstklonierte Mikroorganismen. Sie sind in der Schweiz keine GMO, werden aber im Bericht trotzdem behandelt, weil sie einerseits in der EU als GMO gelten und andererseits nicht immer klar ist, ob die in der Literatur als selbstkloniert ausgewiesenen Mikroorganismen tatsächlich den rechtlichen Kriterien der Selbstklonierung entsprechen.

Der Fokus des Berichts liegt auf gentechnisch veränderten Viren, Bakterien, Pilzen und Mikroalgen. Da in der Schweiz auch biologisch aktive Nucleinsäuren rechtlich als Mikroorganismen gelten können, sind jedoch auch Entwicklungen von DNA- und mRNA-basierten Produkten beschrieben.

Da biologisch aktive Nucleinsäuren rechtlich GVM sein können, behandelt der Bericht zudem auch Produkte mit inaktivierten GVM. Auch wenn solche mitunter als Paraprobiotika genannten Produkte keine vermehrungsfähigen GVM enthalten, fallen sie in der Schweiz wegen der vorhandenen rekombinanten DNA unter das Gentechnikrecht.

Aufbau des Berichts

Das Kapitel 2 beschreibt kurz einige allgemeine Aspekte, die mehrere Produktbereiche betreffen. Die Kapitel 3 bis 18 behandeln dann die Entwicklungen von GVM in den verschiedenen Produktbereichen. In Kapitel 19 wird schließlich mit den «living materials» ein neuartiger, auf GVM beruhender Ansatz für die Herstellung von Materialien beschrieben, der wiederum mehrere Produktbereiche betreffen kann.

2. Produkt-übergreifende Aspekte

2.1 Konzepte und Strategien für die Nutzung von GVM

Forschung und Industrie verfolgen derzeit eine Reihe von Konzepten und Strategien, die in mehreren der in den Kapiteln 3 bis 19 beschriebenen Bereichen in naher oder teilweise auch erst in ferner Zukunft zu Produkten mit GVM führen können. Diese Konzepte und Strategien sind im Folgenden kurz beschrieben.

2.1.1 Lebende GV-Bakterien für Anwendungen an Mensch und Tier

In mehreren Bereichen arbeiten Forschende an Mitteln, die lebende GV-Bakterien enthalten und für einen Einsatz an Menschen oder Tieren vorgesehen sind. Die Bakterien sind dazu meist so gentechnisch verändert, dass sie entweder als Lieferanten für einen Wirkstoff einsetzbar, als Antagonist unliebsame Mikroorganismen fernhalten oder als Biosensor fungieren. Geplant ist der Einsatz lebender GV-Bakterien in Human- und Tierarzneimitteln (Abschnitte 3.1 und 4.1), in Nahrungsergänzungsmitteln (Abschnitt 5.3), in Futtermittelzutaten (Abschnitt 6.2), in Kosmetika (Abschnitt 16), in Diagnostika (Abschnitt 13) sowie in Bioziden (Abschnitt 11.1). In Zukunft dürfte es deshalb Tiere und Menschen geben, die in ihrem Haut-, Mund- oder Darmmikrobiom GVM mit sich tragen.

2.1.2 Paratransgenese

Die Paratransgenese ist ein Verfahren, bei dem das Mikrobiom von Insekten mit einem GV-Stamm einer autochthonen Art angereichert wird. Das Konzept ist, Mikroorganismen, die mit Insekten assoziiert sind oder mit ihnen in Symbiose leben, so zu verändern, dass sie in ihren Wirtstieren unerwünschte Viren, Bakterien, Pilze oder Parasiten beseitigen oder die Eigenschaften ihrer Wirtstiere selbst verändern. Erprobt wird die Paratransgenese heute vor allem in den Bereichen Public Health und Pflanzenschutz, wo sie als mögliches Mittel zur Kontrolle von Insekten-übertragenen Krankheiten gilt (Abschnitte 11.1 und 7.1). Zudem wird sie im Bereich Tierarzneimittel als Strategie gegen Bienenkrankheiten getestet (Abschnitt 4.2.2).

2.1.3 dsRNA-bildende GVM

Doppelsträngige RNA (dsRNA) ist ein Wirkstoff, mit dem sich in Zellen von Organismen die RNA-Interferenz (RNAi) auslösen und dadurch gezielt Gene stilllegen lassen. Eine Möglichkeit, RNAi für Produkte zu nutzen, ist die Verwendung chemisch synthetisierter dsRNA. Da die chemische Herstellung jedoch teuer ist, kommt synthetisch hergestellte dsRNA nur in Bereichen als Wirkstoff in Frage, in denen Mittel hochpreisig sein können, wie etwa in der Humanmedizin.

Eine Möglichkeit, RNAi auch für Produkte in niedrigpreisigen Bereichen zu nutzen, bieten dsRNA-bildenden GVM. Sie sind dabei nicht nur die kostengünstigere Alternative zur chemischen Herstellung, sondern haben auch noch den Vorteil, dass sie eine Schutzhülle für die sehr umweltlabilen dsRNA-Moleküle bilden. Nachteile gibt es hingegen beim Risikoprofil. Da GVM die dsRNA vor dem Abbau schützen, bleiben die Wirkstoffe auch länger für etwaige Wirkungen auf Nichtzielorganismen aktiv. GVM können sich zudem über den Einsatzort hinaus verbreiten und ihr dsRNA-codierenden Gene an andere Mikroorganismen weitergeben.

dsRNA-bildende GVM sind derzeit als Biozide (Abschnitte 11.1 und 11.3), Pflanzenschutzmittel (Abschnitt 7.1) und Tierarzneimittel (Abschnitt 4.2) in der Erprobung.

2.1.4 Nutzung von GV-Phagen

Bakteriophagen – kurz Phagen genannt – sind Viren, die ausschließlich Bakterien infizieren. Sie gelten als die am häufigsten vorkommenden biologischen Einheiten auf der Erde und kommen zusammen mit Bakterien in allen Lebensräumen vor (Buttimer et al. 2017).

Die Idee, Phagen als biologisches Mittel einzusetzen, um unerwünschte Bakterien zu kontrollieren, gibt es bereits seit den 1920er Jahren. Das F&E-Interesse an ihnen blieb aber lange gering, da Phagen-Mittel nicht mit den leicht verfügbaren und breit wirkenden chemisch-synthetischen Mitteln konkurrieren können. Seit der Jahrtausendwende ist das Interesse aber gestiegen und Phagen gelten heute als vielversprechende und umweltfreundliche Möglichkeit für die Kontrolle unerwünschter Bakterien.

Bei der Entwicklung von Phagen-basierten Produkten kommen auch gentechnische Methoden zum Einsatz. Mit ihnen werden GV-Phagen kreiert, die stabiler sind, ein

breiteres Wirtsspektrum haben oder ihre Zielbakterien effizienter töten. Zudem entstehen auch GV-Phagen, die als Vektoren für den Transfer von Genen wirken. Derzeit werden GV-Phagen für Humanarzneimittel (Abschnitte 3.2 und 3.3), für Pflanzenschutzmittel (Abschnitt 7.3) und für Biozide (Abschnitt 11.7) entwickelt

2.1.5 CRISPR/Cas-basierte Mittel gegen Bakterien

Bakterien mit ihren eigenen Waffen schlagen – das ist die Idee hinter einem Konzept, das Firmen derzeit erproben, um neuartige Antibiotika (Abschnitt 3.3), Pflanzenschutzmittel (Abschnitte 7.5) und Futtermittelzusätze (Abschnitte 6.2.1) zu entwickeln.

Das Konzept beruht auf der Beobachtung, dass das CRISPR/Cas-System – die Immunabwehr von Bakterien gegen Viren – in ein System umgewandelt werden kann, mit dem sich gezielt die Bakterien einer Art töten lassen. Die Umwandlung gelingt, indem die Leit-RNA des CRISPR/Cas-Systems so gestaltet wird, dass sie das Schneideenzym Cas zum Chromosom der Zielbakterien führt. Durchtrennt Cas dann das Chromosom an den vorbestimmten Stellen, ist das für Bakterien meist tödlich, da sie die Schnitte nicht reparieren können (Greene 2018).

Die technische Umsetzung des Konzepts beinhaltet als ersten Schritt das Design der Leit-RNA. Deren Sequenzen sind so zu gestalten, dass sie spezifisch für die Chromosomen der Zielbakterien sind. Heute stehen für die Gestaltung KI-gesteuerte Computerprogramme zur Verfügung (Rottinghaus et al. 2023). Nach dem Design der Leit-RNA ist zu entscheiden, welche Komponenten des CRISPR/Cas-Systems in die Zielbakterien einzubringen sind. Meistens sind das Cas-Enzym sowie eine oder mehrere Leit-RNA die notwendigen Komponenten. Sind pathogene Bakterien das Ziel, die über eine eigene CRISPR-Maschinerie verfügen, kann es aber auch ausreichen, allein Leit-RNA zu verwenden. Das Cas-Enzym der Zielbakterien wird in diesem Fall durch die eingebrachte Leit-RNA zum eigenen Chromosom geführt und fügt dort dann die tödlichen Doppelstrangbrüche ein (Li & Peng 2019).

Die Gene für die Bildung der CRISPR/Cas-Komponenten können schließlich auf drei Wegen in die Zielbakterien eingeführt werden (Mayorga-Ramos et al. 2023):

- via GV-Bakterien, die die Anleitungen für die Bildung von Cas und Leit-RNA auf einem konjugativen Plasmid tragen;
- via GV-Phagen, die die Anleitungen für die Bildung von Cas und Leit-RNA in ihrem Genom tragen;
- via nanoverkapselte Plasmide, die die Anleitung für die Bildung von Cas und Leit-RNA enthalten;

2.1.6 Gentechnische Veränderung von Bakterien in situ

Bisher beruht die Entwicklung von GV-Bakterien für Anwendungen in der Umwelt auf folgendem Vorgehen: Bakterien werden im Labor in Kultur genommen, dort gentechnisch verändert und dann am Bestimmungsort eingesetzt. Dieses Vorgehen hat zwei Nachteile: Erstens lassen sich damit nur Bakterienarten nutzen, die im Labor kultivierbar sind. Bei im Boden lebenden Arten sind das zum Beispiel bloß ein Prozent (Fierer et al.

2017). Zweitens können die freigesetzten GVM am Einsatzort oft nicht wie gewünscht wirken, da sie gegenüber der autochthonen Mikroflora nicht konkurrenzfähig sind.

Als Ausweg erproben Forschende derzeit eine Reihe von Methoden, um Bakterien direkt *in situ* – also beispielsweise in Ackerböden, im Darm von Tieren oder auf der Haut des Menschen – gentechnisch verändern zu können. Eine der Methoden beruht darauf, GV-Bakterien als Vektoren zu nutzen, die in der Umwelt rekombinante Plasmide via Konjugation an indigene Bakterienarten weitergeben (Ronda et al. 2019). Eine Variante der Methode ist das *DNA-Editing all-in-one RNA-guided CRISPR-Cas Transposase* (DART)-Verfahren. Es beruht auf Plasmiden, die für eine Leit-RNA und eine CRISPR-assoziierte Transposase codieren. In Bakterien, die die Plasmide aufnehmen, sorgen Leit-RNA und Transposase jeweils für eine gezielte Veränderung des Chromosoms (Rubin et al. 2022, Koch 2022, Mozumdar et al. 2022, Tringe 2022). Eine *in situ* Genomeditierung könnte zudem auch mit GV-Phagen möglich werden, die die Gene für die Bildung von CRISPR/Cas-Reagenzien in Bakterien übertragen (Brödel et al. 2024, Kamm, C., & Beisel 2024, LeMieux 2024, Peng et al. 2024).

Die *in situ* Gentechnik wird derzeit bei der Entwicklung von Humanarzneimitteln (Abschnitt 3.4), Futtermittelzusätzen (Abschnitt 6.2.6), Pflanzenschutzmitteln (Abschnitt 7.4) sowie Mitteln für die Bioremediation (Abschnitt 14.1) erprobt.

2.1.7 Ausbreitungsfähige GV-Viren

GV-Viren, die heute außerhalb geschlossener Systeme zum Einsatz kommen, können sich in der Umwelt nicht ausbreiten. In jüngster Zeit erhalten in der Forschung auch Konzepte vermehrt Aufmerksamkeit, die die Entwicklung von GV-Viren zum Ziel haben, die sich in der Umwelt ausbreiten können. So stehen selbstausbreitende GV-Viren als Impfstoffe für die Zoonoseprävention und für den Schutz von Wildtieren (Abschnitt 4.3) sowie als Mittel für die Kontrolle von Tierbeständen zur Diskussion (Abschnitt 11.5). Für Anwendungen in der Landwirtschaft wiederum sind GV-Viren vorgesehen, die sich via Insekten von Pflanze zu Pflanze übertragen können und den Pflanzen neue Eigenschaften vermitteln sollen (Abschnitt 10.3).

2.1.8 Konsortien

Heute bestehen gentechnisch hergestellte mikrobielle Produkte mehrheitlich aus einer einzelnen Art von GVM. Künftig dürfte es vermehrt Produkte geben, die aus mehreren verschiedenen GVM bestehen (Marken et al. 2024). Solche Konsortien liegen im Trend, weil die Nutzung mehrerer GVM eine Wirkung verstärken oder auch erst ermöglichen kann und zudem multifunktionale Produkte möglich werden. Der Einsatz von Konsortien wird derzeit in mehreren der in Kapitel 3 bis 19 behandelten Bereichen diskutiert und erprobt.

2.1.9 GVM mit genetischem Biocontainment

Um zu vermeiden, dass sich GVM in der Umwelt unkontrolliert über den Einsatzort hinaus verbreiten und/oder ihre Gene an indigene Mikroorganismen weitergeben, werden in der Forschung «Safe by Design»-Konzepte verfolgt und Strategien für genetisches

Biocontainment entwickelt (Kim & Lee 2020, Pantoja Angles et al. 2022, Payne et al. 2024). Die Idee ist, GVM jeweils zusätzlich so gentechnisch zu verändern, dass ihr Einsatz in der Umwelt zeitlich und örtlich begrenzt bleibt und/oder die Möglichkeiten zum horizontalen Gentransfer eingeschränkt sind.

In den letzten Jahren sind mehrere Strategien für Biocontainmentsysteme erprobt worden; der *Biocontainment Finder* etwa listet über 50 Protostandards dazu auf (Pei et al. 2022). Die getesteten Strategien reichen von der Auxotrophie, die GVM abhängig von einem Nährstoff macht, über Kill-Switches, die den GVM nach getaner Arbeit sterben lassen, bis zur Recodierung, die GVM genetisch inkompatibel mit natürlichen Mikroorganismen machen, und der Nutzung von Chromosomen-freier GVM, die sich nicht vermehren können (Kim & Lee 2020, Pantoja Angles et al. 2022, Chemla et al. 2024). Auch wenn die Machbarkeit dieser Strategien unter Laborverhältnissen gezeigt wurde, fehlen heute weitgehend Daten zur Robustheit der Biocontainmentsysteme unter Real-World-Bedingungen.

Während das genetische Biocontainment in der Forschung ein großes Thema ist und bei der Mehrheit der in den Kapiteln 3 bis 19 beschriebenen Bereichen als Mittel gesehen wird, die Nutzung von GVM sicherer und für die Gesellschaft akzeptabler zu machen, werden die Systeme für die Behörden eine Herausforderung darstellen. Das genetische Biocontainment bringt eine zusätzliche Komplexität in die Risikobewertung, gilt es doch die Verlässlichkeit der Systeme zu prüfen und abzuschätzen, ob durch ihre Nutzung zusätzliche Risiken entstehen.

2.1.10 Design von GVM mit Künstlicher Intelligenz

Fortschritte im Bereich der künstlichen Intelligenz (KI) haben in den letzten Jahren nicht nur die Vorhersage biologischer Funktionen erheblich verbessert, sondern machen es heute auch möglich, regulatorische Sequenzen oder neuartige Proteinen mit Designerfunktionen de novo zu entwerfen (James et al. 2024). In Zukunft sind deshalb vermehrt GVM zu erwarten, die neuartige KI-generierte Proteine exprimieren oder in ihrem Erbgut Mutationen aufweisen, die ein KI-Modell vorgeschlagen hat.

Mit den Fortschritten der generativen KI rückt zudem auch das de novo-Design ganzer, funktionaler Genome von Viren und Bakterien in den Bereich des Möglichen. 2024 wurden mit *Evo* und *MegaDNA* zwei große, genomische Sprachmodelle vorgestellt, die auf generativer KI beruhen und lange DNA-Sequenzen entwerfen können. *Evo* wurde auf Millionen von Bakterien- und Phagengenomen trainiert und kann Vorschläge für DNA-Sequenzen in der Größenordnung eines Bakterienerbguts machen (Nguyen et al. 2024). Auch wenn das KI-Modell noch keine funktionalen Genome hinkriegt, kann es etwa CRISPR/Cas-Reagenzien entwerfen, die auf bestimmte Genorte abzielen, oder bakterielle Gene designen, die im Hinblick auf Expression und Fitness optimiert sind. *MegaDNA* wurde auf Daten von Virengenomen trainiert und soll vollständige Genome von Phagen erzeugen können (Shao & Yan 2024). Wie eine unabhängige Bewertung ergab, weichen die Sequenzzusammensetzung der von *MegaDNA* generierten Genome von den natürlichen Genomen, weshalb auch hier noch Verfeinerungen sind, da-

mit ein de novo-Design voll funktionsfähiger Genome tatsächlich gelingt (Ratcliff 2024, Benegas et al. 2024).

2.1.11 Gene Drives

Gene Drives sind genetische Systeme, die darauf ausgelegt sind, Gene effizient in einer Population zu verbreiten. Mit CRISPR/Cas hat die Entwicklung solcher Systeme starken Auftrieb bekommen und vor allem bei Insekten und Säugern sind bereits anwendungsorientierte F&E-Projekte im Gange.

In den letzten Jahren sind auch für Mikroorganismen erste CRISPR/Cas-basierte Gene Drive-Systeme entwickelt worden – und zwar für Hefen (DiCarlo et al. 2015, Shapiro et al. 2018, Yan & Finnigan, 2018, Roggenkamp et al., 2018), Viren (Walter & Verdin 2020, Walter et al. 2024, Yao et al. 2024) und Bakterien (Valderrama et al. 2019). Viren mit Gene Drive kommen etwa in der Humanmedizin als zukünftige Mittel gegen Viruserkrankungen in Frage (Walter et al. 2024) und Bakterien mit Gene Drive-ähnlichen Systemen könnten in Zukunft eingesetzt werden, um etwa in Böden oder Gewässern Antibiotikaresistenzgene aus Bakterien zu entfernen (Valderrama et al. 2019, Bier 2022). Einsätze in der Umwelt dürften jedoch erst in ferner Zukunft zu erwarten sein.

2.1.12 Xenobionten, Minimalzellen und Synthetische Genome

In der Synthetischen Biologie arbeiten Forschende an der Entwicklung von Xenobionten, Minimalzellen und Mikroorganismen mit synthetischen Genomen. Xenobionten sind GVM, die Xeno-Nukleinsäuren besitzen oder Peptide und Proteine mit nicht-kanonischen Aminosäuren bilden (Schmidt et al. 2018, Gómez-Tatay et al. 2024). Minimalzellen sind GVM mit erheblich verkleinertem Genom. Sie entstehen entweder top down durch Genomreduzierung oder bottom up durch die Herstellung von Protozellen (Ma et al. 2024, Xu et al. 2024). Mikroorganismen mit synthetischen Genomen sind GVM, deren Erbgut aus synthetisch hergestellten DNA-Stückchen zusammengebaut wird (James et al. 2024). Bei allen drei Typen von GVM sind zwar Anwendungen in mehreren Bereichen denkbar, aber ein Einsatz außerhalb geschlossener Systeme dürfte erst in etwas fernerer Zukunft zu erwarten sein.

2.2 Regulatorische Aspekte

GVM werden derzeit für eine Vielzahl unterschiedlicher Anwendungen außerhalb geschlossener Systeme entwickelt. Produkte, die auf dem Markt kommen werden, werden nicht allein gentechnikrechtlichen Vorgaben unterliegen, sondern in den meisten Fällen auch produktrechtlichen Regeln. Ob die geltenden Vorschriften an die neuen Entwicklungen von GVM anzupassen sind, wird für die betroffenen Produktbereiche einzeln zu prüfen sein.

Im Folgenden finden sich einige Anmerkungen zu regulatorischen Aspekten, die allgemeiner Art sind und mehrere Produktbereiche betreffen können.

2.2.1 Risikoabschätzung und -bewertung

Die GVM, die derzeit für den Umgang außerhalb geschlossener Systeme entwickelt werden, gehören nicht nur sehr unterschiedlichen Organismengruppen wie Viren, Bakterien, Pilzen, Mikroalgen und Plasmiden an, sie weisen auch sehr unterschiedliche gentechnische Veränderung auf – von Punktmutationen und Gendeletionen über Plasmidentfernungen und Promotoraustausche bis hin zu Insertionen von cisgenen Sequenzen und artfremden Genclustern für neue Stoffwechselwege. Und die GVM können zudem das Resultat sehr unterschiedlicher Konzepte und Strategien sein (siehe Abschnitt 2.1). Die Konsequenz: Die GVM, die künftig auf den Markt kommen werden, werden sehr unterschiedliche Risikoprofile aufweisen und die bestehenden Vorschriften und Leitlinien für die Risikoabschätzung und -bewertung von GVM sind auf die Notwendigkeit von Anpassungen zu prüfen.

Eine Herausforderung für die Risikoabschätzung und -bewertung von GVM wird auch die Vielfalt möglicher Einsatzorte von GVM sein. Sie reicht von Haut, Mund und Darm von Tieren und Menschen, über Wurzeln, Blätter und Interzellularräumen von Pflanzen bis hin zu Hauswänden, Krankenhausbetten und Vorgärten von Wohnsiedlungen. GVM werden zudem auch für Einsätze in Gewässern und Naturschutzgebiete entwickelt und somit für Lebensräume, die nach Freisetzungsverordnung (FrSV) besonders vor GVO zu schützen sind.

Welche konkreten Herausforderungen für die Risikoabschätzung und -bewertung durch die unterschiedlichen Risikoprofile und Einsatzorte jeweils entstehen, ist nicht Gegenstand des Berichts und wird in den Kapiteln 3 bis 19 bloß ansatzweise und fragmentarisch beleuchtet werden.

2.2.2 Geschlossene Freisetzungen

Die gegenwärtige Regulierung von GVO unterscheidet klar zwischen Umgang in geschlossenen Systemen, bei dem der Kontakt der GVM mit Mensch und Umwelt zu begrenzen und vermeiden ist, und Umgang in der Umwelt, bei dem Begrenzungen wegfallen. Jetzt sind Produkte mit GVM in der Entwicklung, die diese klare Trennung herausfordern. Zu diesen Produkten gehören etwa Biosensoren, bei denen GVM in einem Gerät eingeschlossen sind, oder Diagnostika und Biotherapeutika, bei denen GVM in Kapseln eingesperrt sind. Bei Produkten mit lebenden Materialien wiederum werden GVM in Matrices eingebettet sein. Das gemeinsame Charakteristikum dieser Produkte ist, dass mit ihnen zwar ein Umgang außerhalb geschlossener Systeme verbunden ist, ein direkter Kontakt der GVM mit Mensch und Umwelt aber begrenzt oder verhindert ist. Wie der Umgang mit solchen «geschlossenen Freisetzungen» zu regulieren ist, bleibt zu klären.

2.2.3 Antibiotikaresistenzgene

GV-Bakterien enthalten herstellungsbedingt oft Antibiotikaresistenzgene. Verleihen diese Gene Resistenzen gegen solche Antibiotika, die in der Human- oder Veterinärmedizin verwendet werden, gelten sie wegen des möglichen Transfers auf

Mikroorganismen in der Umwelt als «sequences of concern». Bei F&E-Projekten mit GV-Bakterien wird der Einsatz von Antibiotikaresistenzgenen mittlerweile zwar oft vermieden, dennoch dürfte aber damit zu rechnen sein, dass Produkte mit solchen «sequences of concern» zum Inverkehrbringen beantragt werden.

Um den Sicherheitsbedenken Rechnung zu tragen, hat der Gesetzgeber in der Schweiz für viele Bereiche ein Verbot erlassen für das Inverkehrbringen von GV-Bakterien mit Resistenzgenen gegen Antibiotika, die zur Verwendung in der Human- und Veterinärmedizin zugelassen sind. Ausgenommen davon sind Human- und Tierarzneimittel sowie Lebens- und Futtermittel und damit vier Bereiche, in denen derzeit eine Reihe von Mitteln mit GV-Bakterien entwickelt werden. Ob der mögliche Einsatz dieser GV-Bakterien es notwendig macht, auch in den vier ausgenommenen Bereichen ein Verbot zu erlassen oder ob den Sicherheitsbedenken anderswie begegnet werden kann, bleibt zu diskutieren.

2.2.4 Monitoring nach unbewilligten GVM

Da Umweltsituationen von GVM außerhalb der Schweiz zunehmen, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass GVM hierzulande unbewilligte GVM auftreten. Damit stellt sich die Frage, ob es wie bei GV-Pflanzen Monitoringsysteme für unbewilligte GVM braucht (Van den Akker & Wassenaar 2012).

3. Humanarzneimittel

GVM werden in der Humanmedizin bereits seit mehr als 30 Jahren eingesetzt. Vor allem GV-Viren sind Bestandteil zahlreicher zugelassener Produkte. Sie sind in mehreren Gentherapien als Vektoren enthalten, die Gene in menschliche Zellen lotsen, und sorgen bei einer Reihe von Impfstoffen für die Auslösung der Immunantwort. Die in der EU und der Schweiz zugelassenen GV-Viren-basierten Gentherapien und Impfstoffe sind in Tabelle 1 aufgelistet. Neben GV-Viren ist in der EU derzeit mit dem Cholera-Impfstoff *Vaxchora* auch ein attenuiertes GV-Bakterium zugelassen.

Anders als in der EU gelten in der Schweiz biologisch aktive Nukleinsäuren als Mikroorganismen, weshalb hierzulande auch mRNA-basierte Humanarzneimittel wie die beiden zugelassenen COVID-19-Impfstoff *Spikevax* und *Comirnaty* als GVO-Produkte eingestuft sind.

In der Forschung werden derzeit eine Reihe von neuartigen Konzepten und Ansätzen für GVM-basierten Arzneimitteln erprobt, die nicht wie gewohnt zu Gentherapien oder Impfstoffen führen und deshalb Anpassungen bei der Regulierung notwendig machen dürften. Die neuartigen Konzepte und Ansätze – die Nutzung von GV-Bakterien als Medikamente, Therapien mit GV-Phagen, CRISPR/Cas-basierte Antibiotika und die in situ Veränderung des Haut- und Darmmikrobiom – sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

Tabelle 1: Humanarzneimittel, die GVM enthalten und in der EU und der Schweiz (mit * markiert) zugelassen sind.

GVM	Produkt	Anwendung	Firma
Bakterien			
Vibrio cholerae	Vaxchora	Cholera-Impfstoff	Bavarian Nordic
Viren			
AAV	Bequez	Gentherapeutikum gegen Hämophilie B	Pfizer
AAV	Hemgenix*	Gentherapeutikum gegen Hämophilie B	CSL Behring
AAV	Luxturna*	Gentherapeutikum gegen lebersche kongenitale Amaurose	Novartis
AAV	Roctavian	Gentherapeutikum gegen Hämophilie B	BioMarin
AAV	Upstaza	Gentherapeutikum gegen AADC--Mangel	PTC Therapeutics
AAV	Zolgensma*	Gentherapeutikum gegen Spinale Muskelatrophie	Novartis
Adenovirus	Jcovden	COVID-19-Impfstoff	Janssen
Adenovirus	Vaxzevria	COVID-19-Impfstoff	AstraZeneca
Adenovirus	Zabdeno	Ebola-Impfstoff	Janssen
Dengue-Virus	Dengvaxia	Dengue-Impfstoff	Vertex
Dengue-Virus	Qdenga*	Dengue-Impfstoff	Takeda
HSV 1	Imlygic*	Gentherapeutikum gegen Melanom	Amgen
Influenzavirus	Fluenz Tetra*	Grippeimpfstoff	AstraZeneca
Influenzavirus	PI H5N1	Pandemischer Grippeimpfstoff	AstraZeneca
Lentivirus	Abecma*	Gentherapeutikum gegen Multiples Myelom	Bristol-Myers Squibb
Lentivirus	Breyanzi*	Gentherapeutikum gegen diffus großzellige B-Zell-Lymphome, primär mediastinale großzellige B-Zell-Lymphome, follikuläre Lymphome	Bristol-Myers Squibb
Lentivirus	Carvykti*	Gentherapeutikum gegen Multiples Myelom	Janssen
Lentivirus	Kymriah*	Gentherapeutikum gegen Lymphatische Leukämie / B-Zell-Lymphom	Novartis
Lentivirus	Libmeldy*	Gentherapeutikum gegen Metachromatische Leukodystrophie	Orchard Therapeutics
Lentivirus	Tecartus*	Gentherapeutikum gegen Mantelzelllymphom	Kite Pharma
Lentivirus	Skysona	Zerebrale Adrenoleukodystrophie	bluebird bio
Retrovirus	Strimvelis	Gentherapeutikum gegen ADA-SCID	Fondazione Telethon
Retrovirus	Yescarta*	Gentherapeutikum gegen Non-Hodgkin-Lymphome	Kite Pharma
Vaccinia-Virus	Mvabea	Ebola-Impfstoff	Ebola-Impfstoff
VSV	Ervebo*	Ebola-Impfstoff	MSD
mRNA-basierte Produkte**			
	Comirnaty	COVID-19-Impfstoff	BioNTech/Pfizer
	Spikevax	COVID-19-Impfstoff	Moderna

*: Mittel ist auch in der Schweiz zugelassen. **: mRNA-basierte Produkte gelten in der EU nicht als GVM.

AAV: Adeno-assoziiertes Virus, HSV: Herpes-simplex-Virus 1; VSV: Vesikulärer Stomatitis Virus. Quelle: AU (2024)

3.1 Lebende Biotherapeutika

Der Einsatz lebender GV-Bakterien zur Behandlung von Krankheiten ist ein Konzept, das in der humanmedizinischen Forschung derzeit vermehrt Beachtung findet. Es beruht darauf, GV-Bakterien als Lieferanten zu nutzen, die therapeutisch wirksame Substanzen an den Behandlungsort bringen – sei es die Haut, der Darm, der Magen, die Atemwege oder der Genitaltrakt (Cao et al. 2024). Die Basis bilden Bakterienarten, die gemeinhin als harmlose Probiotika eingestuft sind – wie etwa *Escherichia coli* Nissle 1917, *Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum* oder das Milchsäurebakterium *Lactobacillus rhamnosus*. Zudem gibt es auch den Ansatz, Bakterien aus dem Mikrobiom von Patientinnen und Patienten zu isolieren und sie dann gentechnisch in Lieferanten von therapeutisch wirksamen Substanzen umzuprogrammieren (Russel et al. 2020).

Das Konzept, GVM als lebende Biotherapeutika zu nutzen, ist in den letzten Jahren mehrfach im Labor und in klinischen Versuchen erprobt worden – unter anderem zur Behandlung von Darmkrebs (Zhang et al. 2024), Parkinson (Wu et al. 2023), Fettleibigkeit (Wang et al. 2022a) oder Fettleber (Hendriks et al. 2019). Bisher ist noch kein GVM auf dem Markt. Mehrere Firmen arbeiten jedoch an der Lancierung von Produkten.

Das schweizerisch-finnische Unternehmen *Aurealis Therapeutics* entwickelt GV-Milchsäurebakterien, die die Wundheilung bei Diabetes verbessern sollen, indem sie drei vom Menschen stammende Substanzen absondern, die die Narbenbildung fördern (Kurkipuro et al. 2022). Auch *Ilya Pharma* hat GV-Milchsäurebakterien zur Wundheilung in der Pipeline (Öhnstedt et al. 2022). *GenCirq* wiederum arbeitet an tumorkolonisierenden *Escherichia coli* Nissle 1917, um Wucherungen im Dickdarm zu behandeln (Gurbatri et al. 2024). *Synflora* will GVM auf den Markt bringen, die auf der Haut einen Wirkstoff gegen Akne absondern (Knödlseher et al. 2024). *GeneGuard Probiotics* bereitet ein Mittel gegen Diabetes vor. Und bei *Synlogic* sind GV-Bakterien in der Entwicklung, mit denen sich Stoffwechselkrankheiten wie Homocystinurie und Phenylketonurie behandeln lassen sollen (Triassi et al. 2023, Perreault et al. 2024). Schließlich bleibt noch *Integral Solutions* zu nennen. Die Firma nutzt laut ihrer Webseite CRISPR/Cas, um psychobiotische GV-Bakterien zu entwickeln, die bei Störungen des Nervensystems helfen sollen.

Wenn GV-Bakterien als Therapeutika zum Einsatz kommen, werden sie unweigerlich die Körper der Patientinnen und Patienten verlassen – bei oral verabreichten Produkten durch Ausscheidung im Kot und bei topisch verabreichten Produkten etwa durch Hautkontakt mit anderen Menschen (Gulig et al. 2024). Um den damit einhergehenden Sicherheitsbedenken für Mensch und Umwelt zu begegnen, werden derzeit verschiedene genetische und physikalische Biocontainment-Strategien erprobt (Zhou & Han 2022, Bai et al. 2023, Gulig et al. 2024). Als vielversprechende physikalische Strategie gilt dabei die Verkapselung der GV-Bakterien in Hydrogelen (Dey & Sankaran 2024).

3.1.1 Living Theranostics

Eine erweiterte Form von lebenden Therapeutika sind «living theranostics». Sie enthalten GVM, die therapeutische mit diagnostischen Fähigkeiten verbinden (Armstrong &

Islam 2024). Ein Beispiel ist ein *Escherichia coli*-Stamm der Firma *Bluehalo* (ehemals *UES*). Er ist als «intelligentes Probiotikum» konzipiert, das die Darm-Hirn-Achse moduliert und bei Angst und Depressionen helfen soll, die Stimmung zu verbessern. Der GVM erkennt dazu nicht nur erhöhte Cortisolspiegel, wie sie bei Stress und Angst im Darm vorkommen, sondern reagiert darauf auch mit der Bildung von Tryptamin – einer Vorläufersubstanz von Serotonin, das als Neuromodulator den Cortisolspiegel senkt (Litteral et al. 2023). Ein weiteres Beispiel ist ein *Escherichia coli*-Stamm, der Entzündungen im Darm erkennen und daraufhin entzündungshemmende Moleküle freisetzen soll (Chua et al. 2022).

3.2 Therapien mit GV-Phagen

Die Idee der Phagentherapie gibt es bereits seit mehr als 100 Jahren, sie ist jedoch wegen anfänglicher Misserfolge und der Verfügbarkeit von Antibiotika lange kaum umgesetzt worden. Mit der wachsenden Zahl der bakteriellen Krankheitserreger, die gegen mehrere Antibiotika resistent sind, ist das Interesse jüngst stark gestiegen. Verzeichnete clinicaltrials.gov zwischen 2000 und 2015 insgesamt lediglich sieben klinische Phagentherapie-Studien, sind allein im Jahr 2022 18 neue Studien initiiert worden (Sawa et al. 2024).

Unlängst wird bei der Entwicklung von Phagentherapien auch Gentechnik eingesetzt (Lenneman et al. 2021, Hussain et al. 2023, Olawade et al. 2024). Durch Veränderung der Virengenome entstehen dabei GV-Varianten, die stabiler sind, ein breiteres Wirtsspektrum haben oder ihre Zielbakterien effizienter töten. Einer der gentechnischen Ansätze ist, Phagen in Lieferanten von Genen («genetic payloads») umzuwandeln (Schmitt et al. 2024). Zu den genetischen Nutzlasten gehören dabei auch Gene, die für RNA-Moleküle oder dCas-Enzyme codieren und mit denen die Genexpression infizierter Bakterien beeinflusst werden kann (Hsu et al. 2020, Schmitt et al. 2024). Mit den Anleitungen für CRISPR/Cas-Reagenzien als Nutzlast sollen sich zudem neuartige Antibiotika entwickeln lassen (siehe Abschnitt 3.3).

Aktuell gibt es noch keine zugelassenen Therapien mit GV-Phagen. Erste Behandlungen einzelner Patienten fanden jedoch bereits statt. 2018 wurde in den USA eine Jugendliche mit zystischer Fibrose, die an einer schweren Infektion durch Antibiotikaresistente *Mycobacterium abscessus* litt, mit einem Cocktail aus drei GV-Phagen behandelt (Dedrick et al. 2019, Fox 2019). Aus den drei Phagen waren mit einer Recombinering genannten Technik Gene entfernt worden, was ihre Fähigkeit zur Tötung der Bakterien effizienter machte. Da die GV-Phagen keine artfremden DNA enthielten, galten sie regulatorisch nicht als GVO (LeMieux & Hatfull 2020).

Phico Therapeutics ist eine der Firmen, die derzeit an Therapien mit GV-Phagen arbeiten. Ihre Technik trägt den Namen *SASPject* und nutzt die Viren als Vektoren für kleine antimikrobiell wirkende Sporenpoteine (Cass et al. 2021, Turner et al. 2024). Das Startup *BiomX* hat GV-Phagen in der Pipeline, die gegen *Fusobacterium nucleatum* wirken sollen – ein Bakterium, das oft bei Patientinnen und Patienten mit Dickdarmkrebs auftritt und ein tumorförderndes Milieu im Darm schafft (Johnson 2023).

Unternehmen wie *SNIPR Biome*, *Locus Biosciences* und *Eligo Bioscience* wiederum entwickeln CRISPR-verstärkte Phagentherapien als neuartige Antibiotika (siehe Abschnitt 3.3).

Therapien mit natürlichen oder gentechnisch veränderten Phagen stellen für die Regulierung weitgehend ein Novum dar. Laut Cui et al. (2024) sind für die Zulassung und klinische Umsetzung noch standardisierter Protokolle für die Produktion, Sicherheit und Wirksamkeit von Phagen zu entwickeln.

In Deutschland und im Vereinigten Königreich ließen die jeweiligen Parlamente jüngst prüfen, welche Schritte Regulierungsbehörden und die an der Phagenforschung und -vermarktung Beteiligten unternehmen können, um eine angemessene Bewertung und Nutzung von Phagen sicherzustellen (König & Sauter 2023, SITC 2024).

GV-Phagen, die oral oder topisch verabreicht werden, werden unweigerlich auch in die Umwelt gelangen. Mögliche Folgen dieser Freisetzung müssten im Rahmen des Bewilligungsverfahrens bewertet werden.

3.2.1 Sonderfall: Wildtyp-Phagen aus GV-Bakterien

Um Wildtyp-Phagen zu speichern und zu vermehren werden unter anderem auch GV-Bakterien eingesetzt (Faltus 2024). In diesen Fällen stellt sich die Frage nach dem GVO-Status der Viren. Technisch betrachtet wird aus einem GVO zwar ein Nicht-GVO gewonnen, da Nachkommen von GVO in der Regel aber rechtlich ihrerseits ebenfalls GVO sind, bleibt der Status der Phagen zu klären (Faltus 2024).

3.3 CRISPR/Cas-basierte Antibiotika

Die Idee, CRISPR/Cas zu nutzen, um bestimmte Arten von Bakterien durch gezielte DNA-Doppelstrangbrüche aus dem Mikrobiom des Menschen zu entfernen, gibt es seit 2014 (siehe auch Abschnitt 2.1.5). Damals zeigten erste Machbarkeitsstudien, dass Bakterien gezielt getötet werden können, wenn CRISPR-Reagenzien mit GVM als Vektoren in sie eingebracht werden (Bikard et al. 2014, Citorik et al. 2014). Seither wurde das Konzept mehrfach erprobt und weiterentwickelt und heute gilt es vor allem für die Behandlung von ESKAPE-Bakterien als vielversprechendes Mittel (Moitra et al. 2024). ESKAPE steht für eine Gruppe von Keimen, die gegen mehrere Antibiotika resistent sind und denen gängige Mittel nichts mehr anhaben können.

Bestand der Ansatz des Konzepts ursprünglich darin, die DNA der Zielbakterien mit Cas9 entzweizuschneiden (Abschnitt 2.1.5), versuchen Forschende heute den Tod der Erreger auch durch andere Mechanismen herbeizuführen – etwa durch das Schreddern der DNA mit Cas3 (Kim et al. 2024) oder den Abbau der RNA mit Cas13a (Kiga et al. 2020, Shimamori et al. 2024). Neben dem gezielten Abtöten der Keime werden zudem auch Ansätze entwickelt, um resistente Bakterien wieder empfindlich gegenüber Antibiotika zu machen. Dazu gehören gezielte Entfernung von Plasmiden, die Resistenzgene beherbergen (Hao et al. 2020), oder die Stilllegung der Resistenzgene mittels CRISPR-Interferenz (Frusteri Chiacchiera et al. 2024).

Aktuell arbeiten mehrere Firmen daran, CRISPR-basierte Antibiotika auf den Markt zu bringen. *Locus Biosciences* etwa entwickelt Mittel, bei denen GV-Phagen als Vektoren für CRISPR/Cas3 fungieren. Eines ihrer Produkte, das in klinischen Versuchen ist, ist ein Phagencocktail namens LBP-EC01 für die Behandlung von Harnwegsinfektionen, die durch antibiotikaresistente *Escherichia coli* verursacht werden (Kim et al. 2024). Auch das dänische Unternehmen *SNIPR Biome* nutzt GV-Phagen als Vektoren. Es hat mit SNIPR001 unter anderem einen Phagencocktail in der Entwicklung, der vor *Escherichia*-Infektionen der Blutbahn schützen soll (Gencay et al. 2024, Turner et al. 2024).

