

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W. J. Mansveld
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 28 november 2012
KENMERK CGM/121128-01
ONDERWERP Advies classificatie *Geobacter sulfurreducens* en *Shewanella oneidensis*

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een wijziging van vergunningaanvraag IG 99-194 met de titel "Metabolisme van micro-organismen" van de Radboud Universiteit Nijmegen, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse-indeling van de bacteriën *Geobacter sulfurreducens* en *Shewanella oneidensis*. Tevens is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met deze twee bacteriesoorten en over de eventuele plaatsing van *G. sulfurreducens* op Bijlage 1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo). Bijlage 1 bestaat uit een lijst van micro-organismen die in principe niet pathogeen zijn voor mens, dier of plant. Met de micro-organismen die in Bijlage 1 zijn opgenomen, mag onder bepaalde voorwaarden op het laagste inperkingsniveau ML-I gewerkt worden.

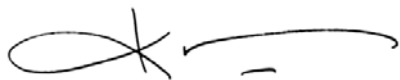
Sinds 1994 wordt *G. sulfurreducens* veelvuldig gebruikt in diverse laboratoria. Er zijn bij de COGEM geen publicaties bekend waarin *G. sulfurreducens* geassocieerd wordt met pathogeniteit bij mens, dier of plant. Conform haar advies uit 2011 adviseert *G. sulfurreducens* in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en acht zij opname van *G. sulfurreducens* in Bijlage 1 van de Regeling ggo gerechtvaardigd.

Op basis van het feit dat de identificatie van *Shewanella* soorten niet eenduidig is, het onduidelijk is wat het pathogene potentieel van *S. oneidensis* is, de bacterie genetisch materiaal voor theoretische virulentiemarkers bevat, en gerelateerde *Shewanella* species als pathogeen aangemerkt worden, is de COGEM van mening dat indeling van *S. oneidensis* in pathogeniteitsklasse 2 het meest passend is.

Gebaseerd op bovenstaande pathogeniteitsklasse-indeling, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein als de voorgenomen werkzaamheden met *G. sulfurreducens* plaatsvinden op ML-I inperkingsniveau en de voorgenomen werkzaamheden met *S. oneidensis* op ML-II inperkingsniveau.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,



Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

cc Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau GGO
Dr. I. van der Leij, Ministerie van IenM

Classificatie van *Geobacter sulfurreducens* en *Shewanella oneidensis*

COGEM advies CGM/121128-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse-indeling van de bacteriën *Geobacter sulfurreducens* en *Shewanella oneidensis*. Tevens is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met deze twee bacteriesoorten en over de eventuele plaatsing van *G. sulfurreducens* op Bijlage 1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo). De adviesvraag is gerelateerd aan een wijziging van een al eerder afgegeven vergunning getiteld "Metabolisme van micro-organismen".

Geobacter sulfurreducens

G. sulfurreducens is voor het eerst beschreven in 1994 en is een anaerobe, staafvormige, gramnegatieve bacterie.¹ Het genus *Geobacter* behoort tot de familie *Geobacteraceae* en de klasse Deltaproteobacteria. De stam *G. sulfurreducens* PCA en daarvan afgeleide mutanten zijn uitgebreid experimenteel onderzocht en in de literatuur beschreven. *G. sulfurreducens* PCA is geïsoleerd uit de bovenste sedimentlaag van de bodem van een sloot.¹ Onderzoek heeft aangetoond dat de stam in de ademhalingsketen geen gebruik maakt van zuurstof maar van metaaloxides van ijzer, cobalt en mangaan, en van elementair zwavel.^{1,2,3} Recent is beschreven dat biofilms (laagjes micro-organismen gehecht aan vast materiaal en omgeven door extracellulaire componenten) en pili (haarachtige structuren aan de buitenzijde van een bacterie) van *G. sulfurreducens* PCA elektrisch geleidend vermogen bezitten.^{4,5} De eigenschappen van deze bacterie maken hem potentieel toepasbaar bij het saneren van milieuverontreinigingen (bioremediatie) en als microbiële brandstofcel.^{4,5,6,7,12} Het gehele genoom van *G. sulfurreducens* PCA is gesequenced.^{3,8}

