

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

**DATUM** 02 juni 2014  
**KENMERK** CGM/140602-01  
**ONDERWERP** Advies pathogeniteitsclassificatie *Clostridium autoethanogenum*

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 14-033 met de titel "Metabolic engineering of carboxydrotrophic clostridia" van Syngip B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd om de bacteriesoort *Clostridium autoethanogenum* te classificeren en werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) *C. autoethanogenum* die het eiwit isopreen-synthase tot expressie brengt, in te schalen.

*C. autoethanogenum* is geïsoleerd uit de keutels van konijnen en is in staat om de gassen koolstofmonoxide en koolstofdioxide om te zetten in acetaat en ethanol. De bacterie is niet geassocieerd met ziekte in konijnen. Verondersteld wordt dat *C. autoethanogenum* een belangrijke rol speelt in de nutriëntenbehoefte van konijnen.

Het eiwit isopreen-synthase is betrokken bij de productie van isopreen. Isopreen is onder andere betrokken bij smogvorming en heeft een negatieve invloed op de afbraak van het broeikasgas methaan. Deze koolwaterstof wordt door planten gemaakt en in het milieu uitgescheiden. Isopreen wordt ook door de mens uitgeademd.

De COGEM is van mening dat *C. autoethanogenum* tot het microbiom van konijnen behoort. Aangezien deze bacterie in de wetenschappelijke literatuur nooit is geassocieerd met pathogeniteit, en het genoom grote overeenkomst vertoont met de erkend apathogene bacterie *C. ljundahlii* adviseert de COGEM *C. autoethanogenum* in de laagste pathogeniteitsklasse in te delen.

Door het apathogene karakter van *C. autoethanogenum*, het feit dat isopreen algemeen aanwezig is in het milieu en de aard en opzet van voorgenomen werkzaamheden acht de COGEM de risico's voor mens en milieu van voorgenomen laboratoriumwerkzaamheden met gg-*C. autoethanogenum* verwaarloosbaar klein. Derhalve adviseert zij deze werkzaamheden in te schalen 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

# Pathogeniteitsclassificatie *Clostridium autoethanogenum* en inschaling van werkzaamheden met gg-*C. autoethanogenum*

## COGEM advies CGM/140602-01

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de vergunningaanvraag IG 14-033 met de titel ‘*Metabolic engineering of carboxydrotrophic clostridia*’ van Syngip B.V. De aanvrager wil onder andere het isopreen-synthase uit de zilverpopulier (*Populus alba*) in de bacterie *Clostridium autoethanogenum* tot expressie brengen.

De adviesvraag betreft de pathogeniteitsclassificatie van de bacteriesoort *C. autoethanogenum* en de inschaling van de werkzaamheden met het genetisch gemodificeerde *C. autoethanogenum*.

#### 1.1 *Clostridium autoethanogenum*

De bacteriesoort *C. autoethanogenum* behoort tot het genus *Clostridium* binnen de familie van de Bacillaceae. Het *Clostridium* genus bestaat uit een heterogene groep van tenminste 12 lijnen van anaerobe, gram-positieve, staaf-vormige en sporenvormende bacteriën.<sup>1</sup> *Clostridia* worden over de gehele wereld in de bodem en in watersediment aangetroffen en resideren tevens in het maag-darmkanaal van dieren en mensen. Hoewel de meeste *Clostridium* soorten een strikt saprofytisch bestaan leiden, veroorzaken enkele soorten ziekten in mens en dier.

Onderzoek naar anaerobe micro-organismen die koolstofmonoxide (CO) kunnen omzetten in bruikbare chemicaliën als methaan en acetaat heeft in 1994 geleid tot de isolatie van de bacteriesoort *C. autoethanogenum* uit de feces van konijnen.<sup>2</sup> Dit micro-organisme is in staat om enkelvoudige koolstofgassen als koolstofmonoxide (CO) en koolstofdioxide (CO<sub>2</sub>) om te zetten in acetaat en ethanol. Op basis van deze eigenschap is *C. autoethanogenum* ingedeeld in het cluster van zogenaamde ‘acetogene’ bacteriën waartoe ook *C. ljungdahlii* en *C. ragsdalei* behoren.<sup>2,3,4</sup>