Die in Paris ansässige Firma *Eligo Bioscience* wiederum rüstet Phagemide zu CRISPR-Vektoren um. Ein Produkt ihrer *Eligobiotics* genannten Plattform ist EB003. Das Mittel erhielt 2022 in den USA den Orphan-Drug-Status für die Behandlung des hämolytisch-urämischen Syndroms (Johnson 2023). Zudem arbeitet *Eligo Bioscience* an einem Präparat, mit dem sich Akne-verursachende Bakterienstämme selektiv aus dem Hautmikrobiom entfernen lassen sollen (Grinstein 2021, Johnson 2023).

Auch wenn CRISPR-basierte Antibiotika bereits in klinischen Versuchen sind, hat die Diskussion regulatorischer Fragen erst kürzlich begonnen (Pacia et al. 2024, Moitra et al. 2024). Zu den Sicherheitsbedenken, die bei der Regulierung zu berücksichtigen sind, gehören etwa die Befürchtungen, dass in den Zielbakterien neue Varianten von Antibiotikaresistenzgenen entstehen oder die Gene für die CRISPR/Cas-Reagenzien auf Nicht-Ziel-Mikroben übertragen werden (Ahmed et al. 2024, Frusteri Chiacchiera et al. 2024).

3.4 Mittel für in situ-Gentechnik

Forschende verfolgen neu das Konzept, auf der Haut oder im Darm ansässige Mikroorganismen direkt vor Ort gentechnisch zu verändern. Diese in situ-Gentechnik – eine Art Genterapie für das Mikrobiom – soll etwa für Behandlungen entwickelt werden, bei denen die zu verändernden Bakterien nicht kultiviert werden können oder aus mehreren Arten innerhalb der ansässigen Mikroflora bestehen (Dorado-Morales et al. 2024, Cappio Barazzone et al. 2024).

Ein Ansatz für die in situ-Gentechnik ist die Nutzung von GVM, die leicht übertragbare konjugative Elemente besitzen (Brophy et al. 2018). Eine Machbarkeitsstudie mit Mäusen zeigte, dass *Escherichia coli* als Vektor rekombinante Plasmide im Darm der Tiere auf andere Bakterienarten übertragen kann (Ronda et al. 2019).

Ein weiterer Ansatz ist das DART-Verfahren (Abschnitt 2.1.5). In einer Stuhlprobe eines Säuglings konnten damit gezielt Gene ins Erbgut von Mikroorganismen des menschlichen Darmmikrobioms übertragen werden (Rubin et al. 2022).

Die Firma *Trobix Bio* entwickelt Mittel für die in situ-Gentechnik, die auf einer Kombination von zwei GV-Phagen beruht. Der eine Phage wirkt als Lieferant, der die gewünschten Gene in die Zielbakterien des menschlichen Mikrobioms bringt. Der andere Phage dient der Anreicherung, indem er diejenigen Zielbakterien abtötet, die die Gene nicht aufnehmen (Lifshitz 2024).

2024 zeigte die Firma *Eligo Bioscience* bei Versuchen an Mäusen, dass auch die in situ-Mikrobiom-Editierung möglich ist. Die Firma entwickelte dazu Phagemide – hybride Vektoren aus Phagen und Plasmiden –, die einen Basen-Editor¹ liefern. Damit gelang es, das Erbgut von Bakterien direkt im Darm der Mäuse zu editieren (Brödel et al. 2024, Kamm & Beisel 2024, LeMieux 2024).

4. Tierarzneimittel

In der Tiermedizin werden GVM – vor allem Viren, selten auch Bakterien – seit mehr als 30 Jahren als Impfstoffe eingesetzt. Die in der EU und der Schweiz derzeit verkehrsfähigen GV-Vakzine sind in der Tabelle 2 aufgelistet.

Im Tierpark Bern und im Zoo Basel findet zwischen 2013 und 2016 ein Versuch mit einem rekombinanten Virus der vesikulären Stomatitis (VSV) statt, der für die Impfung von Wildvögeln gegen die aviäre Influenza entwickelt wird. Dies ist der erste Freisetzungsversuch mit einem GVM in der Schweiz. 1995 war zwar bereits ein Versuch mit einem rekombinanten Virus als Tollwutimpfstoff geplant, aber die Freisetzung fand aufgrund von Protesten nicht statt.

In der Forschung werden derzeit eine Reihe von Konzepten und Ansätzen entwickelt, die zu neuartigen GVM-basierten Tierarzneimitteln führen werden und deshalb Anpassungen bei der Regulierung notwendig machen könnten. Die Nutzung lebender GV-Bakterien als Biotherapeutika, Mittel mit dsRNA-bildenden GVM und Impfstoffe mit selbstausbreitenden GV-Viren sind dazu in den folgenden Abschnitten beschrieben. Da in der Schweiz biologisch aktive Nukleinsäuren rechtlich als GVO gelten können, behandeln zwei Abschnitte zudem auch die Entwicklungen von mRNA- und DNA-basierten Tierarzneimitteln.

4.1 Lebende Biotherapeutika

Die Entwicklung von GV-Bakterien als lebende biotherapeutische Produkte (LBP), die in der Humanmedizin auf großes Interesse stößt (Abschnitt 3.1), findet auch in der Tiermedizin zunehmend Aufmerksamkeit.

Während sich in der wissenschaftlichen Literatur noch kaum Beispiele von GV-Bakterien finden lassen, die als LBP für Tiere entwickelt werden, gibt es bereits einige Firmen, die in diesem Bereich aktiv sind. *Biomedit* zum Beispiel will probiotische Bakterien zu Vektoren machen, um antiinfektiös oder immunmodulatorisch wirkende Substanzen in den Verdauungstrakt von Tieren zu bringen (Susanti et al. 2023, Gangaiah et al. 2024). Laut Firmenwebseite sind Produkte in der Pipeline sind, die bei Katzen das Körpergewicht regulieren und bei Masthühnern einen Schutz vor Infektionen mit Clostridien oder *Campylobacter* bieten sollen (Biomedit 2024)

¹ Ein Basen-Editor ist ein CRISPR-basiertes Werkzeug, das gezielt einzelne DNA-Basen ohne Doppelstrangbrüche oder umfangreiche Reparaturmechanismen verändert. Durch chemische Modifikationen wandelt beispielsweise Cytosin in Thymin Adenin in Guanin um.

Tabelle 2: Tierimpfstoffe, die GVM enthalten und in der EU und der Schweiz (mit * markiert) zugelassen sind.

GVM	Name des Impfstoffes	Tier und Indikation	Firma
Bakterien			
Escherichia coli	Poulvac E. coli*	Hühner: Coliruhr	Zoetis
Streptococcus equi	Equilis StrepE	Pferde: Druse	Intervet
Viren			
Bovines Herpesvirus	Hiprabovis IBR Marker	Rinder: Rhinotracheitis	Hipra
BVD-Virus	Bovela	Rinder: Diarrhoe	BI
BVD-Virus	Suvaxyn CSF Marker	Schweine: Schweinpest	Zoetis
Canines Parvovirus	Nobivac DP Plus	Hunde: Hundestaupe	Intervet
Hühnerpockenvirus	Vectormune FP ILT	Hühner: Pocken, Laryngotracheitis	Ceva
	Vectormune FP ILT+AE	Hühner: Pocken, Laryngotracheitis, Enzephalomyelitis	Ceva
Kanarienvirus	Purevax RCPCH FeLV	Katzen: Rhinotracheitis, Calicivirus, Panleukopenie, Chlamydiose, Leukose	BI
	ProteqFlu*	Pferde: Grippe	BI
	ProteqFlu-Te*	Katze: Grippe und Tetanus	BI
	Proteq West Nile	Pferde: Infektion mit West Nile Virus	BI
	Purevax FeLV*	Katzen: Leukose	BI
	Purevax Rabies*	Katzen: Tollwut	BI
	Purevax RCP FeLV*	Katzen: Rhinotracheitis, Calicivirus, Panleukopenie, Leukose	BI
MD-Virus	Prevexxion RN*	Hühner: Marek-Krankheit	BI
	Prevexxion RN+HVT+IBD*	Hühner: Bursitis und Marek-Krankheit	BI
Myxoma-Virus	Nobivac Myxo-RHD Plus	Kaninchen: Myxomatose- und Chinaseuche	Intervet
Putenherpesvirus	Innovax-ILT	Hühner: Laryngotracheitis, Marek Krankheit	Intervet
	Innovax-ND-IBD	Hühner: Bursitis, Newcastle- und Marek-Krankheit	Intervet
	Innovax-ND-ILT	Hühner: Laryngotracheitis, Newcastle- und Marek-Krankheit	Intervet
	Innovax-ILT-IBD	Hühner: Bursitis, Laryngotracheitis, Marek-Krankheit	Intervet
	Newflend ND H9	Hühner: NDV, Influenza	Ceva
	Poulvac Procerta	Hühner: Bursitis, Marek Krankheit	Zoetis
	Ultifend	Hühner: Bursitis, Newcastle- und Marek Krankheit	Ceva
	Vaxxitek HVT+IBD*	Hühner: MD-/Gumboro-Impfstoff für Hühner	BI
Vectormune ND	Hühner: Newcastle- und Marek-Krankheit	Ceva	
Tollwutvirus	Rabitec	Füchse und Marderhunde: Tollwut	Ceva
Vaccinia	Raboral	Füchse: Tollwut	BI

*: Mittel ist auch in der Schweiz zugelassen. BI: Böhringer-Ingelheim. Quellen: AU (2024)

GVM zum Schutz von Geflügel vor Clostridien sind auch bei *General Probiotics* in der Entwicklung. Die Firma isoliert dazu Stämme von *Escherichia coli* und *Bacillus*-Arten aus den Därmen von Hühnern und verändert sie im Labor so, dass sie antimikrobielle Peptide bilden (Kaznessis et al. 2021/2024). Ein *Escherichia coli*-Stamm mit dem Kürzel *GP1191*, der das Peptid Enterocin A aussondert, steht in den USA vor der Zulassung. Feldversuche mit mehr als einer Million Vögel sollen gezeigt haben, dass *GP1191* bei

vorschriftsmäßiger Anwendung ein gutes Sicherheitsprofil hat (General Probiotics 2023). Weitere Produkte, an denen *General Probiotics* arbeitet, sind GVM gegen Streptokokken in der Schweinehaltung und GVM gegen Kokzidien, die als Parasiten im Magen-Darm-Trakt mehrerer Nutztierarten leben.

Zwei weitere Firmen, die GVM als LBP entwickeln, sind *IctioBiotic* und *ActivaQ*. In einem gemeinsamen Projekt stellten sie Milchsäurebakterien her, die Lachs-Interferon bilden (Muñoz et al. 2021). In der Lachszucht sollen diese GVM wie ein Breitband-Biotherapeutikum wirken können, das einerseits die Robustheit der Fische gegenüber viralen Infekten erhöht und andererseits die Wirkung von Impfstoffen verstärkt.

4.2 Mittel mit dsRNA-bildenden GVM

Der Einsatz von dsRNA-basierten Wirkstoffen gilt in der Tiermedizin als vielversprechende Möglichkeit, um Schädlinge und Pathogene auf eine nachhaltige Art bekämpfen zu können. Die Forschung dazu hinkt im Vergleich zum Pflanzenschutz zwar hinterher, aber der zunehmende Schädlings- und Krankheitsdruck und die geringe Verfügbarkeit von risikoarmen Mitteln in der Nutztierhaltung führen dazu, dass die RNAi-Technik auch in der Veterinärmedizin an Bedeutung gewinnt (Menezes et al. 2022, Bonina & Arpaia 2023, Fajardo et al. 2024). In den USA steht mit *Vadescana* ein erstes Produkt vor der Zulassung. Das von der Firma *Greenlight Bioscience* entwickelte Mittel, das Honigbienen vor der Varroa-Milbe schützen soll, enthält isolierte dsRNA, die den Tieren in Zuckersirup verfüttert wird (McGruddy et al. 2024).

Neben Produkten mit aufgereinigter dsRNA sind auch Mittel mit dsRNA-bildenden GVM (Abschnitt 2.1.3) in der Erprobung. Sie gelten zwar als kostengünstigere und technisch einfachere Verabreichungsform als isolierte dsRNA, haben aber – was das Risikoprofil betrifft – auch zwei Nachteile: GVM können in den behandelten Tieren eine Immunreaktion auslösen und sie können sich in der Umwelt ausbreiten und dort dauerhaft dsRNA exprimieren, was sich auf Nichtzielorganismen auswirken kann (Luo et al. 2024).

Gegenwärtig werden dsRNA-bildende GVM in der Garnelenzucht und der Imkerei als Tierarzneimittel erprobt.

4.2.1 Aquakultur

Virusinfektionen wie Weißflecken- und Gelbkopf-Krankheit schränken die Produktion Garnelen stark ein und verursachen jährlich weltweite Verluste in der Höhe von Milliarden US-Dollar (Arbon et al. 2024). Für die Bekämpfung der Viren sind eine Reihe von dsRNA-bildenden Hefen, Mikroalgen, Milchsäurebakterien und *Escherichia coli* in der Erprobung (Álvarez-Sánchez et al. 2018, Charoonart et al. 2019, Dekham et al. 2022, Yang et al. 2024). Sie sollen in Zukunft entweder lebend als LBP oder inaktiviert als Paraprobiotika gegen die Virus-Krankheiten zum Einsatz kommen.

Mehrere Firmen arbeiten an GVM zur Bekämpfung des WSS-Virus, dem Erreger der Weißfleckenkrankheit. *TransAlgae/Algavac* und *Sundew* arbeiten dabei jeweils mit GV-

Mikroalgen (Sayre, R., & Vinogradava-Shah 2020, MacKenzie-Lamb et al. 2020), *Pepple Labs* will für seine Produkte GV-Bakterien einsetzen (Chen 2020).

4.2.2 Imkerei

Bei der Entwicklung von Mitteln für die Bienengesundheit steht die Paratransgenese im Fokus, wobei Bakterien als dsRNA-Lieferanten genutzt werden, die symbiotisch im Darm der Honigbienen leben (Leonard et al. 2018, Lariviere et al. 2024). Erste Machbarkeitsstudien fanden mit *Snodgrassella alvi* statt. Eine Arbeit zeigte, dass der Symbiont im Darm der Bienen mittels dsRNA-Moleküle gezielt Gene der Varroa-Milbe und des Krüppelflügelvirus stilllegen kann (Leonard et al. 2020). In zwei weiteren Studien konnten GV-Stämme des Symbionten Honigbienen vor dem Darmparasiten *Nosema ceranae* schützen (Lang et al. 2023, Huang et al. 2023).

2024 stellte die Firma *Hangzhou Sipu Edu & Tech* einen GVM vor, dessen Wirkungsweise der RNAi ähnelt. Die Firma veränderte *Bacillus subtilis*, ein natürlicherweise im Darm von Bienen vorkommendes Bakterium, derart, dass es einzelsträngige Antisense-RNA bildet, die komplementär zu einem lebenswichtigen Gen von *Nosema ceranae* ist. Bienen, die mit diesem GV-Bakterium behandelt wurden, hatten weniger Parasiten im Darm als ihre unbehandelten Artgenossen (Wang et al. 2024a).

Auch wenn die bisherigen Ergebnisse mit GV-Symbionten als vielversprechend gelten, bleibt das wahre Potenzial der GVM wegen fehlender Felduntersuchungen unklar (Motta & Moran 2024). Vor einer kommerziellen Nutzung bleiben die langfristigen Auswirkungen des Einsatzes der GVM zu untersuchen (Sattayawat et al. 2024). In der Schweiz dürften zudem regulatorische Fragen zur Koexistenz zu klären sein. Da GV-Symbionten sich nicht nur innerhalb eines Bienenvolkes verbreiten, sondern auch auf benachbarte Bienenvölker übertragen werden können (Menzel & Paxton 2020), wäre etwa zu regeln, wie Imkereibetriebe gegebenenfalls vor ungewollten GVM-Einträgen zu schützen sind.

4.3 Impfstoffe mit selbstausbreitenden GV-Viren

Die bisher als Tierimpfstoffe zugelassenen GV-Viren können sich nicht selber von Tier zu Tier ausbreiten. Um einen Herdenschutz zu erreichen, sind Tiere deshalb individuell zu impfen. Eine Möglichkeit, die individuelle Verabreichung zu umgehen, bieten Impfstoffe mit selbstausbreitenden GV-Viren. Da sich diese Viren autonom und mit einer epidemieähnlichen Dynamik zwischen Tieren verbreiten können sollen, reicht die Impfung einiger weniger Individuen aus, um Herdenimmunitätseffekte zu erzielen. Das Konzept der selbstausbreitenden Impfstoffe ist nicht neu, hat aber in den letzten Jahren vermehrt Aufmerksamkeit erhalten (Basinski et al. 2028, Bull et al. 2018/2024, Nuismer & Bull 2020, Schreiner et al. 2023, Rupprecht et al. 2023, Chan et al. 2024, Streicker et al. 2024).

Einer der beiden Zwecke, für die selbstausbreitende Impfstoffe entwickelt werden sollen, ist der Schutz von Wildtieren. In Spanien entstand dazu bereits Ende der 1990er Jahre *Lapinvac* – ein übertragbarer Impfstoff aus einem abgeschwächten Myxomavirus, der Wildkaninchen vor Myxomatose und hämorrhagischem Fieber schützen sollte.

Lapinvac wurde 1999 auf der Mittelmeerinsel Illa de l'Aire im Freien getestet (Torres et al. 2001) und ein Jahr später beantragten die Hersteller bei der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) die Lizenzierung. Nachdem die EMA technische Probleme bei der Sicherheitsbewertung feststellte und die Genomdaten des GV-Virus forderte, wurde das Projekt 2007 beendet (Craig 2022, Rupprecht et al. 2023). Heute werden selbstausbreitende Impfstoffe als mögliches Mittel diskutiert, um Frösche vor Chytridiomykose (Berger et al. 2024) und Fledermäuse vor dem Weißnasensyndrom zu schützen (Rocke et al. 2019).

Der andere Zweck, den selbstausbreitende Impfstoffe in Zukunft erfüllen sollen, ist die Prävention von Zoonosen. Derzeit sind vor allem Impfungen von Wildtieren im Gespräch, die ein Reservoir für bekannte Zoonose-Erreger sind. So gibt es etwa Vorschläge und Bestrebungen für die Entwicklung übertragbarer GV-Vakzine, die Primaten gegen Ebola-Viren (Rupprecht et al. 2023), Fledermäuse gegen Tollwut-Viren (Bakker et al. 2019, Griffiths et al. 2023) und Nagetiere gegen Lassa-Viren (Varrelman et al. 2022, TVG 2023) immunisieren sollen.

Die mögliche Freisetzung selbstausbreitender GV-Viren und die damit einhergehenden Risiken werden in der Literatur kontrovers diskutiert (Sandbrink et al. 2021, Lentzos et al. 2022a/b, Streicker et al. 2022, Bull et al. 2024, Eckerstorfer et al. 2024). Das deutsche Bundesamt für Naturschutz warnte 2022 davor, dass Freisetzungen einer Abkehr gut etablierter und evidenzbasierter wissenschaftlicher Normen gleichkämen (BfN 2022). 2024 schlug eine Gruppe aus sowohl befürwortenden als auch kritischen Forschenden Strategien vor, die bei der Entwicklung selbstausbreitender GV-Viren die Wahrscheinlichkeit erhöhen sollen, dass die potenziellen Risiken durch den Nutzen für den Naturschutz, den Tierschutz und die Zoonoseprävention aufgewogen werden (Streicker et al. 2024).

4.4 mRNA-Impfstoffe

mRNA-Impfstoffe haben sich während der SARS-CoV-2-Pandemie als neue Technologie bewährt. Da mRNA-Moleküle rekombinante und biologisch aktive Nukleinsäuren sind, gelten sie in der Schweiz – anders als etwa in der EU – rechtlich als GVM (Aeberhard 2022).

Auch in der Veterinärmedizin sind mRNA-Impfstoffe zunehmend en vogue. Erforscht werden sie zwar schon länger – Bayer und *BioNTec* zum Beispiel vereinbarten bereits 2016 eine Kooperation, um mRNA-Impfstoffe für tiermedizinische Anwendungen zu entwickeln (Anonymous 2016) – doch mit dem Erfolg der COVID-19-Vakzine und dank technischer Fortschritte erleben sie derzeit in der Tierimpfstoffforschung einen neuen Aufschwung (Fazel et al. 2024). Der Fokus liegt dabei auf selbst-amplifizierender mRNA. Bei diesen saRNA genannten Molekülen handelt es sich um Replikons, die von RNA-Viren abgeleitet sind (Bloom et al. 2021). Anders als herkömmliche mRNA kann sich saRNA in Zellen eine Weile lang selbst vermehren, da sie zusätzlich zur Bauanleitung des Antigens auch für Enzyme codiert, die RNA-Moleküle vervielfältigen können. Da sich Replikons in Tieren selbst vermehren können, ist die für eine bestimmte Immun-

antwort benötigte Impfstoffmenge um einiges kleiner als bei herkömmlichen mRNA-Vakzinen. Die Kosteneinsparungen, die dadurch möglich sind, machen saRNA interessant für Anwendungen an Nutztieren.

In den USA wurden bereits 2013 und 2014 erste saRNA-Impfstoffe eingesetzt. Zwei von *Harrisvaccines* entwickelte Replikons – *iPED* und *iPED+* – erhielten damals eine befristete Zulassung, um auf Schweinefarmen die Ausbrüche der Porzinen Epidemischen Diarrhoe einzudämmen (Langel 2016). Aktuell ist mit *Sequivity* ein saRNA-Impfstoff auf dem Weltmarkt erhältlich. Das von *MSD* hergestellte Produkt ist in Kanada und den USA als Schweinegrippe-Impfstoff zugelassen und besteht aus Replikons, die in Virus-ähnlichen Partikeln verpackt sind (Le et al. 2022, Fazel et al. 2024).

MSD will mit seiner Replikon-Technik weitere Vakzine herstellen, mit denen sich Hühner gegen Bursitis und Vogelgrippe und Lachse gegen Pankreasnekrose und infektiöse Anämie impfen lassen sollen (Wolf et al. 2014, Abdullah et al. 2015, Comes et al. 2024). Auch *Ceva*, *Genvax Technologies* und *Eco Animal Health* entwickeln saRNA-Impfstoffe für Tiere.

Replikons aus nackten oder in Virus-ähnlichen Partikeln verpackten saRNA-Molekülen können sich in den Zellen von Tieren zwar selbst vermehren, sie können sich aber nicht auf andere Tiere ausbreiten, da sie keine infektiösen Partikel bilden. Sie gelten deshalb als relativ sicher (Comes et al. 2023). Ein potenzielles Umweltrisiko ist, dass Replikons in geimpften Tieren mit infektiösen Viren rekombinieren und dadurch chimerische Viren entstehen (Hick et al. 2024).

Da das Interesse an der Entwicklung von saRNA-Impfstoffen für Mensch und Tiere steigt, die Zahl der F&E-Projekte zunimmt und Replikons von Wildtyp-Viren stammen können, die pathogen sind, wird auch eine sorgfältige Risikobetrachtung zunehmend wichtig. Biosicherheitskommissionen wie die ZKBS in Deutschland und die COGEM in den Niederlanden haben jüngst Statements zu Replikons veröffentlicht oder Studien dazu veranlasst (ZKBS 2021, COGEM 2022/2024, Van der Meulen & Rüdelsheim 2022, Van der Meulen et al. 2023).

In der EU gibt es eine Kontroverse um den GVO-Status von Replikons, die in Virus-ähnlichen Partikeln verpackt sind (COGEM 2024). Aus Sicht der EU-Kommission sind diese Replikons keine Organismen und deshalb auch keine GVO, da sie keine infektiösen Viren bilden können. Da die Replikons auf der gentechnischen Veränderung von Viren beruhen, vertritt COGEM hingegen die Auffassung, dass sie GVO sind und unter das Gentechnikrecht fallen. COGEM hält es für notwendig, dass bei der Markteinführung eine Umweltrisikoprüfung nach Richtlinie 2001/18 erfolgt, und kritisiert deshalb die Sichtweise der EU-Kommission (COGEM 2024).

Die mögliche Nutzung von mRNA-Impfstoffen bei lebensmittelliefernden Tieren sorgt in einigen Ländern bereits vor der breiten Markteinführung für Debatten. In den USA wurden 2023 in mehreren Bundesstaaten Gesetze ausgearbeitet oder in Erwägung gezogen, die die Verwendung von mRNA-Impfstoffen bei Lebensmitteltieren verbieten oder zumindest eine Kennzeichnungspflicht für Produkte von geimpften Tieren vorschreiben wollten (Verhoeven 2023). Die Kennzeichnungspflicht war 2023 auch im

Deutschen Bundestag ein Thema. Die Bundesregierung hielt dabei auf eine schriftliche Anfrage fest, dass eine Kennzeichnung der Produkte geimpfter Tiere nicht geboten sei, da nur als unbedenklich eingestufte mRNA-Impfstoffe zugelassen werden (Deutscher Bundestag 2023). In Australien kursierten 2023 Gerüchte, dass die Regierung die Impfung von Nutztieren mit mRNA-Impfstoffen fordere und der Verzehr von Erzeugnissen geimpfter Tiere nicht sicher sei, was das Landwirtschaftsministerium zu einer öffentlichen Richtigstellung veranlasste (Australian Government 2023).

4.5 DNA-basierte Mittel

Auf dem Weltmarkt sind einige Tierarzneimittel erhältlich, die rekombinante und biologisch aktive Plasmid-DNA als Wirkstoff enthalten (Tabelle 3). In der Schweiz, wo es bisher noch keine Zulassungen gibt, dürften diese Produkte rechtlich als GVM gelten.

Die Mehrheit der DNA-basierten Tierarzneimittel sind Impfstoffe. Ihre Plasmide codieren für Antigene und lösen deshalb in behandelten Tieren eine Immunreaktion aus. Produkte mit Zulassungen sind *Apex IHN* und *Clynav* zur Vorbeugung von Virusinfekten bei Lachsen, *Oncept* zur Behandlung von Melanomen und *Neoleish* zum Schutz vor Leishmaniose bei Hunden, *WNV-Innovator* zur Prävention des West-Nil-Fiebers bei Pferden und das Schweinegrippe-Vakzin *ExactVac* (Pagliari et al. 2023, EMA 2024).

Neben Impfstoffen ist mit *Life Tide SW5* auch ein Plasmid zugelassen, das Schweine zur Bildung eines wachstumssteigernden Hormon anregt (Soboka et al. 2016). Zudem sind zwei DNA-Immunstimulatoren, *Zelnate* und *Victrio*, auf dem Markt erhältlich. Die beiden Produkte enthalten Plasmid-DNA, die reich an nicht-methylierten CpG-Motiven ist. Da diese Motive von tierischen Zellen als Pathogen wahrgenommen werden, aktivieren die Plasmide das Immunsystem von Tieren (Ilg 2020).

Ein potenzielles Risiko bei DNA-basierten Mitteln ist die vollständige oder teilweise Integration des Plasmids in das Genom behandelter Tiere. Da die in der Literatur beschriebenen Fälle von Integration selten sind, gehen Fachleute heute davon aus, dass das Risiko sehr klein und vernachlässigbar ist (Comes et al. 2023, Kozak & Hu 2024, Lu et al. 2024).

Ein weiteres potenzielles Risiko ist, dass DNA-basierte Mittel zur Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen führen. Da Plasmide in der Regel in GVM hergestellt werden, besitzen sie aus prozesstechnischen Gründen häufig Gene, die für eine Resistenz gegen ein Antibiotikum codieren. Kozak & Hu (2024) stufen das Resistenzgen-Szenario als unwahrscheinlich ein, da bisherige Untersuchungen keine Belege für sein Eintreten liefern.

Mit neuen Techniken gelingt es heute, auf die Nutzung von Antibiotikaresistenzgenen zu verzichten. So kann herkömmliche Plasmid-DNA durch Minicircle-DNA ersetzt werden. Das sind kleine und kompakte kreisförmige DNA-Moleküle, die zwar noch in GV-Bakterien hergestellt werden, denen aber unnötige bakterielle Sequenzen wie Antibiotikaresistenzgene entfernt werden (Nafissi et al. 2014). Zudem gelingt es heute, DNA auch *in vitro* herzustellen – das heißt ohne Zellen und damit ohne bakterielle Se-

quenzen. Die Firma *Touchlight Aquaculture* zum Beispiel produziert mit ihrer Zell-freien Doggybone-Plattform lineare DNA und will damit DNA-Impfstoffe für die Aquakultur herstellen (Touchlight 2021). Das Unternehmen *Evvivax* wiederum, das Krebsmittel für Haustiere entwickelt, setzt unter anderem LinearDNA ein – das ist mit einem PCR-System hergestellte lineare DNA (Shrourou 2018, Conforti et al. 2022).

Die Nutzung DNA-basierter Impfstoffe wirft in einigen Ländern Fragen zum GVO-Status geimpfter Tiere auf (Foss & Rogne 2003, Hølvold et al. 2014): Führt der Prozess der Injektion von rekombinanter DNA dazu, dass geimpfte Tiere von der rechtlichen GVO-Definition erfasst sind? Sind geimpfte Tiere GVO, weil sich die Plasmid-DNA in ihr Erbgut integrieren könnte? Soll der GVO-Status so lange gelten, wie Plasmid-DNA in den Tieren nachweisbar ist? In Europa beschäftigten sich bisher die EU und Norwegen mit diesen Fragen und zwar im Rahmen der Zulassung von *Clynav*, einem DNA-Impfstoff für Lachse von *Elanco*. Um beurteilen zu können, ob mit *Clynav* geimpfte Fische als GVO im Sinne der Richtlinie 2001/18 zu betrachten sind, verlangte die EU-Kommission zuerst von *Elanco*, Untersuchungen zur möglichen Integration der Plasmid-DNA in das Genom der Fische durchzuführen, und beauftragte dann die EFSA, die Ergebnisse der Untersuchungen zu bewerten (EFSA 2013/2017). Da die EFSA wie *Elanco* die Wahrscheinlichkeit eines Integrationsereignis als sehr gering beurteilte und davon ausging, dass die Integrationsrate um Größenordnungen unter der Nachweisgrenze verfügbarer Tests liegt (EFSA 2017a), stuft die EU-Kommission mit *Clynav* geimpfte Fische nicht als GVO ein. In Norwegen beschäftigte sich das *Biotechnology Advisory Board* mehrmals mit *Clynav* und empfahl dabei jeweils, geimpfte Tiere nicht als GVO zu behandeln. Das Umweltministerium folgte dieser Empfehlung und entschied 2017, mit *Clynav* geimpfte Lachse nicht als GVO einzustufen (NBAB 2018).

Tabelle 3: Plasmid-basierte Tierarzneimittel mit Zulassungen

Produkt	Hersteller	Verwendung	Zulassung
Apex IHN	Novartis/Elanco	IHN*- Impfstoff für Lachse	USA, Kanada
Clynav	Elanco	Pankreasnekrose-Impfstoff für Lachse	EU, Norwegen
ExactVac	Huvepharma	Grippe-Impfstoff für Schweine	USA
Neoleish	CZ Veterinaria	Leishmaniose-Impfstoff für Hunde	EU
LifeTide	VGX Animal Health	Leistungssteigerung bei Schweinen	Australien
Oncept	Boehringer Ingelheim	Krebsimpfstoff für Hunde	USA
Victrio	Bayer	Immunostimulans für Schweine	USA
West Nile	Fort Dodge	WNV**-Impfstoff für Pferde	USA
Zelnate	Bayer	Immunostimulans für Rinder	USA

*IHN =Infektiöse Hämatopoetische Nekrose; **WNV = West-Nil-Virus

5. Lebensmittel

Gegenwärtig spielen GVM im Lebensmittelbereich vor allem bei der fermentativen Herstellung von Substanzen wie Zuckern, Vitaminen oder Enzymen eine Rolle, die in aufgereinigter Form als Zutaten, Verarbeitungshilfsstoffe oder Nahrungsergänzungsmittel zum Einsatz kommen. Wegen der geringen Kundenakzeptanz finden lebende GVM im Lebensmittelbereich bisher kaum Verwendung. So konnten sich GV-Hefen, die in den 1990er und 2000er Jahren zugelassen wurden, auf dem Markt nicht durchsetzen (siehe unten). Erst seit kurzen sind in den USA erstmals GV-Hefen und GV-Probiotika auf dem Markt erhältlich (Tabelle 4).

In Europa sind aktuell keine lebenden GVM im Lebensmittelbereich zugelassen. Doch auch hier zeigen Firmen erstmals seit langem offen ein Interesse an der Nutzung von GVM. 2024 haben etwa *Sacco*, *Lesaffre*, *Novonesis*, *Lallemand* und *DSM* – Konzerne, die den Markt mit Starterkulturen beherrschen – gemeinsam mit ihrem europäischen Branchenverband *EFFCA* ein Papier veröffentlicht, in dem sie CRISPR/Cas als ein mächtiges Werkzeug für die nachhaltige Lebensmittelproduktion ausloben und Lockerungen der Gesetzgebung verlangen (Dal Bello et al. 2024). In einem gemeinsamen Papier mit dem Branchenverband *EuropaBio* äußerten die Konzerne *IFF*, *DSM*, *Novonesis* und *Lallemand* die Meinung, dass es keine Rechtfertigung für eine strengere Regulierung von GVM im Vergleich zu ihren Nicht-GV-Pendants gebe, zumal die Unterscheidung zwischen GVO und Nicht-GVO durch neue Verfahren wie CRISPR/Cas verwischt werden (Lensch et al. 2024).

In der EU haben die Behörden begonnen, sich auf die Lancierung von Produkten mit lebenden GVM vorzubereiten. So ließ die EFSA erheben, welche GVM im Lebensmittelsektor zu erwarten sind (Van der Vlugt 2020, Ballester et al. 2023), und prüfte dann anhand von Fallbeispielen, ob die bestehenden Leitlinien für die Risikobewertung ausreichen (EFSA 2020, EFSA 2024b). Wie die Prüfung ergab, ist eine Aktualisierung der Leitlinien erforderlich.

5.1 Starterkulturen mit Hefen

Hefen – vor allem *Saccharomyces cerevisiae* – sind unverzichtbar für die Herstellung von Brot, Bier und Wein. Die Versuche, GV-Stämme für die Backwaren- und Spirituosen- und Brauereindustrie herzustellen, führten bereits in den 1990er und 2000er Jahren zu ersten Zulassungen (Tabelle 4; Aldhous 1990, Schuller & Casal 2005, Browning et al. 2023). In Großbritannien erhielten 1990 eine GV-Backhefe und 1994 eine GV-Bierhefe grünes Licht von den Behörden. Japan folgte 2001 mit der Zulassung einer selbstklonierten Sake-Hefe. In Kanada und den USA wiederum gab es 2003 und 2006 Freigaben für die GV-Weinhefen *ML01* und *ECMo01*. 2010 und 2012 erhielten die selbstklonierten Brauhefe *P1Y0* und «Acrylamid-Preventing»-Backhefe in den USA den «Generally Recognized as Safe» (GRAS)-Status. Wegen der geringen Akzeptanz bei Konsumentinnen und Konsumenten und dem damit einhergehenden Desinteresse in der Back- und Brauereibranche konnten sich diese GV-Stämme jedoch kommerziell

nicht durchsetzen (Browning et al. 2023). Seit anfangs der 2020er Jahre wurden in einigen Ländern jedoch GV-Bierhefen zugelassen, die auf dem Markt tatsächlich auch eingesetzt werden.

Tabelle 4: GVM, die in einigen Ländern im Lebensmittelbereich verkehrsfähig sind.

GVM	Verwendung	Firma	Land
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
APY*,**	Hefe für Backwaren mit weniger Acrylamid	Functional Technologies	USA
ECMo01*	Hefe für Wein mit weniger Urethan	FVT	USA, Kanada
ML01*	Hefe für Wein ohne Apfelsäure	Lesaffre	USA, Kanada
P1Y0*,**	Hefe für Wein mit weniger Schwefel	Phytterra Yeast	USA
1250S*,**	Hefe für Sake mit Apfelgeschmack	YPITI	Japan
OYR-185**	Hefe für Bier ohne Phenol-Geschmack	Omega Yeast	USA
OYR-243**	Hefe für Bier mit erhöhtem Thiolgehalt	Omega Yeast	USA
yBBS002	Hefe für Bier mit Geschmacksvariationen	Berkeley Yeast	USA
BY-989	Hefe für Bier mit Geschmacksvariationen	Berkeley Yeast	USA
Sourvisiae	Hefe für Sauerbier	Lallemand	USA, Kanada, Brasilien
<i>Bacillus subtilis</i>			
ZB183	Probiotikum gegen Kater	ZBiotics	USA
ZB423	Probiotikum für mehr Ballaststoffe	ZBiotics	USA
AAN000002	Sporen als biologische Marker	Aanika Biosciences	USA

FVT: First Venture Technologies; YPITI: Yamaguchi Prefectural Industrial Technology Institute.

*: GVM sollen auf dem Markt nicht mehr erhältlich sein. **: Transgen-freie GVM, die selbstkloniert, cisgen oder mit CRISPR/Cas gezielt mutiert worden sind.

5.1.1 Bierhefen

Für die Herstellung von Sauerbier ist seit 2020 *Sourvisiae* von *Lallemand* auf dem Markt erhältlich. Die in Kanada, Brasilien und den USA zugelassene GV-Hefe enthält ein Laktatdehydrogenase-Gen aus einem Schimmelpilz und kann deshalb während der Gärung neben Alkohol auch Milchsäure produzieren (FDA 2019a, Health Canada 2024). Da sich Biere mit *Sourvisiae* in einem einzigen Schritt gären und säuern lassen, können Brauereien bei der Herstellung von Sauerbier Zeit und Kosten sparen. Mit *Galactic Chico* bietet auch die Firma *Berkeley Yeast* in den USA eine GV-Hefe an, die während der Gärung Milchsäure produziert. Das auf die gentechnische Herstellung von Bierhefen spezialisierte Unternehmen hat zudem den GRAS-Status für zwei GV-Hefen erhalten, mit denen sich der Geschmack von Lager- und Ale-Bieren variieren lässt (FDA 2019b/2023a). Die eine Hefe ist dazu mit Genen aus Minze und Basilikum, die andere mit einem Gen aus *Citrobacter freundii* verändert worden.

Während die Produkte von *Lallemand* und *Berkeley Yeast* artfremde Sequenzen enthalten, hat die Firma *Omega Yeast* mit CRISPR/Cas GV-Hefen entwickelt, die frei von Transgenen sind (FDA 2023b/c). Zwei Beispiele sind *Cosmic Punch* und *Lunar Crush*. Sie sind mit Hefe-eigenen Genen so verändert worden, dass sie in Craft-Bieren den

Gehalt an Thiolverbindungen erhöhen und dadurch zu tropischen Fruchtaromen führen. Zwei weitere Produkte von *Omega Yeast* sind *Bananza* und *Sundew*. Bei ihnen wurde mit CRISPR/Cas das FDC1-Gen ausgeschaltet, wodurch sich Biere ohne phenolischen Geschmack brauen lassen.

Neben *Omega Yeast* nutzen noch weitere Firmen CRISPR/Cas, um GV-Hefen ohne artfremden Gene herzustellen. *Brain Biotech* etwa arbeitet an GV-Hefen für die Herstellung alkoholarmer Biere (Borgmeister et al. 2024). *Dupont* hat die Patentierung einer GV-Hefe beantragt, die verhindern soll, dass in Flaschen abgefülltes Bier unter Sonnenlicht zu Stinkbier wird (Cramer et al. 2021). Und *Anheuser Busch* hat mit CRISPR/Cas eine cisgene Hefe erzeugt, die auch bei hohem Kohlendioxiddruck gute Aromen bilden soll (Malcorps et al. 2022).

5.1.2 Weinhefen

Aktuell sind keine GV-Weinhefen auf dem Markt erhältlich. Wie bei den Bierhefen entstanden in den letzten Jahren jedoch eine Reihe mit CRISPR/Cas erzeugter GV-Stämme. Dazu gehören Stämme mit erhöhter Osmosetoleranz (Muysson et al. 2019), gesteigerter Fermentationsgeschwindigkeit (Vallejo et al. 2020) und verbesserter Fermentationseffizienz unter stickstoffarmen Bedingungen (Lang et al. 2021). Andere mit CRISPR/Cas veränderte Hefen erleichtern die gemeinsame Gärung mit Nicht-Saccharomyces-Hefen (Lang et al. 2022) oder helfen, in Weinen den Gehalt unerwünschter Substanzen wie Urethan oder Schwefelwasserstoff zu verringern (Chin et al. 2016, Vigentini et al. 2017, Walker et al. 2021, Jung et al. 2022).

In der Weinindustrie scheint es immer noch eine Zurückhaltung gegenüber dem Einsatz von GV-Hefen zu geben. Mit *Danstar Ferment* ist im Rahmen dieser Arbeit nur eine Firma bekannt geworden, die GV-Hefen für die Weinzubereitung entwickelt. Die Schweizer Tochtergesellschaft von *Lallemand* ließ einen Stamm patentieren, der das Geschmacksprofil von Wein verbessern können soll (Rice & Argyros 2024).