Shewanella oneidensis

S. oneidensis is voor het eerst beschreven in 1988.^{9,10} Het is een facultatief anaerobe, staafvormige, gramnegatieve bacterie, en behoort tot de familie *Shewanellaceae* en de klasse Gammaproteobacteria. Tot nu toe zijn binnen het genus *Shewanella* 60 species beschreven. *Shewanella* spp. worden in zoet en zout water aangetroffen.^{11,12} De stam *S. oneidensis* MR-1 is uitgebreid experimenteel onderzocht en in de literatuur beschreven. Deze stam is geïsoleerd uit de sedimentlaag van de bodem van "Lake Oneida" in de staat New York (USA).^{9,10} De optimale groeitemperatuur van deze bacterie is 30°C.¹⁰ *S. oneidensis* isolaten zijn ook aangetroffen in de sedimentlaag van de bodem van "Lake Michigan" (USA) en in de Zwarte Zee.¹²

S. oneidensis gebruikt in de ademhalingsketen naast zuurstof ook metaaloxides van ijzer, chroom, mangaan en uranium, (an)organische zwavelverbindingen en elementair zwavel.^{10,13} Evenals bij *G. sulfurreducens*, maken de eigenschappen van *S. oneidensis* de bacteriestam potentieel toepasbaar als bioremediator en microbiële brandstofcel.^{5,11,12,13,14}

De gehele genoomsequentie van *S. oneidensis* MR-1 is bekend en de annotatie van het genoom is in 2008 bijgesteld.^{13,15} De genoomsequentie laat een aantal theoretisch virulentiemarkers zien zoals de aanwezigheid van een functioneel type I secretiesysteem dat een potentieel porie vormend RTX toxine kan bevatten.¹³ Tevens is de aanwezigheid van een adenylcyclase aangetroffen.¹⁵ Dit enzym zou bij injectie in eukaryote cellen celdood kunnen geven. Ook bevat het genoom twee type IV piline genclusters.¹³ Deze pili kunnen van belang zijn bij het koloniseren van de gastheer. Een van deze twee genclusters speelt tevens een rol bij de vorming van biofilms, en is ook aangetroffen bij *Vibrio cholerae*. Daarnaast zijn homologen van het Fic proteïne aangetoond. Het Fic proteïne kan lethaal zijn als er een type IV secretiesysteem in de cel aanwezig is (bijvoorbeeld bij zoogdiercellen).¹⁶

Pathogeniteitsclassificatie

In de Regeling ggo worden micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen.¹⁷ Deze indeling start met pathogeniteitsklasse 1, die gevormd wordt door niet pathogene (apathogene) micro-organismen en loopt op tot pathogeniteitsklasse 4, de groep van hoog pathogene micro-organismen.

Volgens de Regeling ggo is een indeling in pathogeniteitsklasse 1 van toepassing als het micro-organisme minimaal aan één van de volgende criteria voldoet:

- het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant.
- het heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen zijn getroffen.
- het behoort tot een soort die wel vertegenwoordigers bevat van klasse 2, 3 of 4, maar de stam in kwestie bevat geen genetisch materiaal dat verantwoordelijk is voor de virulentie.
- het niet-virulente karakter van het micro-organisme is door middel van adequate tests aangetoond.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 2 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat die zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat, alsmede een micro-organisme dat bij planten of dieren ziekte kan veroorzaken.

Bijlage 1 Regeling ggo

Bijlage 1 van de Regeling ggo is een lijst van micro-organismen die in principe niet pathogeen zijn voor mens, dier of plant (pathogeniteitsklasse 1). Deze bijlage is voor vergunningaanvragers van belang, omdat met deze micro-organismen onder bepaalde voorwaarden op het laagste inperkingsniveau, ML-I, gewerkt mag worden. Dit is toegestaan wanneer voor het vervaardigen van het ggo een veilig geachte vector gebruikt wordt en zich in deze vector geen insertie bevindt die een potentieel gevaar voor mens en milieu vormt.¹⁷ Voorbeelden van potentieel ‘gevaarlijke’

inserties zijn genen die coderen voor toxines, virulentie- of pathogeniteitsfactoren en virale en cellulaire oncogenen.

In de huidige inschalingspraktijk wordt een micro-organisme als pathogeen gezien als deze bij mensen met een normaal functionerend immuunsysteem ziekte kan veroorzaken. Opportunistische pathogenen, die uitsluitend ziekte kunnen veroorzaken bij individuen met een verzwakt immuunsysteem, worden in de regel als niet pathogeen beschouwd en kunnen, als aan een van de bovengenoemde voorwaarden is voldaan, op Bijlage 1 geplaatst worden.

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is van plan *G. sulfurreducens* PCA en *S. oneidensis* MR-1 te transformeren met expressieplasmiden waarin niet-schadelijke sequenties gekloneerd zijn van de nitrificerende en denitrificerende bacteriën *Brocadia anammoxidans* en *Kuenenia stuttgartiensis*. Deze sequenties coderen voor enzymen betrokken bij metabole processen in prokaryoten.