Naast het gebruik van CO is *C. autoethanogenum* ook in staat suikers afkomstig van cellulose afbraak zoals xylose en arabinose te metaboliseren. Sinds de eerste beschrijving van deze bacterie in 1994 zijn er verscheidene studies gedaan naar het energie-metabolisme van *C. autoethanogenum* en de optimale condities waaronder CO wordt omgezet in ethanol.<sup>4,5,6,7,8,9</sup>

#### 1.2 *Isopreen synthase*

Isopreen is een vluchtige koolwaterstof die door dieren, bacteriën en verschillende planten wordt uitgescheiden. Wereldwijd wordt de emissie van isopreen door natuurlijke bronnen geschat op minimaal 100 Tg/jaar.<sup>10,11</sup> De emissie van isopreen staat sinds kort in de belangstelling omdat het betrokken is bij de vorming van smog in de lage atmosfeer en omdat het de concentratie van atmosferische OH radicalen verlaagt die van belang zijn bij de afbraak van het broeikasgas methaan.<sup>12</sup>

Het enzym isopreen-synthase is in planten betrokken bij de synthese van isopreen uit dimethylallyldifosfaat. De functie van isopreen in de plant wordt slechts ten dele begrepen, maar het lijkt de plant te beschermen tegen omgevingsstress als tijdelijke hoge temperaturen en oxidatieve schade.<sup>10</sup> Isopreen is een belangrijke grondstof voor de rubber en farmaceutische industrie.

### ***1.3 Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen***

Volgens de Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (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.

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. 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 mogelijk anderszins 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.

Opportunistische pathogenen, die uitsluitend ziekte kunnen veroorzaken bij individuen met een verzwakt immuunsysteem, worden in de regel eveneens als niet pathogeen beschouwd.

## **2. Eerder COGEM advies en classificatie in andere landen**

In 2007 heeft de COGEM een onderzoeksproject laten uitvoeren naar de pathogeniteitsclassificatie van een groot aantal bacteriesoorten. Daarbij zijn lijsten van 9 beoordelende instanties uit het buitenland met elkaar vergeleken. Op grond van deze vergelijking en op basis van een beoordeling van experts heeft dit vervolgens tot een rapport met uiteindelijke pathogeniteitsclassificaties geleid. In haar adviezen uit 2011 over de classificatie van (a)pathogene bacteriën heeft de COGEM zich gebaseerd op dit rapport, en heeft zij verschillende *Clostridium* soorten geclassificeerd als een klasse 2 pathogeen.<sup>13</sup> In het advies over apathogene bacterie soorten uit 2011 en de update van de lijsten met bacterieclassificaties uit 2013 zijn alleen *Clostridium butyricum* en *Clostridium phytofermentans* als

apathogeen aangemerkt.<sup>14,15</sup> Op de huidige Bijlage 1 staan verschillende *Clostridium* soorten als apathogeen vermeld, waaronder de aan *C. autoethanogenum* verwante soort *C. ljungdahlii*.

Door de Duitse instantie “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen” is *C. autoethanogenum* voorlopig geassocieerd in de laagste risicogroep (risicogroep 1).<sup>16</sup> Daarentegen worden de *Clostridium* spp. door de ‘Public Health Agency of Canada’ in zijn algemeenheid in risicogroep 2 ingedeeld, onder vermelding dat dit niet geldt voor alle *Clostridium* soorten.<sup>17</sup>

### 3. Overweging en advies

#### 3.1 Classificatie van *Clostridium autoethanogenum*

De acetogene bacteriesoort *C. autoethanogenum* is geïsoleerd uit de feces van konijnen. Het is al lange tijd bekend dat in de blinde darm van konijnen CO<sub>2</sub> omgezet wordt in acetaat en uit wetenschappelijk onderzoek is gebleken dat konijnen feces een rijke bron is aan CO-benuttende bacteriën.<sup>2</sup> *C. autoethanogenum* is niet geassocieerd met ziekte in deze dieren en wordt zelfs verondersteld een belangrijke rol te vervullen in de nutriëntenbehoeften van konijnen.<sup>2</sup> De COGEM is derhalve van mening dat deze bacterie waarschijnlijk deel uit maakt van het normale microbioom van konijnen.