5.1.3 Backhefen

Anwendungen CRISPR-basierter Methoden führten in den letzten Jahren auch bei Backhefen zu GV-Stämmen, die frei von artfremden Sequenzen sind. Das südkoreanische Lebensmittelunternehmen *SPC Group* zum Beispiel erzeugte mit CRISPR/Cas Transgen-freie Varianten von SPC-SNU 70 – einem Hefestamm, der sehr triebkräftig und beim Backen mit Sauerteig gefragt ist (Cha et al. 2025). Nach der gentechnischen Bearbeitung soll der SPC-SNU 70 nun neu auch bei mageren und süßen Teigen verwendbar sein. In Laboren öffentlicher Forschungseinrichtungen entstanden zudem GV-Backhefen mit verbesserter Triebkraft (Lee et al. 2022) und erhöhter Gefriertoleranz (Chen & Lin 2022).

5.2 Starterkulturen mit Milchsäurebakterien

Milchsäurebakterien verdanken ihren Namen der Fähigkeit, Milchsäure als Hauptprodukt ihres Stoffwechsels zu produzieren. Ihre Vertreter finden sich bei den Gattungen *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* und *Pediococcus*.

cus. In der Lebensmittelindustrie sind sie unverzichtbar, spielen sie doch bei der Herstellung von Produkten wie Joghurt, Käse, Kefir, Sauermilch, Salami oder Sauerkraut eine zentrale Rolle.

Aktuell sind keine Starterkulturen mit GV-Milchsäurebakterien auf dem Markt erhältlich. Bis vor kurzem kamen gentechnische Methoden auch noch relativ selten zum Einsatz und erst mit dem Aufkommen der CRISPR/Cas-Technik ist das Interesse an GV-Stämmen gestiegen (Börner et al. 2019, Cui & Qu 2024). Markt-orientierte Forschungsprojekte finden sich jedoch noch kaum. Die Bemühungen der letzten Jahre richteten sich vor allem darauf, die CRISPR-basierte Methoden bei den unterschiedlichen Arten von Milchsäurebakterien zu etablieren (Xie et al. 2024).

In der Schweiz startete Agroscope 2018 ein Projekt, in dem unter anderem CRISPR/Cas als Knockout-Methode für Milchsäurebakterien evaluiert und etabliert werden sollte. Eine der leitenden Fragen des Projektes war, ob sich mit CRISPR/Cas unerwünschte Gene wie Antibiotikaresistenz- oder Toxin-codierende Gene aus dem Erbgut der Bakterien entfernen lassen (Agroscope 2018).

Auch Forschende der niederländischen Firma *Nizo* testeten CRISPR/Cas, um unerwünschte Sequenzen aus Milchsäurebakterien zu entfernen. Sie zeigten, dass sich Prophagen aus dem für Molkereien wichtigen *Lactococcus lactis* ausschneiden lassen (van der Els et al. 2018). Prophagen sind ins Erbgut inserierte Sequenzen von Bakteriophagen, die zu fehlerhaften Gärungen und damit zu verlorenen Chargen führen können.

Auch Plasmide können mit CRISPR/Cas aus Milchsäurebakterien entfernt werden (Jang et al. 2017). Bei *Pediococcus acidilactici* führte das zu einem erhöhten Wachstum (Liu et al. 2021).

Da Metabolite von Milchsäurebakterien den Geschmack und die Textur fermentierter Lebensmittel beeinflussen, ist geplant, mit CRISPR/Cas Einfluss auf die Biosynthese solcher Metabolite zu nehmen und so die probiotischen, geschmacklichen und sensorischen Eigenschaften fermentierter Lebensmittel zu ändern (Cui & Qu 2024).

5.3 Nahrungsergänzungsmittel

ZB183 und ZB423 – das sind die Kürzel für die GV-Stämme von *Bacillus subtilis*, die in den beiden weltweit ersten kommerzialisierten GVM-haltigen Nahrungsergänzungsmitteln enthalten sind (Ergün et al. 2024). Beide Stämme kommen aus den Laboren der Firma *ZBiotics* und sind auf dem US-Markt erhältlich. ZB183 fungiert als Wirkstoff eines Mittels, das vor dem Konsum von Alkohol eingenommen werden kann, um einem Kater vorzubeugen. Da ZB183 ein Gen enthält, das für eine Acetaldehyd-Dehydrogenase kodiert, kann der Stamm Acetaldehyd abbauen – denjenigen Stoff, der für den Kater verantwortlich ist. ZB183 wurde 2019 lanciert und soll seither über fünf Millionen Mal verkauft worden sein (Hassan-Casarez et al. 2024). Auch wenn *ZBiotics* in einem Tierversuch an Ratten zeigte, dass ZB183 keine toxischen Nebenwirkungen hat (Barla et al. 2019), bemängeln Ma et al. (2022), dass bei der Markteinführung die Sicherheit von ZB183 im menschlichen Körper nicht ausreichend nachgewiesen war.

Den zweiten GV-Stamm – ZB423 – brachte ZBiotics 2024 auf den Markt. Er soll als Probiotikum wirken, indem er im Darm Zucker in den Ballaststoff Levan umwandelt (Ergün et al. 2024).

ZBiotics ermittelte den GRAS-Status seiner GV-Stämme jeweils im Rahmen einer Selbstzertifizierung (ZBiotics 2024). Die Firma, die ihre Produkte mit «proudly GMO» bewirbt, sammelte 2024 12 Millionen US-Dollar an Risikokapital ein und will damit nun auch für andere Bereiche wie Schlaf, vaginale Gesundheit und sportliche Leistung Produkte mit GVM entwickeln (Marston 2024).

5.4 Herkunftsnachweis mit GVM

Mittel zum Nachweis der Herkunft und der Authentizität von Produkten spielen in der globalisierten Lebensmittelversorgungskette zunehmend eine wichtige Rolle. Treten etwa Lebensmittel mit Gesundheitsrisiken auf, erleichtern solche «Track and Trace»-Mittel gezielte Produktrückrufe.

2020 stellten Forschende erstmals GVM vor, die eine rasche Herkunftsermittlung von Lebensmitteln ermöglichen sollen (Nivala 2020, Qian et al. 2020). Sie hatten dazu in lebensmitteltaugliche *Bacillus subtilis* und *Saccharomyces cerevisiae* kurze DNA-Abschnitte – eine Art genetische Barcodes – eingefügt, die mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) leicht verfolgt werden können. Werden Früchte, Gemüse oder Salate gleich nach der Ernte mit Sporen der GVM besprüht, kann ihre Herkunft mit PCR über die ganze Lebensmittelkette hinweg ermittelt werden.

In den USA ist ein GVM von *Aanika Biosciences* als biologischer Marker in der Testphase. Dabei handelt es sich um einen *Bacillus subtilis*, der kurze, biologisch nicht funktionale DNA-Stücke als Barcode enthält und dessen Sporen – aufgrund eines Knockouts von vier Genen – nicht keimen können (Aanika 2022). Die Sporen des GVM erhielten 2023 den GRAS-Status und dürfen in den USA als Tracer bei Obst, Nüssen, Gemüse, Getreide, Molkereiprodukten und Meeresfrüchten zur Rückverfolgung eingesetzt werden (FDA 2023d). Derzeit verkauft *Aanika* die Sporen testweise an Firmen, die sie intern verwenden, um Quellen von Verunreinigungen oder Krankheitserregern in ihren Lebensmitteln zu identifizieren.

Auch Plasmide sind als biologisches «Track and Trace»-Mittel in der Erprobung. Liu et al. (2023) zum Beispiel testeten in Siliziumdioxidkugeln eingekapselte DNA als Marker für die Rückverfolgung von Orangen. Da die DNA rekombinant ist, wäre in der Schweiz zu klären, ob das Mittel rechtlich als GVO einzustufen ist.

6. Futtermittel

Gegenwärtig spielen GVM in der Tierernährung vor allem bei der fermentativen Herstellung von aufgereinigten Futtermittelzusatzstoffen wie Vitaminen, Aminosäuren oder Enzymen eine Rolle. Zunehmend sind jedoch auch Futtermittel auf dem Weltmarkt erhältlich die lebende oder inaktivierte GVM enthalten. Denn Forschung und Industrie arbeiten an der Herstellung von GVM, die als Eiweißquelle direkt für die

Nährstoffversorgung der Tiere sorgen oder als Futtermittelzusatz gewisse Funktionen übernehmen sollen.

Die Nutzung lebender GVM als Futtermittel ist für die Regulierung ein Novum und dürfte insbesondere bei der gängigen Risikobewertung und beim Umweltmonitoring Anpassungen notwendig machen. Dabei wird der Fokus nicht allein auf der Sicherheit der gefütterten Tiere liegen. Aufgrund sekundäre Expositionswege werden auch mögliche Folgen für Mensch und Umwelt zu bewerten sein. So könnte zum Beispiel das Ausbringen von GVM in Gülle zu einer Kontamination von Pflanzen und daraus hergestellten Lebensmitteln führen, was eine Exposition der Konsumentinnen und Konsumenten sowie der Umwelt (Boden) zur Folge haben kann

6.1 Einzellerprotein – GVM als Eiweißquelle

Futtermittel aus Biomasse proteinreicher Hefen, Bakterien und Mikroalgen spielen in der Tierernährung eine zunehmend wichtigere Rolle. Das Interesse an der auch «single cell protein» oder kurz SCP genannten Futterkategorie steigt, weil sie eine umwelt- und klimafreundlichere sowie kostengünstigere Alternative zu Tierfutter aus pflanzlichen Proteinen und Fischmehl bietet und den weltweit wachsenden Bedarf an Futterproteinen nachhaltig decken könnte.

SCP-Futtermittel lassen sich je nach Herkunft der mikrobiellen Biomasse in zwei Typen unterteilen. Der eine Produkttyp besteht aus Biomasse, die extra für die Gewinnung von SCP erzeugt wird. Der andere Produkttyp enthält Biomasse, die als Nebenprodukt aus anderen Produktionsprozessen stammt. Bei beiden Typen kann Gentechnik eine Rolle spielen.

6.1.1 GV-Stämme für SCP-Gewinnung

Verbesserung der Produktivität und Erhöhung von Nährwert und Funktionalität – das sind im Wesentlichen die Ziele, wenn es um die gezielte Herstellung von GV-Stämmen für die Gewinnung von SCP geht. In den letzten Jahren sind mehrere Projekte dazu lanciert worden (Balagurunathan et al. 2022, Zhuang et al. 2024). Dabei entstanden unter anderem Stämme, die multifunktional sind und nicht nur Proteine sondern zusätzlich auch ernährungsphysiologische und funktionelle Inhaltsstoffe liefern. Das *Novo Nordisk Foundation Center for Biosustainability* beispielsweise erzeugte eine GV-Hefe mit erhöhter Astaxanthin-Menge, die bei Lachsen und Garnelen die Färbung der Muskeln fördern könnte (Tramontin et al. 2019).

Mit *Knip* und *CJ Bio* haben derzeit zwei Unternehmen Produkte mit inaktivierten GVM im Angebot. Die US-Firma *Knip* (ehemals *KnipBio*) verfügt über GV-Stämme von *Methylobacterium extorquens*, die Taurin oder farbverstärkende Karotinoide bilden (Jones et al. 2020). Der Karotenoid-bildende Stamm KB203, der durch die Entfernung mehrere Gene entstanden ist, hat in den USA den GRAS-Status und darf dort – mit Sprühtrocknung inaktiviert – als Futter für Fische und Krustentiere verkauft werden (FDA 2019c/2020). *Knip* plante, KB203 auch in der EU auf den Markt zu bringen. 2020

zog die Firma ihren Zulassungsantrag jedoch zurück, nachdem die EFSA zusätzliche Daten für die Sicherheitsbewertung gefordert hatte (EFSA 2020).

Das südkoreanische Unternehmen *CJ Bio* entwickelte mehrere GV-Stämme von *Corynebacterium glutamicum*, die für Tiere essentielle Aminosäuren wie Valin, Lysin, Threonin und Tryptophan bilden. In Brasilien sind die inaktivierten Biomassen dieser Stämme als Futtermittel *VALPro*, *TRP Pro*, *THR Pro* und *BestAmino* erhältlich (FAS 2024). 2023 reichte *CJ Bio* in der EU einen Zulassungsantrag für inaktivierte Biomasse eines Lysinproduzierenden GV-Stammes ein (EFSA 2024a).

Die erste kommerzielle Nutzung eines multifunktionalen GV-Stammes als Futtermittel fand bereits anfangs der 2010er Jahren statt. Damals hatte *Dupont* eine Omega-3-Fettsäuren produzierende GV-Hefe entwickelt, um aus ihr Nahrungsergänzungsmittel zu gewinnen. Die Firma *AquaChile* nutzte die Biomasse dieser GV-Hefe als Futter, um bei der Aufzucht ihres besonders nachhaltig geltenden *Verlasso*-Lachses auf Fischmehl verzichten zu können (Xie et al. 2015). Mittlerweile soll *AquaChile* die GV-Hefe durch Mikroalgen ersetzt haben (Sprague et al. 2017).

6.1.2 GV-Futtermittel als Nebenprodukt

Auch beim Produkttyp, bei dem die mikrobielle Biomasse nicht eigens für die SCP-Gewinnung erzeugt wird, sondern eine Zweitverwertung ist, gibt es GVM für die Tierfütterung. So sind in Argentinien, Brasilien und den USA einige inaktivierte GV-Hefen als Futtermittel zugelassen, die in der Biokraftstoffherstellung verwendet werden (Kapitel 17). DSM zum Beispiel erhielt 2017 in den USA den GRAS-Status für eine Bioethanolhefe (FDA 2017). In China soll *Lanzatech* die Biomasse von GV-Bakterien aus der Ethanolherstellung als Schweinefutter verwenden dürfen. In Australien wiederum erhielt die Firma *Cauldron Molecules* die Erlaubnis, GV-Hefen, die für die Produktion tierischer Proteine getestet werden, in inaktivierter Form als Tierfutter zu verwenden (OGTR 2024).

Auch in Europa wurden schon inaktivierte GVM an Tiere verfüttert. Ab den 1990er Jahren verkaufte *Novo Nordisk* in Dänemark unter dem Label *Novo Yeast Cream* Schweinefutter aus abgetöteten GV-Hefen, mit denen der Konzern Insulin für die Humanmedizin produziert (Novo Nordisk 2009). Zwei der Insulin-produzierenden GV-Stämme von *Novo Nordisk* – pMT742 und pAK729 – waren bis 2011 auch in der EU als inaktivierte Biomasse für die Schweinefütterung zugelassen (EFSA 2019). Auch *PL73* von *Ajinomoto* war auf dem EU-Markt erhältlich (EFSA 2017b). Es bestand aus inaktivierter Biomasse eines GV-Stammes von *Brevibacterium lactofermentum*, der für die Herstellung von Lysin eingesetzt wurde. *Ajinomoto* zog 2012 den Antrag auf Fortführung der Zulassung zurück (Ajinomoto 2012).

6.2 Futtermittelzusatzstoffe

In der Tierernährung werden eine Reihe von Substanzen und Mikroorganismen als Zusatzstoffe eingesetzt, um die Gesundheit der Tiere, ihre Futtermittelverwertung, ihre Leistung oder auch die Qualität ihrer Produkte wie Fleisch, Milch oder Eier zu fördern.

Bis vor kurzem spielten GVM noch keine Rolle als Zusatzstoffe. Ende 2024 wurde mit *BiomElix One* in Brasilien jedoch ein erstes Produkt zugelassen. Weitere GVM sind in der Entwicklung. Sie sollen in Zukunft Wachstum und Nährstoffverwertung von Tieren steigern, Methanemissionen von Wiederkäuern senken und vor Krankheitserregern schützen.

6.2.1 Schutz vor pathogenen Mikroorganismen

Im Dezember 2024 wurde *BiomElix One* in die brasilianische Positivliste für Futtermittelzutaten aufgenommen, womit weltweit erstmals ein GVM-basierter Futtermittelzusatzstoff verkehrsfähig ist. Der von *Folium Science* mit der firmeneigenen *Guided Biotics*-Technik entwickelte GVM soll Geflügel vor Infektionen mit Salmonellen schützen und basiert auf dem Konzept, CRISPR/Cas als Mittel zum Abtöten von Bakterien einzusetzen (Abschnitt 2.1.5). Konkret besteht *BiomElix One* aus einem *Escherichia coli*-Stamm, der ein Plasmid mit CRISPR/Cas-Anleitungen enthält. Wird der GVM an Hühner verfüttert, überträgt er in den Vögeln sein Plasmid auf Salmonellen, wo die Bildung der CRISPR/Cas-Reagenzien zum Tod der Erreger führt. Der rekombinante *Escherichia coli*-Stamm von *BiomElix One* wurde in Brasilien als Nicht-GVO eingestuft (Ballester et al. 2023). In der EU wiederum hielt die EFSA kürzlich fest, dass ihre bestehenden Leitlinien für Risikoabschätzung und Umweltüberwachung von GVM nicht ausreichen würden, um eine konsistente Risikobewertung von *BiomElix One* vorzunehmen (EFSA 2024b). Die Naturschutzorganisation *Friends of the Earth* forderte 2023, Produkte der *Guided Biotics*-Technik unter ein Moratorium zu stellen (FOE 2023).

6.2.2 Wachstumssteigerung

Eine der Funktionen, die GVM in Futtermitteln erfüllen sollen, ist die Leistungssteigerung. *Trade Wind Biotech*, eine Firma aus Taiwan, hat etwa eine Astaxanthin-exprimierende GV-Hefe in der Pipeline, die als Zusatzstoff das Wachstum von Fischen und Meeresfrüchten erhöhen soll (Chong et al. 2024). *TransAlgae* arbeitet an GV-Mikroalgen, die das Wachstumshormon von Lachs bilden. Bei Versuchen mit Koi und Skalaren führte die Zufütterung der GVM dazu, dass die beiden Zierfische schneller wuchsen als normal (Moshitzky et al. 2018).

6.2.3 Nährstoffverwertung

Auch die Verbesserung der Nährstoffverwertung von Tieren gehört zu den Zielen, die mit GVM-haltigen Zusatzstoffen erreicht werden sollen. Ein Beispiel sind GV-Milchsäurebakterien, die ein Cellulase-Gen exprimieren. In Versuchen mit Gänsen erhöhten sie die Nahrungsverwertung, weil die Tiere dank der Cellulase Ballaststoffe aus pflanzlichen Futtermitteln besser verdauen konnten (Zhou et al. 2015). Ein zweites Beispiel sind GV-Hefen der US-Firma *Pando Nutrition*. Sie bilden mit Lysozym ein Enzym, das die Nährstoffaufnahme fördern soll (Rouskey & Manofsky 2020).

Mit GVM, die Phytasen bilden, soll wiederum die Phosphorverwertung von Tieren verbessert werden. Phytasen bauen die in pflanzlichen Futtermitteln vorkommende Phytinsäure ab und machen dadurch den Phosphor für Tiere verfügbar. In den letzten

Jahren wurden bei Mikroalgen und bei Bakterien Phytase-produzierende GV-Stämme erzeugt (Erpel et al. 2016, Pudney et al. 2019, Peraza-Echeverria et al. 2021, Medeiros et al. 2023, Bandari et al. 2024).

6.2.4 Siliermittel

Eine weitere Kategorie von Futtermittelzusätzen, bei der GVM in der Entwicklung sind, sind Siliermittel aus Milchsäurebakterien (Okoye et al. 2023). Diese Bakterien werden bei Futtergräsern und -mais eingesetzt, um das geerntete Material zu einer hochwertigen Silage zu gären.

Um von Mais und Luzerne bessere Silagen zu erhalten, sind in den letzten Jahren GV-Stämme von *Lactococcus lactis* und *Lactobacillus plantarum* hergestellt worden, die Zellulose-abbauende Enzyme exprimieren (Guo et al. 2019, Liu et al. 2019, Wan et al. 2024). Diese Enzyme verbessern die Silagequalität, indem sie die Verfügbarkeit von Nährstoffen erhöhen, was die Fermentation optimiert und die Verdaulichkeit für die Tiere steigert. Wan et al. (2024) gehen davon aus, dass GV-Milchsäurebakterien mit Zellulose-abbauenden Enzymen in Zukunft ein Hot Spot der Siliermittelforschung sein werden.

6.2.5 Methandreduktion

GVM für Futtermittelzusätze entstehen derzeit auch in Projekten zur Methanreduzierung. Methan ist ein starkes Treibhausgas und wirkt – auf 100 Jahre gesehen – 28-fach stärker als CO₂. Rund ein Viertel der weltweiten Methanemissionen stammt aus der Haltung von Wiederkäuern – Kühen, Rindern, Schafen und Ziegen. Verantwortlich für die Bildung des Treibhausgases sind methanogene Bakterien, die im Pansen der Tiere leben. Um sie mittels GVM von der Methanbildung abzuhalten, werden derzeit drei Ansätze verfolgt.

Der erste Ansatz beruht auf GVM, die Bromoform produzieren – eine Substanz, die in Bakterien die Methanbildung hemmt (Loan et al. 2024, iGEM Lund 2024). Die Firma *Mootral* entwickelt Bromoform-bildende GV-Mikroalgen (Nevitt Goncalves & Need 2024). Das Startup *Number 8 Bio* wiederum stellt Bromoform in GV-Hefen her und will deren Biomasse dem Futter der Tiere beimischen (Watson 2023).

Der zweite Ansatz ist, methanogene Bakterien aus dem Pansen der Tiere zu isolieren und sie vor dem Zurückbringen so gentechnisch zu verändern, dass sie kein Methan mehr bilden können (Subedi et al. 2022, Mrutu et al. 2023). Eine Firma, die hierzu aktiv zu sein scheint, ist *BiomEdit*. Das Joint Venture des Tierarzneimittelherstellers *Elanco* und der Synbio-Firma *Ginkgo Bioworks* arbeitet dabei an GVM, die nicht nur die Methanemissionen verringern, sondern gleichzeitig auch die Futtermittelleffizienz erhöhen sollen (Marston 2023).

Der dritte Ansatz hat ebenfalls die methanogenen Bakterien im Visier. Der Eingriff in ihr Erbgut soll jedoch nicht im Labor, sondern direkt im Pansen der Tiere erfolgen. Entwickelt wird dieses in situ-Gentechnikverfahren im Rahmen des 2023 gestarteten und mit 70 Millionen US-Dollar ausgestatteten Projekts *Engineering the Microbiome*

with CRISPR to Improve our Climate and Health (Philippidis 2023). Beteiligt sind mehrere US-Universitäten. Sie wollen die DART-Methode weiterentwickeln, um die methanogenen Bakterien direkt in den Wiederkäuern verändern zu können (Anonymous 2023; siehe Abschnitt 2.1.5).

7. Pflanzenschutzmittel

Viren, Pilze und Bakterien gehören in der Land- und Forstwirtschaft bereits seit Jahrzehnten zum Arsenal der Mittel, die zum Schutz von Pflanzen gegen Schadorganismen eingesetzt werden können. In der Schweiz beispielweise sind gegenwärtig von fünfzehn Pilz-, zwölf Bakterien- und vier Virenarten Stämme als Pflanzenschutzmittel zugelassen (PSMV 2024).

Bisher kamen mikrobiellen Biokontrollorganismen vorwiegend im Biolandbau zum Einsatz. In den letzten Jahren ist jedoch auch in der konventionellen Landwirtschaft das Interesse an den – als Biologika ausgelobten – Mitteln gestiegen. Gründe dafür sind der gesellschaftliche Wunsch nach einer nachhaltigen Landwirtschaft, die Abkehr von chemisch-synthetischen Pestiziden, die teuren und aufwendigen Zulassungsverfahren für chemisch-synthetisch Pestizide und die Notwendigkeit, Alternativen zur Kontrolle resistenter Schadorganismen zu finden. Zudem wird die Suche nach neuen chemischen Wirkstoffen für Agrarkonzerne zunehmend schwieriger.

Tabelle 5: GVM, die als Pflanzenschutzmittel zugelassen wurden.

GVM	Produktname	Anwendung	Firma	Land
Bacillus thuringiensis*	Crymax	Bioinsektizid	Certis	USA, Mexiko
Bacillus thuringiensis*	Lepinox**	Bioinsektizid	Certis	USA, Mexiko
Bacillus thuringiensis*	Raven**	Bioinsektizid	Certis	USA
Bacillus thuringiensis	GO33A	Bioinsektizid	nicht bekannt	China
Pseudomonas fluorescens	MVP**,***	Bioinsektizid	Mycogen	USA
Pseudomonas fluorescens	M-Trak**,***	Bioinsektizid	Mycogen	USA
Pseudomonas fluorescens	M-One**,***	Bioinsektizid	Mycogen	USA
Rhizobium rhizogenes*	Nogall	Biobakterizid	Bio-Care Technology	USA, Australien, Türkei

*: Transgen-freier GVM; **: Mittel ist nicht mehr auf dem Markt; ***: Mittel besteht aus inaktivierten GVM.

Bestrebungen, GVM für den Pflanzenschutz zu entwickeln, gibt es seit mehr als vierzig Jahren. Sie führten bereits in den 1980er und 1990er Jahren zu einer ersten Welle von Produkten (Tabelle 5). 1988 wurde in Australien *Nogall* zugelassen – ein Mittel mit einem Transgen-freien GV-Stamm von *GV-Rhizobium rhizogenes*, der gegen Wurzelhalsgallen bei Steinobst wirkt und heute auch in den USA und der Türkei erhältlich ist (Kerr & Bullard 2020). In den 1990er Jahren kamen in den USA sechs Bioinsektizide mit GVM auf den Markt (Baum 1998, Wozniak et al. 2012): drei Transgen-freie Stämme von *Bacillus thuringiensis*, die als *Raven*, *Lepinox WDG* und *Crymax WGD* vermarktet wur-

den, und drei Präparate mit inaktivierten, Bt-Toxin bildenden Stämmen von *Pseudomonas fluorescens*, die als *MVP*, *M-One* und *M-Trak* erhältlich waren. Heute ist von diesen Insektiziden nur noch *Crymax* in den USA und in Mexiko erhältlich.

Mit dem steigenden Interesse an Biologika rückt die Entwicklung von GV-Stämmen aktuell wieder stärker in den Fokus von Forschung und Industrie und in den nächsten dürfte eine zweite Kommerzialisierungswelle von GVM-basierten Pflanzenschutzmitteln zu erwarten sein.

Tabelle 6 listet einige Beispiele von Forschungs- und Entwicklungs- (F&E) Projekten aus den letzten zehn Jahren auf, die die Herstellung von GV-Stämmen bei solchen Bakterien- und Pilzarten zum Ziel hatten, bei denen herkömmliche Stämme in der EU und der Schweiz bereits als Pflanzenschutzmittel verwendet werden. Auch bei anderen Arten sind F&E-Projekte am Laufen. Welche Konzepte und Strategien dabei verfolgt werden, ist in den folgenden Abschnitten beschrieben. Da sowohl die eingesetzten Mikroorganismenarten als auch die gentechnischen Ansätze der F&E-Projekte sehr divers sind, werden sich die zu erwartenden Produkte auch in ihren Risikoprofilen und den Anforderungen an ihre Risikobewertung stark unterscheiden. Hier gilt es deshalb zu prüfen, ob geltende Rechtsvorschriften und Leitlinien für die Risikobewertung zweckdienlich sind oder Anpassungen benötigen (Scheepmaker et al. 2016, Eckerstorfer et al. 2024, Miklau et al. 2024).

Tabelle 6: Gentechnische Veränderungen bei in der EU und der Schweiz zugelassenen Biokontrollorganismen.

Biokontrollorganismus	Art und Zweck der gentechnischen Veränderung
Bakterien	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Erhöhte Wirkung gegen <i>Clavibacter michiganense</i> durch Überexpression des Bacilysin-Gens (Wu et al. 2015).
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Erhöhte Toxizität gegen Baumwoll-Kapsel- und Zuckerrüben-Larven durch Expression des Fusionsprotein-Gens Cry1Ac-HW1X (Sun et al. 2016).
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Erhöhte Blattkäfer-Toxizität durch Expression des cry3Aa8-Gens (Yu et al. 2016).
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Erhöhte Toxizität durch Bildung des Proteins Cry(4Ba-1Ac) (Zghal et al. 2017).
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Erhöhte Toxizität gegen Herbst-Heerwurm durch Bildung einer verkürzten Chitinase (Gonzales-Ponce et al. 2019).
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Erhöhte Toxizität gegen Kohlschabe durch Bildung einer dsRNA zur Stilllegung des Argininkinasegens PxAK (Jiang et al. 2021).
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Schutz gegen UV-Strahlen durch Deletion des leuB-Gens (Quan et al. 2020).
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Schutz gegen UV-Strahlen durch Deletion des hmgA-Gens (Zhu et al. 2022).
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Antagonistische Wirkung gegen Schadpilze durch Bildung der Chitinase Chi9602ΔSP an der Zelloberfläche (Tang et al. 2017).
<i>Bacillus subtilis</i>	Schutz vor Nematoden bei Kartoffeln durch Bildung des Elicitor-Peptids StPep1 von Kartoffel (Zhang & Gleason 2020).
<i>Bacillus subtilis</i>	Schutz vor Blattläusen bei Weizen durch Expression des cry11a-Gens von <i>Bacillus thuringiensis</i> (Maksimov et al. 2020).
<i>Bacillus subtilis</i>	Schutz vor Nematoden bei Soja durch Bildung des Elicitor-Peptids PEP3 von Soja (Alnasrawi et al. 2024).

Bacillus subtilis	Schutz vor Pulverschorf bei Kartoffeln durch Bildung des Elicitor-Peptid StPep1 von Kartoffel (Moroz et al. 2024).
Bacillus subtilis	Schutz vor dem Kartoffelkäfer bei Kartoffeln durch Expression des cry1Ia-Gens von Bacillus thuringiensis (Sorokan et al. 2020).
Bacillus subtilis	Induktion der pflanzlichen Immunabwehr durch Bildung des flg22-Peptides von Pseudomonas aeruginosa (Zhang et al. 2024).
Bacillus velezensis	Erhöhung der Wirksamkeit durch Expression des degQ-Gens (Xu et al. 2019).
Bacillus velezensis	Priming von Pflanzen dank erhöhter Acetoin-Produktion durch die Deletion der Gene bdh, gdh und alsD (Peng et al. 2019).
Bacillus velezensis	Erhöhte Wirkung gegen Nematoden durch dsRNA-Expression (Han et al. 2024).
Pseudomonas protegens	Erhöhte Produktion von antifungalem Pyoluteorin durch Überexpression des pltJKNOP-Operons und Deletion der Gene rsmE, lon und pltZ (Shi et al. 2019).
Pseudomonas protegens	Erhöhte Wirkung gegen Rhizoctonia solani via Knockout des retS-Gens (Jing et al. 2020).

Pilze

Beauveria bassiana	Erhöhte insektizide Aktivität durch Expression des Gens für die Ecdysteroid UDP-Glucosyltransferase EGT von Baculoviren (Zhu et al. 2024).
Beauveria bassiana	Erhöhte Virulenz durch Überexpression des bChit- Gens (Mascarin et al. 2024).
Beauveria bassiana	Erhöhte Virulenz durch Überexpression des cfp-Gens (Mou et al. 2022).
Beauveria bassiana	Erhöhte Virulenz gegen die Baumwoll-Kapselleule durch Bildung des Wespentoxins VRF1 (Zeng et al. 2023).
Coniothyrium minitans	Erhöhte Wirkung gegen <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> durch Überexpression des Eisentransporters CmSIT1 (Sun et al. 2017).
Coniothyrium minitans	Erhöhte Wirkung gegen <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> durch Expression des Gens für den Typ II Apoptosisinhibitor BcBIR1 von Botrytis cinerea (Wu et al. 2024).
Clonostachys rosea	Erhöhte Wirkung durch Überexpression des Chitinase <i>chi67-1</i> (Sun et al. 2017).
Isaria fumosorosea	Resistenz gegen das Fungizid Benomyl durch Expression des <i>ben</i> -Gens (Hao et al. 2015).
Metarhizium anisopliae	Erhöhte Virulenz durch Ausschalten des MaGGPPS5-Gens (Li et al. 2022).
Metarhizium anisopliae	Erhöhte Wirkung gegen die Europäische Wanderheuschrecke durch Bildung einer dsRNA für die Stilllegung des Apolipophorin-D-Gens (Han et al. 2023).
Saccharomyces cerevisiae	Toxische Wirkung gegen die Kirschessigfliege durch Bildung einer dsRNA für die Stilllegung des γ -tub23C-Gens (Abrieux & Chiu 2016).
Trichoderma atroviride	Erhöhte Wirkung gegen Rhizoctonia solani und Fusarium oxysporum durch Knockout des ace1-Gens (Fang & Chen 2018).
Trichoderma atroviride	Erhöhung der antimikrobiellen Wirkung gegen <i>Pythium ultimum</i> durch Expression des Cis-Prenyltransferase-Gens aus Hefe (Perlińska-Lenart et al. 2022)
Trichoderma atroviride	Erhöhung der antimikrobiellen Wirkung gegen <i>Pythium ultimum</i> durch Expression des Farnesylpyrophosphatase-Gens aus Hefe (Graczyk et al. 2020)
Trichoderma atroviride	Erhöhte Wirkung durch Überexpression des Taugt17b1-Gens (Chi et al. 2023)
Trichoderma harzianum	Erhöhung der antagonistischen Wirkung gegen <i>Botrytis cinerea</i> durch Expression des Chitinase-Gens <i>chit42</i> von <i>Metarhizium anisopliae</i> (Xia et al. 2018).
Trichoderma harzianum	Erhöhung der antagonistischen Wirkung gegen <i>Fusarium oxysporum</i> durch Überexpression des Aquaglyceroporin-Gens <i>Thaqp</i> (Vieira et al. 2018).
Trichoderma harzianum	Erhöhte Wirkung gegen Fusarien durch Glucanase-Überexpression (Liu et al. 2024)
Trichoderma harzianum	Erhöhung der antagonistischen Wirkung gegen <i>Rhizoctonia solani</i> durch Bildung einer chimerischen Chitinase 42 (Eslashi et al. 2021).
Trichoderma harzianum	Erhöhte Wirkung gegen <i>Fusarium oxysporum</i> via RNAi (Wen et al. 2023).
Trichoderma harzianum	Erzeugung einer Resistenz gegen DMI-Fungizide durch Expression des CYP51B-Gens von <i>Mycosphaerella graminicola</i> (Wang et al. 2024c).

7.1 Mittel mit dsRNA-bildenden GVM

Doppelsträngige RNA (dsRNA) ist ein neuartiger Wirkstoff für Pflanzenschutzmittel. Da er wegen seines sequenz-spezifischen Mechanismus relativ gezielt wirkt und in der Umwelt instabil ist, gelten RNA-basierten Pflanzenschutzmittel als risikoarme und vielversprechende Alternative zu chemisch-synthetischen Pestiziden (Koch & Petschenka 2022, De Schutter et al. 2022, He et al. 2024). Die F&E-Aktivitäten dazu begannen Mitte der 2000er-Jahre (Baum et al. 2007) und haben mit *Calantha* bisher zu einem kommerzialisierten Produkt geführt. Das von der Firma *GreenLight Biosciences* entwickelte Mittel, das aus aufgereinigter dsRNA besteht und gegen den Kartoffelkäfer wirkt, erhielt Ende 2023 in den USA eine vorerst auf drei Jahre befristete Zulassung (EPA 2023).

Zwei der Hindernisse, die bisher einer weiteren Verbreitung RNA-basierter Pflanzenschutzmittel entgegenstehen, sind die hohen Kosten für die chemische Herstellung und die geringe Umweltstabilität von dsRNA. GVM bieten sich hier für beide Probleme als mögliche Lösung an, lassen sie sich doch in zweifacher Weise nutzen: Einerseits für die kostengünstige Produktion von dsRNA und andererseits als Container, um die dsRNA in der Umwelt vor dem raschen Abbau zu schützen (Goodfellow et al. 2019, Hough et al. 2022, Xue et al. 2023).

Die Strategie, GVM als Produzenten und Schutzhülle von dsRNA einzusetzen, wurde in den letzten Jahren mehrfach erprobt. Folgende Arten von Mikroorganismen standen dabei als Lieferanten von dsRNA im Fokus:

- Mikroorganismen wie *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* und *Saccharomyces cerevisiae*, die in der industriellen Biotechnologie seit Jahrzehnten als Produktionsorganismen verwendet werden (Guan et al. 2021, Xue et al. 2023)
- Mikroorganismen, die bereits bei der biologischen Schädlingsbekämpfung zum Einsatz kommen und deren Wirkung durch die dsRNA-Produktion erhöht werden soll. Dazu gehören das insektenpathogene Bakterium *Bacillus thuringiensis* sowie die insekten-tötenden Pilze *Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium attenuatum* und *Metarhizium anisopliae* (Xue et al. 2023)
- Mikroorganismen aus dem Darm von Insekten. Ein Beispiel ist das aus Blüenthripsen isolierte Bakterium *BFo2*. Werden dsRNA-bildende GV-Stämme von *BFo2* zurück in den Darm der Blüenthripsen gebracht, töten sie die Insekten ab (Whitten et al. 2016). Die Verwendung solcher dsRNA-produzierender Darmmikroben wird auch Symbionten-vermittelte RNAi (Elston et al. 2023) oder RNAi-basierte Paratransgenese (Ratcliffe et al. 2022) genannt.
- *Bacillus*- und *Pseudomonas*-Arten, die endophytisch in Pflanzen leben (Sayre et al. 2020, Zhang et al. 2021).
- Chromosomenfreie Bakterienzellen wie *Escherichia coli*-Minizellen (Islam et al. 2021).
- Mikroalgen wie die Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* (Chen 2020).

Während die duale Nutzung von GVM als Produktionsorganismen und Schutzcontainer Vorteile in Bezug auf Produktionskosten und Umweltstabilität bringt, kann sie im Vergleich zur Nutzung isolierte dsRNA-Moleküle auch zwei Nachteile haben. Da dsRNA-bildende GVM risikoreicher sind als die isolierten Moleküle und unter die Gentechnikgesetzgebung fallen, sind ein Minus bei der Sicherheit und ein Plus bei den Kosten für die Genehmigungsverfahren mögliche Kehrseiten.

7.1.1 Strategien mit nicht-vermehrungsfähigen GVM

Um die beiden Nachteile zu beheben, sind verschiedene Strategien in der Erprobung. Eine davon ist, die dsRNA-produzierenden GVM vor der Anwendung mit Hitze oder Alkohol zu inaktivieren (Hashiro & Yasueda 2022). Mehrere Versuche haben gezeigt, dass dsRNA auch nach dem Abtöten der GVM wirksam bleiben kann (z.B. Ganbaatar et al. 2017, Dhandapani et al. 2020, Máximo et al. 2020). Da inaktivierte GVM sich nicht mehr vermehren können und zumindest in einigen Ländern nicht als GVO gelten, fallen die beiden Nachteile weg, die der Einsatz lebender GVM mit sich bringen würde. Das Gleiche gilt auch für die Strategie, Minizellen für die Produktion von dsRNA zu nutzen, die keine Chromosomen besitzen und sich deshalb nicht vermehren können (Islam et al. 2021).

Eine weitere Strategie ist, Mikroorganismen so gentechnisch zu verändern, dass sie neben der dsRNA zusätzlich Hüllproteine eines Virus bilden. Aus solchen GVM können vermehrungsunfähige Virus-ähnliche Partikel gewonnen werden, die die dsRNA umschließen und als Container fungieren (Hashiro & Yasueda 2022).

Eine mögliche Strategie ist auch, die Zellwände und Zellmembranen der Produktionsorganismen zu zerstören und dann die Zellsäfte zu nutzen, um die dsRNA auf die Felder zu bringen (Ahn et al. 2019, Niño-Sánchez et al. 2021). Damit könnte zwar auch die schützende Wirkung der GVM verloren gehen, die resultierenden Mittel wären jedoch risikoärmer und dürften in einigen Ländern nicht unter der Gentechnikgesetzgebung fallen.

7.1.2 dsRNA-bildende GVM in Firmen-Pipelines

Das Konzept, GVM als Produzenten und Schutzhülle von dsRNA einzusetzen, findet bei privaten Unternehmen reges Interesse. Eine Firma, die Produkte mit lebenden GV-Bakterien auf den Markt bringen will, ist *Pebble Labs*. Das US-Startup isoliert dazu Mikroben aus dem Pflanzenmikrobiom und hat unter anderem Stämme des Endophyten *Pseudomonas sp. Csr-7* zu dsRNA-Lieferanten gemacht (Zhang et al. 2021).

Anders gehen die beiden Firmen *Ajinomoto* und *Senseup* vor: Sie nutzen für Herstellung und Verkapselung der dsRNA *Corynebacterium glutamicum*, eine seit Jahren industriell genutzte Bakterienart, und wollen ihre GVM in inaktiverter Form auf die Felder bringen. *Ajinomoto* arbeitet dabei an Produkten gegen Kartoffel- und 28-Punkt-Marienkäfer (Hashiro et al. 2019, 2021). *SenseUp* soll für die Produktentwicklung im Kontakt mit den weltweit fünf größten Pestizidherstellern sein (Lohmann 2024).

Die kanadische Firma *Renaissance BioScience* wiederum entwickelt dsRNA-basierte Insektizide mit GV-Hefen. Ein Mittel mit inaktivierten Hefezellen gegen den Kartoffelkäfer wurde in Kanada für Freilandversuche bewilligt (AgNews 2023). Die Firma arbeitet zudem auch an GV-Hefen, die bis zu vier verschiedene dsRNA-Moleküle bilden und deshalb gegen mehrere Insektenarten gleichzeitig wirken können sollen (Watson 2024). Gemeinsam mit dem Agrochemiekonzern *Certis Belchim* will *Renaissance BioScience* dsRNA-bildende Hefen entwickeln, die gegen pflanzenpathogene Pilze wirken (Watson 2024).

