

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. V.L.W.A. Heijnen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 23 oktober 2023
KENMERK CGM/231023-01
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie *Candidatus* Nanohalarchaeum antarcticus

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier getiteld 'Ca. Nanohaloarchaeum antarcticus' (IG 23-146) van de Stichting Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee (NIOZ), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

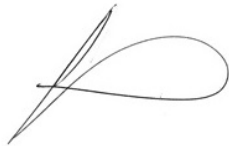
De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van het ééncellige micro-organisme *Candidatus* Nanohalarchaeum antarcticus en de plaatsing van dit organisme op lijst A1 van Bijlage 2 van de Regeling ggo.

Ca. Nha. antarcticus is een archaeon, een organisme dat overeenkomsten heeft met bacteriën, en is recent geïsoleerd uit zoutmeren in Antarctica. Nanohalarchaea hebben een klein genoom, waardoor ze in beperkte mate hun eigen bouwstoffen kunnen produceren en afhankelijk zijn van een gastheer. Zo groeit *Ca. Nha. antarcticus* alleen in de aanwezigheid van een ander Antarctisch archaeon, *Halobacterium lacusprofundi*. De relatie tussen *Ca. Nha. antarcticus* en *H. lacusprofundi* wordt nog onderzocht: mogelijk dringt *Ca. Nha. antarcticus* de cellen van *H. lacusprofundi* binnen om aan bouwstoffen te komen.

Voor zover bij de COGEM bekend, zijn er geen publicaties waarin melding wordt gemaakt dat *Ca. Nha. antarcticus* pathogeen is voor mensen, dieren of planten. De COGEM is van oordeel dat vanwege het voorkomen van *Ca. Nha. antarcticus* in zoutmeren en de afhankelijkheid van *H. lacusprofundi*, uitgesloten kan worden dat dit archaeon kan overleven in mens, dier of plant. De COGEM is van oordeel dat *Ca. Nha. antarcticus* niet ziekteverwekkend is en adviseert deze soort in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en op te nemen in lijst A1 van Bijlage 2 van de Regeling ggo.

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

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c.

- Drs. Y de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
- Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's,
DG Milieu en Internationaal

Pathogeniteitsclassificatie van het archaeon *Candidatus Nanohalarchaeum antarcticus*

COGEM advies CGM/231023-01

1. Inleiding

COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van het archaeon *Candidatus Nanohalarchaeum antarcticus*, naar aanleiding van een verzoek (IG 23-146) van de Stichting Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee (NIOZ). De COGEM is tevens gevraagd of *Candidatus Nanohalarchaeum antarcticus* kan worden opgenomen op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.¹ Deze bijlage bestaat uit een lijst van micro-organismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant. Opname op Bijlage 2, lijst A1 betekent dat onder ML-I laboratoriumcondities met het betreffende micro-organisme ggo's vervaardigd mogen worden indien hierbij vectoren worden gebruikt die wél, of inserties die níet, op de A-lijsten staan (lijst A2 veilige vectoren en lijst A3 inserties).

2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling ggo

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie van een micro-organisme de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden de micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen. Deze indeling start met pathogeniteitsklasse 1, die gevormd wordt door apathogene micro-organismen en loopt op tot pathogeniteitsklasse 4, de groep van hoog pathogene micro-organismen. Iedere pathogeniteitsklasse is gekoppeld aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met ggo's van die klasse.

Apathogene micro-organismen worden ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. Dergelijke micro-organismen dienen minimaal aan één van de volgende criteria te voldoen:

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

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

Een indeling in pathogeniteitsklasse 3 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 4 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

3. Archaea

Archaea zijn ééncellige prokaryote micro-organismen die in het verleden ook wel als archaeobacteriën zijn aangeduid. Zij vertonen gelijkenissen met zowel bacteriën als met eukaryoten. Archaea worden tegenwoordig als apart domein gezien dat onderscheiden wordt van bacteriën op basis van ribosomaal RNA.^{2,3} Enkele eigenschappen onderscheiden archaea van bacteriën en eukaryoten, zoals de aanwezigheid van een archaeaal flagellum (archaellum) en de mogelijkheid om gebruik te maken van unieke vormen van metabolisme, zoals methanogenese.⁴ Oorspronkelijk werden archaea veelal geïsoleerd uit extreme omgevingen, zoals leefgebieden waar hoge temperaturen, lage pH waarden of hoge zoutconcentraties heersen. Tegenwoordig worden deze micro-organismen uit meer uiteenlopende milieus geïsoleerd, variërend van oceanen, zoetwatermeren en het darmstelsel van dieren en mensen.^{4,5}

4. Naamgeving: de voorlopige status *Candidatus*

De soortnaam van een nieuwe prokaryoot is officieel wanneer deze naam wordt vastgelegd in International Code of Nomenclature of Prokaryotes.⁶ Hiervoor moet aan een aantal voorwaarden worden voldaan, om aan te tonen dat het een aparte soort betreft. Prokaryoten waarvan geen pure cultuur beschikbaar is om deze voorwaarden te toetsen, kunnen een voorlopige naam krijgen.⁶ Deze voorlopige status wordt aangegeven met de term *Candidatus* voor de soortnaam, waarbij de soortnaam niet-cursief is weergegeven.

