

Aan de staatssecretaris van  
Volkshuisvesting, Ruimtelijke  
Ordening en Milieubeheer  
De heer drs. P.L.B.A. van Geel  
Postbus 30945  
2500 GX Den Haag

**DATUM** 26 oktober 2006  
**KENMERK** CGM/061026-01  
**ONDERWERP** Advies klonering methanotrofe mengpopulaties (IG 99-194/11)

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van een adviesvraag met betrekking tot de klonering van sequenties afkomstig van methanotrofe mengpopulaties van de Radboud Universiteit Nijmegen, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de risico's van de klonering van sequenties afkomstig uit methaan-oxiderende bacteriën; de zogenaamde methanotrofen. Om methanotrofen te kloneren worden ze eerst gekweekt. Er zouden risico's voor mens en milieu kunnen ontstaan als deze bacteriën, of andere micro-organismen die zich tijdens de kweekperiode in het medium vermeerderd hebben, toxische of pathogene eigenschappen bezitten. VROM heeft de COGEM gevraagd of het uit te sluiten valt dat bovenstaande pathogene of toxische organismen tijdens het experiment aanwezig zijn.

De bacteriën worden vooral geïsoleerd uit grondmonsters en water, bronnen waar veel mensen mee in contact komen. Hiernaast is er over de hele wereld veel onderzoek verricht naar methanotrofen. Indien de bacteriën pathogeen of toxisch zouden zijn, zou hier zeer waarschijnlijk melding van zijn gemaakt. Bij de COGEM is geen literatuur bekend waaruit blijkt dat methanotrofe bacteriën toxisch of pathogeen zouden zijn. Zij acht de kans dat er pathogene of toxische methanotrofen in het kweekmedium aanwezig kunnen zijn zeer klein.

Het is bekend dat tijdens de kweek van methanotrofen een andere bacterie, de *Hyphobacterium* zich ook kan vermeerderen. Bij de COGEM zijn geen gegevens bekend die wijzen op een pathogeen of toxisch karakter van deze bacterie.

Concluderend is de COGEM van mening dat de voorgenomen werkzaamheden uitgevoerd kunnen worden op ML-I inperkingsniveau zonder dat de veiligheid voor mens en milieu in gevaar komt.

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 followed by a horizontal line and a small dash.

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

c.c. Dr. ir. B.P. Loos  
Dr. I. van der Leij

# Klonering van methanotrofe mengpopulaties in micro-organismen van klasse I

## COGEM advies CGM/061026-01

### Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de mogelijke risico's van de klonering in verschillende micro-organismen van sequenties afkomstig van een populatie methanotrofe bacteriën. Het is hierbij de vraag of de methanotrofe bacteriën toxische of pathogene eigenschappen hebben en als dit het geval is, of klonering van het genetisch materiaal van deze bacteriën in verschillende micro-organismen op ML-I niveau, een risico voor mens en milieu met zich mee kan brengen.

### *Methanotrofe bacteriën.*

Methanotrofe bacteriën kenmerken zich doordat ze alleen gebruik maken van methaan (CH<sub>4</sub>) als koolstof- en energiebron. Hiernaast bezitten ze enzymen die bekend staan als methaan mono-oxygenases (MOO) en die methaan oxideren naar methanol. Methanol wordt uiteindelijk via formaldehyde en methaanzuur omgezet in CO<sub>2</sub> (2).

De bacteriën komen voornamelijk voor in de bodem, maar zijn ook geïsoleerd uit zeewater, zoetwater en geisers (1). De bacteriën spelen een belangrijke rol bij de mondiale kringloop van koolstof, stikstof en zuurstof en bij de afbraak van schadelijke chemische verbindingen (2). Ze oxideren methaan uit de atmosfeer en dragen zo bij aan de vermindering van het broeikas effect. Hiernaast bezitten ze veel potentie om ingezet te worden bij de biologische afbraak van toxische chemicaliën (bioremediatie) of bij de commerciële productie van verschillende chemicaliën (1-2). Ook in de diervoederindustrie heeft één bepaalde methanotrofe bacterie, de *Methylococcus capsulatus* haar toepassing gevonden. De eiwitten uit deze bacterie worden hier gebruikt in vis- en veevoer (3).

Methanotrofe bacteriën behoren tot de divisie van de *Proteobacteriën* en zijn op te delen in twee hoofdgroepen; type I en type II. De indeling geschiedt op basis van 16S rRNA, morfologie, koolstofassimilatie routes, membraantype en samenstelling. Type I methanotrofen behoren tot de familie van de *Methylococcaceae* en tot de  $\gamma$ -subklasse van de *Proteobacteriën*. Methanotrofen van type II vallen onder de *Methylocystaceae* familie en behoren tot de  $\alpha$ -subklasse van de *Proteobacteriën*.