Auch die US-Firma *Agrospheres* arbeitet an Mitteln gegen Schadpilze und hat GV-Minuzellen von *Escherichia coli* in der Pipeline, die Erdbeeren vor Grauschimmel schützen sollen (Islam et al. 2021). Zudem entwickelt *Agrospheres* GV-Minuzellen, die in ersten Feldversuchen mit Kohl eine «kommerziell akzeptable» Bekämpfung der Kohlmotte gebracht haben sollen (Stokstad 2024).

Wie *Agrospheres* setzt auch *RNAissance* (ehemals *RNAagri*) für die dsRNA-Produktion auf *Escherichia coli*. Sie verwendet jedoch nicht die Minuzellenplattform, sondern verändert die Bakterien so, dass sie gleichzeitig mit der dsRNA auch noch Virus-ähnliche Partikel bilden (Killmer et al. 2020, Hashiro & Yasueda 2022). Diese nicht vermehrungsfähigen Partikel umschließen die dsRNA und sollen als Container dienen, um die dsRNA geschützt auf die Äcker zu bringen.

Ein weiteres mögliches Vorgehen, inaktivierte GVM als Schutzhülle zu nutzen, verfolgt die israelische Firma *TransAlgae*. Sie nutzt Mikroalgen als Produktionsorganismen und plant, die GVM im Gefriertrockner zu inaktivieren, bevor sie als Pulver auf die Felder versprüht werden (Chen 2020).

7.2 GVM als Lieferanten von Sekundärmetaboliten

Bakterien bilden eine Reihe von Sekundärmetaboliten, die für den Pflanzenschutz von Interesse sind, weil sie antimikrobiell wirken, insektentoxisch sind oder in Pflanzen durch das Triggern des Immunsystems eine systemische Resistenz gegen Phytopathogene auslösen. Einige dieser Substanzen wie beispielsweise Spinosad oder Abamectin werden in isolierter Form als Wirkstoffe in Pflanzenschutzmitteln genutzt. Eine andere Form der Nutzung ist, die Bakterien, die die Wirkstoffe bilden, direkt als Biokontrollorganismen einzusetzen. Hier bietet die Gentechnik neue Möglichkeiten. Da heute eine Vielzahl der Gene identifiziert sind, die in Bakterien an der Bildung der Sekundärmetabolite beteiligt sind, sind GV-Stämme konstruierbar, die im Pflanzenschutz neu als Wirkstofflieferanten eingesetzt werden könnten (Dundas & Dinneny 2022, Ragland et al. 2024).

Eine Strategie für die Konstruktion solcher Stämme ist, die in Operons oder Genclustern organisierten Biosynthesewege von Sekundärmetaboliten in Bakterienarten zu verlegen, die diese Metabolite natürlicherweise nicht bilden (Patel & Archana 2018, Zhang et al. 2020). Ein Beispiel dazu: *Burkholderia*-Arten bilden natürlicherweise den antibakteriellen Wirkstoff Cepacin, kommen aber nicht als Biokontrollorganismen in Frage, weil sie humanpathogen sind. Forschende transferierten deshalb das Cepacin-Gen-

cluster der *Burkholderia*-Arten in *Paraburkholderia phytofirmans* und stellten so einen für Menschen harmlosen GV-Stamm her, der gegen eine Reihe pflanzenpathogener Bakterien und Pilze bioaktiv ist (Petrova et al. 2022).

Eine andere Strategie für die Konstruktion von Wirkstofflieferanten ist, die Bildung von Sekundärmetaboliten in den Bakterien zu erhöhen, die die Metabolite bereits natürlicherweise produzieren. Da dies unter anderem durch die Entfernung regulatorischer Sequenzen, das Knockout von Genen oder den Austausch art eigener Promotoren gelingen kann (Yu et al. 2018, Peng et al. 2019, Carter et al. 2024), können hier GV-Stämme entstehen, die frei von artfremden Sequenzen sind. Da solche Stämme in einigen Ländern von der Gentechnikgesetzgebung ausgenommen sind, dürfte ihre Herstellung aus kommerzieller Sicht besonders interessant sein.

Die US-Firma *BioConsortia* entwickelt laut einem Patentantrag genomeditierte Stämme von *Bacillus velezensis* und *Paenibacillus polymyxa*, die mehr antifungale Metabolite als üblicherweise bilden (Carter et al. 2024).

7.3 Bakterizide mit GV-Phagen

Die Idee, Phagen als biologisches Pflanzenschutzmittel einzusetzen, gibt es bereits seit den 1920er Jahren. Das F&E-Interesse an ihnen blieb aber wegen der Verfügbarkeit chemisch-synthetischer Pestizide lange gering. In den letzten Jahren stieg das Interesse aber an (Holtappels et al. 2021, Toussaint et al. 2024) und in Kanada und den USA kamen erste Phagen-basierte Mittel wie *Agriphage* oder *XylPhi-PD* auf den Markt (OECD 2022). In der EU und in der Schweiz gibt es noch keine zugelassenen Produkte, laut EU-Pestiziddatenbank² sind jedoch zwei Phagenmittel im Zulassungsverfahren.

Der Einsatz der Gentechnik steht bei Phagen-basierten Pflanzenschutzmitteln noch am Anfang (Pizarro-Bauerle et al. 2020). Potenzielle Anwendungen wie die Erweiterung der Wirtsspezifitäten, die Verbesserung der Wirkung oder die Erhöhung der Umweltstabilität werden in der Literatur zwar diskutiert, konkrete Beispiele dazu finden sich jedoch nur wenige (Eckerstorfer et al. 2024). Eines davon stammt aus der Schweiz, wo Forschende von Agroscope und ETH Zürich eine GV-Variante des Phagen Y2 herstellten (Born et al. 2017). Y2 befällt zwar spezifisch das Bakterium *Erwinia amylovora*, den Erreger des Feuerbrands, ist aber in seiner tödlichen Wirkung wenig effektiv. Indem die Forschenden ein Gen für eine Depolymerase aus dem Phagen L1 auf Y2 übertrugen, schufen sie eine GV-Variante, die dank des neuen Enzyms die Hülle des Bakteriums effizient aufzulösen vermag und deshalb tödlicher wirkt als zuvor (Born et al. 2017).

Ein anderes Beispiel ist *Xylencer* – ein 2019 am iGEM³ gestartetes Projekt, das eine Phagentherapie gegen das Feuerbakterium *Xylella fastidiosa* entwickeln will. Der Ansatz von *Xylencer* ist besonders ausgefeilt und besteht aus zwei GVM (Eckerstorfer et

² https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en

³ iGEM ist ein jährlich stattfindender internationaler Wettbewerb für Studierende auf dem Gebiet der synthetischen Biologie; <https://competition.igem.org>

al. 2024, Toussaint et al. 2024). Der eine GVM ist ein Phage, der so verändert wurde, dass er in Pflanzen einen Abwehrmechanismus gegen das Feuerbakterium auslösen und sich durch das Anhaften an Pflanzensaft-fressende Insekten besser verbreiten kann. Der andere GVM ist ein Stamm des Bakteriums *Xanthomonas arboricola*. Er fungiert als Phagen-Lieferant und enthält dazu ein Plasmid, das für die Bildung des GV-Phagen codiert. Zudem ist er mit einem Mechanismus ausgestattet, der ihn die GV-Phagen nur in Nutzpflanzen bilden lassen soll, die mit dem Feuerbakterium infiziert sind. Ein genetisches Biocontainment soll außerdem dafür sorgen, dass die GV-Bakterien innerhalb weniger Tage aus nicht infizierten Pflanzen verschwinden (Eckerstorfer et al. 2024). Die wenigen Firmen, die Phagentherapien für den Pflanzenschutz entwickeln, nutzen hauptsächlich unveränderte Phagen. Eine Ausnahme ist die US-Firma *Auxergen*. Sie verfügt laut Patentanträgen über GV-Phagen, mit denen sich pathogene *Xylella*- und *Xanthomonas*-Bakterien bekämpfen lassen sollen (Yeh 2020, Yeh & Contreras 2024).

7.4 Pflanzenschutz mit in situ-Genomeditierung

Ein besonderer Ansatz für Phagentherapien ist, die Viren als Vektoren für CRISPR/Cas-Reagenzien zu nutzen. Damit kann zum einen das Konzept der CRISPR/Cas-basierten Bakterizide umgesetzt werden (siehe Abschnitt 7.5). Zum anderen rückt damit auch die gentechnische Veränderung von pflanzenpathogenen Bakterien in situ in den Bereich des Machbaren. Dass dadurch Anwendungen für den Pflanzenschutz möglich werden, wurde 2024 in einer ersten Machbarkeitsstudie gezeigt: Peng et al. (2024) statteten den Phagen *RSCq* mit CRISPR/Cas-Reagenzien aus, die im Braunfäule-Erreger *Ralstonia solanacearum* dessen wichtigstes Virulenzgen ausschalten. Als die Forschenden im Gewächshaus Tomaten mit dem GV-Phagen behandelten, waren die Pflanzen vor Braunfäule geschützt, weil die Viren den Erreger durch Genomeditierung avirulent machten (Peng et al. 2024).

7.5 CRISPR/Cas-basierte Bakterizide

In der wissenschaftlichen Literatur finden sich aktuell noch keine Beispiele für die Entwicklung von Pflanzenschutzmitteln, die auf dem Konzept CRISPR/Cas-basierter Bakterizide beruhen (siehe Abschnitt 2.1.5). Zwei Firmen versuchen jedoch bereits, das Konzept für den Pflanzenschutz umzusetzen. In den USA entwickelt *Robigo* «killer plasmids», die die Anleitungen für die Bildung der CRISPR-Reagenzien enthalten und mit GV-Bakterien in Pflanzenpathogene gebracht werden sollen. Laut einem Patentantrag verfügt die Firma über einen GV-Stamm von *Pseudomonas putida*, der sein rekombinantes Plasmid auf pathogene *Xanthomonas*-Arten übertragen kann und damit Tomaten vor der Schwarzfleckenkrankheit schützen soll (Padmakumar et al. 2024).

Die zweite Firma ist *Flourish*, eine im Vereinigten Königreich ansässige Ausgliederung von *Folium Science*. Sie arbeitet mit der von ihrer Muttergesellschaft patentierten *Guided-Biotics*-Technik, die auf GV-Phagen und GV-Bakterien als Lieferanten der CRISPR/Cas-Komponenten beruht (Clube et al. 2016). Laut Informationen auf den Firmen-

Webseiten⁴ will *Flourish* unter anderem ein Mittel entwickeln, das Tomaten vor dem Befall mit *Pseudomonas syringae* schützt. GV-Stämme endophytisch lebender Bakterien sollen dabei als Lieferanten von Cas und Leit-RNA dienen.

7.6 Erhöhung der Stresstoleranz

Die Wirksamkeit mikrobieller Pflanzenschutzmittel ist in der Praxis oft eingeschränkt, da abiotische Stressfaktoren wie Hitze, Feuchtigkeit, UV-Strahlung oder der Einsatz von Fungiziden und Herbiziden die Lebensfähigkeit der Mikroorganismen auf den Feldern beeinträchtigen. Mithilfe der Gentechnik sollen jetzt Biokontrollstämme entstehen, die widerstandsfähiger gegen solche Stressfaktoren sind.

Eines der Ziele ist es, den kombinierten Einsatz von biologischen und chemisch-synthetischen Pflanzenschutzmitteln zu ermöglichen (Hao et al. 2015; Wang et al. 2024c). Ein Beispiel hierfür ist der Pilz *Trichoderma harzianum*, der als Biofungizid verwendet wird. Forschende haben ihn gentechnisch so verändert, dass er eine Toleranz gegenüber DMI-Fungiziden aufweist. Dadurch kann er nun in Kombination mit dem synthetischen Mittel eingesetzt werden, was nicht nur eine synergistische Bekämpfung von Schadpilzen ermöglichen, sondern auch der Entwicklung fungizidresistenter Krankheitserregern entgegenwirken soll (Wang et al. 2024c).

Ein anderes Ziel ist, *Bacillus thuringiensis* toleranter gegenüber UV-Strahlen zu machen. Die Bakterienart findet als Bioinsektizid vor allem im Biolandbau breite Verwendung. Wegen ihrer Empfindlichkeit gegenüber UV-Strahlung hat sie im Vergleich zu synthetischen Insektiziden eine kurze Wirkungsdauer. UV-tolerante Stämme lassen sich erzeugen, indem mit CRISPR/Cas das *HmgA*-Gens ausgeschaltet und dadurch die Bildung von Melanin angekurbelt wird (Zhu et al. 2022). Da Melanin ein Pigment ist, das UV-Strahlung absorbiert, sind die Knockout-Stämme in der Umwelt länger stabil als unveränderte Stämme. Auch das Ausschalten des *leuB*-Gens soll die Toleranz gegenüber UV-Strahlen erhöhen (Quan et al. 2020). In diesem Fall führt der Knockout dazu, dass die Mutterzellyse blockiert ist – ein Prozess, bei dem die Bakterien platzen, um ihre Sporen und Insektentoxine in der Umwelt zu verbreiten. Fällt das Platzen aus, verbleiben die UV-empfindlichen Toxine geschützt in der Mutterzelle. Die Knockout-Stämme sollen zudem den Vorteil haben, dass eine Umweltbelastung durch die Ausbreitung großer Mengen lebensfähiger GV-Sporen ausbleibt (Azizoglu et al. 2023).

7.7 Entschärfung humanpathogener Biokontrollstämme

Einige Bakterienarten eignen sich zwar als Mittel für den biologischen Pflanzenschutz, werden aber aus Sicherheitsgründen nicht kommerziell eingesetzt, weil sie pathogen für Menschen oder Nutztiere sind. Die Gentechnik bietet hier die Möglichkeit, die für die Pathogenität verantwortlichen Gene auszuschalten oder zu entfernen und dadurch pathogene Stämme in apathogene Stämme umzuwandeln, die für den Pflanzenschutz in Frage kommen (Coenye et al. 2019).

⁴ <https://flourish.bio> und <https://foliumscience.com>

Ein Beispiel für die Umwandlung gibt es bei *Burkholderia ambifaria*. Das Bakterium wirkt hemmend auf phytopathogene Pilze, kommt in seiner natürlichen Form aber nicht als Pflanzenschutzmittel in Frage, weil es humanpathogen ist. Forschende konnten das Plasmid aus dem Bakterium entfernen, das die für die Humanpathogenität verantwortlichen Gene trägt (Mullins et al. 2019, Coenye et al. 2019).

Ein weiteres Beispiel ist *Bacillus thuringiensis*, ein Bakterium, das als Bioinsektizid breite Verwendung findet. Einige Stämme dieser Art bilden das Toxin Thuringiensin, das giftig für Menschen und Tiere ist. Die US-Firma *BioConsortia* hat in einem Thuringiensin bildenden Stamm ein Gen aus dem Biosyntheseweg des Giftes entfernt, wodurch ein sicherer Stamm entstanden sein soll. 2024 stellte die Firma in Brasilien bei der Nationalen Kommission für technische Biosicherheit (CTNBio) eine Anfrage zum GVO-Status des Stammes (CTNBio 2024).

7.8 GVM gegen Mykotoxine

Einige Pilze des Pflanzenmikrobioms können die Lebens- und Futtermittelsicherheit gefährden, weil sie Mykotoxine bilden, die giftig für Menschen oder Nutztiere sind. Um Infektionen mit den Toxinproduzenten und dadurch auch Kontaminationen mit den Giftstoffen entgegen zu wirken, gibt es verschiedene Strategien wie Sortenwahl, Fruchtfolge und die Behandlung mit Fungiziden (Schirdewahn et al. 2016). Ebenfalls möglich ist eine biologische Bekämpfung mit atoxigenen Stämmen der Toxin-bildenden Arten. Solche Stämme haben die Fähigkeit zur Toxinbildung verloren und können als Gegenspieler ihre giftigen Verwandten aus den Feldern verdrängen. Beispiele kommerziell erhältlicher Produkte sind *AF-X1* (Italien) und *Afla-Guard* (USA), die beide vor hohen Aflatoxingehalten schützen und aus natürlichen – aus der Umwelt isolierten – atoxigenen Stämmen von *Aspergillus flavus* bestehen.

CRISPR/Cas bietet heute die Möglichkeit, atoxigene Stämme künstlich zu erzeugen, indem die Gencluster aus den Pilzgenomen ausgeschnitten werden, die für die Biosynthese der Gifte verantwortlich sind (Woodcraft et al. 2023, Li et al. 2024a). Die erste Entfernung eines Toxin-Genclusters gelang 2018 bei *Aspergillus niger* – einem Pilz, der als Produktionsstamm in der Lebensmittelindustrie wichtig ist (Zheng et al. 2018). Seither sind atoxigene Stämme bei weiteren Arten erzeugt worden – etwa bei den pflanzenpathogenen Arten *Fusarium verticillioides* (Tang et al. 2024) und *Aspergillus flavus* (Chang 2024). Da CRISPR/Cas die Entwicklung atoxigener Stämme ermöglicht, die Transgen-frei sind, gilt die Strategie als sehr vielversprechend für die zukünftige Biokontrolle von Toxin-bildenden Pilzen (Chang 2024).

Ein Produkt, das sich in der präkommerziellen Phase befindet, ist ein atoxigener Stamm von *Epichloë coenophiala* (Ballester et al. 2023). Der endophytisch in Futtergräsern lebende Pilz bildet normalerweise Alkaloide, die für Nutztiere giftig sind. Um die Sicherheit der Futtermittel zu erhöhen, entfernten Forschende der *University of Kentucky* mit CRISPR/Cas die beiden Gencluster aus dem *Epichloë*-Genom, die für die Bildung der Alkaloide notwendig sind (Florea et al. 2021). Der patentierte atoxigene Stamm ist

frei von Transgenen und wird in den USA deshalb nicht als GVO reguliert (APHIS 2020b).

Die US-Firma *Sustainable Bioproducts* meldete 2022 die CRISPR-basierte Herstellung atoxigener *Fusarium*-Arten zur Patentierung an (Macur 2022).

7.9 Avirulente GV-Stämme pflanzenpathogener Pilze

Avirulente Stämme von pflanzenpathogenen Pilzen gelten als mögliche Mittel für einen nachhaltigen Pflanzenschutz (Singh 2016, Ghorbanpour et al. 2018). Sie sind zwar selbst nicht mehr infektiös, können aber Pflanzen immer noch besiedeln und dadurch auf zwei Wegen eine schützende Wirkung entfalten: Sie können als Antagonisten wirken, indem sie auf der Pflanze mit ihren pathogenen Verwandten um Raum und Nährstoffe konkurrieren, und sie können pflanzliche Abwehrmechanismen auslösen, die die Infektion mit virulenten Stämme verhindern (Singh 2016, Ghorbanpour et al. 2018).

Avirulente Stämme kommen zwar in der Umwelt natürlicherweise vor, da die Suche nach ihnen aber sehr aufwendig ist, gibt es heute kaum entsprechende Produkte auf dem Markt. Jetzt stehen zwei gentechnische Ansätze zur Diskussion, mit denen sich avirulente Stämme künstlich erzeugen lassen könnten. Der eine Ansatz ist, pathogenitätsbezogene Gene mit CRISPR/Cas aus den Pilzen zu entfernen und so Stämme zu kreieren, die nicht nur avirulent sondern auch frei von artfremder DNA sind (Muñoz et al. 2019, Harishchandra et al. 2021).

Der zweite Ansatz ist, Schadpilze mit Genen aus Mykoviren harmlos zu machen (Das et al. 2023a). Er beruht auf der Beobachtung, dass Pilze avirulent werden können, wenn sie von Mykoviren befallen sind. In einer Machbarkeitsstudie verlor *Stemphylium botryosum*, der Erreger der Graufleckenkrankheit bei Tomate, seine Virulenz, nachdem Forschende das ORF3-Gen aus dem Mykovirus SlAV1 in sein Erbgut transferiert hatten (Liu et al. 2022c). Auch bei den Schadpilzen *Fusarium graminearum* und *Sclerotinia sclerotiorum* könnte der Transfer von Mykoviren-Genen zu avirulenten Stämmen für den biologischen Pflanzenschutz führen (Bormann et al. 2018, Gao et al. 2020).

8. Düngemittel

Im Düngemittelbereich kommen Mikroorganismen als Biostimulanzien zum Einsatz. Sie sollen den Stoffwechsel der Pflanzen unterstützen, ihre Nährstoffeffizienz erhöhen oder auch die Wirkung abiotischer Stressfaktoren wie Hitze, Strahlung, Trocken- oder Kältestress minimieren. Wie im Pflanzenschutzmittelbereich ist auch bei Düngemitteln jüngst das Interesse an mikrobiellen Produkten stark gestiegen. Auch hier gelten sie als Biologika, die die Landwirtschaft nachhaltiger machen könnten.

Bis vor kurzem spielten GVM bei Düngemitteln noch kaum eine Rolle. Eine Reihe von Startups und Konzernen hat jedoch begonnen, Bakterien so zu verändern, dass sie künftig als Stickstoff-fixierende, Phosphor-lösende oder Stress-mindernde Biostimulan-

zien auf den Markt gebracht werden können. In den USA sind mit *Proven 40* und *Return* bereits zwei Biostimulanzien mit Stickstoff-fixierenden GVM erhältlich.

8.1 Stickstofffixierende GVM

Laut Schätzungen ernährt sich fast die Hälfte der Weltbevölkerung von Pflanzen, die mit synthetischen Stickstoffdüngern angebaut werden (Gao & Cabrera Serrenho 2023). Sowohl die energieintensive Produktion als auch der übermäßige Einsatz dieser Dünger verursacht eine Reihe von Umweltproblemen wie Eutrophierung, Bodenversauerung und Treibhausgasemissionen. Eine Möglichkeit, die Einträge von synthetischem Stickstoff zu verringern und dadurch die Probleme zu schmälern, ist die Nutzung von diazotrophen Mikroorganismen. Sie sind in der Lage, Stickstoff aus der Luft zu fixieren und ihn so Pflanzen verfügbar zu machen.

Zwei Gruppen von diazotrophen Bakterienarten kommen als Biostimulanzien in Frage: Die eine Gruppe umfasst Knöllchenbakterien der Gattungen *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* und *Mesorhizobium*, die in Symbiose mit Leguminosen leben. Ihr Einsatz begann bereits im frühen 20. Jahrhundert, als Leguminosen erstmals mit Rhizobien beimpft wurden. Die zweite Gruppe umfasst freilebende Stickstoff-Fixierer aus Gattungen wie *Azotobacter*, *Azospirillum* oder *Klebsiella*. Ihre Nutzung in Biostimulanzien ist neueren Datums und soll vor allem im konventionellen Getreideanbau dafür sorgen, dass Kulturarten wie Mais oder Weizen mit weniger synthetischen Stickstoff gedüngt werden. Wie im Folgenden dargestellt, gibt es bei beiden Gruppen Bestrebungen, Biostimulanzien mit GV-Stämmen zu entwickeln.

In der Synthetischen Biologie arbeiten Forschende zudem daran, die für die Fixierung notwendigen Gene aus diazotrophen Arten in nicht-diazotrophe Bodenmikroben zu übertragen und dadurch neue Stickstoff-fixierende Bakterienarten zu kreieren. Die Resultate der jahrzehntelangen Forschung sind hier jedoch bescheiden (Bloch et al. 2020a, Dasgupta et al. 2021, Haskett et al. 2021, Ragland et al. 2024), so dass in naher Zukunft nicht mit Kommerzialisierungen zu rechnen ist.

8.1.1 GV-Stämme von Knöllchenbakterien

F&E-Aktivitäten zur Herstellung von GV-Knöllchenbakterien gibt es bereits seit den 1980er Jahren. In den USA führten sie 1997 zur Zulassung von Dormal PLUS – einem Produkt der Firma *Urbana Labs* (heute BASF). Es enthielt einen GV-Stamm von *Rhizobium meliloti* enthielt, der für die Beimpfung von Luzerne vorgesehen war (McClung 2000, Stanley et al. 2003). Der ursprünglich von *BioTechnica* entwickelte Stamm mit dem Kürzel RMBPC-2 wurde jedoch nie kommerzialisiert.

F&E-Projekte konzentrieren sich mehrheitlich darauf, die Überlebensfähigkeit und die Stickstofffixierung der Mikroben gentechnisch zu optimieren (Goyal et al. 2021). Zudem versuchen Forschende auch, Knöllchenbakterien mit zusätzlichen Funktionen auszustatten. Bei *Sinorhizobium meliloti* sind beispielsweise GV-Stämme erzeugt worden, die die Pflanzenhormone IAA und Zeatin überproduzieren und deshalb Pflanzen nicht

nur mit Stickstoff versorgen, sondern sie auch noch tolerant gegenüber Trockenheit machen sollen (Defez et al. 2017, Yu et al. 2024).

Neue Möglichkeiten sollen sich durch die Etablierung des CRISPR/Cas-Systems ergeben. Sie soll die gentechnische Bearbeitung von Knöllchenbakterien vereinfachen und rationalisieren (Jain et al. 2023). Bei *Azorhizobium caulinodans* ist ein editierter GV-Stamm entstanden, der durch den Knockout des AZC_2928 Gens eine verbesserte Chemotaxis und Biofilmbildung aufweist (Wang et al. 2020). Bei *Bradyrhizobium diazoefficiens* wiederum ist es gelungen, zwei Nukleotide des *epsps*-Gens zu verändern und dadurch einen Transgen-freien Glyphosat-toleranten GV-Stamm herzustellen, der sich für die Beimpfung von Glyphosat-toleranter GV-Soja eignet (Quelas et al. 2021).

In Zukunft soll die gentechnische Anpassung von Knöllchenbakterien an den Klimawandel in den Fokus rücken (Zhang et al. 2024). Ein erstes Beispiel findet sich bei *Mesorhizobium mediterraneum*, das mit einer zusätzlichen Kopie des *clpB*-Gens Hitze-toleranter gemacht wurde (Paço et al. 2016).

Firmen, die gegenwärtig GV-Knöllchenbakterien entwickeln, sind nicht bekannt.

8.1.2 GV-Stämme freilebender diazotropher Bakterien

Während der Einsatz symbiotisch lebender diazotropher Bakterien auf Leguminosen beschränkt ist, haben freilebende Arten das Potenzial, die biologische Stickstofffixierung auch bei Kulturarten wie Mais, Reis oder Weizen zu etablieren.

Bisher kamen freilebende Diazotrophen im Getreidebau vor allem aus zwei Gründen kaum als Biostimulanzien zum Einsatz (Bageshwar et al. 2017, Bloch et al. 2020a): Erstens reicht ihre Stickstofffixierung nicht aus, um synthetischen Dünger komplett zu ersetzen. Zweitens brauchen die Bakterien für die Stickstofffixierung viel Energie und schalten den Prozess deshalb schnell und rigoros ab, wenn bereits exogener Stickstoff vorhanden ist

Mit Gentechnik ist es jetzt möglich geworden, GV-Stämme herzustellen, die auch dann noch Stickstoff aus der Luft fixieren, wenn Dünger ausgebracht wurde und bereits Stickstoff im Boden vorhanden ist. Solche GV-Stämme sollen den Kunstdünger im Getreidebau nicht ersetzen, aber den Bedarf an synthetischen Stickstoff verringern, der für das Erreichen der gewohnten Erträge notwendig ist.

Für die Herstellung der GV-Stämme werden in den Bakterien die regulatorischen Mechanismen, die die Aktivität der Stickstoff-fixierenden Gene steuern, so manipulieren, dass die Gene auch dann aktiv sind, wenn bereits Stickstoff im Boden vorhanden ist. Die Manipulation ist bereits bei mehreren Arten gelungen. Bei *Klebsiella oxytoca* und dem Purpurbakterium *Rhodopseudomonas palustris* sind dabei GV-Stämme mit artfremden Genen entstanden (Tang et al. 2023, Zeng et al. 2023). Bei mehreren Arten gelingt der Eingriff jedoch auch ohne die Insertion artfremder Sequenzen – so etwa bei *Azotobacter chroococcum* (Bageshwar et al. 2017), *Azotobacter vinelandii* (Mus et al. 2022), *Kosakonia sacchari* (Bloch et al. 2020b), *Klebsiella variicola* (Wen et al. 2021) sowie dem Endopyhten *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Dietz et al. 2024).

Um GVM-basierte Biostimulanzien zu entwickeln kann in den Bakterien auch die Aktivität desjenigen Enzyms verringert werden, das die Assimilation des fixierten Stickstoffs einleitet. Bei *Azospirillum brasilense* sind so GV-Stämme entstanden, die mehr Stickstoff an Pflanzen abgeben als üblich (Schnabel & Sattely 2021a/b).

Mehrere Firmen haben jüngst damit begonnen, Biostimulanzien mit GV-Stämmen freilebender diazotropher Bakterien zu entwickeln. Das Interesse gilt dabei vor allem Stämmen, die frei von artfremden Sequenzen sind. In den USA sind mit *Proven 40* und *Return* bereits zwei Produkte auf dem Markt. Beide stammen aus den Laboren von *Pivot Bio*. Die Firma hat Stämme von *Klebsiella variicola* und *Kosakonia sacchari* aus landwirtschaftlichen Böden isoliert und sie dann so genomeditiert, dass sie auch in gedüngten Böden Stickstoff fixieren können (Bloch et al. 2020b, Wen et al. 2021, Martinez-Feria et al. 2024). Entstanden sind so drei kommerzialisierte GV-Stämme: *Klebsiella variicola* 137-1036 ist in *Return* enthalten, einem Biostimulanz für Weizen, Hafer, Gerste, Sorghum und Hirse (Pivot Bio 2024a). *Kosakonia sacchari* 6-5687 und *Klebsiella variicola* 137-2253 sind die Wirkstoffe von *Proven 40*, das bei Mais zum Einsatz kommt (Pivot Bio 2024b). Die drei GV-Stämme sollen frei von artfremden Sequenzen sein und werden in den USA und Brasilien nicht als GVO reguliert. In den USA, wo *Pivot Bio* ein Programm für den Handel von Stickstoffgutschriften unterhält (AgNews 2024b), soll *Proven* bisher auf drei Prozent der Maisanbaufläche zum Einsatz kommen (Service 2024). Wie aus Patentanträgen hervorgeht, hat *Pivot Bio* weitere GV-Stämme in der Pipeline – unter anderem von *Paraburkholderia*-, *Herbaspirillum*-, *Azospirillum*- und *Paenibacillus*-Arten (Eskiyenenturk et al. 2021/2024, Reisinger et al. 2023, Temme et al 2023).

BioConsortia ist eine weitere US-Firma, die Biostimulanzien für die biologische Stickstofffixierung entwickelt. Sie hat genomeditierte *Paenibacillus*-Arten in der Pipeline (Williams et al. 2024). Zwei ihrer GV-Stämme – *Paenibacillus polymyxa* BEC207 und *Paenibacillus odorifer* BEC233 – wurden in Brasilien von den zuständigen Behörden als Nicht-GVO eingestuft (CTNBio 2023).

Bayer und *Ginkgo Bioworks* gingen 2017 eine Kollaboration ein, um eine Technologieplattform zur Stickstoff-Fixierung zu entwickeln. Wie aus einem Patentantrag hervorgeht, entstanden dabei GV-Stämme des Endophyten *Herbaspirillum seropedicae* (Tan 2024).

2020 stieg der zweitgrößte Düngerhersteller der Welt, *Mosaic Company*, in die Entwicklung stickstofffixierender Bakterien ein. Der US-Konzern arbeitet dabei mit *BioConsortia* zusammen, um Biostimulanzien für Mais und Weizen herzustellen (AgNews 2020). Aus der Zusammenarbeit sind die beiden genomeditierten *Paenibacillus*-Stämme BEC176 und BEC177 hervorgegangen, die 2022 in Brasilien als Nicht-GVO eingestuft wurden (CTNBIO 2022a/b, OECD 2024).

Auch der dänische Biotechnologiekonzern *Novonesis* arbeitet an GV-Bakterien für die Stickstofffixierung bei Getreide. Sein Ziel ist, GV-Stämme herzustellen, die 25 Prozent des für Mais benötigten Kunstdüngers ersetzen können (Novozymes 2024).

Schliesslich bleiben noch *Quorum Bio* und *Switch Bioworks* zu nennen. Die beiden 2022 in den USA gegründeten Startups entwickeln ebenfalls Stickstoff-fixierende GVM.

8.2 Phosphor-lösende GVM

Eine umweltfreundliche Alternative oder Ergänzung zu chemischen Phosphatdüngern stellen Bakterien und Pilze dar, die im Boden gebundenen Phosphor lösen und ihn so für Pflanzen verfügbar machen können. Da die Leistung natürlich vorkommender Stämme zuweilen als zu wenig verlässlich für einen kommerziellen Einsatz gilt, sehen Forschende einen Bedarf an GVM, die Phosphor besser lösen können als unveränderte Mikroben (Sharma et al. 2013, Ingle & Padole 2017, Kaur & Upadhyay 2022).

Eine mögliche Strategie, GVM als Phosphatdünger zu entwickeln, bieten der Transfer oder die Überexpression von Genen, die für Phosphor-lösende Enzyme wie Phytasen oder Phosphatasen codieren. Ein GV-Stamm von *Sinorhizobium meliloti* zum Beispiel, der ein Phytase-Gen aus *Escherichia coli* besitzt, erhöhte in Versuchen die Phosphoraufnahme von Mais (Sharma et al. 2016). In einem anderen Projekt sind 82 verschiedene, mit Synthetischer Biologie erzeugte Phytasen in *Pseudomonas simiae*, *Pseudomonas putida* und in einer *Ralstonia*-Art getestet worden. Einige der erzeugten GV-Stämme bewirkten dank dem Phytase-Gen, dass die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* auch unter Phosphor-armen Bedingungen gut wuchs (Shulse et al. 2019).

Eine weitere Strategie ist die Herstellung von GV-Stämmen, die organische Säuren produzieren. Sie beruht darauf, dass von Bakterien sezernierte Säuren den pH-Wert im Boden senken und dadurch gebundenen Phosphor lösen. In einem Versuch mit Reis steigerte ein Keto-D-Gluconsäure bildender GV-Stamm von *Herbaspirillum seropedicae* den Phosphor-Gehalt in der Pflanze. Damit das Bakterium die Säure bilden konnte, mussten ein Operon aus *Pseudomonas putida* und ein Gencluster aus *Acinetobacter calcoaceticus* transferiert werden (Wagh et al. 2016).

Auch wenn bereits anfangs der 2000er Jahre erste Versuche stattfanden, GVM zu einem Ersatz für chemischen Phosphatdünger zu machen (Rodriguez et al. 2000, Reyes et al. 2002), sind die F&E-Bemühungen insgesamt eher bescheiden geblieben (Khan et al. 2022). Mindestens ein GVM ist jedoch in der präkommerziellen Phase: Ein GV-Stamm von *Bacillus thuringiensis*, der an der Oberfläche seiner Sporen eine Phosphor-lösende Phosphatase bildet. Die Firma *Elemental Enzymes* reichte 2024 in Brasilien bei der Nationalen Kommission für technische Biosicherheit CTNBio eine Anfrage nach dem GVO-Status dieses Stammes ein (CTNBio 2024). Neben *Elemental Enzymes* entwickelt auch das US-Startup *Quorum Bio* Phosphat-lösende GVM (Blois 2023).

8.3 GVM als Destruenten

Mikroorganismen, die als Destruenten organisches Material zersetzen und dadurch Nährstoffe für Pflanzen freisetzen, spielen für die Fruchtbarkeit von Agrarböden eine wichtige Rolle. Destruenten sind deshalb Kandidaten für Biostimulanzien.

Während sich kaum Projekte öffentlicher Forschungsinstitutionen finden lassen, die GVM als Zersetzer entwickeln, arbeiten Firmen an GV-Bakterien, die dank Genen für

Glucanasen, Cellulasen oder Galacturonasen Pflanzenreste besser abbauen und dadurch die organische Substanz im Boden schneller verfügbar machen können.

Mit *Bacillus thuringiensis* EX297512 ist bereits ein GVM kommerziell erhältlich. Der von Bayer entwickelte und heute von BASF vermarktete EX297512 exprimiert eine Glucanase, die Pflanzenreste in Glukose umwandelt. Andere Bodenmikroben ernähren sich von der Glukose und steigern ihre Aktivität, was zu einer effektiveren Besiedlung der organischen Materie und eine bessere Verfügbarkeit von Nährstoffen für Pflanzen führt. In Kanada ist EX297512 als TWO.O registriert (CFIA 2024). In den USA ist der GV-Stamm in *Poncho Votivo 2.0* enthalten – einem Saatbeizmittel, das zusätzlich einen unveränderten Stamm von *Bacillus firmus* sowie das synthetische Insektizid Clothianidin enthält (Ahmad et al. 2024).

In Brasilien hat BASF den GVO-Status eines GV-Stammes von *Bacillus thuringiensis* abklären lassen, der ebenfalls eine Glucanase bildet und als Bodenverbesserer verwendet werden soll. Ob es sich dabei um EX297512 oder einen weiteren GV-Stamm handelt, ist nicht bekannt.

Elemental Enzymes (ehemals *Spogen*) und Bayer beschreiben in einem gemeinsamen Patentantrag GV-Stämme von *Bacillus thuringiensis*, die an der Oberfläche ihrer Exosporen Polygalacturonasen bilden (Augustin et al. 2022). Die Firma *Hangzhou Fenghai Biotechnology* wiederum hat einen Stamm von *Bacillus amyloliquefaciens* patentieren lassen, der Lyasen und Cellulasen exprimiert. Der Stamm soll für die Fermentierung von Kelp eingesetzt werden und dann gemeinsam mit dem Ferment als Dünger auf die Felder kommen (Li & Gao 2022).

8.4 GVM gegen abiotischen Stress

Pflanzen sind in Agrarökosystemen oft ungünstigen Umweltbedingungen ausgesetzt, die als abiotische Stressoren bekannt sind. Zu diesen Stressoren gehören etwa Hitze, Trockenheit, Überschwemmungen, Schwermetalle, hohe Salzgehalte und Staunässe. Sie bedrohen die weltweite Pflanzenproduktion und Ernährungssicherheit bereits heute und werden aufgrund des globalen Klimawandels in Zukunft noch häufiger auftreten.

Einige pflanzenassoziierte Bakterienarten können die Stressresistenz von Pflanzen erhöhen und sind deshalb Kandidaten für mikrobielle Biostimulanzien, mit denen sich Ernteverluste unter ungünstigen Umweltbedingungen verringern lassen. Zu den Bakterien, die Pflanzen tolerant gegen widrige Umweltbedingungen machen können, gehören endophytische Arten, die ACC-Deaminasen bilden (Saghafi et al. 2020). Diese Enzyme fördern unter Stressbedingungen das Pflanzenwachstum, indem sie in Pflanzen die Bildung des Stresshormons Ethylen verringern. Die Gentechnik bietet hier die Möglichkeit, GV-Stämme zu kreieren, die ACC-Deaminasen nicht im Zellinnern sondern an ihrer Oberfläche produzieren und dadurch die Wirkung des Enzyms erhöhen. Liu et al. (2017) haben entsprechende GV-Stämme von endophytisch lebenden *Kosakonia-* und *Enterobacter*-Arten hergestellt und in Versuchen mit Reis gezeigt, dass die Bakte-

rien mit ACC-Deaminase an der Zelloberfläche das Wachstum der Pflanzen unter Salzstress besser fördern als ihre unveränderten Artgenossen.

Auch Bakterien, die die Pflanzenhormone IAA oder Zeatin bilden, kommen als Biostimulanzien in Frage, da die Hormone das Wachstum und die Widerstandsfähigkeit von Pflanzen unter Stressbedingungen verbessern (Etesami & Glick 2024). Hier lassen sich mit Gentechnik GV-Stämme herstellen, die die Hormone überproduzieren. Ein Beispiel dazu findet sich bei *Methyloviummicrobium alcaliphilum*, einem Bakterium, das das Treibhausgas Methan als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen kann. Wird es so gentechnisch verändert, dass es IAA überproduziert, soll es die Keimung von Weizen unter Salzstress verbessern können (Pham et al. 2022). Beim Knöllchenbakterium *Sinorhizobium meliloti* wiederum wurde gezeigt, dass sowohl IAA- als auch Zeatin-überproduzierende GV-Stämme die Trockentoleranz von Luzerne erhöhen könnten (Defez et al. 2017, Yu et al. 2024).

Mit *Elemental Enzymes* und *Agrospheres* gibt es mindestens zwei Firmen, die mit GVM die Stresstoleranz von Pflanzen erhöhen wollen. *Elemental Enzymes* beschreibt in einem Patentantrag GV-Bacillus-Stämme, die ACC-Deaminasen in ihren Exosporen bilden (Thompson et al. 2020). *Agrospheres* wiederum will GV-Minizellen patentieren lassen, die ACC-Deaminasen auf ihrer Oberfläche haben (Shakeel et al. 2019).

8.5 CAPME-Technik

Ein neues Konzept für GVM-basierte Biostimulanzien ist die CAPME genannte Technik. CAPME steht für «crop agronomic performance manipulation epigenetically» und beruht darauf, mittels GV-Bakterien Designer-TALE in Pflanzen zu bringen, die dort gezielt die Aktivität einzelner Gene erhöhen und dadurch Wachstum und Ertrag der Pflanzen beeinflussen (Tang et al. 2022).