Niet alleen de transportsector maar ook de chemische industrie is afhankelijk van fossiele brandstoffen. Gasfermentatie van CO of CO<sub>2</sub> in ethanol of acetaat vormt voor deze sectoren een interessante alternatieve route voor de productie van chemicaliën en biobrandstoffen. Vanuit dit perspectief zijn acetogene bacteriën onderwerp van uitgebreid wetenschappelijk onderzoek. Ook naar *C. autoethanogenum* zijn sinds 1994 verschillende studies uitgevoerd om het energie-metabolisme van deze bacterie te ontrafelen en de optimale condities waaronder CO wordt omgezet in ethanol in kaart te brengen. Voor zover bij de COGEM bekend, is *C. autoethanogenum* in de wetenschappelijke literatuur nooit in verband gebracht met pathogeniteit.

*C. autoethanogenum* is zowel fenotypisch als genotypisch sterk verwant aan het apathogene *C. ljungdahlii*. Beide zijn anaerobe, gram-positieve, staafvormige bacteriën die kunnen groeien op CO of CO<sub>2</sub> als de bron van energie en koolstof, en deze gassen omzetten in acetaat en ethanol.<sup>2,3,18</sup> Op basis van het 16S rRNA gen zijn beide micro-organismen niet van elkaar te onderscheiden en ook daarbuiten hebben ze een hoge mate van nucleotidenovereenkomst (TETRA correlatiewaarde van 0.9977).<sup>18</sup> Onlangs zijn de verschillen in de nucleotidesequenties van *C. autoethanogenum* en *C. ljungdahlii* uitgebreid bestudeerd.<sup>19</sup> Deze analyse wees uit dat het genoom van *C. ljungdahlii* ten opzichte van *C. autoethanogenum* veel meer DNA-sequenties van mogelijke pro-fagen bevat. Tevens is er een verschil in het palet van genen aangetoond die betrokken zijn bij het centrale metabolisme en bepalen welke substraten gebruikt kunnen worden. Dit vormt een mogelijke verklaring voor kleine verschillen in het metabolisme van beide micro-organismen. Daarnaast zijn verschillen waargenomen in de eiwitten die betrokken zijn bij de sporulatie en het verdedigingssysteem van beide bacteriën. Opmerkelijk is hierbij de aanwezigheid van een CRISPR systeem in *C. autoethanogenum* dat afwezig is in *C. ljungdahlii*. De sequentieanalyse van het genoom van *C. autoethanogenum* heeft geen indicaties opgeleverd die duiden op de aanwezigheid van toxines of virulentie factoren, en er op zouden wijzen dat *C. autoethanogenum* pathogene eigenschappen zou kunnen bezitten.

Op basis van bovenstaande overwegingen is de COGEM van mening dat de bacteriesoort *C. autoethanogenum* geen pathogene en toxische eigenschappen bezit en acht zij de indeling van deze soort in pathogeniteitsklasse 1 en plaatsing op Bijlage 1 gerechtvaardigd.

### **3.2 Inschaling van werkzaamheden met gg-*C. autoethanogenum***

De aanvrager wil het isopreen-synthase in de bacterie *C. autoethanogenum* tot expressie brengen. De expressie staat onder invloed van een induceerbare promotor, waardoor het alleen in aanwezigheid van lactose wordt geproduceerd. Vermoedelijk is het resulterende ggo door de expressie van het enzym isopreen-synthase in staat de koolwaterstof isopreen te synthetiseren.

