

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Waterstaat  
Mevrouw drs. S. van Veldhoven-van der Meer  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 10 juli 2018  
**KENMERK** CGM/180710-01  
**ONDERWERP** Advies classificatie bacterie *Clostridium thermosuccinogenes*

Geachte mevrouw Van Veldhoven,

Naar aanleiding van een verzoek van Purac Biochem B.V. om de bacterie *Clostridium thermosuccinogenes* op Bijlage 2, lijst A1 te plaatsen (IG 18-104\_2.13-000), deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacterie *Clostridium thermosuccinogenes* en de plaatsing van deze bacterie op Bijlage 2, lijst A1 (apathogene gastheerorganismen) van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen'.

*C. thermosuccinogenes* is een warmteminnende (thermofiele) anaerobe bacterie die voorkomt in de Nederlandse bodem en is aangetroffen in de fecale flora van koeien. Hoewel mens, dier en plant met de bacterie in aanraking komen, zijn er geen aanwijzingen dat *C. thermosuccinogenes* bij deze organismen ziekte veroorzaakt. Tevens zijn er geen aanwijzingen dat de bacterie genen bezit die coderen voor virulentiefactoren of pathogeniteitskenmerken. De COGEM is daarom van oordeel dat de bacterie niet pathogeen is, en adviseert *C. thermosuccinogenes* in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en op te nemen in Bijlage 2, lijst A1 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. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo  
                  Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW

# Pathogeniteitsclassificatie van de anaerobe bacterie

## *Clostridium thermosuccinogenes*

### COGEM advies CGM/180710-01

#### 1. Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van Purac Biochem B.V. (IG 18-104) is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriesoort *Clostridium thermosuccinogenes* en plaatsing van deze bacterie op Bijlage 2, lijst A1 van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen' (Regeling ggo).<sup>1</sup> Deze bijlage bestaat uit een lijst van gastheerorganismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant. Opname op Bijlage 2, lijst A1 betekent dat onder ML-I laboratoriumcondities met het betreffende organisme genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) vervaardigd mogen worden indien hierbij vectoren worden gebruikt die wél, of inserties die níet, op de A-lijsten staan (respectievelijk 'lijst A2 veilige vectoren' en 'lijst A3 inserties'). Activiteiten met deze ggo's kunnen, zonder dat een aanvrager daar een milieurisicobeoordeling voor hoeft aan te leveren, direct na kennisgeving gestart worden.

#### 2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden in de Regeling ggo 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. *Clostridium thermosuccinogenes***

*C. thermosuccinogenes* is voor het eerst in 1991 beschreven en in 1995 op de internationaal erkende taxonomische 'List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature' opgenomen.<sup>2,3,4</sup> Het is een thermofiele grampositieve staafvormige sporevormende strikt anaerobe bacterie, die onder meer in staat is inuline te fermenteren en barnsteenzuur te produceren. Het temperatuurbereik voor inuline fermentatie bedraagt 37 tot 75°C met een optimumtemperatuur van 58°C.<sup>2,8</sup> De bacterie is tevens geassocieerd met het afbreken van lignocellulose, en mogelijk interessant voor industriële fermentatieprocessen.<sup>5,6</sup>

In de literatuur zijn vier *C. thermosuccinogenes* stammen beschreven.<sup>2,7,8,9</sup> Deze zijn geïsoleerd uit koemest, bietenpulp, aarde rondom een Aardpeer ('Jeruzalemartisjok'), en het sediment van een tropische vijver van een botanische tuin. Alle vier de stammen zijn afkomstig uit Nederland.<sup>2</sup> 16S rRNA analyses op de fecale flora van patiënten met het 'irritable bowel syndrome' (prikkelbare darmsyndroom; IBS) en de fecale flora van een gezonde controlegroep laten zien dat er een bepaald *C. thermosuccinogenes* fylotype in feces voorkomt. De 16S rRNA nucleotidesequentie van dit fylotype is voor 85% gelijk aan dat van *C. thermosuccinogenes*. Ten opzichte van de gezonde controlegroep komt het fylotype '*C. thermosuccinogenes* 85%' bij sommige vormen van IBS frequenter en bij andere vormen minder frequent voor.<sup>10,11</sup>

De aanvrager heeft het genoom van de vier *C. thermosuccinogenes* stammen laten sequencen en deze vervolgens bioïnfarmatisch geanalyseerd. Bij de analyses is gebruik gemaakt van de publiek toegankelijke databases van het 'Center for Genomic Epidemiology'.<sup>12</sup> Het betroffen een database met nucleotidesequenties van virulentiegenen ('VirulenceFinder'), en een database met eiwitgroepen die óf geassocieerd zijn met pathogene, óf met niet-pathogene micro-organismen ('PathogenFinder'). De aanvrager geeft aan dat er op grond van de analyses geen aanwijzingen zijn dat de *C. thermosuccinogenes* stammen genen bezitten die coderen voor virulentiefactoren of pathogeniteitskenmerken.