TALE sind Proteine, die DNA binden und als Transkriptionsaktivatoren wirken. Sie stammen aus pflanzenpathogenen *Xanthomonas*-Bakterien und haben dort die Aufgabe, in infizierten Pflanzen die Expression bestimmter Gene zu verändern und dadurch die Abwehrreaktion der Pflanze zu unterdrücken. Die Idee hinter der CAPME-Technik ist, TALE so umzuprogrammieren, dass sie im Erbgut von Pflanzen neu solche Gene erkennen und aktivieren können, die an der Steuerung des Wachstums beteiligt sind. Dass die Technik funktionieren könnte, zeigt eine Machbarkeitsstudie mit einem apathogenen GV-Stamm von *Xanthomonas oryzae*, der ein Designer-TALE für den Promotor des Regulatorgens NGO1 von Reis bildet. Wurden Reispflanzen im Versuch mit diesem GV-Stamm besprüht, erhöhten sie die Expression des NGO1-Gens und ihr Korntrag stieg um mehr als zehn Prozent (Tang et al. 2022).

Die CAPME-Technik steckt noch in den Anfängen und ist bisher – soweit bekannt – nicht Gegenstand von F&E-Projekten privater Unternehmen.

8.6 Dünger aus Biomasse inaktivierter GVM

Aus industriellen Fermentationsverfahren fallen stetig große Mengen an verbrauchter mikrobieller Biomasse («spent microbial biomass», SMP) an. Diese SMP wird zwar meist

auf Mülldeponien entsorgt oder verbrannt, kann aber als nährstoffreiches Nebenprodukt auch als Pflanzendünger wiederverwendet werden (Sullivan et al. 2017). Auch SMP aus GVM ist ein mögliches Düngemittel (Lensch et al. 2024). Novo Nordisk (heute Novonosis) zum Beispiel verkaufte in Dänemark und Brasilien unter dem Namen NovoGro über mehrere Jahre ein Düngemittel, das aus SMP von inaktivierten GVM bestand (Andersen et al. 2001, Sullivan et al. 2017). Dupont testete die Düngertauglichkeit von inaktivierter Biomasse eines GVM, mit dem der Konzern 1,3-propanediol herstellt (Halter & Zahn 2017). Wie weit verbreitet die Wiederverwendung von SMP aus GVM ist, ist nicht bekannt.

9. Kohlenstoffsequestrierung

Da Landwirtschaftlich genutzte Böden sowohl Senken als auch Quellen für atmosphärisches Kohlenstoffdioxid (CO₂) sein können, spielen sie eine wichtige Rolle beim Klimawandel. Die Art ihrer Bewirtschaftung entscheidet dabei, ob sie mehr CO₂ aus der Atmosphäre aufnehmen als abgeben. Landwirtschaftliche Praktiken können daher gezielt zum Klimaschutz beitragen, indem sie Böden zu langfristigen Kohlenstoffspeichern machen. Zu diesen Praktiken gehören der Anbau von Hülsenfrüchten und tiefwurzelnden Pflanzensorten, eine vielfältige Fruchtfolge, eine gute Grünlandbewirtschaftung sowie das Belassen von Ernteresten auf dem Feld und das Ausbringen von Kompost oder Pflanzenkohle (Schwarzer 2019).

Da das Mikrobiom von Ackerböden beeinflusst, wie viel CO₂ langfristig im Boden gespeichert wird, kommen auch Inokula mit Mikroben als «Carbon Dioxide Removal»-Maßnahme in Frage (Mason et al. 2023). Für die Entwicklung solcher Inokula stehen wiederum auch gentechnische Ansätze zur Diskussion (Dundas & Dinneny 2022, Ragland et al. 2024, Wang & Kuzyakov 2024).

Einer dieser Ansätze ist, wurzellosoziierte Bakterien gentechnisch so zu verändern, dass sie verstärkt kohlenstoffreiche Speicherverbindungen wie Zellulose oder Trehalose bilden und so die Kohlenstoffbindung im Boden erhöhen (Dundas & Dinneny 2022, Ragland et al. 2024). Um etwa den Zellulosegehalt im Boden zu steigern, haben Forschende *Pseudomonas*-Arten mit den Zellulose-synthetisierenden Genen von *Komagataeibacter xylinus* ausgestattet (Mulhall 2021).

Ein anderer Ansatz ist die Herstellung von GV-Stämmen, die das Pflanzenhormon Indol-3-essigsäure (IAA) bilden (Ragland et al. 2024). IAA reguliert in Wurzeln die Aktivität derjenigen Pflanzengene, die die Teilung, Differenzierung und Streckung der Zellen vorantreiben. Indem Bakterien IAA produzieren, fördern sie das Wurzelwachstum, wodurch sich der CO₂-Eintrag der Pflanzen in den Boden erhöht. Ein IAA-produzierender GV-Stamm von *Cupriavidus pinatubonensis* führte bei der Modelnpflanze *Arabidopsis thaliana* dazu, dass sie mehr und längere Wurzeln hatte (Zúñiga et al. 2018).

Auch GV-Bakterien, die die Verwitterung von Gesteinsmehl beschleunigen, kommen für die Kohlenstoffsequestrierung in Frage (Ribeiro et al. 2020). Hier beruht der Ansatz

darauf, dass Mehl aus Silikatgesteinen in Ackerböden mit CO₂ und Wasser zu Hydrogenkarbonat reagiert und daraus wiederum Carbonatgesteine wie Kalk und Dolomit entstehen, in denen das CO₂ aus der Luft dann gebunden ist. Da Mikroorganismen an dieser «Versteinerung» von CO₂ beteiligt sind, besteht die Möglichkeit, GV-Stämme zur Beschleunigung des Verwitterungsprozesses zu entwickeln.

Die Nutzung von GVM zur Kohlenstoffsequestrierung im Boden ist in jüngster Zeit zu einem neuen Geschäftsmodell geworden (Maston 2024). Der Grund sind das Carbon Farming und der Emissionsrechtehandel. Sie sorgen für eine potenzielle Nachfrage, da sie Landwirtschaftsbetrieben die Möglichkeit bieten, mit CO₂-Zertifikaten zu handeln und sich das Ausbringen von GVM als Leistung zur Kohlenstoffspeicherung finanzieren zu lassen.

In den USA entwickelt derzeit eine Reihe von Synbio-Firmen GV-Stämme für den neuen Markt. *CroBio* zum Beispiel hat GV-Stämme von *Pseudomonas*-Arten in der Pipeline, die dank einer gesteigerten Produktion von Zellulose die CO₂-Bindung im Boden erhöhen sollen (Mulhall 2021). Die Firma *Andes*, die in den USA bereits ein Kohlenstoffprogramm mit natürlichen Mikroben anbietet, stellte einen GV-Stamm von *Bacillus subtilis* her, der das Gen für eine Carbonanhydrase überexprimiert und damit mehr von dem Enzym bildet, das aus CO₂ Hydrogenkarbonat macht (Fuenzalida et al. 2022). Das Startup *Syntopa* wiederum will Mikroben entwickeln, die die Verwitterung von Gesteinsmehl beschleunigen (Maston 2024). Und *Ginkgo Bioworks* beabsichtigt, aus seinen proprietären Mikroben gentechnisch optimierte Stämme für die Kohlenstoffbindung zu machen (Ginkgo Bioworks 2023). Schließlich bleibt noch *Quorum Bio* zu nennen. Das 2022 gegründete US-Startup arbeitet laut seiner Webseite ebenfalls an GVM für die Kohlenstoffsequestrierung.

10. GVM-vermittelte Traits für Pflanzen

«Traits» ist ein Begriff aus der molekularen Pflanzenzüchtung und bezeichnet Eigenschaften von Pflanzen, die mit gentechnischen Methoden erzeugt werden. Bisher werden Traits ausschließlich züchterisch realisiert. Unzählige GV-Sorten bei Pflanzenarten wie Mais, Raps, Soja, Zuckerrohr, Aubergine oder Baumwolle, die Gene für die Bildung von Peptiden, Proteinen oder dsRNA bilden und in mehreren Ländern im Anbau sind, sind das Resultat der Umsetzung.

Jetzt arbeiten Forschende zudem an neuartigen GVM-basierten Methoden, um Traits zu generieren. Sie wollen damit nicht nur die langwierige und teure Herstellung von GV-Pflanzen überflüssig machen, sondern auch Produktionsmittel zur Verfügung stellen, mit denen Traits «on demand» – also während der Anbausaison je nach Bedarf – erzeugt werden können. Das Konzept dazu ist, GVM als Vektoren zu kreieren, die auf dem Feld die Gene für die Bildung von Peptiden, Proteinen oder dsRNA vorübergehend in Pflanzen einführen, ohne deren Erbgut zu verändern.

10.1 Plasmid-vermittelte Traits

Eine Möglichkeit, Traits «on demand» zu erzeugen, basiert auf Fortschritten in der Nanotechnologie. Sie machen es möglich, biologisch aktive Plasmid-DNA mit Hilfe von Nanopartikeln ins Innere von Pflanzenzellen einzuschleusen und dort zur Expression zu bringen (Demirer et al. 2019, Thagun et al. 2022, Kandhol et al. 2023). Erste Machbarkeitsstudien fanden bei Tomate und der Modelnpflanze *Nicotiana benthamiana* statt. Beim Versuch mit Tomaten wurden die Pflanzen mit in Nanopartikeln verpackter Plasmid-DNA behandelt, die die genetische Anleitung für das CryIAb-Toxin enthält. Als Resultat konnten die Pflanzen das Toxin bilden und sich damit gegen die Miniermotte wehren (Hajiahmadi et al. 2019). Bei *Nicotiana benthamiana* führte mit Nanoträgern verabreichte Plasmid-DNA dazu, dass die Pflanze zwei Proteine bildete, die die Resistenz gegen RNA-Viren erhöhen (Song et al. 2024).

10.2 Viren-vermittelte Traits

Eine zweite Möglichkeit für die Generierung von Traits bieten Pflanzenviren. Sie können gentechnisch in Vektoren umgewandelt werden, die die Gene für die Programmierung von Pflanzeigenschaften liefern (Gleba et al. 2013, Pasin et al. 2019/2024, Massel et al. 2021). Welche Traits sich damit erzeugen lassen, zeigen etwa Versuche, die die Firma *Nomad Science* mit selbstbegrenzten RNA-Viren bei Tomaten durchführte. Je nach Gen, das die Firma mit den viralen Vektoren in Tomaten einschleuste, entstanden Pflanzen, die früher blühten, kompakter wuchsen oder eine erhöhte Trockentoleranz hatten (Torti et al. 2021, Massel et al. 2021).

Ein Vektor, der auf dem *Citrus tristae Virus* basiert, steht in den USA vor der Markteinführung. Die Firma *Silvec Biologics* reichte anfangs 2024 bei der Umweltschutzbehörde EPA den Antrag für seine Zulassung ein (AgNews 2024a). Der von *Southern Gardens Citrus* entwickelte und in Freisetzungsversuchen getestete Vektor codiert für ein Defensin-Gen aus Spinat und soll Orangenbäume vor der *Citrus Greening*-Krankheit schützen (APHIS 2020a, Eckerstorfer et al. 2024). Orangenbäume, die mit dem Vektor behandelt werden, sind in ihrem Erbgut frei von artfremder DNA, können sich aber dank der Bildung der Defensine gegen das *Citrus Greening*-Bakterium wehren. Im Vergleich zu GV-Orangenbäumen, die Spinat-Defensine bilden, bietet die Vektor-Technik den Vorteil, dass sie in Obstanlagen direkt an bestehenden Bäumen angewendet werden kann und keine Neuanpflanzungen notwendig sind.

Die mögliche Lancierung von GV-Viren vermittelten Traits macht es notwendig, die bestehenden Ansätze für die Risikobewertung zu aktualisieren und Konzepte für die Umweltüberwachung nach dem Inverkehrbringen zu erarbeiten (Eckerstorfer et al. 2024, Dolezel et al. 2024a/b).

10.3 HEGAAs

Während bei den oben beschriebenen Strategien Sprays das Mittel sein werden, um GV-Viren oder nanoverpackte Plasmide auf den Feldern zu verbreiten, schlug ein Programm der *U.S. Defense Advanced Research Projects Agency* (DARPA) 2016 einen

ganz anderen Weg vor, um GV-Viren in Pflanzen zu bringen: Im Rahmen des Projekts *Insect Allies* sollten Insekten als «horizontal environmental genetic alteration agents» (HEGAA) entwickelt werden, um GV-Viren auf Pflanzen zu übertragen (Pfeifer et al. 2021). Eine weitere Besonderheit des Projekts war, dass GV-Viren auch als Vektoren für CRISPR/Cas-Reagenzien entwickelt werden sollten, um so die Genomeditierung von Pflanzen direkt im Feld zu ermöglichen. Konkrete Anwendungen sind aus *Insect Allies* bisher nicht hervorgegangen.

Die Entwicklung von HEGAA steht wegen ihres Dual-Use-Potenzials in der Kritik und stellt wegen ihrer Komplexität und Neuartigkeit eine Herausforderung für die Umwelt- risikobewertung dar (Reeves et al. 2018, Simon et al. 2018, Giese 2021, Pfeifer et al. 2022, Greiter et al. 2022).

10.4 mRNA-vermittelte Traits

Eine weitere Möglichkeit, Traits «on demand» zu erzeugen, verfolgt die Firma *Pebble Labs*. Sie beschreibt in einem Patentantrag GV-Bakterien, die für Pflanzen lesbare mRNA bilden. Solche Bakterien sollen mRNA in Pflanzen liefern, wo die genetische Information in Proteine translatiert und so eine neue Eigenschaft vermittelt wird (Sayre et al. 2021).

11. Biozide

Biozide umfassen eine Vielzahl von Wirkstoffen, die dazu dienen, schädliche oder unerwünschte Organismen zu kontrollieren, abzutöten oder abzuschrecken. Die Palette möglicher Anwendungen ist breit. Beispiele gängiger Produkte sind Ratten- und Mäusegifte, Desinfektionsmittel, Ameisenköderdosen, Repellentien wie Mottensäcken und Mückenschutzsprays, Holzschutzmittel und Antifouling-Beschichtungen für Schiffe, die den Bewuchs durch Algen und Muscheln verhindern.

Die meisten Biozide basieren auf chemischen Wirkstoffen. Mikroorganismen können jedoch ebenfalls eine biozide Wirkung haben, was die Entwicklung GVM-basierter Produkte ermöglicht. Derzeit sind noch keine Biozide mit GVM-Wirkstoffen auf dem Markt erhältlich, jedoch wird in mehreren Forschungsprojekten an ihrer Realisierung gearbeitet.

11.1 Mittel gegen Stechmücken

Ein Bereich, in dem bereits seit längerem GVM-basierte Biozide in der Entwicklung sind, ist die Bekämpfung von Stechmücken, die Krankheiten wie Denguefieber oder Malaria auf den Menschen übertragen können und eine erhebliche Belastung für die globale Gesundheit sind (Wang et al. 2025). Der Einsatz von GVM bietet hier mehrere Bekämpfungsstrategien. Eine davon ist die Paratransgenese und basiert auf der gentechnischen Veränderung von Symbionten von Stechmücken (Wang et al. 2025; siehe Abschnitt 2.1.2). Sie wurde zum Beispiel zur Bekämpfung von Malaria erregenden

Plasmodien-Arten getestet. Forschende isolierten dazu die Bakterien *Serratia AS1* und *Asaia bogorensis* aus Anopheles-Mücken und veränderten sie so, dass sie einen Wirkstoff gegen Plasmodien bilden (Wang et al. 2017, Shane et al. 2018).

Eine weitere Strategie zur Kontrolle von Stechmücken ist der Einsatz von GV-Stämmen insektenpathogener Pilze (Perumal et al. 2024). Im Fokus stehen Pilzarten der Gattungen *Beauveria* und *Metarhizium*, deren natürliche Fähigkeit, Mücken zu infizieren, durch Gentechnik verbessert werden soll. Ziel ist es, die Pilze so zu modifizieren, dass sie *Aedes*-, *Anopheles*- und *Culex*-Mücken schneller und effizienter infizieren und abtöten können (Perumal et al. 2024). Da Pilze zudem in der Umwelt länger überleben können, bieten GV-Stämme das Potenzial für eine langfristige Bekämpfung von Stechmückenpopulationen (Wang et al. 2023). Laborversuche mit Bt-Toxin oder Skorpion-Gift produzierenden *Beauveria*-Stämmen sowie ein Versuch unter feldnahen Bedingungen mit einem Insektengift bildenden *Metarhizium*-Stamm deuten darauf hin, dass die Strategie funktionieren könnte (Deng et al. 2017; Lovett et al. 2019, Deng et al. 2019/2024).

Eine dritte GVM-basierte Strategie zur Mückenbekämpfung beruht auf RNAi (siehe Abschnitt 2.1.3) und dem Einsatz von GVM, die dsRNA-Moleküle gegen lebenswichtige Mückengene bilden (Xue et al. 2023). Da Moskitolarven sich von schwebenden Partikeln wie Bakterien, Pilzen und Mikroalgen ernähren, die sie aus dem Wasser filtern, gelten GVM als ein praktisches Mittel, um dsRNA über die Nahrung an die Mücken zu liefern. Wie Versuche zeigen, kann die Strategie sowohl mit lebenden als auch mit inaktivierten Bakterien, Hefen und Mikroalgen funktionieren (Hapairai et al. 2017/2020, Lopez et al. 2019, Taracena et al. 2019, Fei et al. 2020/2021, Ding et al. 2021/2023). Am weitesten fortgeschritten ist die Entwicklung von Präparaten mit inaktivierten GV-Hefen: Erste Freisetzungsversuche in Trinidad und Thailand zeigten, dass in Fällen ausgebrachte Hefe-RNA-Präparaten die Populationen von *Aedes*- und *Culex*-Mücken verringern können (James et al. 2022, Mysore et al. 2023, Stewart et al. 2023).

Seit 2024 wird noch eine vierte GVM-basierte Strategie erforscht, um die Übertragung von Krankheitserregern durch Stechmücken zu verringern. Sie zielt nicht darauf ab, die Population der Stechmücken zu dezimieren, sondern will Mücken davon abhalten, Menschen zu stechen. Die Idee ist, das Hautmikrobiom mit GV-Bakterien anzureichern, die Menschen für Mücken unattraktiv machen. Dafür werden zwei Ansätze vorgeschlagen: Zum einen könnten GV-Bakterien Geruchsstoffe bilden, die Mücken fernhalten. Zum anderen könnten GV-Bakterien dafür sorgen, dass die menschliche Haut weniger Duftstoffe absondert, die Mücken anziehen (Coutinho-Abreu et al. 2024). Für den zweiten Ansatz gibt es eine erste Machbarkeitsstudie: Zwei Hautbakterien des Menschen, *Staphylococcus epidermidis* und *Corynebacterium amycolatum*, wurden gentechnisch so verändert, dass sie weniger Milchsäure produzieren – einen Stoff, der Moskitos anlockt. In Tierversuchen zeigte sich, dass Mäuse, die diese GV-Bakterien auf ihrer Haut trugen, bis zu 11 Tage lang weniger attraktiv für Mücken waren als üblich (Liu et al. 2024).

11.2 Mittel für Artenschutz

Auch im Bereich Artenschutz arbeiten Forschende an GVM-basierten Bioziden. Ein Beispiel betrifft den Panama-Goldfrosch *Atelopus zeteki*. Er kommt vermutlich in Freierbahn nicht mehr vor, weil er besonders von *Batrachochytrium dendrobatidis* betroffen ist, einem Pilz, der weltweit Amphibienbestände dezimiert. Um ex-situ Populationen des Goldfrosches vor dem Pilz zu schützen, haben Forschende ein Bakterium aus der Haut des Tieres isoliert und so verändert, dass es Violacein bildet – eine pilzhemmende Substanz (Becker et al. 2021). Da die GV-Bakterien jedoch auf der Haut des Frosches nicht lange überlebten, blieb der erwünschte Schutz vor dem Pilz aus. Um eine stabilere Schutzwirkung zu erzielen ziehen die Forschenden nun in Betracht, mehrere verschiedene Bakterienarten aus dem Hautmikrobiom des Frosches gentechnisch zu verändern (Becker et al. 2021).

11.3 Mittel gegen invasive Arten

Gegen eine Reihe von invasiven Tierarten werden derzeit Mittel erprobt, die auf dsRNA-bildenden GVM basieren. In den USA zum Beispiel gibt es ein Projekt, das GV-Mikroalgen gegen den Graskarpfen entwickeln will (MAISRC 2024a). Gleich mehrere US-Forschungsgruppen arbeiten zudem an Präparaten aus GV-Bakterien und GV-Mikroalgen, um mit RNAi invasive Muscheln zu bekämpfen (USGS 2019, Gohl 2023, MAISRC 2024b). Im Visier der Forschenden sind die Wander- und Quaggamuscheln – zwei Arten, die sich seit einigen Jahren auch in Schweizer Seen vermehren, dort einheimische Arten vertreiben und hohe Sanierungskosten verursachen, weil sie die Entnahmeleitungen für die Trinkwassergewinnung verstopfen.

Derzeit läuft in den USA zudem ein Projekt, das die Haltung von Stakeholdern gegenüber den Karpfen- und Muschel-Vorhaben ermittelt und unter anderem in Erfahrung bringen will, welche Risiken nach Meinung der Interessenvertreter gründlich untersucht werden müssten, bevor dsRNA-bildende GVM in Gewässer freigesetzt werden (USGS 2024).

Auch in anderen Ländern sind RNAi-Mittel gegen gebietsfremde Arten in der Entwicklung: In China testen Forschende dsRNA-bildende Bakterien als Biozid gegen die Rote Feuerameise, eine der am meisten gefürchteten invasiven Arten der Welt, die 2023 erstmals auch in Europa auftauchte. In der Schweiz hat das iGEM2024-Team der Universität Lausanne GV-Laktokokken mit dsRNA gegen die Asiatische Hornisse kreiert, die hierzulande heimische Bienen, Wespen, Fliegen, Schmetterlinge und Spinnen jagt (iGEM 2024).

11.4 Korrosionsschutzmittel

GVM werden auch als Biozide erforscht, die Metalle vor Korrosion schützen sollen (iGEM 2023, Li et al. 2024b). Das Konzept ist, Metalloberflächen mit GVM zu beschichten, die die Zerfallsprozesse und damit den Materialverlust verhindern können. In China haben Forschende einen GV-Stamm von *Escherichia coli* kreiert, der eine starke Metallbindungsfähigkeit besitzt und auf Metallen einen schützenden Biofilm bildet (Li et al.

2024b). In Zukunft könnten solche GVM beispielsweise zur korrosionshemmenden Beschichtung von Schiffsrümpfen eingesetzt werden (Chemla et al. 2024).

11.5 Immunokontrazeption – Mittel zur Kontrolle von Wildtierbeständen

Virus-vermittelte Immunokontrazeption ist der Name eines Konzepts für Biozide, die auf GV-Viren beruhen und mit denen sich Tierbestände in freier Wildbahn begrenzen lassen sollen (Williams 1997, Hardy 2007, Jacoblinnert et al. 2022). Ihre Funktionsweise ist dabei wie folgt: Viren werden als Vektoren so gentechnisch verändert, dass sie Gene für Proteine enthalten, die die Wildtiere für ihre Fertilität benötigen. In die Umwelt freigesetzt lösen die Viren in infizierten Tieren eine Autoimmunreaktion auf das Fertilitätsantigen aus, was zur Unfruchtbarkeit führt. Da sich infizierte Tiere nicht mehr vermehren können, nimmt die Populationsgröße langfristig ab.

Für die Umsetzung des Konzepts kommen zwei unterschiedliche Vektor-Typen in Frage: Vektoren mit GV-Viren, die sich selber von Tier zu Tier ausbreiten können, und Vektoren mit GV-Viren, die sich nicht selber ausbreiten können. Beim letzteren Typ erfolgt die Infektion der Tiere mit Ködern, die den Virus-vektor enthalten.

Aufgrund der Sicherheitsbedenken, die mit sich selbst ausbreitenden GV-Viren einhergehen, dürfte es in vielen Ländern schwierig bleiben, Bewilligungen und öffentliche Akzeptanz für diesen Vektor-Typ zu finden.

Projekte zur Umsetzung des Konzepts gibt es bisher erst wenige. In Australien stellten Forschende anfangs der 2000er Jahre ein sich selbst ausbreitendes Cytomegalovirus her, das Mäuse sterilisiert. Das Ziel war, ein Biozid zu entwickeln, das die Population des invasiven Säugers im Zaun hält (Farroway et al. 2005, Hardy 2007). In Neuseeland wurde ein rekombinantes Vaccinia-Virus als Verhütungsmittel für Opossums untersucht (Duckworth et al. 2007, Cross et al. 2011). Beide Vorhaben wurden aus technischen Gründen gestoppt. Die Virus-vermittelte Immunokontrazeption wird jedoch weiterhin als attraktiver Ansatz für die Populationskontrolle eingestuft (Jacoblinnert et al. 2022) und 2024 sind GV-Viren für die Immunokontrazeption von Wildkatzen vorgestellt worden (Cottingham et al. 2024).

11.6 Desinfektionsmittel

Bakteriophagen gelten als Kandidaten für umweltschonende Desinfektionsmittel. Da ihr Wirtsspektrum meist begrenzt ist, sind sie vor allem für die gezielte Bekämpfung spezifischer Bakterienarten geeignet. Um ihre Wirksamkeit zu steigern, werden auch gentechnische Methoden eingesetzt (Liu et al. 2022b; König & Sauter, 2023).

Aktuell sind keine Desinfektionsmittel mit GV-Phagen auf dem Markt erhältlich. Eine Firma, die solche Produkte entwickelt, ist *Cytophage*. In einem Patentantrag beschreibt sie GV-Phagen, mit denen sich gezielt Methicillin-resistente Stämme von *Staphylococcus aureus* bekämpfen lassen sollen (Theriault 2019). Diese Stämme verursachen als Krankenhauskeime gefährliche Infektionen. Die GV-Phagen könnten in Spitälern als Desinfektionsmittel dienen, um die Oberflächen von Betten, Vorhängen, Tischen, Stühlen und medizinischen Instrumenten von den resistenten Keimen zu befreien.

12. Biosensoren

Biosensoren mit GVM gelten als vielversprechendes Werkzeug, um schnell, präzise und kosteneffizient Substanzen und Keime nachweisen zu können. Ihre Entwicklung begann bereits vor über 30 Jahren mit der Herstellung eines GV-Stammes von *Pseudomonas fluorescens*, der bei Kontakt mit dem Giftstoff Naphthalin leuchtet (King et al. 1990). Der Stamm enthielt dazu ein Biolumineszenz-Gen aus dem Leuchtbakterium *Vibrio fischeri* und einen daran gekoppelten Genschalter, der die Biolumineszenz aktivierte, wenn Naphthalin in der Umgebung war. Dieses Konzept – ein Reporter-Gen mit einem induzierbaren Genschalter in einem GVM zu verknüpfen – ist seither mit anderen Mikroben und mit anderen Stoffen mannigfach wiederholt und mit dem Aufkommen der Synthetischen Biologie dann auch verfeinert worden (Huang et al. 2024). Heute enthalten Biosensoren neben dem Reporter-Gen und dem induzierbaren Genschalter oft zusätzlich interne Signalverarbeitungsschaltungen.

Ursprünglich für die Umweltüberwachung konzipiert haben Biosensoren das Potenzial auch in anderen Bereichen wie Diagnostik, Lebensmittelsicherheit und industrieller Prozesskontrolle neue Nachweismöglichkeiten zu bieten. Trotz intensiver Forschung – eine Google-Scholar-Suche mit den Stichworten «genetically modified» und «whole cell bioreporter» liefert beispielsweise über 900 Ergebnisse – sind bislang nur wenige Produkte am Markt erhältlich (Tabelle 7).

Die Gründe für die begrenzten kommerziellen Erfolge sind divers und reichen von technischen Gründen über Biosicherheitsbedenken in Bezug auf die Verwendung von GVM bis hin zu regulatorischen Hürden und dem Fehlen von Kommerzialisierungspartnern (Belkin & Wang 2022, Huang et al. 2024).

Hinsichtlich Einsatzort und Eindämmungsstrategie lassen sich drei Kategorien von Biosensoren unterscheiden:

- (I) Biosensoren für den Einsatz in geschlossenen Systemen, wie etwa im Labor;
- (II) Biosensoren für den Einsatz in der Umwelt, bei denen die GVM in einem Gerät eingeschlossen sind;
- (III) Biosensoren für den Einsatz in der Umwelt, bei denen die GVM direkt in die Umwelt freigesetzt werden.

Biosensoren der Kategorie (III) werden derzeit kaum entwickelt. Ausnahmen finden sich in der humanmedizinischen Forschung, wo GVM als «lebende Diagnostika» entwickelt werden (Kapitel 13). Biosensoren der Kategorie (III) werfen im Vergleich zu den beiden anderen Kategorien die meisten Sicherheitsbedenken auf und würden in der Schweiz unter die Freisetzungsverordnung fallen.

Alle derzeit kommerziell erhältlichen Biosensoren mit GVM fallen in die Kategorie (I) (Tabelle 7). Sie sind in der Schweiz ohne Bewilligung verwendbar, solange ihr Einsatz in einem gemäß ESV gemeldeten BSL1-Labor erfolgt. Sicherheitsbedenken bestehen hier kaum.

Biosensoren der Kategorie (II) fordern die gängige Regulierung von GVO heraus. Sie sind zwar mit einem Umgang in der Umwelt verbunden, ein Kontakt der GVM mit Mensch und Umwelt ist aber begrenzt oder verhindert, weil die GVM in einem Gerät eingeschlossen sind. Bei dieser Gruppe stellt sich deshalb die Frage, wie der Umgang mit den Biosensoren im Freien zu regulieren ist – als Umgang im geschlossenen System oder als Umgang in der Umwelt? Wie Beispiele aus der EU und der Schweiz zeigen, können die Antworten fallweise unterschiedlich ausfallen.

Ein Beispiel ist der T102-Test-Kit des finnischen Molkerei-Unternehmens *Valio*. Der Kit besteht aus Ampullen mit einem gefriergetrockneten biolumineszenten GV-Stamm von *Streptococcus thermophilus*, mit dem sich Antibiotikarückstände in Milch nachweisen lassen (Jacobs et al. 1995). Um die Nutzung des Kits im Freien – etwa auf Milchbetrieben – zu ermöglichen, holte *Valio* 1997 in der EU eine Bewilligung zum Inverkehrbringen in die Umwelt ein. Diese Bewilligung ist inzwischen abgelaufen und der Kit ist in der EU nicht mehr erhältlich.

Ein anderes Beispiel ist ein Biosensor-Kit der Firma *Kiwa Water Research*, der eingeschlossene GV-Bakterien zum Nachweis toxischer Substanzen im Wasser enthält (Eltzov et al. 2009). Als die Firma den Kit in den Niederlanden 2008 im Freien testen wollte, wurde der Umgang als Freisetzungversuch eingestuft und *Kiwa* musste bei den zuständigen Behörden eine entsprechende Bewilligung einholen.

In Deutschland kam ein ARSOLux genannter Kit außerhalb eines Labors zum Einsatz. Der Biosensor, der für den Nachweis von Arsen im Wasser konstruiert war, bestand aus GV-Bakterien, die während der ganzen Handhabung in versiegelten Fläschchen verblieben. Die Anwendung des Kits vor Ort erfolgte aus regulatorischen Gründen nicht im Freien, sondern in einem Kleintransporter, der bei den zuständigen Behörden als BSL1-Labor gemeldet und entsprechend mit Sicherheitsdatenblättern, Desinfektionsflaschen und Autoklavierbehälter ausgerüstet war (Sundaram et al. 2023).

In der Schweiz wiederum kam 2014 ein Biosensor-Kit im Freien zum Einsatz. Im Rahmen des Projekts «Bio-Design for the Real World», das in der Do-it-yourself-Biologie-Szene initiiert worden war, veränderten Forschende der ETH Lausanne *Escherichia coli* gentechnisch so, dass die Bakterien bei Kontakt mit Arsen leuchten. Im Biosensor-Kit lagen die GVM in verschlossenen Fläschchen vor. Das Bundesamt für Umwelt (BAFU) stufte den Umgang mit diesem Kit im Freien als Umgang im geschlossenen System ein und ermöglichte den Gang ins Freie durch die Erweiterung einer bestehenden ESV-Globalmeldung (Biodesign 2014).

Obwohl in den letzten Jahren im Rahmen von Forschungsprojekten mehrere GVM als Biosensoren für den Einsatz im Freien erzeugt wurden, sind derzeit keine entsprechenden Produkte auf dem Markt. Auch Firmen, die solche Biosensoren entwickeln, gibt es kaum. Eine Ausnahme ist *Oxford Molecule Biosensors*. Sie arbeitet an GVM für tragbare Biosensor-Kits, die an abgelegenen Orten eine schnelle Bewertung der Luft-, Boden- und Wasserqualität ermöglichen sollen.

Tabelle 7: Kommerziell erhältliche Biosensoren mit GVM

Biosensor	GVM	Nachweisbare Stoffe	Firma
Muta-ChromoPlate	Salmonella typhimurium	Mutagene Stoffe	EBPI
UMU ChromoTest	Salmonella typhimurium	Karzinogene Stoffe	EBPI
SOS ChromoTest	Escherichia coli	Genotoxische Stoffe	EBPI
A-YES	Arxula adenivorans	Endokrine Stoffe	new-diagnostics
S-YES	Saccharomyces cerevisiae	Endokrine Stoffe	new-diagnostics
Xenoscreen	Saccharomyces cerevisiae	Endokrine Stoffe	Xenometrix
Vitotox	Salmonella typhimurium	Mutagene Stoffe	Sciensano

13. Lebende Diagnostika

Living diagnostics – so nennen Forschende GVM-basierte Biosensoren, die in der Humanmedizin zu Erkennung von Krankheiten entwickelt werden (Rottinghaus et al. 2020). Wie die lebenden Biotherapeutika (Abschnitt 3.1) basieren sie gemeinhin auf harmlosen, als Probiotika eingestuft Bakterienarten. Stämme dieser Arten werden mit genetischen Schaltkreisen ausgestattet, so dass sie fähig werden, im menschlichen Körper Krankheiten wie Darmkrebs, chronisch-entzündliche Darmerkrankung oder Magen-Darm-Blutungen zu erkennen (Daeffler et al. 2017, Riglar et al. 2017, Woo et al. 2020, Zou et al. 2024a/b).

Eine besondere Form lebender Diagnostika stellen GVM dar, die DNA-Sequenzen erkennen können. Bei der Konstruktion solcher DNA-Sensoren kommen Bakterienarten zum Einsatz, die natürlicherweise die Fähigkeit besitzen, DNA aus der Umgebung aufzunehmen und ins Erbgut einzubauen (Cheng et al. 2023, Joshi et al. 2024). Die Bakterien werden so verändert, dass sie in ihrem Erbgut einen «Landeplatz» für die Ziel-DNA besitzen. Wird Ziel-DNA aus der Umgebung aufgenommen, ersetzt sie den Landeplatz und löst dadurch in den Bakterien einen Mechanismus aus, der das Vorhandensein der DNA meldet (Joshi et al. 2024). Auf diese Weise haben Forschende zum Beispiel einen Sensor entwickelt, der im Darm von Mäusen die DNA von Krebszellen erkennen konnte (Cooper et al. 2023). Da GV-Sensorstämme externe DNA in ihr Erbgut einbauen, entstehen während der Anwendung GVM mit verändertem Erbgut. Auch bei einer weiteren Form lebender Diagnostika, wie sie an der ETH Zürich entwickelt werden, entstehen während der Anwendung neue GVM. Hier fungieren GV-Stämme von *Escherichia coli* als eine Art molekulares Aufzeichnungsgerät. Sie werden dazu derart verändert, dass sie ihre mRNA in DNA umschreiben und dann in ihr Erbgut einbauen können (Schmidt et al. 2018/2022). Indem die GV-Bakterien auf diese Weise zum Beispiel auf ihrem Weg durch den Darm von Menschen die Aktivität ihrer Gene aufzeichnen, sollen sie Ärztinnen und Ärzten verraten können, ob etwa Polypen oder eine entzündliche Darmerkrankung vorliegen (Nature Podcast 2020).

Bisher sind noch keine lebenden Diagnostika auf dem Markt. Um sie marktreif zu machen, arbeiten Forschende derzeit an Biocontainment-Strategien, die in Zukunft eine

sichere Anwendung der GVM ermöglichen sollen (Rottinghaus et al. 2020, Mecacci et al. 2023). Eine der Strategien folgt dem Konzept der «lebenden Materialien» und führt zu Biosensoren, bei denen die GVM in Kapseln eingeschlossen sind (Kapitel 19).

14. Bioremediation

Bioremediation ist eine Methode zur Sanierung belasteter Böden und Gewässer, bei der Mikroorganismen genutzt werden, um Umweltschadstoffe in harmlose Substanzen abzubauen oder in weniger schädliche Formen umzuwandeln. Die Methode gilt als umweltfreundlich und bietet eine nachhaltige Alternative zu chemischen oder physikalischen Sanierungsverfahren.

Die Idee, durch den Transfer von Genen die Sanierungsfähigkeit von Mikroorganismen zu erhöhen, gibt es bereits seit anfangs der 1970er Jahre. In den Laboren von *General Electric*s entstand damals der ölfressende *Pseudomonas putida*-Stamm, der als «superbug» Berühmtheit erlangte, weil er 1980 in den USA nach neunjährigem Streit zum ersten patentierten Lebewesen der Welt wurde (Pandey & Arora 2020). Seit dem Entstehen dieses Superbakteriums sind zahlreiche weitere Versuche durchgeführt worden, um GVM für die Bioremediation zu entwickeln. Wie groß das Interesse in der Forschung ist, lässt sich etwa daran ermessen, dass Google Scholar bei einer Suche mit den Stichworten «bioremediation» und «genetically modified microorganisms» über 2200 Ergebnisse liefert (Stand November 2024). Im Fokus der Forschung steht heute die Entwicklung von GVM, die Plastik, Pestizide, Schwermetalle, synthetische Farbstoffe oder per- und polyfluorierte Alkylsubstanzen (PAFS) abbauen sollen (Ruomeng et al. 2023, Rafeeq et al. 2023, Hu & Scott 2024, Schneier et al. 2024, Vickram et al. 2024). Auch wenn GVM in der Bioremediationsforschung viel Aufmerksamkeit erhalten, sind die bisherigen Bemühungen weitgehend auf Laborversuche beschränkt. Ausnahmen sind ein paar wenige Freisetzungversuche, die in den 1990er Jahre in Spanien und den USA stattfanden (Ramos et al. 1997, Strong et al. 2000, Ripp et al. 2000) sowie ein Notfalleinsatz in Estland. Dort gab es 1988 in einer Ölschiefermine einen Unfall und ein GV-Stamm von *Pseudomonas putida* wurde zur Sanierung von Phenol in Grubenwasser eingesetzt (Peters et al. 1997).

Da es kaum Daten aus Anwendungen in der Umwelt gibt, bleibt das wahre Potenzial von GVM für die Bioremediation unbekannt. Die Gründe für das Fehlen von Feldstudien und kommerzialisierten Produkten sehen Forschende weitgehend in den Sicherheitsbedenken sowie den rechtlichen Vorschriften, die in vielen Ländern in Kraft sind, um potenziellen Risiken von GVM vorzubeugen (Naismith 2020, Anand et al. 2023, Johnson 2024, Naiel et al. 2024). Da diese Vorschriften den Schritt in die Umwelt und die etwaige Vermarktung aufwendig und kostspielig machen, ist der Anreiz für Freisetzungversuche von GVM. Regulatorische Hürden dürften auch mit ein Grund sein, weshalb es im Bereich Bioremediation kaum Firmen gibt, die an Produkten mit GVM arbeiten. Eine Ausnahme ist *Allonnia*. Das mit 40 Millionen US-Dollar Startkapital

ausgestattete Spin-off des SynBio-Unternehmens *Ginkgo Bioworks* arbeitet seit 2020 an modifizierten Mikroorganismen, die PFAS abbauen sollen (Bomgardner et al. 2020).

14.1 Bioremediation mit in situ-Gentechnik

Um die Geschwindigkeit des Schadstoffabbaus zu erhöhen, entwickeln Forschende vermehrt Methoden, mit denen sich die für den Abbau notwendigen Gene direkt in der Umwelt in indigene Bakterienarten übertragen lassen (Borchert et al. 2021; Abschnitt 2.1.6). Da indigene Bakterien bereits gut an die herrschenden Umweltbedingungen angepasst und konkurrenzfähig sind, sollen sie Schadstoffe effizienter und schneller abbauen können als nicht heimische GVM, deren Menge nach der Inokulation wegen mangelnder Konkurrenzfähigkeit oft rasch abnimmt. Die Idee, natürliche mikrobielle Gemeinschaften für die Sanierung verschmutzter Umgebungen zu nutzen, wird Plasmid-vermittelte Bioremediation oder genetische Bioaugmentation genannt (Garbisu et al. 2017). Sie beruht darauf, leicht übertragbare Plasmide mit den für den Schadstoffabbau notwendigen Genen auszustatten und GVM als Vektoren zu nutzen, die die Plasmide in der Umwelt via horizontalen Gentransfer auf indigene Bakterien übertragen (Garbisu et al. 2017). In Laborversuchen sind mit der in situ-Gentechnik-Strategie bereits GVM entstanden, die Erdöl und Schadstoffe wie Triclocarban und Terephthalate abbauen können (French et al. 2020, Ke et al. 2022, Yip et al. 2024, Marquiegui et al. 2024).