Bij de COGEM zijn geen voorbeelden uit de literatuur bekend waarin pathogene of toxische eigenschappen van methanotrofen worden beschreven. Alle methanotrofen die

zijn ingedeeld in pathogeniteitsklassen behoren tot klasse I (5-6). Dit houdt in dat ze niet pathogeen zijn.

#### *Voorgestelde werkzaamheden*

De aanvrager heeft het voornemen genomisch DNA, genen coderend voor 16S rRNA en de subunits van het enzym methaan mono-oxygenase afkomstig uit de methanotrofe mengpopulatie te kloneren in *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Methanosacrina barkeri*, *Methanothermobacter thermautotrophicus*, en *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. De gebruikte gastheren zijn allen geïnclassificeerd als apathogeen.

Om de mengpopulaties te verkrijgen worden cultures gekweekt waarbij methaan de enige koolstof- en energiebron is. De cultures worden onder zowel aërobe (met zuurstof) als anaërobe (met nitraat) condities gekweekt.

#### **Overwegingen en advies**

De risico's van de voorgenomen werkzaamheden betreffen de mogelijke expressie van toxische of pathogene sequenties in de verschillende gastheren. Deze sequenties zouden afkomstig kunnen zijn van de methanotrofe bacteriën of van andere micro-organismen die zich tijdens de kweekperiode in het medium vermeerderd hebben. Bureau GGO heeft de COGEM de vraag gesteld of het uitgesloten kan worden dat er in de methanotrofe mengpopulaties pathogene of toxine-producerende micro-organismen aanwezig zijn.

Voor zover bekend bij de COGEM zijn er geen methanotrofe bacteriën die toxische of pathogene eigenschappen bezitten. De meeste methanotrofen zijn geïsoleerd uit verschillende bodemtypen of uit water. Contact tussen mens en deze bronnen van methanotrofen heeft in het verleden veelvuldig plaatsgevonden. Hiernaast zijn in laboratoria vele experimenten met methanotrofen verricht. Indien methanotrofen toxisch of pathogeen waren geweest was dit waarschijnlijk wel in de literatuur vermeld.

Omdat niet alle methanotrofen geïdentificeerd zullen zijn is de aanwezigheid van toxische of pathogene sequenties in een mengpopulatie wetenschappelijk gezien nooit uit te sluiten. De COGEM is echter van mening dat de kans hierop zeer klein is.

Tijdens de kweek van methanotrofen wordt gestreefd naar een "zuivere" culture waarin alleen methanotrofe bacteriën aanwezig zijn. Uit onderzoek is echter gebleken dat de bacterie *Hyphomicrobium* zich ook in het kweekmedium kan vermeerderen. Deze bacterie groeit niet op methaan maar op methanol. De methanol die tijdens de groei van de methanotrofen gevormd wordt, is toxisch voor obligate methanotrofe bacteriën. *Hyphomicrobium* gebruikt deze methanol en voorkomt zo dat de methanolniveaus in het medium te hoog worden met het gevolg dat de groei van de methanotrofen niet geremd wordt (2,4).

Naar de mening van de COGEM zijn in de literatuur geen voorbeelden beschreven waaruit blijkt dat *Hyphomicrobium* toxische of pathogene effecten kan veroorzaken. Hiernaast zijn alle *Hyphomicrobium* soorten die zijn ingedeeld in pathogeniteitsklassen, bestempeld als een klasse I organisme, wat bovenstaande apathogene status bevestigt (5).

Concluderend is de COGEM van mening dat de beschreven klonering van de methanotrofe mengpopulatie kan plaatsvinden op ML-I niveau zonder dat de veiligheid voor mens en milieu hierbij in het geding komt

### **Referenties**

1. Murrell J.C. en Radajewski S. (2000). Cultivation-independent techniques for studying methanotroph ecology. *Research in Microbiology* **151**: 807-814
2. Hanson R.S. en Hanson T.E. (1996). Methanotrophic Bacteria. *Microbiological reviews* **60**: 439-471
3. Innovatienetwerk groene ruimte en agrocluster (2005). Single Cell Protein (SCP) als alternatief voor soja. Een haalbaarheidsstudie. Rapportnummer 05.2.102
4. Moore R.L. (1981). The biology of *Hyphomicrobium* and other prosthecate, budding bacteria. *Annual review of microbiology* **35**: 567-594
5. VROM (2004). Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen.
6. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). Bacterial nomenclature XLS. Internetpagina: [http://www.dsmz.de/dsmz/main.php?menu\\_id=5](http://www.dsmz.de/dsmz/main.php?menu_id=5), 19 oktober 2006.

### **Geraadpleegde externe deskundigen**

Prof. dr. ir. A.J.M. Stams, werkzaam bij het laboratorium voor microbiologie, Wageningen Universiteit