

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 27 januari 2014
KENMERK CGM/140127-01
ONDERWERP Advies classificatie *Geobacter metallireducens*

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag met de titel 'Biologische en natuurkundige karakterisatie van stroom-geleidende bacteriële pili door middel van *in vivo* (fluorescente) microscopie en *in vitro* quantum-fysische meetmethoden' van de Technische Universiteit Delft, deelt de COGEM u het volgende mee.

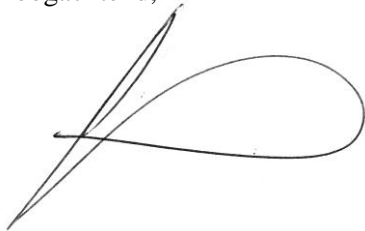
Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van de bacterie *Geobacter metallireducens*. Tevens is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met deze bacteriesoort en over de eventuele plaatsing van *G. metallireducens* 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. *G. metallireducens* wordt als modelorganisme gezien voor de bestudering van onder andere de zuurstofloze (anaerobe) afbraak van aromatische verbindingen. Er zijn bij de COGEM geen publicaties bekend waarin *G. metallireducens* geassocieerd wordt met pathogeniteit bij mens, dier of plant. Conform haar advies uit 2011 adviseert *G. metallireducens* in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en acht zij opname van *G. metallireducens* in Bijlage 1 van de Regeling ggo gerechtvaardigd. Gebaseerd op deze indeling, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein indien de voorgenomen werkzaamheden met *G. metallireducens* plaatsvinden op ML-I inperkingsniveau.



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

Classificatie van *Geobacter metallireducens*

COGEM advies CGM/140127-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van de bacterie *Geobacter metallireducens*. Tevens is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met deze bacteriesoort en over de eventuele plaatsing van *G. metallireducens* op Bijlage 1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo).

Geobacter metallireducens

G. metallireducens behoort tot het genus *Geobacter* in de familie *Geobacteraceae*. Het is een strikt anaerobe, staafvormige, gramnegatieve bacterie die in 1987 geïsoleerd werd uit het sediment van de Potomac rivier in de Verenigde Staten.¹ De bacterie is in staat om organische verbindingen, zoals vetzuren, alcoholen en mono-aromatische koolwaterstoffen te oxideren naar CO₂ waarbij ijzer(III)oxide als elektronenacceptor dient.^{2,3} Ook kan de bacterie acetaat oxideren met behulp van mangaan-, nitraat-, en uraniumionen als elektronenacceptor.² Vanwege deze eigenschappen is *G. metallireducens* potentieel toepasbaar bij sanering en natuurlijke afbraak van bodemverontreinigingen.²

De gehele genomesequentie van *G. metallireducens* is bekend. Het genoom is 4 megabasenparen groot en bevat naar schatting 3635 genen. De bacterie bevat tevens een plasmide van 13 kilobasenparen waarop 13 genen gelegen zijn.^{4,5}

Pathogeniteitsclassificatie

In de Regeling ggo worden micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen.⁶ 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.⁶ 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. metallireducens* en *G. sulfurreducens* te transformeren met expressieplasmiden, waarin niet-schadelijke sequenties gekloneerd zijn die coderen voor membraanpotentiaal of pH-gevoelige fluorescente eiwitten. De membraanpotentiaal gevoelige eiwitten zijn afgeleid van bacteriële rhodopsines. Verder wordt het pH-gevoelige ‘green fluorescent protein’ (eGFP) gebruikt afkomstig uit de kwal *Aequorea victoria*.