Als Variante der genetischen Bioaugmentation steht auch die Nutzung von Plasmiden zur Diskussion, die für CRISPR/Cas-Komponenten codieren. Solche Plasmide könnten dazu verwendet werden, Bakterien direkt in der Umwelt derart zu editieren, dass sie Schadstoffe abbauen können (Johnson 2024).

Wie andere Anwendungen der in situ Gentechnik dürfte auch die genetische Bioaugmentation die etablierte Regulierungsmechanismen stark herausfordern.

15. Mikroalgenzucht

Mikroalgen sind photosynthetisch aktive Mikroorganismen und umfassen Grünalgen, Kieselalgen und Cyanobakterien. Da sie CO₂ aus der Atmosphäre aufnehmen, im Vergleich zu Landpflanzen eine höhere Wachstumsrate haben, keine fruchtbaren Böden benötigen und eine Reihe von Produkten – wie Tierfutter, Lebensmittel, Biotreibstoffe oder bioaktive Stoffe für Kosmetika und Medikamente – liefern können, gilt ihr Anbau in Zeiten von Klimakrise als nachhaltige und vielversprechend Produktionsform.

In Europa ist die Kultivierung von Mikroalgen gegenwärtig wenig verbreitet. Die steigende Nachfrage nach Leistungen oder Produkten von Algen, politische Fördermaßnahmen wie die Algeninitiative der EU (EU-Kommission 2022) und der Strukturwandel in der Landwirtschaft führen aber dazu, dass das Interesse steigt und

die Zahl der Betriebe wächst, die entweder ihre Produktion mit der Algenkultur diversifizieren oder ganz auf das «grüne Gold» setzen.

In den letzten Jahren sind auch in der Schweiz erste Algenfarmen in Betrieb gegangen. Wie weit verbreitet sie in Zukunft sein werden, lässt sich schwer vorhersagen. Unabhängig von der Anzahl der Farmen ist es möglich, dass hierzulande auch die Kultivierung von GV-Mikroalgen und die mit ihr einhergehenden Sicherheits- und regulatorischen Fragen zur Diskussion stehen werden. Vom geltenden GVO-Moratorium ist der Anbau von GV-Mikroalgen nicht erfasst.

GV-Mikroalgen werden für mehrere unterschiedliche Anwendungen entwickelt – dazu gehören etwa die Herstellung von Biotreibstoffen, (Wang et al. 2024b), von Bioplastik (Arora et al. 2023) und von Lebens- und Futtermitteln (Baldia et al. 2023) sowie die Kohlenstoffabscheidung (Ugya et al. 2024).

Für den Anbau der GV-Mikroalgen stehen grundsätzlich zwei Systeme zur Verfügung: Die Kultivierung in geschlossenen Photobioreaktoren und die Anzucht in Open-Pond-Systemen wie zum Beispiel in Raceway-Teichen.

Aus regulatorischer Sicht stellt vor allem die Nutzung von Open-Pond-Systemen eine neue Herausforderung dar. Da in Teichen gehaltene GV-Mikroalgen durch Wind, Wasser, Vögel, Tiere, Unwetter oder Unfälle in die Umwelt gelangen und sich dort verbreiten können, kann die Haltung von GV-Mikroalgen in offenen Freilandanlagen auch unbeabsichtigte Folgen nach sich ziehen, weshalb die gängigen Schemas für Umweltrisikoprüfung und Umweltmonitoring von GVO an GV-Mikroalgen anzupassen sind (Beacham et al. 2017, Wang et al. 2024b, Dolezel et al. 2024).

Erfahrungen zum Umgang mit GV-Mikroalgen in der Umwelt gibt es bisher kaum. Weltweit fanden erst wenige Freisetzungsversuche statt. 2015 testete *Sapphire Energy* in den USA eine GV-Mikroalge mit erhöhter Fettsäuresynthese in einer offenen Pilotanlage (Szyjka et al. 2017). In Mexiko untersuchte die Firma *StelaGenomics* zwischen 2016 und 2019 einen GV-Stamm von *Synechococcus elongatus* in offenen Raceway-Teichen (González-Morales et al. 2020). In Australien wiederum fand ein Freisetzungsversuch mit einem GV-Stamm der Meeresalge *Nannochloropsis oceanica* statt, wobei sich die offenen Teiche in einer überdachten Produktionsanlage befanden (OGTR 2020). Bei allen drei Fällen waren die Bewilligungen der Freisetzungen mit Auflagen verknüpft, die ein Entweichen der GV-Mikroalgen in die Umwelt verhindern sollten. In den USA und Mexiko zum Beispiel schrieben die Behörden unter anderem Rückhalteeinrichtungen und das Anbringen von Vogel- und Nagernetzen vor (Sebesta et al. 2022).

Auch die Kultivierung von GV-Mikroalgen in Photobioreaktoren stellt die GVO-Regulierung vor neue Herausforderungen. Die Reaktoren sind zwar geschlossene Systeme, sie können aber im Freien stehen. Da Unfälle und Leckagen dazu führen würden, dass GV-Mikroalgen direkt in die Umwelt gelangen, stellt sich die Frage, ob im Freien stehende Photobioreaktoren unter die ESV oder die FrSV fallen sollten. Ein 2012 im Auftrag der Niederländischen Kommission für genetische Veränderung (COGEM) verfasste Studie beleuchtete diese Frage nach EU-Recht. Sie kam zum Schluss, dass im Freien stehende

Photobioreaktoren mit GV-Mikroalgen in der Regel unter die Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG fallen. Ausnahmen seien fallweise möglich, wenn das jeweilige System bereits im Rahmen der «guten industriellen Praxis in großem Maßstab» (GILSP) sicher verwendet wurde und die GV-Mikroalge aus sicheren Vektoren und Inserts besteht und eine geringere Fitness aufweist als der Wildtyp (Enzing et al. 2012). In solchen Fällen käme die Richtlinie 2009/41/EG zur Geltung.

Auch die Größe einer Photobioreaktor-Anlage kann die klare Abgrenzung zwischen offenen und geschlossenen Systemen erschweren. Das zeigt wiederum ein Blick in die Niederlande. 2020 nahm dort die Firma *Photanol* eine Pilotanlage in Betrieb, in der GV-Cyanobakterien eine organische Säure produzieren. Da *Photanol* aufgrund der Größenordnung ihrer Anlage den Einschluss der GV-Mikroalge nicht zu 100 Prozent gewährleisten konnte, entschied sich die Firma, den Betrieb der Anlage als Freisetzung nach Richtlinie 2001/18/EG zu beantragen.

16. Kosmetika

Mikroorganismen finden zunehmend auch Anwendung in Kosmetika. Als probiotische Mittel sollen sie etwa die Mundflora gesund halten oder das Hautmikrobiom so unterstützen, dass Reizungen ausbleiben und das Hautbild verbessert wird.

In den letzten Jahren haben einige Unternehmen begonnen, GVM für kosmetische Mittel zu entwickeln. *Seed Health*, eine US-Firma, die mit CRISPR/Cas arbeitet, beschreibt etwa in einem Patenantrag GVM, die auf der Haut unerwünschte Bakterien fernhalten sollen (Tye & Kovarik 2023). Zudem entwickelt die Firma Zahnstreifen mit biolumineszenten GVM, die im Mund das Wachstum nützlicher Bakterien fördern sollen (Kovarik 2022).

Oragenics besitzt ein Patent auf einem rekombinanten *Streptococcus mutans*-Stamm, der nahezu keine Milchsäure mehr bildet und so Karies vorbeugen soll (Hillman et al. 2015). *Streptococcus mutans* kommt natürlicherweise in der Mundflora vor und bildet dort Milchsäure, die den Schmelz der Zähne angreift. Indem der GV-Stamm im Mund seine unveränderten Artgenossen verdrängt, soll er die Menge der Karies-verursachende Milchsäure verringern. In den USA ist er kurz vor der Markteinführung. Die Firma *Lumina Bioworks* bietet den GV-Stamm auf ihrer Webseite bereits zum Vorbestellen an.

Auch *Azitra* soll an der Entwicklung GVM-basierter Kosmetika arbeiten. Im Visier der Firma ist das harmlose Hautbakterium *Staphylococcus epidermidis*. *Azitra* will es laut einem Medienbericht so gentechnisch verändern, dass es zur Behandlung rauer oder trockener Haut eingesetzt werden kann (Synbiobeta 2019).

GVM-basierte Kosmetika sind regulatorisches Neuland (Chemla et al. 2024). Würden bei ihrer Entwicklung etwa Tests an Freiwilligen gemacht, dürfte das gängige Konzept für die Regulierung von Freisetzungsversuchen schwer anwendbar sein. Auch dürften heute weitgehend Daten fehlen, um die mögliche Ausbreitung der GVM von der Haut

oder dem Mund in die Umwelt zu bewerten. Zudem wäre zu klären, wie regulatorisch mit den Szenarien umzugehen ist, dass Menschen mit GVM auf der Haut oder im Mund ihre GVM auf andere Menschen übertragen oder in Länder reisen, in denen die GVM nicht zugelassen sind.

17. Herstellung von Biotreibstoffen

Mikroorganismen spielen eine wichtige Rolle bei der Herstellung von Biotreibstoffen wie Biogas, Biodiesel und Bioethanol. Durch ihre natürlichen Stoffwechselprozesse können sie organische Materialien oder CO₂ in nutzbare Energiequellen umwandeln und damit eine Alternative zu fossilen Brennstoffen bieten. Mit Hefen lässt sich aus Zuckern Bioethanol herstellen. Biodiesel kann mit Mikroalgen aus CO₂ erzeugt werden. Bei der Biogasproduktion wiederum bauen methanogene Mikroorganismen organische Abfälle unter anaeroben Bedingungen ab und setzen dabei energiereiches Methan frei.

Ob Biogas, Biodiesel oder Bioethanol – in allen drei Fällen arbeiten Forschende daran, die Fähigkeiten der Mikroorganismen mittels Gentechnik zu optimieren und mit neuen Stoffwechselwegen zu erweitern (Singh et al. 2020, Banner et al. 2021, Zhang et al. 2021, Das et al. 2023b). Während bei Biogas und Biodiesel noch keine Starterkulturen mit GV-Stämmen auf dem Markt erhältlich sind, gibt es für die Bioethanolherstellung mehrere kommerzialisierte GV-Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Tabelle 8). 2012 brachte *Lallemand* mit *TransFerm* das erste Produkt auf den Markt. Wie viele Nachfolgeprodukte basiert *TransFerm* auf dem «Consolidated Bioprocessing», das darauf abzielt, die für die Bioethanolherstellung aus Stärke notwendigen Enzyme direkt von den GV-Hefen produzieren zu lassen. Der Prozess macht den Zukauf der teuren Enzyme überflüssig und verringert so die Betriebskosten.

In Kanada und den USA ist der Einsatz von GV-Starterkulturen bei der Biotreibstoffherstellung aus Mais seit längerer Zeit etabliert. Bereits im Jahr 2019 sollen rund 70 Prozent der Bioethanolanlagen in den beiden Ländern GV-Hefen verwendet haben (Gibson 2019). Auch in Brasilien, wo Bioethanol überwiegend aus Zuckerrohr gewonnen wird, ist der Einsatz von GV-Hefen seit Mitte der 2010er Jahre gängige Praxis (Jacobus et al. 2021). 2023 sind auch in Paraguay und 2024 in Argentinien erstmals GV-Hefen für die Bioethanolherstellung zugelassen worden (Voegele 2024, Benítez et al. 2024).

Da *Saccharomyces cerevisiae* eine harmlose Hefe ist und die Bioethanolherstellung in geschlossenen Systemen erfolgt, gibt die Nutzung von GV-Stämmen gemeinhin wenig Anlass zu Sicherheitsbedenken. Ein Entweichen der GVM aus Produktionsanlagen ist jedoch nicht vollständig auszuschließen, weshalb Firmen in der Regel vor einer Kommerzialisierung die Umweltrisiken in einem Zulassungs- oder Meldeverfahren bewerten müssen. Eine Risikobewertung ist auch notwendig, wenn Trockenschlempe mit inaktivierten GV-Hefen, ein Nebenprodukt der Bioethanolherstellung, als Futtermittel verwendet werden soll (siehe auch Abschnitt 6.1.2). In Brasilien, Argentinien und Paraguay ist hierfür eine Bewilligung der Behörden notwendig. In den USA können Firmen ebenfalls eine

Einwilligung der Behörden einholen. Sie dürfen die Trockenschlempen im Rahmen eines «Self-GRAS»-Prozesses⁵ aber auch eigenständig als sicher einstufen.

Einige der kommerziell erhältlichen GV-Hefen sind selbstklonierte oder mit CRISPR/Cas gezielt mutierte Stämme und enthalten keine artfremde DNA (mit Sternchen gekennzeichnete Produkte in Tabelle 8). Sie können in einigen Ländern von der Gentechnikgesetzgebung ausgenommen sein. In Brasilien zum Beispiel sind mehrere dieser Fremd-DNA-freien GV-Hefen als Nicht-GVO eingestuft worden (CTNBio 2024), weshalb sie dort wie herkömmliche Hefen ohne Bewilligungen eingesetzt werden dürfen.

In Zukunft könnten auch GV-Stämme für die Biogasherstellung auf den Markt kommen. Da auch bei Biogas die Produktion in geschlossenen Systemen erfolgt, wäre die Umwelt wie bei der Bioethanolherstellung kaum gegenüber GVM exponiert. Eine direkte Exposition ist jedoch wiederum möglich, falls GVM aus dem Gärprozess als Dünger («Gärgülle») auf die Felder kommen würden.

Anders als bei der Biogas- und Bioethanolproduktion kann die Herstellung von Biodiesel mit Mikroalgen auch außerhalb geschlossener Systeme im Freien in Open-Pond-Systemen erfolgen. Der Einsatz von GV-Mikroalgen würde hier die gängige GVO-Risikobewertung vor eine neue Herausforderung stellen (Kapitel 15).

Tabelle 8: Kommerziell erhältliche GV-Hefen für die Bioethanolherstellung

Firma	GV-Hefe(n)
Danisco	GICC03636, GICC03661
DSM	eBoost
Fermentec	FT2728L
Globalyeast	Excellomol 4.0*, Excellomol 4.0 Next*
GranBio	Celere-2L
IFF	Synerxia Ruby, Synerxia Sapphire
Lallemand	C5 Fuel, Fermboost, TransFerm, SucraMax, XyloFerm, M18447*, M20544*, M22993*, M25319*
Leaf by Lesaffre	CelluX, Evolve Evergreen
Novonensis	Innova Eclipse, Innova Quantum
Terranol	cV-110
YesSinergy	YS2101*

*GV-Hefen ohne artfremde DNA, die selbstkloniert oder mit CRISPR/Cas gezielt mutiert worden sind.

⁵ Self-GRAS steht für self-affirmed Generally Recognized as Safe. Der Prozess erlaubt es Firmen in den USA, Lebens- oder Futtermittelprodukte selbst als GRAS (Generally Recognized as Safe) einzustufen, ohne dass diese Einstufung von der FDA (Food and Drug Administration) geprüft oder genehmigt werden muss.

18. Schul- und Freizeitbereich

Im Schul- und Freizeitbereich sind GVM seit mehreren Jahren im Handel erhältlich. Bereits seit den 1990er Jahren gibt es beispielweise Experimentierkästen für Laien und Laiinnen, die rekombinante Plasmide und Mikroorganismen enthalten und mit denen sich GVM herstellen lassen. Lange Zeit waren solche Gentechnik-Baukästen ausschließlich für den Gebrauch in Schulen und öffentlichen Laboren akademischer Institutionen konzipiert. Mit dem Entstehen der Do-it-yourself-Biologie Ende der 2000er Jahre erweiterte sich der Adressatenkreis um die Anhängerinnen und Anhänger dieser DIY-Bewegung und es kamen neu auch Experimentiersets für den Heimgebrauch sowie für *Biohackerspaces* genannte Gemeinschaftslabore auf den Markt (Vogel 2022).

Heute gibt es weltweit rund zwei Dutzend Firmen, die Sets für gentechnische Experimente herstellen. Sie bieten ihre Produkte entweder online auf ihren firmeneigenen Webseiten an oder beauftragen Unternehmen mit dem Vertrieb, die mit Laborbedarf oder Lehrmaterialien handeln. Zudem sind Gentechniksets auch auf Online-Marktplätzen wie Amazon, Alibaba oder eBay bestellbar.

Die kommerziell erhältlichen Experimentiersets lassen sich in drei Gruppen unterteilen:

- (I) Sets, die einen GVM enthalten.
- (II) Sets, die ein rekombinantes Plasmid und einen unveränderten Mikroorganismus enthalten und mit denen sich ein GVM herstellen lässt.
- (III) Sets, die ein rekombinantes Plasmid enthalten.

Sets der Gruppen I und II beruhen in den meisten Fällen auf harmlosen Stämmen von *Escherichia coli* und selten auch auf Stämmen der Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Tabelle 9). Beispiele für Sets, die beim Kauf bereits einen GVM enthalten, sind *BioArt Microbe Mosaic* von The Odin und *BioInk Print Kit* von Amino Labs. Mit beiden lässt sich lebende Biokunst machen, indem mit den enthaltenen verschiedenfarbigen GVM Bilder auf Textilien und Wachstumsmedien gemalt werden. Die Sets der Gruppe II beinhalten in den meisten Fällen einfache Transformationsexperimente, bei denen rekombinante Plasmide in Bakterien eingeschleust werden. Die beiden etwa an Schweizer Schulen am häufigsten eingesetzten Transformationssets sind die *Gen Spirale* von Novartis und der *pGLO-Kit* von Bio-Rad. In den letzten Jahren sind auch erstmals CRISPR-Baukästen auf den Markt gekommen, mit denen sich das Erbgut von Bakterien genomeditieren lässt. Einer dieser Baukästen ist der DIY-CRISPR-Kit der US-Firma The Odin. Er sorgte 2017 kurz nach seiner Lancierung in der EU für Aufregung, weil es dort nicht nur Fälle von unrechtmäßigen Einsätzen des Kits gab, sondern auch Chargen mit Pathogenkontaminationen entdeckt worden waren. In Deutschland zum Beispiel sah sich die Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) dazu veranlasst, eine Stellungnahme zur Sicherheit von DIY-Kits zu veröffentlichen (ZKBS 2017), und einige Bundesländer informierten die Öffentlichkeit aktiv über die gentechnikrechtlichen Vorschriften beim Kauf von Gentechniksets (LAG 2018).

Neueren Datums sind die Experimentiersets der Gruppe III, die allein rekombinante Plasmide enthalten und somit ohne lebende GVM auskommen. Sie spiegeln die Fortschritte in der Zell-freien Synthetischen Biologie wieder, fallen in den meisten Ländern nicht unter die gentechnikrechtlichen Vorschriften und finden auch in der Literatur Beachtung (Huang et al. 2018, Stark et al. 2018/2019, Williams et al. 2020, Jung et al. 2023, Collins et al. 2024).

Tabelle 9: Beispiele von im Online-Handel erhältlichen Gentechnik-Experimentiersets

Kit	GVM	Hersteller
<i>Sets, die GVM enthalten</i>		
BioInk Print Kit	Escherichia coli	Amino Labs
Canvas Kit	Escherichia coli	Amino Labs
Bioprocessing of Chromogenic Proteins	Escherichia coli	Edvotek
rAmylase Project: Kit for Plasmid Isolation	Escherichia coli	G-Biosciences
Geno-Lab – Genotoxicity Educational Kit	Escherichia coli	EBPI
PCR Mediated Site Directed Mutagenesis Kit	Escherichia coli	Himedia
BioArt Microbe Mosaic	Escherichia coli	The Odin
Genetically Engineer Yeast	Hefe	The Odin
<i>Sets, mit denen sich GVM herstellen lassen</i>		
Smell it-Kit	Escherichia coli	Amino Labs
Heat-it Kit	Escherichia coli	Amino Labs
Eau That Smell Kit	Escherichia coli	BioBuilder
Golden Bread Transformation	Hefe	BioBuilder
pGLO Bacterial Transformation Kit	Escherichia coli	Bio-Rad
CRISPR Gene Editing Kits	Escherichia coli	Bio-Rad
Transformation of E. coli with pGAL™	Escherichia coli	Edvotek
GFP Genetic Engineering of Bacteria	Escherichia coli	G-Biosciences
Transformation with p-Amylase	Escherichia coli	G-Biosciences
Gen Spirale	Escherichia coli	Novartis
Transformation of Yeast Cell Teaching Kit	Hefe	OPRL
DIY Bacterial Gene Engineering CRISPR Kit	Escherichia coli	The Odin
Genetic Design Starter Kit	Escherichia coli	The Odin
Improved Bacterial Transformation	Escherichia coli	Ward's Science
<i>Sets mit rekombinanten Plasmiden</i>		
Biobits Central Dogma	Plasmid	MiniPCR Bio
Biobits	Plasmid	MiniPCR Bio
CRISPRkit	Plasmid	CRISPRkit

In der Schweiz ist der Umgang mit GVM- und Plasmid-enthaltenden Experimentiersets grundsätzlich erlaubt. Er muss jedoch dem Bund gemeldet werden und darf nur Räumen stattfinden, die die Anforderungen an ein S1-Labor erfüllen. Bund und

Kantone verfassten hierzu Broschüren, die sich an Schulen und die Do-it-Yourself-Biologie-Szene der Schweiz richten und über den sach- und rechtmäßigen Umgang mit GVM informieren. Die Vollzugsstellen nahmen zudem 2021 die damals im Online-Handel erhältlichen Gentechnikkits unter die Lupe und bewerteten sie als ungefährlich (Vogel 2022).

19. Lebende Materialien

«Engineered Living Materials» – kurz ELM genannt – sind ein Forschungsbereich, der die Synthetische Biologie mit den Materialwissenschaften vereint. Er beruht auf dem Einsatz von GVM, die entweder selbst eine Materialmatrix bilden – wie in Biofilmen – oder in bestehende Matrices eingebaut werden. Indem lebende GVM in nicht-lebenden Matrices eingeschlossen werden, sollen Materialien entstehen, die im Vergleich zu herkömmlichen Werkstoffen neuartige Funktionen besitzen. Dazu gehören:

- Selbstheilung: die Fähigkeit, Schäden eigenständig zu reparieren;
- Selbstreplikation: die Fähigkeit, Kopien von sich selbst zu erzeugen;
- Bioremediation: die Fähigkeit, Schadstoffe abzubauen, zu verändern oder zu entfernen;
- Resilienz: die Fähigkeit, sich schnell von Schäden zu erholen;
- Signalisierung: die Fähigkeit, Signale zu empfangen, zu verarbeiten und weiterzugeben;
- Sensorik: die Fähigkeit, Umweltsignale wahrzunehmen und darauf zu reagieren;
- Remodellierung: die Fähigkeit, Form oder Struktur aktiv zu verändern;
- Selbstregulierung: die Fähigkeit, Eigenschaften eigenständig zu überwachen und anzupassen.

Das Spektrum potenzieller Anwendungen von ELM ist breit und reicht von Bauwesen über Umwelttechnik bis hin zu Medizin, Textilien und Raumfahrt. Welche Produkte zu erwarten sind, veranschaulichen folgende Beispiele: Forschende wollen etwa lebende Tattoos als eine Art tragbare Diagnostika entwickeln. Das Konzept dahinter ist, GV-Bakterien, die auf bestimmte Reize mit Licht reagieren, in Hydrogele zu verpacken und diese Hydrogele als «Tinte» für das Tätowieren zu verwenden. Nach der Tätowierung sollen die GV-Bakterien in den Mikrogelen eingeschlossen bleiben, von dort aber Signale senden, wenn sie bestimmten Reizen ausgesetzt sind. Zwei Machbarkeitsstudien haben bisher eine erste Grundlage geschaffen, um GV-Bakterien als lebende Biosensoren in Tätowierungen zu verwenden (Liu et al. 2018, Allen et al. 2024).

Ein weiteres Beispiel ist ein lebendes Diagnostikum für Blutungen im Magen-Darm-Trakt von Menschen. Forschende arbeiten hier an einer einnehmbaren Kapsel mit gentechnisch veränderten *Escherichia coli*-Bakterien, die Häm – eine Substanz die bei Blutungen nachweisbar ist – erkennen und dann eine biolumineszierende Luziferase bilden

(Mimee et al. 2018). Die GV-Bakterien, die das Häm durch eine semipermeable Membran empfangen, sollen in der Kapsel eingeschlossen bleiben.

Auch selbstheilender Beton könnte als ELM entstehen. So gelten GV-Bakterien und GV-Pilze als mögliche Kandidaten, die Risse in Betonoberflächen reparieren können (Zhang et al. 2019, Wong et al. 2024). Die GVM sollen dazu im Beton ruhen, bis sie aufgrund von Rissen mit der Außenluft und Feuchtigkeit in Kontakt kommen und dadurch aktiviert werden. Indem die GVM dann das umgebende Kalziumkarbonat ausfällen, sollen sie Schäden im Beton beheben.

Weitere Beispiele sind lebende Kleider oder Pflaster mit Biosensoren, die Gesundheitsdaten erheben (Feng et al. 2024), lebende Klebstoffe, die autonom Schäden reparieren können (An et al. 2020), mit GVM infundierte Handschuhe, die bei Kontakt mit Chemikalien leuchten, tragbare Geräte, die vor Ort eine On-Demand-Produktion rekombinanter Proteine ermöglichen (Yuan et al. 2021), und lebende Tapeten, die ein Signal abgeben, wenn die Luft in Innenräumen zu viel Kohlenmonoxid enthält (Srubar 2021). Zudem gibt es auch das Konzept, ELMs mit Elektronik zu verbinden und dadurch «Living Synthelectronics» zu kreieren – zum Beispiel autonome Biocomputer für Situationen, bei denen Selbstheilung und Selbstreplikation wichtiger sind als schnelles Rechnen (Sorenson & Adamala 2024, Sun et al. 2024).

Ob und in welchem Umfang ELMs den Weg auf den Markt finden werden oder ob dem Forschungsbereich auch droht, im «Valley of Death» der Innovationen zu landen (Srubar 2021), ist derzeit schwer abschätzbar. Zu den Problemen, die einer raschen Umsetzung der Konzepte noch im Wege stehen, gehören die Mikroevolution – also das Auftreten von Mutationen im Erbgut der in Biomaterialien eingebetteten GVM – sowie die Schwierigkeit, die GVM während der gesamten Lebensdauer eines Produkts am Leben zu halten (Rodrigo-Navarro et al. 2021, Nettersheim et al. 2024). Zu lösen bleibt auch, wie während der ganzen Lebensphase von ELM-Produkten – also auch bei ihrer Entsorgung oder einem etwaigen Recycling – sichergestellt werden kann, dass GVM nicht in die Umwelt entweichen. Letztendlich bleibt die Frage zu klären, welche Governanz es braucht, um einen verantwortungsvollen Umgang mit lebenden Materialien zu gewährleisten.

Literatur

- Anika (2023). Watermarked Bacillus subtilis AA07-1 spore preparation. <https://www.fda.gov/media/170432/download>
- Abdullah, A., Olsen, C. M., Hodneland, K., & Rimstad, E. (2015). A polyprotein-expressing salmonid alphavirus replicon induces modest protection in Atlantic salmon (*Salmo salar*) against infectious pancreatic necrosis. *Viruses*, 7(1), 252-267.
- Aeberhard, L. (2022). mRNA-Präparate gleich Gentherapie – was hat es damit auf sich? <https://www.medinside.ch/post/mrna-praeparate-gleich-gentherapie-was-hat-es-damit-auf-sich>
- AgNews (2024a). Silvec Biologics announces new solution for citrus greening disease progresses to US EPA Full Science Review. <https://news.agropages.com/News/NewsDetail---51130.htm>
- Agroscope (2018). Projekte des SFF 8: Die mikrobielle Biodiversität für die Land- und Ernährungswirtschaft nutzbar machen. <https://www.agroscope.admin.ch/agroscope/de/home/themen/arbeitsprogramm-alt/arbeitsprogramm-2018-2021/sff08.html>
- Ahmad, J., Grunden, A., & Kuzma, J. (2024). Biotechnology executive order opens door for regulatory reform and social acceptance of genetically engineered microbes in agriculture. *GM Crops & Food*, 15(1), 248-261.
- Ahmed, M. M., Kayode, H. H., Okesanya, O. J., Ukoaka, B. M., Eshun, G., Mourid, M. R., ... & Lucero-Prisno III, D. E. (2024). CRISPR-Cas systems in the fight against antimicrobial resistance: Current status, potentials, and future directions. *Infection and Drug Resistance*, 5229-5245.
- Ajinomoto (2012). Withdrawal letter. <https://open.efsa.europa.eu/questions/EFSA-Q-2007-157b>
- Aldhous, P. (1990). Modified yeast fine for food. *Nature*, 344(6263).
- Allen, M. E., Kamilova, E., Monck, C., Ceroni, F., Hu, Y., Yetisen, A. K., & Elani, Y. (2024). Engineered bacteria as living biosensors in dermal tattoos. *Advanced Science*, 2309509.
- Álvarez-Sánchez, A. R., Romo-Quinones, C., Rosas-Quijano, R., Reyes, A. G., Barraza, A., Magallón-Barajas, F., ... & Mejía-Ruíz, C. H. (2018). Production of specific ds RNA against white spot syndrome virus in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Aquaculture Research*, 49(1), 480-491.
- An, B., Wang, Y., Jiang, X., Ma, C., Mimee, M., Moser, F., ... & Zhong, C. (2020). Programming living glue systems to perform autonomous mechanical repairs. *Matter*, 3(6), 2080-2092.
- An, B., Wang, Y., Huang, Y., Wang, X., Liu, Y., Xun, D., ... & Zhong, C. (2022). Engineered living materials for sustainability. *Chemical Reviews*, 123(5), 2349-2419.
- Anand, U., Dey, S., Bontempi, E., Ducoli, S., Vethaak, A. D., Dey, A., & Federici, S. (2023). Biotechnological methods to remove microplastics: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 21(3), 1787-1810.
- Andersen, J. T., Schäfer, T., Jørgensen, P. L., & Møller, S. (2001). Using inactivated microbial biomass as fertilizer: the fate of antibiotic resistance genes in the environment. *Research in Microbiology*, 152(9), 823-833.
- Anonymous (2016). Bayer partners with BioNTech to develop mRNA vaccines, drugs for animal health. *Genetic Engineering & Biotechnology News* <https://www.genengnews.com/topics/drug-discovery/bayer-partners-with-biontech-to-develop-mrna-vaccines-drugs-for-animal-health/>
- Anonymous (2023). Can microbes save the planet?. *Nature Biotechnology* 41: 735.
- APHIS (2020a). Environmental impact statement. Southern Gardens Citrus Nursery, LLC permit to release genetically engineered Citrus tristeza virus. <https://www.aphis.usda.gov/sites/default/files/17-044101r-feis.pdf>
- APHIS (2020b). Re: Confirmation of the regulatory status of genome edited *Epichloë coenophiala* with inability to produce ergot alkaloids. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. https://www.aphis.usda.gov/sites/default/files/20-169-01_air_response_signed.pdf
- Arbon, P. M., Andrade Martinez, M., Jerry, D. R., & Condon, K. (2024). Towards a 'systems' approach for viral challenge experiments in shrimp: Reporting guidelines for publication. *Reviews in Aquaculture*, 16(2), 923-941.

- Armstrong, A., & Isalan, M. (2024). Engineering bacterial theranostics: from logic gates to in vivo applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 12, 1437301.
- Arora, Y., Sharma, S., & Sharma, V. (2023). Microalgae in bioplastic production: a comprehensive review. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 48(6), 7225-7241.
- AU (2024). Vergleich der Zulassungen von GVO Produkten in der EU und der Schweiz. Amt für Umweltschutz, Liechtenstein. https://www.llv.li/serviceportal2/amtsstellen/amt-fuer-umwelt/umweltschutz/vergleich_gvoprodukte_eu_ch_2024.pdf
- Augustin, J., Curtis, D., Henry, E. M., Hotton, S. K., Lamsa, A., Manavalan, L. P., ... & Thompson, B. (2022). Fusion proteins, recombinant bacteria, and exosporium fragments for plant health. Patent Application US 2022/0169999 A1. <https://www.lens.org/lens/patent/027-515-356-358-912>
- Australian Government (2023). Correcting the record on mRNA vaccines. Department of Agriculture, Fisheries and Forestry. <https://www.agriculture.gov.au/about/news/correcting-the-record-on-mrna-vaccines>
- Azizoglu, U., Salehi Jouzani, G., Sansinenea, E., & Sanchis-Borja, V. (2023). Biotechnological advances in *Bacillus thuringiensis* and its toxins: Recent updates. *Reviews in Environmental Science Bio/Technology*, 22(2), 319-348.
- Bai, X., Huang, Z., Duraj-Thatte, A. M., Ebert, M. P., Zhang, F., Burgermeister, E., ... & Zuo, T. (2023). Engineering the gut microbiome. *Nature Reviews Bioengineering*, 1(9), 665-679.
- Bakker, K. M., Rocke, T. E., Osorio, J. E., Abbott, R. C., Tello, C., Carrera, J. E., ... & Streicker, D. G. (2019). Fluorescent biomarkers demonstrate prospects for spreadable vaccines to control disease transmission in wild bats. *Nature Ecology & Evolution*, 3(12), 1697-1704.
- Balagurunathan, B., Ling, H., Choi, W. J., & Chang, M. W. (2022). Potential use of microbial engineering in single-cell protein production. *Current Opinion in Biotechnology*, 76, 102740.
- Baldia, A., Rajput, D., Kumar, A., Pandey, A., & Dubey, K. K. (2023). Engineering microalgae as the next-generation food. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 3(1), 166-178.
- Ballester, A. R., Roqué, M., Ricci-Cabello, I., Rotger, A., & Malih, N. (2023). Horizon scanning on microorganisms and their products obtained by new developments in biotechnology. *EFSA Supporting Publications*, 20(12), 8503E.
- Bandari, N. M., Abootaleb, M., Nikokar, I., & Karimli, M. (2024). Biologically engineered probiotic supplement production containing phytase enzyme for livestock, poultry, and aquaculture consumption. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 85(1), 41.
- Banner, A., Toogood, H. S., & Scrutton, N. S. (2021). Consolidated bioprocessing: synthetic biology routes to fuels and fine chemicals. *Microorganisms*, 9(5), 1079.
- Barla, A. N., Kannan, K., Kumar, D. P. S., Oliver, J. W., & Abbott, Z. D. (2019). Lyophilized *B. subtilis* ZB183 spores: 90-day repeat dose oral (Gavage) toxicity study in wistar rats. *bioRxiv*, 724542.
- Baum, J. A. (1998). Transgenic *Bacillus thuringiensis*. *Phytoprotection*, 79(4), 127-130.
- Beacham, T. A., Sweet, J. B., & Allen, M. J. (2017). Large scale cultivation of genetically modified microalgae: a new era for environmental risk assessment. *Algal Research*, 25, 90-100.
- Behm, K., Nappa, M., Aro, N., Welman, A., Ledgard, S., Suomalainen, M., & Hill, J. (2022). Comparison of carbon footprint and water scarcity footprint of milk protein produced by cellular agriculture and the dairy industry. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 27(8), 1017-1034.
- Benítez Candia, N., Ulke Mayans, M. G., Sotelo, P. H., Nara Pereira, E., Arrúa Alvarenga, A. A., & Fernández Ríos, D. (2024). Paraguay's approach to biotechnology governance: a comprehensive guide. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 12, 1373473.
- Berger, L., Skerratt, L. F., Kosch, T. A., Brannelly, L. A., Webb, R. J., & Waddle, A. W. (2024). Advances in Managing Chytridiomycosis for Australian Frogs: *Gradarius Firmus Victoria*. *Annual Review of Animal Biosciences*, 12(1), 113-133.

- BfN (2022). BfN warnt vor Abbau wissenschaftlicher Normen in Teilbereichen der Gentechnik. <https://www.bfn.de/pressemitteilungen/science-bfn-warnt-vor-abbau-wissenschaftlicher-normen-teilbereichen-der>
- Bier, E. (2022). Gene drives gaining speed. *Nature Reviews Genetics*, 23(1), 5-22.
- Bikard, D., Euler, C. W., Jiang, W., Nussenzweig, P. M., Goldberg, G. W., Duportet, X., ... & Marraffini, L. A. (2014). Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nature Biotechnology* 32(11): 1146-1150.
- Biomedit (2024). Our pipeline. <https://biomedit.com/pipeline/>
- Blois, M. (2023). USDA funds agriculture start-ups. *C&EN* 101 (29) <https://cen.acs.org/food/agriculture/USDA-funds-food-agriculture-start/101/i29>
- Bloom, K., van den Berg, F., & Arbuthnot, P. (2021). Self-amplifying RNA vaccines for infectious diseases. *Gene Therapy*, 28(3), 117-129.
- Bomgardner, M. M. (2020). Allonia launches to destroy pollution with microbes. *Chemical & Engineering News*, 98, 42.
- Bonina, V., & Arpaia, S. (2023). The use of RNA interference for the management of arthropod pests in livestock farms. *Medical and Veterinary Entomology*, 37(4), 631-646.
- Borchert, E., Hammerschmidt, K., Hentschel, U., & Deines, P. (2021). Enhancing microbial pollutant degradation by integrating eco-evolutionary principles with environmental biotechnology. *Trends in Microbiology*, 29(10), 908-918.
- Borgmeister, C., Gabor, E. & Meurer, G. (2024). A modified yeast strain for low alcohol fermentation. Patent Application EP 4461741 A1. <https://www.lens.org/lens/patent/004-312-245-691-144>
- Bormann, J., Heinze, C., Blum, C., Mentges, M., Brockmann, A., Alder, A., ... & Schäfer, W. (2018). Expression of a structural protein of the mycovirus FgV-ch9 negatively affects the transcript level of a novel symptom alleviation factor and causes virus infection-like symptoms in *Fusarium graminearum*. *Journal of Virology*, 92(17), 10-1128.
- Börner, R. A., Kandasamy, V., Axelsen, A. M., Nielsen, A. T., & Bosma, E. F. (2019). Genome editing of lactic acid bacteria: opportunities for food, feed, pharma and biotech. *FEMS Microbiology Letters*, 366(1), fny291.
- Brödel, A. K., Charpenay, L. H., Galtier, M., Fuche, F. J., Terrasse, R., Poquet, C., ... & Bikard, D. (2024). In situ targeted base editing of bacteria in the mouse gut. *Nature*, 632(8026), 877-884.
- Brophy, J. A., Triassi, A. J., Adams, B. L., Renberg, R. L., Stratis-Cullum, D. N., Grossman, A. D., & Voigt, C. A. (2018). Engineered integrative and conjugative elements for efficient and inducible DNA transfer to undomesticated bacteria. *Nature Microbiology*, 3(9), 1043-1053.
- Browning, M., Burns, L., Rice, C. & Chayevitz, A. (2023). Genetically engineered yeast – A review of terminology, science and regulation. *MBAA Technical Quarterly*, 59(3), 136-143.
- Bull, J. J., Smithson, M. W., & Nuismer, S. L. (2018). Transmissible viral vaccines. *Trends in Microbiology*, 26(1), 6-15.
- Bull, J. J., Nuismer, S. L., Remien, C. H., Griffiths, M. E., & Antia, R. (2024). Recombinant transmissible vaccines will be intrinsically contained despite the ability to superinfect. *Expert Review of Vaccines*, 23(1), 294-302.
- Cao, Z., Pang, Y., Pu, J., & Liu, J. (2024). Bacteria-based drug delivery for treating non-oncological diseases. *Journal of Controlled Release*, 366, 668-683.
- Cappio Barazzone, E., Diard, M., Hug, I., Larsson, L., & Slack, E. (2024). Diagnosing and engineering gut microbiomes. *EMBO Molecular Medicine*, 16, 2660-2677.
- Carter, M., Alford, B., Curtis, D., Phillips, A., Patri, A., & Akum, F. (2024). Genome edited microbes for improved fungicidal and bactericidal activity. Patent Application WO 2024/168284 A1. <https://www.lens.org/lens/patent/188-471-054-174-612>
- Cass, J., Barnard, A., & Fairhead, H. (2021). Engineered bacteriophage as a delivery vehicle for antibacterial protein, SASP. *Pharmaceuticals*, 14(10), 1038.

CFIA (2024). Registered Products List. Canadian Food Inspection Agency. https://active.inspection.gc.ca/scripts/database/fereng_manusubmit.asp?lang=e&CName=138&TCategory=1

Cha, S., Cho, K., Lim, N., Oh, H., Choi, E., Shim, S., ... & Hahn, J. S. (2025). Enhancement of fermentation traits in industrial Baker's yeast for low or high sugar environments. *Food Microbiology*, 125, 104643.

Chan, B., Nuismer, S. L., Alqirbi, H., Nichols, J., Remien, C. H., Davison, A. J., ... & Redwood, A. J. (2024). Fine-tuning the evolutionary stability of recombinant herpesviral transmissible vaccines. *Proceedings B*, 291(2034), 20241827.

Chang, P. K. (2024). Creating large chromosomal segment deletions in *Aspergillus flavus* by a dual CRISPR/Cas9 system: Deletion of gene clusters for production of aflatoxin, cyclopiazonic acid, and ustiloxin B. *Fungal Genetics and Biology* 170: 103863.

Charoonart, P., Worakajit, N., Zedler, J. A., Meetam, M., Robinson, C., & Saksmerprome, V. (2019). Generation of microalga *Chlamydomonas reinhardtii* expressing shrimp antiviral dsRNA without supplementation of antibiotics. *Scientific Reports*, 9(1), 3164.

