

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
dhr. J.J. Atsma
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 21 februari 2011
KENMERK CGM/110221-01
ONDERWERP Advies: Classificatie van *E. coli* W

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag over een wijziging van de vergunning met de titel 'Genetisch modificeren van micro-organismen voor microbiële productie van chemicaliën' van Purac Biochem B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van de bacteriestam *Escherichia coli* W. De aanvrager wil deze bacterie gebruiken voor de productie van chemicaliën, zoals melkzuur. Tevens is de COGEM verzocht advies uit te brengen over de mogelijke plaatsing van dit micro-organisme 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. De voorgenomen werkzaamheden met een andere *E. coli* stam (*E. coli* K12) zijn reeds vergund en mag de aanvrager uitvoeren op inperkingsniveau ML-I.

De *E. coli* W stam is in 1943 uit de bodem geïsoleerd en werd niet veel later geïntroduceerd als standaardcontrole bij de analyse van de gevoeligheid van bacteriën voor antibiotica. Naast uitvoerig gebruik in wetenschappelijk onderzoek is de *E. coli* W stam (en afgeleiden van deze stam) ook uitgebreid ingezet bij industriële toepassingen voor onder andere ethanolproductie.

Gedurende de meer dan 60 jaar van intensief gebruik in wetenschappelijk onderzoek en industriële toepassing is de *E. coli* W stam nooit geassocieerd met pathogene infecties bij mens, dier of plant. De COGEM adviseert de *E. coli* W stam in de laagste pathogeniteitsklasse (klasse 1) in te delen. Tevens acht de COGEM plaatsing van deze bacteriestam op Bijlage 1 gerechtvaardigd.

Concluderend acht de COGEM de risico's van de voorgenomen werkzaamheden op ML-I niveau voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

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

c.c. Drs. H.P. de Wijs
Dr. I. van der Leij

Classificatie van bacteriestam *Escherichia coli* W

COGEM advies CGM/110221-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren in welke pathogeniteitsklasse de bacteriestam *Escherichia coli* W ingedeeld dient te worden. Tevens is de COGEM verzocht te adviseren over de plaatsing van dit micro-organisme op Bijlage 1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo) en inschaling van kloneringshandelingen met deze bacteriestam.

De aanvrager heeft al een vergunning voor kloneringswerkzaamheden met onder andere *E. coli* K12 voor onderzoek naar de mogelijkheden van de microbiële productie van chemicaliën als lactaat en gluconzuur. Deze werkzaamheden zijn ingeschaald op ML-I inperkingsniveau. Om dit onderzoek ook uit te kunnen voeren met de *E. coli* W stam, vraagt de aanvrager in het onderhavige wijzigingsverzoek deze stam aan de vergunning toe te voegen.

Escherichia coli

De *E. coli* bacterie behoort tot de familie van *Enterobacteriaceae*. Het organisme komt van nature vooral voor in de darm van warmbloedige dieren, maar door verspreiding van dierlijke mest en lozing van rioolwater komt *E. coli* vrijwel overal voor in het milieu. Gebaseerd op de sequentie van huishoudgenen worden *E. coli* stammen ingedeeld in vijf verschillende phylogroepen: A, B1, B2, D en E.¹ De commensale stammen worden voornamelijk aangetroffen in groep A en B1, de pathogene stammen in groep B2, D en E. In de wetenschappelijke literatuur worden de algemeen toegepaste *E. coli* stammen K-12, B, C, Crooks en W beschouwd als veilige bacteriestammen die behoren tot risicogroep 1.² Op basis van de genomsequentie worden *E. coli* K-12, B en Crooks ingedeeld in phylogroep A en wordt *E. coli* stam W gerekend tot phylogroep B1.²

De *E. coli* Walksman stam (*E. coli* W) is in 1943 door Selman Walksman geïsoleerd uit aarde afkomstig van de begraafplaats nabij de Rutgers Universiteit (New Jersey, Verenigde Staten). Deze stam heeft een hoge gevoeligheid voor streptomycine, een antibioticum dat door Walksman en Schatz is ontwikkeld. Door deze gevoeligheid is *E. coli* W in 1945 als de standaardstam geïntroduceerd in gevoeligheidstesten voor streptomycine en andere antibiotica.³

Naast gebruik van deze stam voor wetenschappelijk onderzoek, bezit de *E. coli* W stam verscheidene eigenschappen die de stam aantrekkelijk maken voor industriële doeleinden. De stam kan tot grote dichtheid opgegroeid worden en is goed bestand tegen relatief hoge ethanolconcentraties, zuurconcentraties en osmotische stress.^{4,5} Daarnaast is de *E. coli* W stam de enige, volgens de wetenschappelijke literatuur veilige stam die sucrose kan gebruiken als koolstofbron. De *E. coli* W stam groeit net zo hard op sucrose als op glucose.⁶ Sinds zijn ontdekking zijn er van *E. coli* W verschillende afgeleiden ontwikkeld voor de productie van onder andere peniciline G acylase, ethanol, poly-3-hydroxybutyraat, lactaatzuur en alanine.⁷⁻⁹

Classificatie

In de Regeling ggo worden 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.¹⁰

Bijlage 1 van de Regeling ggo is een lijst van micro-organismen die in principe niet pathogeen (apathogeen) zijn voor mens, dier of plant. 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.¹⁰ Voorbeelden van potentieel ‘gevaarlijke’ inserties zijn genen die coderen voor toxines, virulentie- of pathogeniteitsfactoren en virale en cellulaire oncogenen.