Enerzijds wordt deze vluchtige koolwaterstof in de wetenschappelijke literatuur in verband gebracht met smogvorming en een verminderde afbraak van het broeikasgas methaan.<sup>12</sup> Ook zijn er aanwijzingen dat betreffende koolwaterstof carcinogeen is voor de muis, in tegenstelling tot de rat.<sup>20</sup> Anderzijds wordt isopreen algemeen geproduceerd en uitgescheiden door planten en vormt het een van de belangrijkste endogene koolwaterstoffen die door de mens uitgedemd wordt.<sup>11,20</sup> Op basis van bovengenoemde eigenschappen van isopreen, het feit dat isopreen algemeen aanwezig is in het milieu, de aard en opzet van voorgenomen werkzaamheden en het apathogene karakter van *C. autoethanogenum* acht de COGEM de risico's voor mens en milieu bij genoemde laboratoriumwerkzaamheden met betreffend gg-*C. autoethanogenum* verwaarloosbaar klein. Derhalve adviseert zij deze werkzaamheden in te schalen op ML-I inperkingsniveau.

## **4. Referenties**

1. Johnson EA (2009). Clostridia. In: Encyclopedia of Microbiology. Third edition. Ed. Schaechter M Academic Press, Elsevier, Oxford (UK)
2. Abrini *et al.* (1994). *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. Arch. Microbiol 161:345-51
3. Tanner R *et al.* (1993). *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an acetogenic species in Clostridial rRNA homology group I. Int J of Syst Bacteriol 43:232-236
4. Wang S *et al.* (2013). NADP-specific electron-bifurcating [FeFe]-hydrogenase in a functional complex with formate dehydrogenase in *Clostridium autoethanogenum* grown on CO. J Bacteriol 195:4373-4386
5. Cotter JL *et al.* (2009). Influence of process parameters on growth of *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* on synthesis gas. Enzyme Microb Technol 44:281-288
6. Köpke M *et al.* (2014). Reconstruction of an acetogenic 2,3-butanediol pathway involving a novel NADPH-dependent primary-secondary alcohol dehydrogenase. Appl Environ Microbiol 80:3394-403
7. Guo Y *et al.* (2010). Medium optimization for ethanol production with *Clostridium autoethanogenum* with carbon monoxide as sole carbon source. Bioresour Technol 101:8784-8789
8. Abubackar HN *et al.* (2012). Biological conversion of carbon monoxide to ethanol: Effect of pH, gas pressure, reducing agent and yeast extract. Bioresour Technol 114:518-522
9. Cotter JL *et al.* (2009). Ethanol and acetate production by *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* using resting cells, Bioprocess Biosyst Eng 32:369-380

10. Köksal M *et al.* (2010). Structure of isoprene synthase illuminates the chemical mechanism of teragram atmospheric carbon emission. *J Mol Biol* 402:363-373
11. Vickers CE *et al.* (2010). Genetic structure and regulation of isoprene synthase in poplar (*Populus* spp.) *Plant Mol Biol* 73:547-558
12. Miller B *et al.* (2001). First isolation of an isoprene synthase gene from poplar and successful expression of the gene in *Escherichia coli*. *Planta* 213:383-487
13. COGEM (2011). Classificatie pathogene bacterien. COGEM advies CGM/111220-03
14. COGEM (2011). Classificatie apathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-02
15. COGEM (2013). Update van de lijsten met classificaties van bacteriën. COGEM advies CGM/131022-01
16. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. [http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-10061.html?tx\\_dsmzresources\\_pi5%5BreturnPid%5D=304](http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-10061.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=304) (mei 2014)
17. Public Health Agency of Canada. <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/clostridium-spp-eng.php> (mei 2014)
18. Bruno-Barcena JM *et al.* (2013). Genome sequence of the autotrophic acetogen *Clostridium autoethanogenum* JA1-1 strain DSM 10061, a producer of ethanol from carbon monoxide. *Genome Announc* 15:1 doi: 10.1128/genomeA.00628-13
19. Brown SD *et al.* (2014). Comparison of single-molecule sequencing and hybrid approaches for finishing the genome of *Clostridium autoethanogenum* and analysis of CRISPR systems in industrial relevant Clostridia. *Biotechnol Biofuels* 7:40 doi: 10.1186/1754-6834-7-40
20. Melnick RL (1994). Technical report on toxicity studies of isoprene: National Toxicology Program [http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/st\\_rpts/tox031.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/st_rpts/tox031.pdf) ( mei 2014)