Chemla, Y., Sweeney, C. J., Wozniak, C. A., & Voigt, C. A. (2024). Engineering bacteria for environmental release: Regulatory challenges and design strategies. *Authorea Preprints*.

Chen, O. (2020). Transgenic microalgae and use thereof as a feed for delivery of interfering RNA molecules. US Patent No. 10781447. <https://www.lens.org/lens/patent/122-451-399-411-967/fulltext>

Chen, B. C., & Lin, H. Y. (2022). Deletion of NTH1 and HSP12 increases the freeze-thaw resistance of baker's yeast in bread dough. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 149.

Chen, Z., Jin, W., Hoover, A., Chao, Y., & Ma, Y. (2023). Decoding the microbiome: advances in genetic manipulation for gut bacteria. *Trends in Microbiology*, 31(11), 1143-1161.

Chin, Y. W., Kang, W. K., Jang, H. W., Turner, T. L., & Kim, H. J. (2016). CAR1 deletion by CRISPR/Cas9 reduces formation of ethyl carbamate from ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(11), 1517-1525.

Chong, C., Mohammad Rashedi, I., Christianus, A., De Cruz, C., , Lai, K., Abd Halid, N., Ng, H., Nan, F. & Chang, J. (2024). Astaxanthin-expressing yeast as feed additive for aquaculture. Patent Application WO 2024/151157 A2. <https://www.lens.org/lens/patent/005-470-754-279-641/fulltext?l=en>

Chua, K. J., Ling, H., Hwang, I. Y., Lee, H. L., March, J. C., Lee, Y. S., & Chang, M. W. (2022). An engineered probiotic produces a type III interferon IFNL1 and reduces inflammations in in vitro inflammatory bowel disease models. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 9(9), 5123-5135.

Citorik, R. J., Mimee, M., & Lu, T. K. (2014). Sequence-specific antimicrobials using using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nature Biotechnology* 32(11): 1141-1145.

COGEM (2022). Generic downscaling of containment requirements for work with viral replicons derived from alphaviruses and flaviviruses. <https://cogem.net/app/uploads/2023/03/221223-01-Generic-advice-on-alphavirus-and-flavivirus-replicons.pdf>

COGEM (2024). Advice on the decision by the European Commission on the GMO status of viral replicon particles. <https://cogem.net/en/publication/advice-on-the-decision-by-the-european-commission-on-the-gmo-status-of-viral-replicon-particles/>

Collins, M., Lau, M. B., Ma, W., Shen, A., Wang, B., Cai, S., ... & Qi, L. S. (2024). A frugal CRISPR kit for equitable and accessible education in gene editing and synthetic biology. *Nature Communications*, 15(1), 6563.

Comes, J. D., Pijlman, G. P., & Hick, T. A. (2023). Rise of the RNA machines—self-amplification in mRNA vaccine design. *Trends in Biotechnology*, 41(11), 1417-1429.

Conforti, A., Salvatori, E., Lione, L., Compagnone, M., Pinto, E., ... & Aurisicchio, L. (2022). Linear DNA amplicons as a novel cancer vaccine strategy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 41(1), 195.

Cottingham, E., Johnstone, T., Vaz, P. K., Hartley, C. A., & Devlin, J. M. (2024). Construction and in vitro characterisation of virus-vectored immunocontraceptive candidates derived from felid alphaherpesvirus 1. *Vaccine*, 42(22), 125999.

- Craig, J. (2022). The controversial quest to make a 'contagious' vaccine. <https://www.nationalgeographic.com/science/article/the-controversial-quest-to-make-a-contagious-vaccine>
- Cramer, J., Anthony, L., & Hong, S.-P. (2021). Improved yeasts for brewing. Patent Application WO 2021/163439 A1. <https://www.lens.org/lens/patent/126-815-888-345-542>
- Coenye, T. (2019). Uncoupling virulence and biocontrol. *Nature Microbiology*, 4(6), 908-909.
- Cubillos-Ruiz, A., Alcantar, M. A., Donghia, N. M., Cárdenas, P., Avila-Pacheco, J., & Collins, J. J. (2022). An engineered live biotherapeutic for the prevention of antibiotic-induced dysbiosis. *Nature Biomedical Engineering*, 6(7), 910-921.
- Cui, Y., & Qu, X. (2024). CRISPR-Cas systems of lactic acid bacteria and applications in food science. *Biotechnology Advances*, 108323.
- Cui, L., Watanabe, S., Miyanaga, K., Kiga, K., Sasahara, T., Aiba, Y., ... & Wannigama, D. L. (2024). A comprehensive review on phage therapy and phage-based drug development. *Antibiotics*, 13(9), 870.
- CTNBio (2024). Produtos Avaliados – Técnicas Inovadoras de Melhoria de Precisão. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. <http://ctnbio.mctic.gov.br/documents/566529/2304555/Tabela+TIMP/8c4a7218-f810-405b-94bf-a352d849f3dc?version=1.17>
- Dal Bello, F., Bocquet, L., Bru, A., Laulund, S., Machielsen, R., Raneri, M., ... & Rusek, J. (2024). New Genomic Techniques applied to food cultures: a powerful contribution to innovative, safe, and sustainable food products. *FEMS Microbiology Letters*, 371, fnae010.
- Das, T., Prasad, A., & Dey, A. (2023a). Mycoviral gene-incorporating phytopathogenic fungi: a biocontrol agent. *Trends in Plant Science* 28(8): 864-866.
- Das, A., Das, S., Das, N., Pandey, P., Ingti, B., Panchenko, V., ... & Pandey, P. (2023b). Advancements and innovations in harnessing microbial processes for enhanced biogas production from waste materials. *Agriculture*, 13(9), 1689.
- Dedrick, R. M., Guerrero-Bustamante, C. A., Garlena, R. A., Russell, D. A., Ford, K., Harris, K., ... & Spencer, H. (2019). Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nature Medicine*, 25(5), 730-733.
- Defez, R., Andreozzi, A., Dickinson, M., Charlton, A., Tadini, L., Pesaresi, P., & Bianco, C. (2017). Improved drought stress response in alfalfa plants nodulated by an IAA over-producing *Rhizobium* strain. *Frontiers in Microbiology* 8: 2466.
- Dekham, K., Jitrakorn, S., Charoonnart, P., Isarangkul, D., Chaturongakul, S., & Saksmerprome, V. (2022). Probiotics expressing double-stranded RNA targeting VP28 efficiently protect shrimps from WSSV infection. *Aquaculture Reports*, 23, 101067.
- Demirer, G. S., Zhang, H., Matos, J. L., Goh, N. S., Cunningham, F. J., Sung, Y., ... & Landry, M. P. (2019). High aspect ratio nanomaterials enable delivery of functional genetic material without DNA integration in mature plants. *Nature Nanotechnology* 14(5): 456-464.
- Deutscher Bundestag (2023). Schriftliche Frage: Zulassung mRNA-basierte Impfstoffe oder Therapeutika für lebensmittelliefernde Tiere in der EU. <https://dip.bundestag.de/vorgang/zulassung-mrna-basierte-impfstoffe-oder-therapeutika-fuer-lebensmittelliefernde-tiere-in-der/299550>
- Dey, S., & Sankaran, S. (2024). Engineered bacterial therapeutics with material solutions. *Trends in Biotechnology*, 42(12), 1663-1676.
- DiCarlo, J. E., Chavez, A., Dietz, S. L., Esvelt, K. M., & Church, G. M. (2015). Safeguarding CRISPR-Cas9 gene drives in yeast. *Nature Biotechnology*, 33(12), 1250-1255.
- Dolezel, M., Lang, A., Greiter, A., Eckerstorfer, M., Greiter, A., Miklau, & M., Heissenberger, A. (2024a). Genome Editing. Neue Anforderungen an das Monitoring von Umweltwirkungen. *BfN-Schriften* 711. <https://bfn.bsz-bw.de/frontdoor/deliver/index/docId/1833/file/Schrift711.pdf>

- Dolezel, M., Lang, A., Greiter, A., Miklau, M., Eckerstorfer, M., Heissenberger, A., ... & Züghart, W. (2024b). Challenges for the post-market environmental monitoring in the European Union imposed by novel applications of genetically modified and genome-edited organisms. *BioTech*, 13(2), 14.
- Dorado-Morales, P., Lambérioux, M., & Mazel, D. (2024). Unlocking the potential of microbiome editing: a review of conjugation-based delivery. *Molecular Microbiology*, 122(3), 273-283.
- Dundas, C. M., & Dinneny, J. R. (2022). Genetic circuit design in rhizobacteria. *BioDesign Research*. Article ID: 9858049
- Eckerstorfer, M. F., Dolezel, M., Miklau, M., Greiter, A., Heissenberger, A., & Engelhard, M. (2024). Scanning the horizon for environmental applications of genetically modified viruses reveals challenges for their environmental risk assessment. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(3), 1507.
- EFSA (2013). Scientific advice on the suitability of data for the assessment of DNA integration into the fish genome of a genetically modified DNA plasmid-based veterinary vaccine. *EFSA Journal*, 11(5), 3232.
- EFSA (2017a). Assessment of the potential integration of the DNA plasmid vaccine CLYNAV into the salmon genome. *EFSA Journal*, 15(1), e04689.
- EFSA (2017b). Application EFSA-Q-2007-157b. European Food Safety Authority. <https://open.efsa.europa.eu/questions/EFSA-Q-2007-157b>
- EFSA (2019). Application EFSA-Q-2007-156b. European Food Safety Authority. <https://open.efsa.europa.eu/questions/EFSA-Q-2007-156b>
- EFSA (2020). Application EFSA-Q-2020-00397. European Food Safety Authority. <https://open.efsa.europa.eu/questions/EFSA-Q-2020-00397>
- EFSA Scientific Committee, More, S., Bampidis, V., Benford, D., Bragard, C., Halldorsson, T., ... & Cocconcelli, P. S. (2022). Evaluation of existing guidelines for their adequacy for the food and feed risk assessment of microorganisms obtained through synthetic biology. *EFSA Journal*, 20(8), e07479.
- EFSA (2024a). Application EFSA-Q-2023-00484. European Food Safety Authority. <https://open.efsa.europa.eu/questions/EFSA-Q-2023-00484>
- EFSA (2024b). New developments in biotechnology applied to microorganisms. *EFSA Journal*, 22(7), e8895.
- Enzing, C., Nooijen, A., Eggink, G., Springer, J., & Wijffels, R. (2012). Algae and genetic modification: Research, production and risks. The Netherlands Commission on Genetic Modification. <https://cogem.net/app/uploads/2019/07/CGM-2012-05-Algae-and-genetic-modification-research-production-and-risks1-2.pdf>
- Ergün, D., Tartar, G., & Yazgan-Karataş, A. (2024). *B. subtilis* probiotics for humans, animals and plants: Mechanisms, applications and prospects. <https://www.intechopen.com/online-first/1202416>
- Erpel, F., Restovic, F., & Arce-Johnson, P. (2016). Development of phytase-expressing *Chlamydomonas reinhardtii* for monogastric animal nutrition. *BMC Biotechnology*, 16, 1-7.
- Etesami, H., & Glick, B. R. (2024). Bacterial indole-3-acetic acid: A key regulator for plant growth, plant-microbe interactions, and agricultural adaptive resilience. *Microbiological Research*, 127602.
- Fajardo, C., De Donato, M., Macedo, M., Charoonart, P., Saksmerprome, V., Yang, L., ... & Costas, B. (2024). RNA Interference Applied to Crustacean Aquaculture. *Biomolecules*, 14(11), 1358.
- Faltus, T. (2024). The medicinal phage – Regulatory roadmap for phage therapy under EU pharmaceutical legislation. *Viruses*, 16(3), 443.
- FAS (2024). Agricultural Biotechnology Annual – Brazil. USDA-Foreign Agricultural Service. https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Agricultural%20Biotechnology%20Annual_Brasilia_Brazil_BR2024-0030
- Fazel, F., Doost, J. S., Raj, S., Boodhoo, N., Karimi, K., & Sharif, S. (2024). The mRNA vaccine platform for veterinary species. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 274, 110803.
- FDA (2017). GRAS Notice No. AGRN 20. Food and Drug Administration, USA. <https://www.fda.gov/media/105922/download>

FDA (2019a). *Saccharomyces cerevisiae* expressing L-lactate dehydrogenase from *Rhizopus oryzae*. GRAS Notice No. 841. <https://www.fda.gov/media/134782/download>

FDA (2019b). *Saccharomyces cerevisiae* strain yBBS002 for use as a starter culture for brewing beer in accordance with good manufacturing practice. GRAS Notice No. 798 <https://www.fda.gov/media/131847/download>

FDA (2019c). GRAS Notice No. AGRN 26. Food and Drug Administration, USA. <https://www.fda.gov/media/120258/download>

FDA (2020). GRAS Notice No. AGRN 33. Food and Drug Administration, USA. <https://www.fda.gov/media/140271/download>

FDA (2023a). *Saccharomyces cerevisiae* strain BY-989 expressing a gene encoding a carbon-sulfur lyase from *Citrobacter freundii*. GRAS Notice No. 1094 <https://www.fda.gov/media/182778/download>

FDA (2023b). *Saccharomyces cerevisiae* strain OYR-185. GRAS Notice No. 1062. <https://www.fda.gov/media/169394/download>

FDA (2023c). *Saccharomyces cerevisiae* strain OYR-243. GRAS Notice No. 1096. <https://www.fda.gov/media/170675/download>

FDA (2023d). GRAS Notice No. GRN 001095. <https://www.fda.gov/media/175247/download>

Feng, Y., Su, C., Mao, G., Sun, B., Cai, Y., Dai, J., & Ma, Y. (2024). When synthetic biology meets medicine. *Life Medicine*, 3(1), Inae010.

Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 15(10), 579-590.

Fletcher, R. (2020). Could DNA vaccines offer fresh hope for global aquaculture? The Fish Site. <https://thefishsite.com/articles/could-dna-vaccines-offer-fresh-hope-for-global-aquaculture>

Florea, S., Jaromczyk, J., & Schardl, C. L. (2021). Non-transgenic CRISPR-mediated knockout of entire ergot alkaloid gene clusters in slow-growing asexual polyploid fungi. *Toxins*, 13(2), 153.

FOE (2023). Genetically engineered soil microbes: risks and concerns. Friends of the Earth. https://foe.org/wp-content/uploads/2023/08/GE_Microbes_Report_Final.pdf

Foss, G. S., & Rogne, S. (2003). Gene medication or genetic modification? The devil is in the details. *Nature Biotechnology*, 21(11), 1280-1281.

Fox, A. (2019). Viruses genetically engineered to kill bacteria rescue girl with antibiotic-resistant infection. <https://www.science.org/content/article/viruses-genetically-engineered-kill-bacteria-rescue-girl-antibiotic-resistant-infection>

French, K. E., Zhou, Z., & Terry, N. (2020). Horizontal 'gene drives' harness indigenous bacteria for bioremediation. *Scientific Reports*, 10(1), 15091.

Frusteri Chiacchiera, A., Casanova, M., Bellato, M., Piazza, A., Migliavacca, R., Batt, G., ... & Pasotti, L. (2024). Harnessing CRISPR interference to re-sensitize laboratory strains and clinical isolates to last resort antibiotics. *bioRxiv*, 2024-07.

Fuenzalida, G., Timmermann, T., Traag, B., Lina, L. E. O. N., Pandey, N., & Singh, R. (2022). Compositions and methods for producing bicarbonate and minerals. Patent Application WO 2022/087289 A1. www.lens.org/lens/patent/137-579-502-211-38X

Gangaiah, D. M., Kumar, A., & Mane, S. P. (2024). Genetically modified *Bacillus subtilis* strain and use as a live delivery and production system. Patent Application WO 2023/049155 A1. <https://www.lens.org/lens/patent/100-912-691-081-492>

Gao, Z., Wu, J., Jiang, D., Xie, J., Cheng, J., & Lin, Y. (2020). ORF I of mycovirus SsNSRV-1 is associated with debilitating symptoms of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Viruses* 12(4): 456.

Garbisu, C., Garaiurrebaso, O., Epelde, L., Grohmann, E., & Alkorta, I. (2017). Plasmid-mediated bioaugmentation for the bioremediation of contaminated soils. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1966.

- Gencay, Y. E., Jasinskytė, D., Robert, C., Semsey, S., Martínez, V., Petersen, A. Ø., ... & Sommer, M. O. A. (2024). Engineered phage with antibacterial CRISPR–Cas selectively reduce *E. coli* burden in mice. *Nature Biotechnology*, 42(2), 265-274.
- General Probiotics (2023). Live therapeutics for the prevention and control of necrotic enteritis association with *Clostridia perfringens* in chickens. <https://portal.nifa.usda.gov/web/crisprojectpages/1024013-live-therapeutics-for-prevention-and-control-of-necrotic-enteritis-associated-with-clostridia-perfringens-in-poultry.html>
- Ghorbanpour, M., Omidvari, M., Abbaszadeh-Dahaji, P., Omidvar, R., & Kariman, K. (2018). Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. *Biological Control*, 117, 147-157.
- Gibson, L. (2019). Alcohol School moves to the lab, addresses yeast modification. *Ethanol Producer Magazine*. <https://ethanolproducer.com/articles/alcohol-school-moves-to-the-lab-addresses-yeast-modification-16531>
- Ginkgo Bioworks (2023). Biologicals for carbon sequestration: Product headstart. <https://www.ginkgobioworks.com/wp-content/uploads/2023/07/Ginkgo-Bioworks-Biologicals-for-Carbon-Sequestration-Product-Headstart.pdf>
- Gleba, Y. Y., Tusé, D., & Giritich, A. (2013). Plant viral vectors for delivery by *Agrobacterium*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 375, 155-192.
- Gohl, D. (2023). RNA interference (RNAi) for targeted control of invasive zebra mussels. Department of Defense. <https://serdp-estcp.mil/projects/details/de4d357b-4060-4aba-8729-2ec01508ec48/rna-interference-rnai-for-targeted-control-of-invasive-zebra-mussels>
- Gómez-Tatay, L., & Hernández-Andreu, J. M. (2024). Xenobiology for the Biocontainment of Synthetic Organisms: Opportunities and Challenges. *Life*, 14(8), 996.
- González-Morales, S. I., Pacheco-Gutiérrez, N. B., Ramírez-Rodríguez, C. A., Brito-Bello, A. A., Estrella-Hernández, P., Herrera-Estrella, L., & López-Arredondo, D. L. (2020). Metabolic engineering of phosphite metabolism in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 as an effective measure to control biological contaminants in outdoor raceway ponds. *Biotechnology for Biofuels*, 13, 1-19.
- Greene, A. C. (2018). CRISPR-based antibacterials: transforming bacterial defense into offense. *Trends in Biotechnology* 36(2): 127-130.
- Griffiths, M. E., Meza, D. K., Haydon, D. T., & Streicker, D. G. (2023). Inferring the disruption of rabies circulation in vampire bat populations using a betaherpesvirus-vectored transmissible vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(11), e2216667120.
- Grinstein, J. D. (2021). Bacteriophage to the future: insight from the third bacteriophage therapy summit. *Phage*, 2(2), 75.
- Gulig, P., Swindle, S., Fields, M., & Eisenman, D. (2024). A review of clinical trials involving genetically modified bacteria, bacteriophages and their associated risk assessments. *Applied Biosafety*, 29(4), 186-206.
- Guo, J., Xie, Y., Yu, Z., Meng, G., & Wu, Z. (2019). Effect of *Lactobacillus plantarum* expressing multifunctional glycoside hydrolases on the characteristics of alfalfa silage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 7983-7995.
- Gurbatri, C. R., Radford, G. A., Vrbanac, L., Im, J., Thomas, E. M., Coker, C., ... & Danino, T. (2024). Engineering tumor-colonizing *E. coli* Nissle 1917 for detection and treatment of colorectal neoplasia. *Nature Communications*, 15(1), 646.
- Hajjahmadi, Z., Shirzadian-Khorramabad, R., Kazemzad, M., & Sohani, M. M. (2019). Enhancement of tomato resistance to *Tuta absoluta* using a new efficient mesoporous silica nanoparticle-mediated plant transient gene expression approach. *Scientia Horticulturae*, 243, 367-375.
- Halter, M. C., & Zahn, J. A. (2017). Degradation and half-life of DNA present in biomass from a genetically-modified organism during land application. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44(2), 213-220.
- Hao, Y., Shaukat, A., Shen, M., Ren, S., & Huang, Z. (2015). Construction of *Isaria fumosorosea* blastospore-transforming system by *Agrobacterium*-mediated transformation with benomyl-resistance gene. *Pakistan Journal of Zoology*, 47(4), 943-951.

- Hao, M., He, Y., Zhang, H., Liao, X. P., Liu, Y. H., Sun, J., ... & Chen, L. (2020). CRISPR-Cas9-mediated carbapenemase gene and plasmid curing in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(9), 10-1128.
- Harishchandra, D. L., Chethana, K. W. T., Zhang, W., Xing, Q. K., Peng, J. B., Brooks, S., ... & Li, X. H. (2021). CRISPR/Cas9: contemporary designer nucleases for efficient genome editing in phytopathogenic fungi. *Curr Res Environ Appl Mycology (J Fungal Biol)*, 11, 341-63.
- Hassan-Casarez, C., Ryan, V., Shuster, B. M., Oliver, J. W., & Abbott, Z. D. (2024). Engineering a probiotic *Bacillus subtilis* for acetaldehyde removal: A hag locus integration to robustly express acetaldehyde dehydrogenase. *PLoS One*, 19(11), e0312457.
- Health Canada (2024). Novel Food: Sourvisiae. <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/genetically-modified-foods-other-novel-foods/approved-products/sourvisiae/document.html>
- Hendriks, T., Duan, Y. I., Wang, Y., Oh, J. H., Alexander, L. M., Huang, W., ... & Schnabl, B. (2019). Bacteria engineered to produce IL-22 in intestine induce expression of REG3G to reduce ethanol-induced liver disease in mice. *Gut*, 68(8), 1504-1515.
- Hick, T. A., Geertsema, C., Nguyen, W., Bishop, C. R., van Oosten, L., Abbo, S. R., ... & Pijlman, G. P. (2024). Safety concern of recombination between self-amplifying mRNA vaccines and viruses is mitigated in vivo. *Molecular Therapy*, 32(8), 2519-2534.
- Hillman, J.D., Smith, J.L. & Wilson-Stanford, S.R. (2015). Replacement therapy for dental caries. US 2015/0044146 A1. <https://www.lens.org/lens/patent/008-986-885-313-13X>
- Hølvold, L. B., Myhr, A. I., & Dalmo, R. A. (2014). Strategies and hurdles using DNA vaccines to fish. *Veterinary research*, 45, 1-11.
- Hsu, B. B., Plant, I. N., Lyon, L., Anastassacos, F. M., Way, J. C., & Silver, P. A. (2020). In situ reprogramming of gut bacteria by oral delivery. *Nature Communications*, 11(1), 5030.
- Hu, M., & Scott, C. (2024). Toward the development of a molecular toolkit for the microbial remediation of per- and polyfluoroalkyl substances. *Applied and Environmental Microbiology*, 90(4), e00157-24.
- Huang, A., Nguyen, P. Q., Stark, J. C., Takahashi, M. K., Donghia, N., Ferrante, T., ... & Collins, J. J. (2018). BioBits™ Explorer: A modular synthetic biology education kit. *Science Advances*, 4(8), eaat5105.
- Huang, Q., Lariviere, P. J., Powell, J. E., & Moran, N. A. (2023). Engineered gut symbiont inhibits microsporidian parasite and improves honey bee survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(25), e2220922120.
- Hussain, W., Yang, X., Ullah, M., Wang, H., Aziz, A., Xu, F., ... & Wang, S. (2023). Genetic engineering of bacteriophages: Key concepts, strategies, and applications. *Biotechnology Advances*, 64, 108116.
- iGEM (2023). Biofilm for metal corrosion prevention. <https://2023.igem.wiki/neu-china/human-practices>
- iGEM (2024). V.E.S.P.A. <https://2024.igem.wiki/unilausanne/team>
- iGEM Lund (2024). Methane ReMOOver. <https://2024.igem.wiki/lund/>
- Ilg, T. (2020). The immunostimulator Victrio activates chicken toll-like receptor 21. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 220, 109977.
- Ingle, K. P., & Padole, D. A. (2017). Phosphate solubilizing microbes: An overview. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(1), 844-852.
- Jacoblinnert, K., Jacob, J., Zhang, Z., & Hinds, L. A. (2022). The status of fertility control for rodents – recent achievements and future directions. *Integrative Zoology*, 17(6), 964-980.
- Jacobus, A. P., Gross, J., Evans, J. H., Ceccato-Antonini, S. R., & Gombert, A. K. (2021). *Saccharomyces cerevisiae* strains used industrially for bioethanol production. *Essays in Biochemistry*, 65(2), 147-161.
- James, J. S., Dai, J., Chew, W. L., & Cai, Y. (2024). The design and engineering of synthetic genomes. *Nature Reviews Genetics*, 1-22.

- Jang, Y. J., Seo, S. O., Kim, S. A., Li, L., Kim, T. J., Kim, S. C., ... & Han, N. S. (2017). Elimination of the cryptic plasmid in *Leuconostoc citreum* by CRISPR/Cas9 system. *Journal of Biotechnology*, 251, 151-155.
- Jing, X., Cui, Q., Li, X., Yin, J., Ravichandran, V., Pan, D., ... & Zhang, Y. (2020). Engineering *Pseudomonas protegens* Pf-5 to improve its antifungal activity and nitrogen fixation. *Microbial Biotechnology* 13(1): 118-133.
- Johnson, B. (2023). Microbiome-friendly phages join the campaign for better antimicrobials. *Nature Biotechnology*, 41, 435-440.
- Jones, S. W., Karpol, A., Friedman, S., Maru, B. T., & Tracy, B. P. (2020). Recent advances in single cell protein use as a feed ingredient in aquaculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 61, 189-197.
- Jung, J. Y., Kang, M. J., Hwang, H. S., Baek, K. R., & Seo, S. O. (2022). Reduction of ethyl carbamate in an alcoholic beverage by CRISPR/Cas9-based genome editing of the wild yeast. *Foods*, 12(1), 102.
- Jung, J. K., Rasor, B. J., Rybnicky, G. A., Silverman, A. D., Standeven, J., Kuhn, R., ... & Jewett, M. C. (2023). At-home, cell-free synthetic biology education modules for transcriptional regulation and environmental water quality monitoring. *ACS Synthetic Biology*, 12(10), 2909-2921.
- Kamm, C., & Beisel, C. L. (2024). Phages to the rescue: in situ editing of the gut microbiota. *Trends in Microbiology*, 32(10), 934-935.
- Kandhol, N., Singh, V. P., Herrera-Estrella, L., Tran, L. S. P., & Tripathi, D. K. (2023). Nanocarrier spray: a nontransgenic approach for crop engineering. *Trends in Plant Science*, 28(3), 259-261.
- Kaur, A., & Upadhyay, S. K. (2022). Agricultural applications of engineered microbes. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 363-375). Elsevier.
- Kaznessis, Y. J., Kruziki, K. G., & Sidiropoulos, D. N. (2021). Compositions including probiotic bacteria for the expression and secretion of enterocins to control clostridia perfringens-induced necrotic enteritis in livestock and related methods. Patent Application WO 2021/154872 A1. <https://www.lens.org/lens/patent/071-389-033-239-661/>
- Kaznessis, D., Kruziki, K., & Morris, S. (2024). Antimicrobial recombinant live products and methods. Patent Application WO 2024/006835 A1. <https://www.lens.org/lens/patent/003-216-636-952-632/>
- Ke, Z., Wang, S., Zhu, W., Zhang, F., Qiao, W., ... & Chen, K. (2022). Genetic bioaugmentation with triclocarban-catabolic plasmid effectively removes triclocarban from wastewater. *Environmental Research*, 214, 113921.
- Kerr, A., & Bullard, G. (2020). Biocontrol of crown gall by *Rhizobium rhizogenes*: challenges in biopesticide commercialisation. *Agronomy*, 10(8), 1126.
- Khan, M. S., Rizvi, A., Ahmed, B., & Lee, J. (2022). Phosphate biofertilizers: Recent trends and new perspectives. *Trends of Applied Microbiology for Sustainable Economy*, 421-461.
- Kiga, K., Tan, X. E., Ibarra-Chávez, R., Watanabe, S., Aiba, Y., Sato'o, Y., ... & Cui, L. (2020). Development of CRISPR-Cas13a-based antimicrobials capable of sequence-specific killing of target bacteria. *Nature Communications*, 11(1), 2934.
- Kim, D., & Lee, J. W. (2020). Genetic biocontainment systems for the safe use of engineered microorganisms. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 25: 974-984.
- Kim, P., Sanchez, A. M., Penke, T. J., Tuson, H. H., Kime, J. C., McKee, R. W., ... & Garofolo, P. M. (2024). Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of LBP-EC01, a CRISPR-Cas3-enhanced bacteriophage cocktail, in uncomplicated urinary tract infections due to *Escherichia coli* (ELIMINATE): the randomised, open-label, first part of a two-part phase 2 trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 24(12), 1319-1332.
- Knödseder, N., Fábrega, M. J., Santos-Moreno, J., Manils, J., Toloza, L., Marín Vilar, M., ... & Güell, M. (2024). Delivery of a sebum modulator by an engineered skin microbe in mice. *Nature Biotechnology*, 42, 1661-1666.
- Koch, L. (2022). CRISPR editing within microbial communities. *Nature Reviews Genetics*, 23(2), 72-72.
- König, H. & Sauter, A. (2023). Bakteriophagen in Medizin, Land- und Lebensmittelwirtschaft – Anwendungsperspektiven, Innovations- und Regulierungsfragen. Büro für Technikfolgen-Abschätzung beim Deutschen Bundestag, TAB-Arbeitsbericht Nr. 206. https://www.tab-beim-bundestag.de/projekte_bakteriophagen-in-medizin-land-und-lebensmittelwirtschaft.php

- Kovarik, J. (2022). Method and system for increasing beneficial bacteria and decreasing pathogenic bacteria in the oral cavity. Patent Application US 2022/0257410 A1. <https://www.lens.org/lens/patent/124-947-920-779-407>
- Kozak, M., & Hu, J. (2024). DNA Vaccines: Their formulations, engineering and delivery. *Vaccines*, 12(1), 71.
- Kurkipuro, J., Mierau, I., Wirth, T., Samaranayake, H., Smith, W., Kärkkäinen, H. R., ... & Yrjänheikki, J. (2022). Four in one-Combination therapy using live *Lactococcus lactis* expressing three therapeutic proteins for the treatment of chronic non-healing wounds. *PLoS One*, 17(2), e0264775.
- LAG (2018). Tätigkeitsbericht der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG). https://www.umweltministerkonferenz.de/umlbeschluesse/umlaufBericht2018_24.pdf
- Lang, T. A., Walker, M. E., & Jiranek, V. (2021). Disruption of ECM33 in diploid wine yeast EC1118: cell morphology and aggregation and their influence on fermentation performance. *FEMS Yeast Research*, 21(5), foab044.
- Lang, T. A., Walker, M. E., Boss, P. K., & Jiranek, V. (2022). Effect of 'loss of function' mutation in SER in wine yeast: fermentation outcomes in co-inoculation with non-Saccharomyces. *OENO One*, 56(2), 47-61.
- Lang, H., Wang, H., Wang, H., Zhong, Z., Xie, X., Zhang, W., ... & Zheng, H. (2023). Engineered symbiotic bacteria interfering *Nosema* redox system inhibit microsporidia parasitism in honeybees. *Nature Communications*, 14(1), 2778.
- Langel, S. N., Paim, F. C., Lager, K. M., Vlasova, A. N., & Saif, L. J. (2016). Lactogenic immunity and vaccines for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): Historical and current concepts. *Virus Research*, 226, 93-107.
- Lariviere, P. J., Ashraf, A. Z., Navarro-Escalante, L., Leonard, S. P., Miller, L. G., Moran, N. A., & Barrick, J. E. (2024). One-step genome engineering in bee gut bacterial symbionts. *Mbio*, 15(9), e01392-24.
- Le, T., Sun, C., Chang, J., Zhang, G., & Yin, X. (2022). mRNA vaccine development for emerging animal and zoonotic diseases. *Viruses*, 14(2), 401.
- Lee, Y. G., Kim, B. Y., Bae, J. M., Wang, Y., & Jin, Y. S. (2022). Genome-edited *Saccharomyces cerevisiae* strains for improving quality, safety, and flavor of fermented foods. *Food Microbiology*, 104, 103971.
- LeMieux, J. (2024). Base editing tweaks mouse gut microbiome, in scientific first. *GEN Edge*, 6(1), 626-629.
- LeMieux, J., & Hatfull, G. (2020). Set phages to kill: An interview with Graham Hatfull, PhD. *Phage*, 1(1), 4-9.
- Lenneman, B. R., Fernbach, J., Loessner, M. J., Lu, T. K., & Kilcher, S. (2021). Enhancing phage therapy through synthetic biology and genome engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 68, 151-159.
- Lensch, A., Lindfors, H. A., Duwenig, E., Fleischmann, T., Hjort, C., Kärenlampi, S. O., ... & van Kranenburg, R. (2024). Safety aspects of microorganisms deliberately released into the environment. *EFB Bioeconomy Journal*, 4, 100061.
- Lentzos, F., Rybicki, E. P., Engelhard, M., Paterson, P., Sandholtz, W. A., & Reeves, R. G. (2022a). Eroding norms over release of self-spreading viruses. *Science*, 375(6576), 31-33.
- Lentzos, F., Rybicki, E. P., Engelhard, M., Paterson, P., Sandholtz, W. A., & Reeves, R. G. (2022b). Self-spreading vaccines: Base policy on evidence – Response. *Science*, 375(6587), 1363-1363.
- Leonard, S. P., Perutka, J., Powell, J. E., Geng, P., Richhart, D. D., Byrom, M., ... & Barrick, J. E. (2018). Genetic engineering of bee gut microbiome bacteria with a toolkit for modular assembly of broad-host-range plasmids. *ACS Synthetic Biology*, 7(5), 1279-1290.
- Li, H., & Gao, Y. (2022). Recombinant *Bacillus amyloliquefaciens* realizing exocytosis of alginate lyase and cellulase and application of recombinant *Bacillus amyloliquefaciens*. Patent CN 111206010 A. <https://www.lens.org/lens/patent/187-230-686-435-485/>
- Li, Y., & Peng, N. (2019). Endogenous CRISPR-Cas system-based genome editing and antimicrobials: review and prospects. *Frontiers in Microbiology* 10: 2471.

- Li, L., Li, Z., Yao, W., Zhang, X., Wang, R., Li, P., ... & Liu, K. (2020). Metabolic engineering of *Pseudomonas chlororaphis* Qlu-1 for the enhanced production of phenazine-1-carboxamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(50), 14832-14840.
- Li, T., Li, J., Wang, J., Xue, K. S., Su, X., ... & Jiang, Y. (2024a). The occurrence and management of fumonisin contamination across the food production and supply chains. *Journal of Advanced Research*, 60, 13-26.
- Li, Z., Ren, Y., Li, Z., Zhang, J., Fan, Y., Jiang, G., ... & Wang, F. (2024b). Engineered living biofilm with enhanced metal binding ability for corrosion protection in seawater. *Advanced Functional Materials*, 34(13), 2313120.
- Litteral, V., Migliozi, R., Metzger, D., McPherson, C., & Saldanha, R. (2023). Engineering a cortisol sensing enteric probiotic. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 9(9), 5163-5175.
- Liu, Y., Cao, L., Tan, H., & Zhang, R. (2017). Surface display of ACC deaminase on endophytic *Enterobacteriaceae* strains to increase saline resistance of host rice sprouts by regulating plant ethylene synthesis. *Microbial Cell Factories*, 16, 1-9.
- Liu, X., Yuk, H., Lin, S., Parada, G. A., Tang, T. C., Tham, E., ... & Zhao, X. (2018). 3D printing of living responsive materials and devices. *Advanced Materials*, 30(4), 1704821.
- Liu, Q., Li, J., Zhao, J., Wu, J., & Shao, T. (2019). Enhancement of lignocellulosic degradation in high-moisture alfalfa via anaerobic bioprocess of engineered *Lactococcus lactis* with the function of secreting cellulase. *Biotechnology for Biofuels*, 12, 1-17.
- Liu, L., Yang, D., Zhang, Z., Liu, T., Hu, G., He, M., ... & Peng, N. (2021). High-efficiency genome editing based on endogenous CRISPR-Cas system enhances cell growth and lactic acid production in *Pediococcus acidilactici*. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(20), e00948-21.
- Liu, K., Xing, R., Sun, R., Ge, Y., & Chen, Y. (2022). An accurate and rapid way for identifying food geographical origin and authenticity: editable DNA-traceable barcode. *Foods*, 12(1), 17.
- Liu, S., Lu, H., Zhang, S., Shi, Y., & Chen, Q. (2022b). Phages against pathogenic bacterial biofilms and biofilm-based infections: a review. *Pharmaceutics*, 14(2), 427.
- Liu, H., Wang, H., Liao, X. L., Gao, B., Lu, X., Sun, D., ... & Zhou, Q. (2022c). Mycoviral gene integration converts a plant pathogenic fungus into a biocontrol agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 119(50): e2214096119.
- Loan, T. D., Vickers, C. E., Ayliffe, M., & Luo, M. (2024). β -dicarbonyls facilitate engineered microbial bromoform biosynthesis. *ACS Synthetic Biology*, 13, 1492-1497.
- Lu, B., Lim, J. M., Yu, B., Song, S., Neeli, P., Sobhani, N., ... & Chai, D. (2024). The next-generation DNA vaccine platforms and delivery systems: Advances, challenges and prospects. *Frontiers in Immunology*, 15, 1332939.
- Luo, X., Nanda, S., Zhang, Y., Zhou, X., Yang, C., & Pan, H. (2024). Risk assessment of RNAi-based biopesticides. *New Crops*, 100019.
- Ma, J., Lyu, Y., Liu, X., Jia, X., Cui, F., Wu, X., ... & Yue, C. (2022). Engineered probiotics. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 72.
- Ma, S., Su, T., Lu, X., & Qi, Q. (2024). Bacterial genome reduction for optimal chassis of synthetic biology: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 44(4), 660-673.
- MacKenzie-Lamb, V. A., Jegathese, S. P., & Kwang-Chul, K. W. O. N. (2020). Dna constructs for manufacturing bio-therapeutic polypeptides for use in animal vaccines and therapeutics. US Patent No 10844382 B2. <https://www.lens.org/lens/patent/053-525-123-645-621/>
- Macur, R. (2022). Recombinant fungal strains with reduced levels of mycotoxins. Patent Application US 2022/0315881 A1. <https://www.lens.org/lens/patent/048-165-628-239-584/>
- MAISRC (2024b). RNA interference (RNAi) for targeted control of invasive zebra mussels. Minnesota Aquatic Invasive Species Research Center. <https://maisrc.umn.edu/rna-biocontrol>

- Malcorps, P., De Graeve, S., Souffriau, B., Hagman, A. & Thevelein, J. (2022). Methods of preventing inhibition of flavour production in yeast. Patent Application WO 2023/111343 A1. <https://www.lens.org/lens/patent/137-639-856-242-409>
- Marken, J.P., Maxon, M.E., and Murray, R.M. (2024). Policy recommendations for the regulation of engineered microbes for environmental release. Linde Center for Science, Society, and Policy, Caltech. doi: 10.57959/bgny-v542
- Marquiegui Alvaro, A., Kottara, A., Chacon, M., Brockhurst, M., & Dixon, N. (2024). Genetic bioaugmentation-mediated bioremediation of terephthalate in soil microcosms using an engineered environmental plasmid. *bioRxiv*, 2024-08.
- Marston, J. (2023). BiomEdit lands \$4.5m Bill & Melinda Gates grant to reduce cattle emissions in South Asia and Africa. <https://agfundernews.com/biomedit-lands-4-5m-bill-melinda-gates-grant-to-reduce-cattle-emissions-in-south-asia-and-africa>
- Marston, J. (2024). ZBiotics raises \$12m Series A for its 'proudly GMO' probiotics targeting gut health, hangovers and more. <https://agfundernews.com/zbiotics-raises-12m-series-a-for-its-proudly-gmo-probiotics-targeting-gut-health-hangovers-and-more>
- Mason, A. R. G., Salomon, M. J., Lowe, A. J., & Cavagnaro, T. R. (2023). Microbial solutions to soil carbon sequestration. *Journal of Cleaner Production*, 417, 137993.
- Maston, J. (2024). Enhanced rock weathering with Syntopa, a new startup 'flipping the script' on ag biologics. *AgFunderNews* May 27, 2024. <https://agfundernews.com/enhanced-rock-weathering-101-with-syntopa-a-new-startup-flipping-the-script-on-ag-biologics>
- Mayorga-Ramos, A., Zúñiga-Miranda, J., Carrera-Pacheco, S. E., Barba-Ostria, C., & Guamán, L. P. (2023). CRISPR-Cas-based antimicrobials: design, challenges, and bacterial mechanisms of resistance. *ACS Infectious Diseases* 9(7): 1283-1302.
- McGruddy, R. A., Smeele, Z. E., Manley, B., Masucci, J. D., Haywood, J., & Lester, P. J. (2024). RNA interference as a next-generation control method for suppressing *Varroa destructor* reproduction in honey bee (*Apis mellifera*) hives. *Pest Management Science*, 80(9), 4770-4778.
- Medeiros, L., Nornberg, B., Azevedo, R., Cardoso, A., Rosas, V. T., Tesser, M. B., ... & Marins, L. F. (2023). Dietary addition of recombinant *Bacillus subtilis* expressing a fungal phytase increases phosphorus fixation in muscle of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*, 31(3), 1729-1742.
- Menezes, P. S., Yan, Y., Yang, Y., Mitter, N., Mahony, T. J., & Mody, K. T. (2022). RNAi-based biocontrol of pests to improve the productivity and welfare of livestock production. *Applied Biosciences*, 1(3), 229-243.
- Miklau, M., Burn, S. J., Eckerstorfer, M., Dolezel, M., Greiter, A., Heissenberger, A., ... & Hagen, K. (2024). Horizon scanning of potential environmental applications of terrestrial animals, fish, algae and microorganisms produced by genetic modification, including the use of new genomic techniques. *Frontiers in Genome Editing*, 6, 1376927.
- Mimee, M., Nadeau, P., Hayward, A., Carim, S., Flanagan, S., Jerger, L., ... & Lu, T. K. (2018). An ingestible bacterial-electronic system to monitor gastrointestinal health. *Science*, 360(6391), 915-918.
- Moitra, A., Chakraborty, A., & Dam, B. (2024). CRISPR-Cas9 system: a potent tool to fight antibiotic resistance in bacteria. *The Microbe*, 5, 100184.
- Molina-Espeja, P. (2020). Next generation winemakers: Genetic engineering in *Saccharomyces cerevisiae* for trendy challenges. *Bioengineering*, 7(4), 128.
- Moshitzky, S., Eisenstadt, D., Levi, G., & Chen, O. (2018). Transgenic microalgae and use thereof for oral delivery of proteins. US Patent No. 11,344,590. <https://www.lens.org/lens/patent/057-802-974-468-473/>
- Motta, E. V., & Moran, N. A. (2024). The honeybee microbiota and its impact on health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 22(3), 122-137.
- Mozumdar, D., Csörgő, B., & Bondy-Denomy, J. (2022). Genetic manipulation of a CAST of characters in a microbial community. *The CRISPR Journal*, 5(1), 4-6.