5. De soort *Candidatus Nanohalarchaeum antarcticus*

Het archaeon *Candidatus Nanohalarchaeum* (Nha.) *antarcticus* is geïsoleerd uit zoutmeren in Antarctica en is in 2019 oorspronkelijk beschreven als *Nanohaloarchaeum antarcticus*.⁷ In 2021 is de genusnaam van het archaeon gewijzigd naar *Nanohalarchaeum*.^{8,9} *Ca. Nha. antarcticus* heeft geen officiële familie-aanduiding, maar wordt in het fylum *Candidatus Nanohaloarchaeota*, en het superfylum DPANN (Diapherotrites, Parvarchaeota, Aenigmarchaeota, Nanoarchaeota, Nanohaloarchaeota)^a geplaatst.^{7,10} *Nanohaloarchaeota* worden aangetroffen in gebieden met hoge zoutconcentraties.¹¹ Zij hebben een ronde (coccus) morfologie met een gemiddelde diameter van 0,6 µm en hebben een zeer klein genoom.^{11,12}

Veel DPANN archaea zijn afhankelijk van symbiotische interacties met andere archaea.¹³ Ook van *Ca. Nha. antarcticus* is beschreven dat dit archaeon beperkte mogelijkheden tot biosynthese heeft, en voor

a. De monofyletische status van dit superfylum staat in de wetenschappelijke literatuur nog onder discussie. Tegenwoordig worden ook de Woesearchaeota, Huberarchaeota, Pacearchaeota, Mamarchaeota, en Micrarchaeota tot dit superfylum gerekend.

groei afhankelijk is van direct celcontact met het Antarctische haloarchaeon *Halobacterium lacusprofundi*.⁷ Via het celcontact kan *Ca. Nha. antarcticus* essentiële componenten zoals lipiden, aminozuren en nucleotiden verkrijgen van *H. lacusprofundi*.⁷ De *Ca. Nha. antarcticus* cellen hebben een diameter tussen de 0,2 en 0,8 µm, en zijn daarmee kleiner dan de *H. lacusprofundi* cellen met een diameter tussen 1 en 3 µm.

Het *Ca. Nha. antarcticus* genoom bevat genen die coderen het SPEARE-eiwit, dat kenmerkend is voor Nanohalarchaea en bestaat uit serine protease, adhesie en restrictie endonuclease domeinen. Vermoedelijk zorgt een SPEARE-eiwit ervoor dat de S-laag van de gastheer doorbroken wordt (serine-protease), zich vasthecht (adhesie), en een doorgang vormt voor transport uit het cytoplasma van de gastheer waarbij genetisch materiaal wordt afgebroken (restrictie-endonuclease domein).⁷ Het SPEARE-eiwit van *Ca. Nha. Antarcticus* bevat een bacteriotoxine-domein, dit toxine zorgt voor porevorming in membranen van andere cellen.⁷

Volgens onderzoek dat nog niet door vakgenoten is beoordeeld, is *Ca. Nha. antarcticus* geen symbiont maar een parasiet van *H. lacusprofundi*.¹⁴ Volgens dit onderzoek dringt *Ca. Nha. antarcticus* de gastheercel binnen. In het cytoplasma van de gastheercel neemt *Ca. Nha. antarcticus* nutriënten op en vermeerderd zich. Door het internaliseren van *Ca. Nha. antarcticus* destabiliseert het membraan van de gastheercel, met lysis van de gastheercel tot gevolg.

6. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over Archaea die tot het geslacht Nanohalarchaeum behoren. Wel heeft zij eerder geadviseerd over het archaeon *Ignicoccus hospitalis* dat uit hydrothermale bronnen in de buurt van IJsland is geïsoleerd.¹⁵ *I. hospitalis* fungeert als gastheer voor *Nanoarchaeum equitans* en is als apathogeen organisme ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. Het organisme waarvan *Ca. Nha. antarcticus* afhankelijk is, *H. lacusprofundi*, is niet eerder door de COGEM geclassificeerd, maar is wel in de Regeling ggo opgenomen op Bijlage 2, lijst A1 (apathogene organismen).¹

Buitenlandse instanties die de pathogeniteit van onder andere prokaryoten beoordelen, hebben *Ca. Nha. antarcticus* niet ingedeeld in een risicogroep.

7. 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 micro-organismen weinig literatuur over apathogeniteit voorhanden.