Micro-organismen die op Bijlage 1 vermeld staan, voldoen in ieder geval aan één van de volgende criteria:¹⁰

- Het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant.
- Het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen zijn getroffen.
- Het micro-organisme 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.

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 (apathogeen) beschouwd en kunnen, als aan een van de bovengenoemde voorwaarden is voldaan, op Bijlage 1 geplaatst worden.

In het verleden zijn de *E. coli* K12, B en C stammen door de COGEM als niet-pathogeen micro-organisme beoordeeld en in Bijlage 1 van de Regeling ggo opgenomen.¹⁰

Overweging

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 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 mogelijk anderszins moeilijk worden

opgemerkt als zij niet erg uitgesproken van aard zijn en er niet gericht naar wordt gezocht. Anderzijds zijn vanuit de meeste micro-organismen apathogeen. Daarom worden micro-organismen bij afwezigheid van expliciete aanwijzingen voor pathogeniteit bij langdurig gebruik als apathogeen beschouwd.

De *E. coli* W stam wordt in de 'Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen (DSMZ)' geïnclassificeerd als klasse 1 pathogeen.¹¹ Werkzaamheden met de *E. coli* W stam worden door American Type Culture Collection (ATCC) ingeschaald op 'Biosafety level' 1.¹²

In 2011 is de sequentie van het genoom van de *E. coli* W stam bepaald en vergeleken met andere *E. coli* stammen.² Net als de andere veilige bevonden stammen als *E. coli* K12, en *E. coli* B bevat *E. coli* W genen die coderen voor pathogeniteitsfactoren. De *E. coli* W stam bezit een groter genoom en meer van dergelijke genen dan andere veilig bevonden stammen. Deze genen zijn echter door mutaties geïnactiveerd of missen belangrijke componenten die vereist zijn voor pathogeniteit.

In theorie is niet uit te sluiten dat een bacterie pathogene factoren herstelt of verwerft. In het geval van *E. coli* W moeten diverse (sets van) defecte of missende genen worden hersteld of verworven, voordat een pathogeen fenotype wordt verkregen. Gedurende de afgelopen 60 jaar waarin deze stam is gebruikt, is dit niet waargenomen. De COGEM acht de kans derhalve verwaarloosbaar klein dat reversie zal optreden tot een pathogene *E. coli* stam.

De *E. coli* W stam wordt sinds zijn ontdekking in 1943 veelvuldig gebruikt in het onderzoek en voor industriële toepassingen. In deze periode is het gebruik van *E. coli* W nooit geassocieerd met pathogeniteit in mens, dier of plant. Voor zover de COGEM uit de literatuur kan opmaken, wordt na toediening van *E. coli* W aan muizen geen virulentie waargenomen.¹³

Door het langdurige en veilige gebruik van deze stam is de COGEM van mening dat de *E. coli* W stam als niet-pathogeen aangemerkt dient te worden.

Advies

Op basis van de bovenstaande overwegingen adviseert de COGEM de bacteriestam *E. coli* W in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en acht zij de opname van deze bacterie op Bijlage 1 van de Regeling ggo gerechtvaardigd.

Gezien de aard van de werkzaamheden en gebaseerd op de indeling van *E. coli* W in pathogeniteitsklasse 1 adviseert de COGEM de voorgenomen kloneringswerkzaamheden met *E. coli* W in te schalen op ML-I niveau. Op dit inperkingsniveau acht de COGEM de risico's voor mens en milieu van deze werkzaamheden verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Gordon DM *et al.* (2008). Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ. Microbiol.* 10: 2484-2496

2. Archer CT *et al* (2011). The genome sequence of *E. coli* W (ATCC 9637): comparative genome analysis and an improved genome-scale reconstruction of *E. coli*. *BMC Genomics* 12: 9
3. Waksman SA & Reilly HC. (1945). Agar-streak method for assaying antibiotic substances. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 7: 556-558
4. Alterthum F & Ingram LO (1989). Efficient ethanol production from glucose, lactose and xylose by recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1943-1948
5. Nagata S (2001). Growth of *Escherichia coli* ATCC 9637 through the uptake of compatible solutes at high osmolarity. *J. Biosci. Bioeng.* 92: 324-329
6. Lee SY & Chang HN (1993). High cell density cultivation of *Escherichia coli* W using sucrose as a carbon source. *Biotechnol. Lett.* 15: 971-974
7. Sobotkova L *et al.* (1996). Development of a high-expression system for penicillin G acylase based on the recombinant *Escherichia coli* strain RE3(pKA18). *Enzyme Microb. Technol.* 19: 389-397
8. Yomano LP *et al.* (2008). Re-engineering *Escherichia coli* for ethanol production. *Biotechnol. Lett.* 30: 2097-2103
9. Zhang X *et al.* (2007). Production of L-alanine by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77: 355-366
10. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. (2004).
11. Deutsche Sammlung von Microorganism und Zellkulturen (DSMZ). <http://www.dsmz.de/microorganisms/html/strains/strain.dsm001116.html> (14-02-2011)
12. American Type Culture Collection (ATCC). <http://www.lgcstandards-atcc.org/> (14-02-2011)
13. Pohanka M *et al.* (2007). Diagnosis of tularaemia using piezoelectric biosensor technology. *Talanta* 71: 981-985