- Mrutu, R. I., Umar, K. M., Abdulhamid, A., Agaba, M., & Abdussamad, A. M. (2023). Microbial engineering to mitigate methane emissions in ruminant livestock – A Review. arXiv preprint arXiv:2307.14372.
- Mulhall, R. (2021). Genetically engineered microorganisms. Patent Application WO 2021/110856 A1. <https://www.lens.org/lens/patent/190-337-863-290-167>
- Mullins, A. J., Murray, J. A., Bull, M. J., Jenner, M., Jones, C., Webster, G., ... & Mahenthiralingam, E. (2019). Genome mining identifies cepacin as a plant-protective metabolite of the biopesticidal bacterium *Burkholderia ambifaria*. *Nature Microbiology*, 4(6), 996-1005.
- Muñoz, I. V., Sarrocco, S., Malfatti, L., Baroncelli, R., & Vannacci, G. (2019). CRISPR-Cas for fungal genome editing: a new tool for the management of plant diseases. *Frontiers in Plant Science*, 10, 135.
- Muñoz, C., González-Lorca, J., Parra, M., Soto, S., Valdes, N., Sandino, A. M., ... & Tello, M. (2021). *Lactococcus lactis* expressing type I interferon from atlantic salmon enhances the innate antiviral immune response in vivo and in vitro. *Frontiers in Immunology*, 12, 696781.
- Muysson, J., Miller, L., Allie, R., & Inglis, D. L. (2019). The use of CRISPR-Cas9 genome editing to determine the importance of glycerol uptake in wine yeast during Icewine fermentation. *Fermentation*, 5(4), 93.
- Nafissi, N., Alqawlaq, S., Lee, E. A., Foldvari, M., Spagnuolo, P. A., & Slavcev, R. A. (2014). DNA ministrings: highly safe and effective gene delivery vectors. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 3.
- Naiel, M. A., Taher, E. S., Rashed, F., Ghazanfar, S., Shehata, A. M., Mohammed, N. A., ... & Shukry, M. (2024). The arsenic bioremediation using genetically engineered microbial strains on aquatic environments: An updated overview. *Heliyon*.
- Naismith, L. (2020). Bioremediation: breaking down the regulations of genetically modified microorganisms. *Texas A&M Law Review*, 8, 607.
- NBAB (2018). The Gene Technology Act – Invitation to Public Debate. The Norwegian Biotechnology Advisory Board. <https://www.bioteknologiradet.no/filarkiv/2010/07/genteknologiloven-engelsk-hele-for-web-v-2.pdf>
- Nevitt Goncalves, T., L. & Neef, D.W. (2024). Recombinant *Chlamydomonas reinhardtii*. Patent Application GB 2627745 A. <https://www.lens.org/lens/patent/123-287-073-501-860>
- Nivala, J. (2020). Follow the barcoded microbes. *Science*, 368(6495), 1058-1059.
- Novo Nordisk (2009). Summary NOVO Yeast Cream (pAK729). <https://open.efsa.europa.eu/questions/EFSA-Q-2007-156b>
- Novozymes (2024). New technology solutions in agriculture: Where can they take the industry? <https://biosolutions.novozymes.com/en/insights/article/new-technology-solutions-agriculture-where-can-they-take-industry-open>
- OGTR (2020). Limited and controlled release of microalgae genetically modified for increased production of fatty acids. Office of the Gene Technology Regulator. Licence Application No. DIR 169. 2020. <https://www1.health.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/DIR169>
- Öhnstedt, E., Lofton Tomenius, H., Frank, P., Roos, S., Vågesjö, E., & Phillipson, M. (2022). Accelerated wound healing in minipigs by on-site production and delivery of CXCL12 by transformed lactic acid bacteria. *Pharmaceutics*, 14(2), 229.
- Okoye, C. O., Wang, Y., Gao, L., Wu, Y., Li, X., Sun, J., & Jiang, J. (2023). The performance of lactic acid bacteria in silage production: A review of modern biotechnology for silage improvement. *Microbiological Research*, 266, 127212.
- Olawade, D. B., Fapohunda, O., Egbon, E., Ebiesuwa, O. A., Usman, S. O., ... & Fidelis, S. C. (2024). Phage therapy: A targeted approach to overcoming antibiotic resistance. *Microbial Pathogenesis*, 197, 107088.
- Pacia, D. M., Brown, B. L., Minssen, T., & Darrow, J. J. (2024). CRISPR-phage antibacterials to address the antibiotic resistance crisis: scientific, economic, and regulatory considerations. *Journal of Law and the Biosciences*, 11(1), Isad030.
- Pagliari, S., Dema, B., Sanchez-Martinez, A., Zurbia-Flores, G. M., & Rollier, C. S. (2023). DNA vaccines: history, molecular mechanisms and future perspectives. *Journal of Molecular Biology*, 435(23), 168297.

- Pandey, P., & Arora, N. K. (2020). Prof. Ananda Mohan Chakrabarty: The Superbug Superhero!. *Environmental Sustainability*, 3, 333-335.
- Pantoja Angles, A., Valle-Pérez, A. U., Hauser, C., & Mahfouz, M. M. (2022). Microbial biocontainment systems for clinical, agricultural, and industrial applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 830200.
- Pasin, F., Menzel, W., & Daròs, J. A. (2019). Harnessed viruses in the age of metagenomics and synthetic biology: an update on infectious clone assembly and biotechnologies of plant viruses. *Plant Biotechnology Journal*, 17(6), 1010-1026.
- Pasin, F., Uranga, M., Charudattan, R., & Kwon, C. T. (2024). Engineering good viruses to improve crop performance. *Nature Reviews Bioengineering*, 2, 532-534
- Patel, J. K., & Archana, G. (2018). Engineered production of 2, 4-diacetylphloroglucinol in the diazotrophic endophytic bacterium *Pseudomonas* sp. WS5 and its beneficial effect in multiple plant-pathogen systems. *Applied Soil Ecology* 124: 34-44.
- Payne, S., Wick, S., Carr, P. A., & Guido, N. J. (2024). A Methodology for the Assessment and Prioritization of Genetic Biocontainment Technologies for Engineered Microbes. *Applied Biosafety* in press
- Pei, L., Garfinkel, M., & Schmidt, M. (2022). Bottlenecks and opportunities for synthetic biology biosafety standards. *Nature Communications*, 13(1), 2175.
- Peng, G., Zhao, X., Li, Y., Wang, R., Huang, Y., & Qi, G. (2019). Engineering *Bacillus velezensis* with high production of acetoin primes strong induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Microbiological Research* 227: 126297.
- Peng, S., Xu, Y., Qu, H., Nong, F., Shu, F., Yuan, G., ... & Zheng, D. (2024). Trojan Horse virus delivering CRISPR-AsCas12f1 controls plant bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Mbio*, 15(8), e00619-24.
- Peraza-Echeverria, S., Bernardo-Candelero, S., Baas-Espinola, F. M., Puch-Hau, C., ... & Herrera-Valencia, V. A. (2021). Production of a ruminal bacterial phytase in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* with potential applications in monogastric animal feed. *Bioresource Technology Reports*, 14, 100660.
- Perreault, M., Means, J., Gerson, E., James, M., Cotton, S., Bergeron, C. G., ... & Hava, D. L. (2024). The live biotherapeutic SYN1353 decreases plasma methionine via directed degradation in animal models and healthy volunteers. *Cell Host & Microbe*, 32(3), 382-395.
- Peters, M., Heinaru, E., Talpsep, E., Wand, H., Stottmeister, U., Heinaru, A., & Nurk, A. (1997). Acquisition of a deliberately introduced phenol degradation operon, pheBA, by different indigenous *Pseudomonas* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4899-4906.
- Petrova, Y. D., Zhao, J., Webster, G., Mullins, A. J., Williams, K., Alswat, A. S., ... & Mahenthalingam, E. (2022). Cloning and expression of Burkholderia polyene biosynthetic gene clusters in Paraburkholderia hosts provides a strategy for biopesticide development. *Microbial Biotechnology*, 15(10), 2547-2561.
- Pham, D. N., Mai, D. H. A., Nguyen, A. D., Chau, T. H. T., & Lee, E. Y. (2022). Development of an engineered methanotroph-based microbial platform for biocatalytic conversion of methane to phytohormone for sustainable agriculture. *Chemical Engineering Journal*, 429, 132522.
- Philippidis, A. (2023). IGI wins \$70 million to study microbiome engineering for health, climate challenges. *Genetic Engineering & Biotechnology News (GEN)* <https://www.genengnews.com/insights/igi-wins-70-million-to-study-microbiome-engineering-for-health-climate-challenges/>
- PSMV (2024). Verordnung über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln. SR 916.161. <https://www.fedlex.admin.ch/eli/cc/2010/340/de>
- Pudney, A., Gandini, C., Economou, C. K., Smith, R., Goddard, P., Napier, J. A., ... & Sayanova, O. (2019). Multifunctionalizing the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* for sustainable co-production of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids and recombinant phytase. *Scientific Reports*, 9(1), 11444.
- Qi, R., Swayambhu, G., Bruno, M., Zhang, G., & Pfeifer, B. A. (2021). Consolidated plasmid design for stabilized heterologous production of the complex natural product siderophore yersiniabactin. *Biotechnology Progress*, 37(2), e3103.

- Qian, J., Lu, Z. X., Mancuso, C. P., Jhuang, H. Y., del Carmen Barajas-Ornelas, R., Boswell, S. A., ... & Springer, M. (2020). Barcoded microbial system for high-resolution object provenance. *Science*, 368(6495), 1135-1140.
- Quan, M., Peng, J., Zhu, Z., Zhou, P., Luo, S., Xie, J., ... & Ding, X. (2020). Construction of a conditionally asporogenous *Bacillus thuringiensis* recombinant strain overproducing cry protein by deletion of the leuB gene. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1769.
- Ragland, C. J., Shih, K. Y., & Dinneny, J. R. (2024). Choreographing root architecture and rhizosphere interactions through synthetic biology. *Nature Communications*, 15(1), 1370.
- Ramos, C., Molina, L., Ronchel, M. C., MOHN, S., & Ramos, J. L. (1997). Field release of biologically contained soil bacteria for environmental applications in bioremediation. In *The 4th International Symposium on The Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms. The 3rd JIRCAS International Symposium, Japan International Research Center for Agricultural Sciences* (pp. 21-29).
- Ratcliff, J. D. (2024). Transformer model generated bacteriophage genomes are compositionally distinct from natural sequences. *NAR Genomics and Bioinformatics*, 6(3), lqae129
- Redwood, A. J., Smith, L. M., Lloyd, M. L., Hinds, L. A., Hardy, C. M., & Shellam, G. R. (2007). Prospects for virally vectored immunocontraception in the control of wild house mice. *Wildlife Research*, 34(7), 530-539.
- Reyes, I., Bernier, L., & Antoun, H. (2002). Rock phosphate solubilization and colonization of maize rhizosphere by wild and genetically modified strains of *Penicillium rugulosum*. *Microbial Ecology*, 44, 39-48.
- Ribeiro, I. D. A., Volpiano, C. G., Vargas, L. K., Granada, C. E., ... & Passaglia, L. M. P. (2020). Use of mineral weathering bacteria to enhance nutrient availability in crops: a review. *Frontiers in Plant Science*, 11, 590774.
- Rice, C. F., & Argyros, A. (2024). Beta-glucosidase expressing yeast for enhanced flavor and aroma in beverage production. US Patent 11939557. <https://www.lens.org/lens/patent/044-303-731-517-500/fulltext?l=en>
- Ripp, S., Nivens, D. E., Ahn, Y., Werner, C., Jarrell, J., Easter, J. P., ... & Saylor, G. S. (2000). Controlled field release of a bioluminescent genetically engineered microorganism for bioremediation process monitoring and control. *Environmental Science & Technology*, 34(5), 846-853.
- Rodriguez, H., Gonzalez, T., & Selman, G. (2000). Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. *Journal of Biotechnology*, 84(2), 155-161.
- Roggenkamp, E., Giersch, R. M., Schrock, M. N., Turnquist, E., Halloran, M., & Finnigan, G. C. (2018). Tuning CRISPR-Cas9 gene drives in *Saccharomyces cerevisiae*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(3), 999-1018.
- Rocke, T. E., Kingstad-Bakke, B., Wüthrich, M., Stading, B., Abbott, R. C., Isidoro-Ayza, M., ... & Osorio, J. E. (2019). Virally-vectored vaccine candidates against white-nose syndrome induce anti-fungal immune response in little brown bats (*Myotis lucifugus*). *Scientific Reports*, 9(1), 6788.
- Roper, J. M., Smith, B. L., Caverly Rae, J. M., Huang, E., Walker, C. A., ... & Reidinger, K. S. (2019). Nutrient composition and safety evaluation of simulated isobutanol distillers dried grains with solubles and associated fermentation metabolites when fed to male Ross 708 broiler chickens. *Plos one*, 14(7), e0219016.
- Rouskey, C., & Manofsky, D. (2020). Recombinant yeast as animal feed. Patent Application US 2020/0337336 A1. <https://www.lens.org/lens/patent/096-664-032-973-507>
- Rottinghaus, A. G., Vo, S., & Moon, T. S. (2023). Computational design of CRISPR guide RNAs to enable strain-specific control of microbial consortia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 120(1): e2213154120.
- Rubin, B. E., Diamond, S., Cress, B. F., Crits-Christoph, A., Lou, Y. C., Borges, A. L., ... & Doudna, J. A. (2022). Species- and site-specific genome editing in complex bacterial communities. *Nature Microbiology*, 7(1), 34-47.
- Ruomeng, B., Meihao, O., Siru, Z., Shichen, G., Yixian, Z., ... & Baishan, F. (2023). Degradation strategies of pesticide residue: From chemicals to synthetic biology. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 8(2), 302-313.
- Russell, B. J., Brown, S. D., Siguenza, N., Mai, I., Saran, A. R., Lingaraju, A., ... & Zarrinpar, A. (2022). Intestinal transgene delivery with native *E. coli* chassis allows persistent physiological changes. *Cell*, 185(17), 3263-3277.

- Russell, B. J., Brown, S. D., Siguenza, N., Mai, I., Saran, A. R., Lingaraju, A., ... & Zarrinpar, A. (2022). Intestinal transgene delivery with native *E. coli* chassis allows persistent physiological changes. *Cell*, 185(17), 3263-3277.
- Saghafi, D., Lajayer, B. A., & Ghorbanpour, M. (2020). Engineering bacterial ACC deaminase for improving plant productivity under stressful conditions. In: V. Sharma, R. Salwan, and L. K. Tawfeeq Al-ani (eds), *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture*, Elsevier, pp. 259-277.
- Sandbrink, J. B., Watson, M. C., Hebbeler, A. M., & Esvelt, K. M. (2021). Safety and security concerns regarding transmissible vaccines. *Nature Ecology & Evolution*, 5(4), 405-406.
- Sattayawat, P., Inwongwan, S., Noirungsee, N., Li, J., Guo, J., & Disayathanoowat, T. (2024). Engineering gut symbionts: A way to promote bee growth?. *Insects*, 15(5), 369.
- Sawa, T., Moriyama, K., & Kinoshita, M. (2024). Current status of bacteriophage therapy for severe bacterial infections. *Journal of Intensive Care*, 12(1), 44.
- Sayre, R., & Vinogradava-Shah, T. (2020). Novel system for the biocontrol of pathogens in aquaculture and other animal systems. US Patent No. 10774329 B2. <https://www.lens.org/lens/patent/056-884-503-906-620>
- Sayre, R., Costa-Nunes, P. & Yin, G. (2021). System and methods for engineering bacteria fit for eukaryotic mRNA production, export, and translation in a eukaryotic host. Patent Application US 2021/0292775 A1 <https://www.lens.org/lens/patent/174-375-606-102-687>
- Scheepmaker, J. W. A., Hogervorst, P. A., & Glandorf, D. C. M. (2016). Future introductions of genetically modified microbial biocontrol agents in the EU: Are current EU legislation and risk assessment fit for purpose?. RIVM letter report 2016-0057.
- Schmidt, M., Pei, L., & Budisa, N. (2018). Xenobiology: State-of-the-art, ethics, and philosophy of new-to-nature organisms. *Synthetic Biology–Metabolic Engineering*, 301-315.
- Schmitt, D. S., Siegel, S. D., & Selle, K. (2024). Applications of designer phage encoding recombinant gene payloads. *Trends in Biotechnology*, 42(3), 326-338.
- Schneier, A., Melaugh, G., & Sadler, J. C. (2024). Engineered plastic-associated bacteria for biodegradation and bioremediation. *Biotechnology for the Environment*, 1(1), 7.
- Schuller, D., & Casal, M. (2005). The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 292-304.
- Schwarzer, S. (2019). Putting Carbon back where it belongs - the potential of carbon sequestration in the soil. UNEP Foresight Brief 013. <https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/28453/Foresight013.pdf>
- Sebesta, J., Xiong, W., Guarnieri, M. T., & Yu, J. (2022). Biocontainment of genetically engineered algae. *Frontiers in Plant Science*, 13, 839446.
- Service, R.F. (2024). Synthetic biology, once hailed as a moneymaker, meets tough times. <https://www.science.org/content/article/synthetic-biology-once-hailed-moneymaker-meets-tough-times>
- Shakeel, A. H., Davis, Z. G., Frank, J. T., Zomorodi, S., & Pourtaheri, P. (2019). Compositions and methods for scalable production and delivery of biologicals. Patent Application WO 2019/060903. <https://www.lens.org/lens/patent/080-818-280-564-209>
- Shao, B., & Yan, J. (2024). A long-context language model for deciphering and generating bacteriophage genomes. *Nature Communications*, 15(1), 9392.
- Shapiro, R. S., Chavez, A., Porter, C. B., Hamblin, M., Kaas, C. S., DiCarlo, J. E., ... & Collins, J. J. (2018). A CRISPR–Cas9-based gene drive platform for genetic interaction analysis in *Candida albicans*. *Nature Microbiology*, 3(1), 73-82.
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2, 1-14.
- Sharma, V., Kumar, A., Archana, G., & Kumar, G. N. (2016). Ensifer meliloti overexpressing *Escherichia coli* phytase gene (*AppA*) improves phosphorus (P) acquisition in maize plants. *Science of Nature* 103: 1-10.

- Shimamori, Y., Tan, X. E., Li, F. Y., Nishikawa, Y., Watanabe, S., Sasahara, T., ... & Cui, L. (2024). Efficient synthesis of CRISPR-Cas13a-antimicrobial capsids against MRSA facilitated by silent mutation incorporation. *Scientific Reports*, 14(1), 16225.
- Shrourou, A. (2018). LineaRx signs agreement with Takis/Evvivax to develop linear-DNA based anti-cancer vaccines. *News Medical Life Sciences* <https://www.news-medical.net/news/20180920/LineaRx-signs-agreement-with-TakisEvvivax-to-develop-linear-DNA-based-anti-cancer-vaccines.aspx?showform=printpdf>
- Shulse, C. N., Chovatia, M., Agosto, C., Wang, G., Hamilton, M., Deutsch, S., ... & Blow, M. J. (2019). Engineered root bacteria release plant-available phosphate from phytate. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(18), e01210-19.
- Singh, S. (2016). Role of nonpathogenic fungi in inducing systemic resistance in crop plants against phytopathogens. *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 2: Functional Applications*, 69-83.
- Singh, S., Gaurav, A. K., & Verma, J. P. (2020). Genetically modified microbes for second-generation bioethanol production. *Fungal Biotechnology and Bioengineering*, 187-198.
- SITC (2024). The antimicrobial potential of bacteriophages. Science, Innovation and Technology Committee, UK Parliament. <http://daebl.de/BU98>
- Soboka, G., Kemal, J., & Kefale, M. (2016). Gene therapeutic enhancement of animal health and performance. *Advances in Biological Research*, 10(1), 15-21.
- Song, L., Zhang, D., Liu, T., Jiang, C., Li, B., Li, C., ... & Yang, J. (2024). Non-transgenic, PAMAM co-delivery DNA of interactive proteins NbCRVP and NbCalB endows *Nicotiana benthamiana* with a stronger antiviral effect to RNA viruses. *Journal of Nanobiotechnology* 22(1): 23.
- Sorenson, C., & Adamala, K. P. (2024). Laws of thought in living cells. *Cell*, 187(18), 4830-4832.
- Sprague, M., Betancor, M. B., & Tocher, D. R. (2017). Microbial and genetically engineered oils as replacements for fish oil in aquaculture feeds. *Biotechnology Letters*, 39, 1599-1609.
- Stark, J. C., Huang, A., Nguyen, P. Q., Dubner, R. S., Hsu, K. J., Ferrante, T. C., ... & Jewett, M. C. (2018). BioBits™ Bright: A fluorescent synthetic biology education kit. *Science Advances*, 4(8), eaat5107.
- Stark, J. C., Huang, A., Hsu, K. J., Dubner, R. S., Forbrook, J., Marshalla, S., ... & Jewett, M. C. (2019). BioBits health: classroom activities exploring engineering, biology, and human health with fluorescent readouts. *ACS Synthetic Biology*, 8(5), 1001-1009.
- Streicker, D. G., Bull, J. J., & Nuismer, S. L. (2022). Self-spreading vaccines: Base policy on evidence. *Science*, 375(6587), 1362-1363.
- Strong, L. C., McTavish, H., Sadowsky, M. J., & Wackett, L. P. (2000). Field-scale remediation of atrazine-contaminated soil using recombinant *Escherichia coli* expressing atrazine chlorohydrolase. *Environmental Microbiology*, 2(1), 91-98.
- Srubar, W. V. (2021). Engineered living materials: taxonomies and emerging trends. *Trends in Biotechnology*, 39(6), 574-583.
- Subedi, U., Kader, K., Jayawardhane, K. N., Poudel, H., Chen, G., Acharya, S., ... & Singer, S. D. (2022). The potential of novel gene editing-based approaches in forages and rumen archaea for reducing livestock methane emissions. *Agriculture*, 12(11), 1780.
- Sullivan, C. T., Harman, R. M., Eash, N. S., Zahn, J. A., Goddard, J. J., Walker, F. R., ... & Morrison Jr, J. E. (2017). Utilization of spent microbial biomass as an alternative crop nitrogen source. *Agronomy Journal*, 109(5), 1870-1879.
- Sun, J., Yang, R., Li, Q., Zhu, R., Jiang, Y., Zang, L., ... & Liu, Z. (2024). Living synthelectronics: A New Era for bioelectronics powered by synthetic biology. *Advanced Materials*, 36(25), 2400110.
- Susanti, D., Kumar, A., & Gangaiah, D. (2023). Antimicrobial peptides. Patent Application WO 2023/049162 A1. <https://www.lens.org/lens/patent/129-771-434-687-481>

- Synbiobeta (2019). Living medicines: engineering the microbiome. <https://www.synbiobeta.com/read/living-medicines-engineering-the-microbiome>
- Szyjka, S. J., Mandal, S., Schoepp, N. G., Tyler, B. M., Yohn, C. B., Poon, Y. S., ... & Mayfield, S. P. (2017). Evaluation of phenotype stability and ecological risk of a genetically engineered alga in open pond production. *Algal Research*, 24, 378-386.
- Tang, Y., Wang, C., Wang, F., Li, M., Fang, Y., & Zhao, K. (2022). Development of designer transcription activator-like effector-based plant growth regulator for higher yield in rice. *Frontiers in Plant Science*, 13, 924645.
- Tang, T., Ding, Y., & Guo, W. (2024). Development of an efficient CRISPR/Cas9 system in *Fusarium verticillioides* and its application in reducing mycotoxin contamination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(25), 14229-14240.
- Thagun, C., Horii, Y., Mori, M., Fujita, S., Ohtani, M., Tsuchiya, K., ... & Numata, K. (2022). Non-transgenic gene modulation via spray delivery of nucleic acid/peptide complexes into plant nuclei and chloroplasts. *ACS Nano* 16(3): 3506-3521.
- Thammasorn, T., Jitrakorn, S., Charoonnart, P., Sirimanakul, S., Rattanaojpong, T., Chaturongakul, S., & Saksmerprom, V. (2017). Probiotic bacteria (*Lactobacillus plantarum*) expressing specific double-stranded RNA and its potential for controlling shrimp viral and bacterial diseases. *Aquaculture International*, 25, 1679-1692.
- Therault, S. (2019). Genetically modified bacteriophage. Patent Application WO 2019/140534 A1. <https://www.lens.org/lens/patent/127-371-658-640-943/fulltext>
- Thompson, B. M., Augustin, J., & Siegel, A. (2020). Fusion proteins, recombinant bacteria, and exosporium fragments for plant health. Patent US 2020/0216828. <https://www.lens.org/lens/patent/000-130-565-019-530>
- Torres, J. M., Sánchez, C., Ramírez, M. A., Morales, M., Bárcena, J., Ferrer, J., ... & Sánchez-Vizcaino, J. M. (2001). First field trial of a transmissible recombinant vaccine against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease. *Vaccine*, 19(31), 4536-4543.
- Touchlight (2021). Reshaping the production of DNA-based therapies. <https://www.nature.com/articles/d43747-021-00074-2>
- Toussaint, B., Muñoz Piñeiro, A., & Pirnay, J. P. (2024). Overview and outlook of phage therapy and phage biocontrol. Publications Office of the European Union. JRC135367. <https://data.europa.eu/doi/10.2760/71288>
- Tramontin, L. R. R., Kildegaard, K. R., Sudarsan, S., & Borodina, I. (2019). Enhancement of astaxanthin biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* via microalgal pathway. *Microorganisms*, 7(10), 472.
- Triassi, A. J., Fields, B. D., Monahan, C. E., Means, J. M., Park, Y., Doosthosseini, H., ... & Voigt, C. A. (2023). Redesign of an *Escherichia coli* Nissle treatment for phenylketonuria using insulated genomic landing pads and genetic circuits to reduce burden. *Cell Systems*, 14(6), 512-524.
- Tringe, S. G. (2022). A toolkit for microbial community editing. *Nature Reviews Microbiology*, 20(7), 383-383.
- Turner, P. E., Azeredo, J., Buurman, E. T., Green, S., Haaber, J. K., Haggstrom, D., ... & Portillo, M. A. (2024). Addressing the research and development gaps in modern phage therapy. *Phage*, 5(1), 30-39.
- Tye, J. & Kovarik, J. (2023). Topical application of CRISPR-modified bacteria to treat acne vulgaris. Patent Application US 2023/0218682 A1. <https://www.lens.org/lens/patent/047-713-303-456-554>
- Ugya, A. Y., Sheng, Y., Chen, H., & Wang, Q. (2024). Microalgal bioengineering: a futuristic tool for carbon capture. *Results in Engineering*, 102990.
- Valderrama, J. A., Kulkarni, S. S., Nizet, V., & Bier, E. (2019). A bacterial gene-drive system efficiently edits and inactivates a high copy number antibiotic resistance locus. *Nature Communications*, 10(1), 5726.
- Vallejo, B., Peltier, E., Garrigós, V., Matallana, E., Marullo, P., & Aranda, A. (2020). Role of *Saccharomyces cerevisiae* nutrient signaling pathways during winemaking: a phenomics approach. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 853.

- Van den Akker, H. C. M., & Wassenaar, F. (2012). Potential introduction of unapproved GM animals and GM products in the Netherlands. RIVM Report 609021118. <https://rivm.openrepository.com/server/api/core/bitstreams/ca9dd7f1-06a5-42c4-a5ee-7c1d74f5f14d/content>
- Van der Els, S., James, J. K., Kleerebezem, M., & Bron, P. A. (2018). Versatile Cas9-driven subpopulation selection toolbox for *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(8), e02752-17.
- Van der Meulen, K. & Rüdelsheim, P. (2022). Viral replicon systems and their biosafety aspects –Inventory and description of viral replicon systems and characteristics relevant for risk assessment. COGEM Report CGM 2022-06. <https://cogem.net/app/uploads/2022/12/CGM-2022-06-Viral-replicon-systems-and-their-biosafety-aspects.pdf>
- Van der Meulen, K., Smets, G., & Rüdelsheim, P. (2023). Viral replicon systems and their biosafety aspects. *Applied Biosafety*, 28(2), 102-122.
- Van der Vlugt, C. J. (2020). Horizon scan of synthetic biology developments for microorganisms with application in the agri-Food sector. *EFSA Supporting Publications*, 17(3), 1664E.
- Varrelman, T. J., Remien, C. H., Basinski, A. J., Gorman, S., Redwood, A., & Nuismer, S. L. (2022). Quantifying the effectiveness of betaherpesvirus-vectored transmissible vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(4), e2108610119.
- Vickram, A. S., Shofia, S. I., Palanivelu, J., Karishma, S., Saravanan, A., & Yaashikaa, P. R. (2024). A comprehensive analysis and exploration of the recent developments in the utilization of genetically modified microorganisms for the remediation of hazardous dye pollutants. *Groundwater for Sustainable Development*, 101315.
- Vigentini, I., Gebbia, M., Belotti, A., Foschino, R., & Roth, F. P. (2017). CRISPR/Cas9 system as a valuable genome editing tool for wine yeasts with application to decrease urea production. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2194.
- Vilela, A. (2021). An overview of CRISPR-based technologies in wine yeasts to improve wine flavor and safety. *Fermentation*, 7(1), 5.
- Verhoeven, D. (2023). mRNA vaccines could prevent diseases in farm animals. *Scientific American*. <https://www.scientificamerican.com/article/mrna-vaccines-could-prevent-diseases-in-farm-animals/>
- Voegelé, E. (2024). Argentina approves GM yeasts for ethanol production. *Ethanol Producer Magazine*. <https://ethanolproducer.com/articles/interaction-encouraged-16595>
- Vogel, B. (2022). Do-it-yourself Gentechnik zu Hause. *Zürcher Umweltpraxis ZUP*, 104, 29-30.
- Wagh, J., Chanchal, K., Sonal, S., Praveena, B., Archana, G., & Kumar, G. N. (2016). Inoculation of genetically modified endophytic *Herbaspirillum seropedicae* Z67 endowed with gluconic and 2-ketogluconic acid secretion, confers beneficial effects on rice (*Oriza sativa*) plants. *Plant and Soil*, 409, 51-64.
- Walker, M. E., Zhang, J., Sumbly, K. M., Lee, A., Houlès, A., Li, S., & Jiranek, V. (2021). Sulfate transport mutants affect hydrogen sulfide and sulfite production during alcoholic fermentation. *Yeast*, 38(6), 367-381.
- Walter, M., & Verdin, E. (2020). Viral gene drive in herpesviruses. *Nature Communications*, 11(1), 4884.
- Walter, M., Haick, A. K., Riley, R., Massa, P. A., Strongin, D. E., Klouser, L. M., ... & Verdin, E. (2024). Viral gene drive spread during herpes simplex virus 1 infection in mice. *Nature Communications*, 15(1), 8161.
- Watson, E. (2023). Number 8 Bio raises \$1.2m for novel enteric methane reduction technology. <https://agfundernews.com/breaking-number-8-bio-raises-1-2m-for-novel-enteric-methane-reduction-tech>
- Wan, X., SunKang, Y., Chen, Y., Zhang, Z., Gou, H., Xue, Y., ... & Yang, Y. (2024). Co-expression of endoglucanase and cellobiohydrolase from yak rumen in lactic acid bacteria and its preliminary application in whole-plant corn silage fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1442797.
- Wang, C., & Kuzyakov, Y. (2024). Rhizosphere engineering for soil carbon sequestration. *Trends in Plant Science*, 29(4), 447-468.
- Wang, L., Cheng, X., Bai, L., Gao, M., Kang, G., Cao, X., & Huang, H. (2022a). Positive interventional effect of engineered butyrate-producing bacteria on metabolic disorders and intestinal flora disruption in obese mice. *Microbiology Spectrum*, 10(2), e01147-21.

- Wang, S., Wang, R., Zhao, X., Ma, G., Liu, N., Zheng, Y., ... & Qi, G. (2022b). Systemically engineering *Bacillus amyloliquefaciens* for increasing its antifungal activity and green antifungal lipopeptides production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 10: 961535.
- Wang, S., Li, H., Shi, R., & Fu, Y. (2024). Symbiont-mediated antisense RNA delivery controls *Nosema ceranae* infections in *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 207, 108185.
- Wang, M., Ye, X., Bi, H., & Shen, Z. (2024). Microalgae biofuels: illuminating the path to a sustainable future amidst challenges and opportunities. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 17(1), 10.
- Wang, W., Peng, G., Sun, Y., & Chen, X. (2024). Increasing the tolerance of *Trichoderma harzianum* T-22 to DMI fungicides enables the combined utilization of biological and chemical control strategies against plant diseases. *Biological Control*, 192, 105479.
- Williams, L. C., Gregorio, N. E., So, B., Kao, W. Y., Kiste, A. L., Patel, P. A., ... & Oza, J. P. (2020). The genetic code kit: an open-source cell-free platform for biochemical and biotechnology education. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 941.
- Wolf, A., Hodneland, K., Frost, P., Hoeijmakers, M., & Rimstad, E. (2014). Salmonid alphavirus-based replicon vaccine against infectious salmon anemia (ISA): impact of immunization route and interactions of the replicon vector. *Fish & Shellfish Immunology*, 36(2), 383-392.
- Wong, P. Y., Mal, J., Sandak, A., Luo, L., Jian, J., & Pradhan, N. (2024). Advances in microbial self-healing concrete: A critical review of mechanisms, developments, and future directions. *Science of the Total Environment*, 174553.
- Woodcraft, C., Chooi, Y. H., & Roux, I. (2023). The expanding CRISPR toolbox for natural product discovery and engineering in filamentous fungi. *Natural Product Reports*, 40(1), 158-173.
- Wozniak, C. A., McClung, G., Gagliardi, J., Segal, M., & Matthews, K. (2012). Regulation of genetically engineered microorganisms under FIFRA, FFDCA and TSCA. In: Wozniak CA, McHughen A, editors. *Regulation of Agricultural Biotechnology: The United States and Canada*, Heidelberg: Springer. (2013). p. 57-94.
- Wu, H., Wei, J., Zhao, X., Liu, Y., Chen, Z., Wei, K., ... & Chen, T. (2023). Neuroprotective effects of an engineered *Escherichia coli* Nissle 1917 on Parkinson's disease in mice by delivering GLP-1 and modulating gut microbiota. *Bioengineering & Translational Medicine*, 8(5), e10351.
- Xie, D., Jackson, E. N., & Zhu, Q. (2015). Sustainable source of omega-3 eicosapentaenoic acid from metabolically engineered *Yarrowia lipolytica*: from fundamental research to commercial production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 1599-1610.
- Xie, Z., McAuliffe, O., Jin, Y. S., & Miller, M. J. (2024). Genomic modifications of lactic acid bacteria and their applications in dairy fermentation. *Journal of Dairy Science*, 107(11), 8749-8764.
- Xu, C., Martin, N., Li, M., & Mann, S. (2022). Living material assembly of bacteriogenic protocells. *Nature*, 609(7929), 1029-1037.
- Yan, Y., & Finnigan, G. C. (2018). Development of a multi-locus CRISPR gene drive system in budding yeast. *Scientific Reports*, 8(1), 17277.
- Yang, L., Huang, S., Wang, Z. A., Han, D., Gan, Y., Geng, R., ... & Xu, X. (2024). Oral delivery of bacteria expressing wsv108 gene-specific dsRNA protects shrimp from white spot syndrome virus (WSSV) infection. *International Journal of Biological Macromolecules*, 261, 129840.
- Yao, Q., Lin, Z., Lai, K., Zeng, X., Lei, G., Zhang, T., & Dai, H. (2024). Un1Cas12f1 and Cas9 gene drive in HSV1: viruses that 'infect' viruses. *eLife preprint*. <https://elifesciences.org/reviewed-preprints/95151>
- Yeh, T. Y. (2020). Disease control of the plant bacterial pathogens causing citrus canker and rice blight. US-Patent Nr. 10,626,375. <https://www.lens.org/lens/patent/149-778-251-143-948>
- Yeh, T. Y., & Contreras, G. (2024). Bio-control methods for *Xylella* and *Xanthomonas* bacteria. Patent Application US 18/068,594. <https://www.lens.org/lens/patent/099-267-876-566-098>

- Yip, A., McArthur, O. D., Ho, K. C., Aucoin, M. G., & Ingalls, B. P. (2024). Degradation of polyethylene terephthalate (PET) plastics by wastewater bacteria engineered via conjugation. *Microbial Biotechnology*, 17(9), e70015.
- Yu, J. M., Wang, D., Ries, T. R., Pierson III, L. S., & Pierson, E. A. (2018). An upstream sequence modulates phenazine production at the level of transcription and translation in the biological control strain *Pseudomonas chlororaphis* 30-84. *PLoS One* 13(2): e0193063
- Yu, W., Luo, L., Qi, X., Cao, Y., An, J., Xie, Z., ... & Yang, P. (2024). Insights into the Impact of trans-Zeatin overproduction-engineered *Sinorhizobium meliloti* on alfalfa (*Medicago sativa* L.) tolerance to drought stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(15), 8650-8663.
- Yuan, S. F., Brooks, S. M., Nguyen, A. W., Lin, W. L., Johnston, T. G., Maynard, J. A., ... & Alper, H. S. (2021). Bioproduced proteins on demand (Bio-POD) in hydrogels using *Pichia pastoris*. *Bioactive Materials*, 6(8), 2390-2399.
- ZBiotics (2024). Product Safety. <https://zbiotics.com/blogs/journal/product-safety>
- Zhang, Z., Weng, Y., Ding, Y., & Qian, S. (2019). Use of genetically modified bacteria to repair cracks in concrete. *Materials*, 12(23), 3912.
- Zhang, J., Chen, Y., Fu, L., Guo, E., Wang, B., Dai, L., & Si, T. (2021). Accelerating strain engineering in biofuel research via build and test automation of synthetic biology. *Current Opinion in Biotechnology*, 67, 88-98.
- Zhang, J., Hasty, J., & Zarrinpar, A. (2024). Live bacterial therapeutics for detection and treatment of colorectal cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 21(5), 295-296.
- Zhou, Y., & Han, Y. (2022). Engineered bacteria as drug delivery vehicles: principles and prospects. *Engineering Microbiology*, 2(3), 100034.
- Zhuang, Z., Wan, G., Lu, X., Xie, L., Yu, T., & Tang, H. (2024). Metabolic engineering for single-cell protein production from renewable feedstocks and its applications. *Advanced Biotechnology*, 2(4), 35.
- ZKBS (2017). Stellungnahme zur Risikobewertung von im Handel frei erhältlichen Do-it-yourself (DIY)-Kits für gentechnische Experimente. Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit. <https://zkbs-online.de/stellungnahmen/allgemeine-themen>
- ZKBS (2021). RNA-Viren: Minigenome, Replikons & virusähnliche Partikel. [https://www.zkbs-online.de/ZKBS/SharedDocs/Downloads/01_Allgemeine%20Stellungnahmen/10_Viren/RNA-Viren:_Minigenome ,_Replikons_&_virusaehnliche%20Partikel%20\(2021\).pdf](https://www.zkbs-online.de/ZKBS/SharedDocs/Downloads/01_Allgemeine%20Stellungnahmen/10_Viren/RNA-Viren:_Minigenome,_Replikons_&_virusaehnliche%20Partikel%20(2021).pdf)
- Zúñiga, A., Fuente, F. D. L., Federici, F., Lionne, C., Boñnet, J., De Lorenzo, V., & González, B. (2018). An engineered device for indoleacetic acid production under quorum sensing signals enables *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 to stimulate plant growth. *ACS Synthetic Biology*, 7(6), 1519-1527.