Ca. Nha. antarcticus is een archaeon dat in Antarctische meren met extreme zoutconcentraties aangetroffen wordt. Mede doordat dit archaeon recentelijk is ontdekt, is informatie over *Ca. Nha. antarcticus* schaars. Van andere zoutminnende archaea, de haloarchaea, is bekend dat zij het zout uit de omgeving opnemen in het cytoplasma. De haloarchaeale eiwitten zijn zodanig aangepast aan hoge zoutconcentraties dat ze denatureren bij lagere concentraties, wat de haloarchaea niet overleven.¹⁶

In het laboratorium wordt *Ca. Nha. antarcticus* opgegroeid in media dat water uit het zoutmeer bevat, of media met artificieel zeewater.^{7,17} *Ca. Nha. antarcticus* heeft voor groei celcontact nodig met het Antarctische haloarchaeon *H. lacusprofundi*.⁷ Mogelijk wordt *Ca. Nha. antarcticus* geïnternaliseerd in het cytoplasma van de *H. lacusprofundi* cellen, waar het nutriënten kan opnemen en waardoor de gastheercellen lyseren.¹⁴ Deze relatie zou als parasitair omschreven kunnen worden, omdat het nadelig is voor *H. lacusprofundi*. Het onderzoek dat deze levenswijze beschrijft, moet nog door vakgenoten worden beoordeeld. Derhalve is de COGEM van oordeel dat op basis van gepubliceerd onderzoek, gesteld kan worden dat *Ca. Nha. antarcticus* voor groei afhankelijk is van *H. lacusprofundi*, maar dat de aard van deze relatie nog niet is vastgesteld.

Ca. Nha. antarcticus komt voor in zoutmeren in Antarctica. Voor zover bij de COGEM bekend, zijn er geen publicaties waarin melding wordt gemaakt dat *Ca. Nha. antarcticus* pathogeen is voor mensen, dieren of planten. Vanwege de afhankelijkheid van het Antarctische haloarchaeon *H. lacusprofundi*, kan uitgesloten worden dat dit archaeon kan overleven in mens, dier of plant.

Al het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat *Candidatus Nanohalarchaeum antarcticus* niet pathogeen is voor mens, plant of dier. De COGEM deelt dit archaeon in pathogeniteitsklasse 1, en adviseert om deze soort op te nemen in Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2014). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2023-10-01> (bezocht: 12 oktober 2023)
2. Woese CR *et al.* (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 4576-4579
3. Winker S & Woese CR (1991). A definition of the domains *Archaea*, *Bacteria* and *Eucarya* in terms of small subunit ribosomal RNA characteristics. *Syst. Appl. Microbiol.* 14: 305-310
4. Van Wolferen M *et al.* (2022). The cell biology of archaea. *Nat. Microbiol.* 7: 1744-1755
5. Dombrowski N *et al.* (2021). Chapter 21. *Archaea*. In: *Practical Handbook of Microbiology*. Eds. Green LH & Goldman E, CRC Press
6. Oren A *et al.* (2023). International Code of Nomenclature of Prokaryotes. Prokaryotic Code (2022 Revision). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 73: 10.1099/ijsem.0.005585
7. Hamm JN *et al.* (2019). Unexpected host dependency of Antarctic Nanohaloarchaeota. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116: 14661–14670
8. Oren A & Garrity GM (2021). *Candidatus* List No. 2. Lists of names of prokaryotic *Candidatus* taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 71: 10.1099/ijsem.0.004671
9. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). Species "*Candidatus Nanohalarchaeum antarcticum*" <https://lpsn.dsmz.de/species/nanohalarchaeum-antarcticum> (bezocht: 16 oktober 2023)

10. NCBI Taxonomy browser. *Candidatus* Nanohaloarchaeota.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1462430&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> (bezocht: 12 oktober 2023)
11. Narasingarao P *et al.* (2012). De novo metagenomic assembly reveals abundant novel major lineage of Archaea in hypersaline microbial communities. *ISME J.* 6: 81–93
12. Andrade K *et al.* (2015). Metagenomic and lipid analyses reveal a diel cycle in a hypersaline microbial ecosystem. *ISME J.* 9: 2697–2711
13. Dombrowski N *et al.* (2019). Genomic diversity, lifestyles and evolutionary origins of DPANN archaea. *FEMS Microbiol. Lett.* 366: fnz008
14. Hamm JN *et al.* (2023). The parasitic lifestyle of an archaeal symbiont. *BioRxiv*. 2023.02.24.529834; doi: <https://doi.org/10.1101/2023.02.24.529834>
15. COGEM (2021). Pathogeniteitsclassificatie van het archaeon *Ignicoccus hospitalis*. COGEM advies CGM/211228-01
16. Leigh JA *et al.* (2011). Model organisms for genetics in the domain Archaea: methanogens, halophiles, Thermococcales and Sulfolobales. *FEMS Microbiol. Rev.* 35: 577–608
17. Dylla-Smith M (2009) Medium DBCM2, for square haloarchaea of Walsby (“*Haloquadratum walsbyi*”) in the halohandbook: Protocols for halobacterial genetics. ed. https://haloarchaea.com/wp-content/uploads/2018/10/Halohandbook_2009_v7.3mds.pdf