Eerdere COGEM adviezen

In 2006 heeft de COGEM geadviseerd over werkzaamheden met methanotrofe bacteriën behorende tot de Alfa- en Gammaproteobacteria. De werkzaamheden bestonden uit het kloneren van genomische DNA-sequenties afkomstig van een methanotrofe mengpopulatie in diverse gastheren van pathogeniteitsklasse 1. De COGEM adviseerde deze werkzaamheden onder ML-I inperkingsniveau te laten plaatsvinden.¹⁸ Eind 2011 heeft de COGEM geadviseerd over de classificatie van (a)pathogene bacteriën.^{19,20} Daarbij is het gehele genus van *Geobacter* geclassificeerd als een klasse 1 pathogeen. *S. oneidensis* is niet geclassificeerd. Wel zijn de species *S. algae* en *S. putrefaciens* geclassificeerd als klasse 2 pathogeen.

Overweging en advies

Wetenschappelijk gezien is de pathogeniteit van een micro-organisme goed aan te tonen. De afwezigheid van pathogeniteit is echter moeilijk te bewijzen. Daarbij worden gevallen van pathogeniteit gepubliceerd, terwijl er nauwelijks wordt gerapporteerd over de apathogeniteit van micro-organismen. Hierdoor is van veel bacteriën weinig literatuur over apathogeniteit voorhanden. Een lange gedocumenteerde historie van veilig gebruik, waarbij geen nadelige effecten zijn gerapporteerd, vormt in dit opzicht een belangrijk referentiekader voor apathogeniteit. Als kanttekening moet hierbij opgemerkt worden dat effecten mogelijkerwijs moeilijk worden opgemerkt als zij niet erg uitgesproken van aard zijn en er niet gericht naar wordt gezocht. Anderzijds zijn veruit de meeste micro-organismen apathogeen. Daarom worden micro-organismen bij afwezigheid van expliciete aanwijzingen voor pathogeniteit bij langdurig gebruik als apathogeen beschouwd.

Geobacter sulfurreducens

De aanvrager geeft aan dat er in de literatuur geen aanwijzingen zijn dat *G. sulfurreducens* pathogene eigenschappen bezit.

De "American Type Culture Collection" beschouwt *G. sulfurreducens* PCA als een micro-organisme vallend onder het laagste veiligheidsniveau ("biosafety level 1").²¹ Ook door de Duitse "Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe" wordt *G. sulfurreducens* in de laagste risicogroep ingedeeld.²²

Sinds 1994 wordt *G. sulfurreducens* veelvuldig gebruikt in diverse laboratoria. Er zijn bij de COGEM geen publicaties bekend waarin *G. sulfurreducens* geassocieerd wordt met pathogeniteit bij mens, dier of plant. In 2011 heeft de COGEM het genus *Geobacter* geclassificeerd als een klasse 1 pathogeen.

Op basis van bovenstaande gegevens ziet de COGEM geen reden om haar advies uit 2011 te herzien. Zij adviseert *G. sulfurreducens* in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en acht opname in Bijlage 1 van de Regeling ggo gerechtvaardigd.

Shewanella oneidensis

De aanvrager geeft aan dat er in de literatuur geen aanwijzingen zijn dat *S. oneidensis* pathogene eigenschappen bezit.

De "American Type Culture Collection" beschouwt *S. oneidensis* MR-1 als een micro-organisme vallend onder het laagste veiligheidsniveau ("biosafety level 1").²¹ Ook door de Duitse "Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe" wordt *S. oneidensis* in de laagste risicogroep ingedeeld.²²

In de microbiële laboratoriumdiagnostiek is het genus *Shewanella* goed te identificeren maar differentiatie tussen *S. algae*, *S. putrefaciens* en gerelateerde *Shewanella* soorten is niet eenduidig.^{11,12} *S. algae* en *S. putrefaciens* worden beschouwd als pathogeen, zowel voor de mens als sommige vissoorten, mosselen en zeeslakken.^{11,12} Beide bacteriesoorten kunnen bij de mens infecties geven van oren, huid of zachte weefsels. Bij immuungecompromitteerde patiënten kunnen ernstige bloedinfecties voorkomen. In de literatuur zijn eenmaal vier klinische *S. oneidensis* isolaten benoemd, maar aanvullende gegevens over betreffende isolaten of bijbehorende patiëntgegevens ontbreken.^{10,11} Het genoom van *S. oneidensis* bevat een aantal theoretisch virulentiemarkers.^{13,15,16}

De natuurlijke habitat van *S. oneidensis* is bodem en sediment. De bacterie is in zoet en zout water aangetroffen. Het is de COGEM niet bekend of *S. oneidensis* voorkomt in de Nederlandse oppervlaktewateren en of plant, dier en mens veelvuldig blootgesteld worden aan deze bacteriesoort. De COGEM heeft daarom geen inzicht in het potentiële ziekteverwekkende vermogen van *S. oneidensis*.