### **4. Eerder COGEM advies**

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over *C. thermosuccinogenes*. Wel heeft zij geadviseerd over andere bacteriën binnen het genus *Clostridium*.<sup>13</sup> *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium*

*butyricum* en *Clostridium phytofermentans* heeft zij ingedeeld in klasse 1. Een veertigtal *Clostridia* soorten waaronder *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* en *Clostridium tetani*, heeft zij ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.

## 5. Classificaties door andere beoordelende instanties

De ‘Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin’ (BAuA) die pathogeniteit voor de mens beoordeelt, heeft *C. thermosuccinogenes* ingedeeld in risicogroep 1.<sup>14</sup> Het Zwitserse ‘Federal Office for the Environment’ (FOEN) heeft de bacteriesoort eveneens in de laagste risicogroep ingedeeld.<sup>15</sup> De FOEN neemt pathogeniteit voor mens, dier en plant in ogenschouw. De inschaling door buitenlandse instanties geldt als referentie en achtergrondinformatie bij de risicobeoordeling die door de COGEM wordt uitgevoerd.

## 6. 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 voor handen.

*C. thermosuccinogenes* komt voor in de Nederlandse bodem en is aangetroffen in de fecale flora van koeien. Daarnaast zijn er op basis van analyses op 16S rRNA coderende sequenties aanwijzingen dat een bacterie, verwant aan *C. thermosuccinogenes*, voorkomt in de fecale flora van de mens. Hoewel mens, dier en plant met *C. thermosuccinogenes* in aanraking komen, zijn er geen aanwijzingen dat de bacterie als ziekteverwekkend voor mens, dier of plant aangemerkt kan worden. Tevens zijn er geen aanwijzingen dat de bacterie genen bezit die coderen voor virulentiefactoren of pathogeniteitskenmerken. Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat *C. thermosuccinogenes* niet pathogeen is en adviseert zij de bacterie in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Tevens is de COGEM van oordeel dat *C. thermosuccinogenes* in aanmerking komt voor plaatsing op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

## Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2015). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <http://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2017-01-01> (bezocht: 5 juli 2018)
2. Drent WJ *et al.* (1991). Fermentation of inulin by *Clostridium thermosuccinogenes* sp. nov., a thermophilic anaerobic bacterium isolated from various habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 455-462
3. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). [www.bacterio.net/clostridium.html](http://www.bacterio.net/clostridium.html) (bezocht: 29 juni 2018)
4. Validation list (1995). Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List no. 55. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 879-880
5. Koendjibiharie JG *et al.* (2018). Investigating the central metabolism of *Clostridium thermosuccinogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 84: e00363-18

6. Wang W *et al.* (2011). Characterization of a microbial consortium capable of degrading lignocellulose. *Bioresour. Technol.* 102: 9321-9324
7. Sridhar J & Eiteman MA (1999). Influence of redox potential on product distribution in *Clostridium thermosuccinogenes*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 82: 91-101
8. Sridhar J *et al.* (2000). Elucidation of enzymes in fermentation pathways used by *Clostridium thermosuccinogenes* growing on inulin. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 246-251
9. Sridhar J & Eiteman MA (2001). Metabolic flux analysis of *Clostridium thermosuccinogenes*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 94: 51-69
10. Lyra A *et al.* (2009). Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome distinguishable by 16S rRNA gene phylotype quantification. *World J. Gastroenterol.* 15: 5936-5945
11. Lyra A *et al.* (2010). Effect of a multispecies probiotic supplement on quantity of irritable bowel syndrome-related intestinal microbial phylotypes. *BMC Gastroenterol.* 10: 110-120
12. Center for Genomic Epidemiology. [www.genomicepidemiology.org](http://www.genomicepidemiology.org) (bezocht: 29 juni 2018)
13. COGEM (2017). Actualisatie van de lijsten met de indeling in pathogeniteitsklassen van een groot aantal apathogene en pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/170929-03
14. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (2015). Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe. [www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-466.html](http://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-466.html) (bezocht: 29 juni 2018)
15. Federal Office for the Environment (2013). Classification of organisms. [www.bafu.admin.ch/bafu/en/home/topics/biotechnology/publications-studies/publications/classification-of-organisms.html](http://www.bafu.admin.ch/bafu/en/home/topics/biotechnology/publications-studies/publications/classification-of-organisms.html) (bezocht: 29 juni 2018)