Daarnaast wil de aanvrager verschillende gemodificeerde bacteriestammen gebruiken, waarbij de expressie van bepaalde membraaneiwitten is uitgeschakeld om zo de rol van deze eiwitten te bepalen. Deze stammen zijn volgens de aanvrager in het buitenland vervaardigd. Indien de mutanten niet uit het buitenland verkregen kunnen worden, zullen zij door de aanvrager zelf worden vervaardigd. Hiervoor wordt het gen dat codeert voor het membraaneiwit via homologe recombinatie vervangen door een antibioticumresistentie cassette die codeert voor kanamycine of streptomycine. De resistentiecassettes zijn gelegen op vectoren (of afgeleiden hiervan) die vermeld zijn in Bijlage 2.1.1 van de Regeling GGO.

Eerdere COGEM adviezen

Eind 2011 heeft de COGEM geadviseerd over de classificatie van (a)pathogene bacteriën.^{7,8} Daarbij is het gehele genus van *Geobacter* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. Verder heeft de

COGEM in 2012 de bacterie *G. sulfurreducens* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1 en achtte zij de opname van *G. sulfurreducens* in Bijlage 1 van de Regeling ggo gerechtvaardigd.

Overweging en advies

G. metallireducens wordt als modelorganisme gezien voor de bestudering van onder andere de anaerobe afbraak van aromatische verbindingen in de bodem en het grondwater.⁹ Sinds haar ontdekking in 1987 wordt *G. metallireducens* veelvuldig gebruikt in diverse laboratoria. Er zijn bij de COGEM geen publicaties bekend waarin *G. metallireducens* geassocieerd wordt met pathogeniteit bij mens, dier of plant. De genomsequentie geeft geen aanwijzingen voor de aanwezigheid van virulentiefactoren. De bacteriën kunnen pili en flagellen maken die kunnen bijdragen aan de voortbeweging en de vorming van zogenoemde biofilms. Deze eigenschappen zijn echter niet geassocieerd met ziekte. De donorsequenties en toe te passen plasmiden coderen niet voor (potentieel) schadelijke genproducten.

In 2011 heeft de COGEM het genus *Geobacter* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. De "American Type Culture Collection" beschouwt *G. metallireducens* als een micro-organisme vallend onder het laagste veiligheidsniveau ("biosafety level 1").¹⁰ Ook in de Duitse "Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe" is *G. metallireducens* in de laagste risicogroep ingedeeld.¹¹

Op basis van bovenstaande gegevens ziet de COGEM geen reden om haar advies uit 2011 te herzien. Zij adviseert *G. metallireducens* in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en acht opname in Bijlage 1 van de Regeling ggo gerechtvaardigd. Gebaseerd op deze indeling acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein indien de voorgenomen werkzaamheden met *G. metallireducens* plaatsvinden op ML-I inperkingsniveau.

Referenties

1. Lovley DR *et al.* (1987). Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism. *Nature* 330: 252-254
2. Lovley DR *et al.* (1993). *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Arch Microbiol.* 159(4): 336-344
3. Childers SE *et al.* (2002). *Geobacter metallireducens* accesses insoluble Fe(III) oxide by chemotaxis. *Nature*. 416: 767-769
4. Aklujkar M *et al.* (2009). The genome sequence of *Geobacter metallireducens*: features of metabolism, physiology and regulation common and dissimilar to *Geobacter sulfurreducens*. *BMC Microbiol.* 9: 109
5. *Geobacter metallireducens* (*Geobacter metallireducens* GS-15) Genome Browser Gateway. <http://bit.ly/1kDykhk> (bezocht op 16-1-2014)
6. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. Mei 2004
7. COGEM (2011). Classificatie apathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-02

8. COGEM (2011). Classificatie pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-03
9. Tremblay PL *et al.* (2012). A genetic system for *Geobacter metallireducens*: role of the flagellin and pilin in the reduction of Fe(III) oxide. *Environ Microbiol Rep.* 4: 82-88
10. ATCC: The Global Bioresource Center (16 januari 2014) <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/53774.aspx>
11. Fachausschuss Chemie, Bundesministerium für Arbeit und Soziales, Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA 466) (16 januari 2014) <http://www.baua.de/cae/servlet/contentblob/672886/publicationFile/48583/TRBA-466.pdf>