Bovengenoemde gegevens bieden onvoldoende zekerheid over het vermeende apathogene karakter van *S. oneidensis*. Op basis van het feit dat de identificatie van *Shewanella* soorten niet eenduidig is, het onduidelijk is wat het pathogene potentieel van *S. oneidensis* is, de bacterie genetisch materiaal voor theoretische virulentiemarkers bevat, en gerelateerde *Shewanella* species als pathogeen aangemerkt zijn, is de COGEM derhalve van mening dat indeling in pathogeniteitsklasse 2 het meest passend is.

Samengevat adviseert de COGEM *G. sulfurreducens* in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en *S. oneidensis* in te delen in pathogeniteitsklasse 2. Gebaseerd op deze indeling, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein indien de voorgenomen werkzaamheden met *G. sulfurreducens* plaatsvinden op ML-I inperkingsniveau en de voorgenomen werkzaamheden met *S. oneidensis* op ML-II inperkingsniveau.

Referenties

1. Caccavo F *et al.* (1994). *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. Appl. Environm. Microbiol. 60(10): 3752-3759
2. Afkar E *et al.* (2005). A novel *Geobacteraceae*-specific outer membrane protein J (OmpJ) is essential for electron transport to Fe (III) and Mn (IV) oxides in *Geobacter sulfurreducens*. BMC Microbiology 5: 41-11
3. Methé BA *et al.* (2003). Genome of *Geobacter sulfurreducens*: metal reduction in subsurface environments. Science 302: 1967-1969
4. Malvankar NS *et al.* (2011). Tunable metallic-like conductivity in microbial nanowire networks. Nature Nanotechnology 6: 573-579
5. Qian F & Li Y (2011). A natural source of nanowires. Nature Nanotechnology 6: 538-539
6. Mahadevan R *et al.* (2011). *In situ* to *in silico* and back: elucidating the physiology and ecology of *Geobacter* spp. using genome-scale modelling. Nature Reviews Microbiology 9: 39-50
7. Geobacter Project (20 november 2012). <http://www.geobacter.org/about>
8. Butler JE *et al.* (2012). Comparative genomic analysis of *Geobacter sulfurreducens* KN400, a strain with enhanced capacity for extracellular electron transfer and electricity production. BMC genomics 13: 471-484
9. Myers CR & Nealson KH (1988). Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. Science 240: 1319-1321
10. Venkateswaran K *et al.* (1999). Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 705-724
11. Janda JM & Abbott SL (2012). The genus *Shewanella*: from the briny depths below to human pathogen. Critical Reviews in Microbiology, Early Online: 1-21
12. Hau HH & Gralnick JA (2007). Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. Annu. Rev Microbiol 61: 237-258
13. Heidelberg JF *et al.* (2002). Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. Nature Biotechnology 20: 1118-1123
14. Qian F *et al.* (2009). A 1.5 microL microbial fuel cell for on-chip bioelectricity generation. Lab Chip 9(21): 3076-3081
15. Frederickson JK *et al.* (2008). Towards environmental systems biology of *Shewanella*. Nature Reviews Microbiology 6: 592-603
16. Engel P *et al.* (2012). Adenylation control by intra- or intermolecular active-site obstruction in Fic proteins. Nature 482: 107-112

17. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. Mei 2004
18. COGEM (2006). Klonering van methanotrofe mengpopulaties in micro-organismen van klasse I. COGEM advies CGM/061026-01
19. COGEM (2011). Classificatie apathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-02
20. COGEM (2011). Classificatie pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-03
21. ATTC-LCG Standards (22 november 2012)
http://www.lgcstandards-atcc.org/LGC_AdvancedCatalogueSearch/AllCollectionSearch/tabid/1069/Default.aspx
22. Fachausschuss Chemie, Bundesministerium für Arbeit und Soziales, Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA 466) (22 november 2012)
<http://www.baua.de/cae/servlet/contentblob/672886/publicationFile/48583/TRBA-466.pdf>