

Aan de Minister van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
Mevrouw dr. J.M. Cramer
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 12 november 2008
KENMERK CGM/081112-01
ONDERWERP Werkzaamheden met *Clostridium phytofermentans*

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag met de titel “Genetische modificatie van Gram-positieve, niet-pathogene bacteriën ten bate van de productie van metabolieten en eiwitten” van TNO, Kerngebied Kwaliteit van Leven, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de bacterie *Clostridium phytofermentans*. Gevraagd wordt of deze soort beschouwd kan worden als een zogenaamd klasse 1 organisme en daarmee op Bijlage 1 geplaatst kan worden. Bijlage 1 is een lijst van micro-organismen welke niet ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant. Met organismen van deze lijst mag onder bepaalde voorwaarden op het laagste inperkingsniveau, ML-I, gewerkt worden.

Er zijn geen aanwijzingen dat *C. phytofermentans* pathogene eigenschappen bezit. Ook nauwverwante soorten zijn naar alle waarschijnlijkheid niet pathogeen. In de Verenigde Staten en in Duitsland mogen werkzaamheden met dit organisme op het laagste inperkingsniveau plaatsvinden. Inmiddels is in de Verenigde Staten tien jaar op dit niveau gewerkt met *C. phytofermentans* zonder dat gezondheids- of milieuproblemen zijn opgetreden.

Op basis van het bovenstaande, is de COGEM van mening dat *C. phytofermentans* beschouwd kan worden als apathogeen. De COGEM adviseert daarom om dit organisme te erkennen als klasse 1 en op te nemen op Bijlage 1.

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 genetisch gemodificeerde *Clostridium phytofermentans*

COGEM advies CGM/081112-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over het al dan niet pathogene karakter van de bacterie *Clostridium phytofermentans*. De aanvrager wil werkzaamheden met dit organisme uitvoeren onder inperkingsniveau ML-I.

Kenmerken van het micro-organisme

Alvorens op enkele kenmerken van *C. phytofermentans* in te gaan, wordt hieronder eerst informatie gegeven over het geslacht *Clostridium*.

Het *Clostridium* geslacht

Tot het geslacht *Clostridium* behoren meer dan 130 beschreven soorten welke sporenvormend en anaeroob of aerotolerant zijn (3). De organismen zijn wijdverspreid in het milieu en bevinden zich onder andere in de grond, het water en het riool (3). Bovendien zijn sommige clostridiumsoorten onderdeel van de normale microbiële flora in het maag-darmkanaal van mens en dier (3)

De meeste clostridiumsoorten zijn niet-schadelijke en leven van plantaardig afval. Maar sommigen zijn pathogeen voor mens en dier en worden vooral geassocieerd met huid- en weefselinfecties, voedselvergiftiging en darmontsteking (3). Een voorbeeld hiervan is *C. perfringens* (3). Slechts enkele clostridia zijn in staat om ernstige ziektes bij de mens te veroorzaken. Zo veroorzaakt *C. tetani* tetanus en *C. botulinum* botulisme (3).

Ziekte ten gevolge van de aanwezigheid van *Clostridium* bacteriën wordt vaak niet veroorzaakt door de bacterie zelf, maar door de gevormde toxines, zoals neuro- en enterotoxines (3). Dergelijke toxines zijn verantwoordelijk voor onder meer tetanus, botulisme en gasgangreen (onder andere door *C. perfringens* en *C. difficile*) (3).

Ook dieren kunnen geïnfecteerd raken met *Clostridium* bacteriën, waaronder *C. perfringens* en *C. botulinum*. Infecties kunnen onder meer optreden in vogels, herkauwers en paarden (4,9,10).

Verder is ook beschreven dat clostridiumsoorten infecties bij planten kunnen veroorzaken. Er wordt gedacht dat sommige soorten (zoals *C. butyricum*) een rol spelen bij het ontstaan van de ziekte 'wetwood syndrome' bij populier, iep en eik (5,6,7,8).

Kenmerken van *C. phytofermentans*

C. phytofermentans is geïsoleerd uit bosgrond in een gematigd vochtig gebied in de Verenigde Staten (1). *C. phytofermentans* kan alleen groeien onder anaerobe omstandigheden en heeft een optimale groeitemperatuur van 37°C (1). Het micro-

organisme is tevens in staat om te groeien bij een temperatuur van 15°C (1). Daarnaast groeit de bacterie bij een pH waarde die ligt tussen 6.0 en 9.0 (1). Verder vormt het organisme sporen (1). In de literatuur zijn geen aanwijzingen dat de bacterie toxines vormt. Het genoom van *C. phytofermentans* is inmiddels volledig gesequenced.

C. phytofermentans heeft zijn naam te danken aan het grote aantal plantaardige polysacchariden welke het kan benutten voor zijn groei (1). De bacterie wordt daarom ingedeeld bij de zogenaamde cellulolytische clostridiumsoorten (1). Zo is *C. phytofermentans* in staat om naast cellulose ook galactose, glucose, lactose, xylose en zetmeel af te breken (1). Eén van de afbraakproducten is ethanol, wat de bacterie interessant maakt voor de productie van biobrandstoffen (1,2).

De aanvrager geeft aan dat *C. phytofermentans* geen genen bevat die over een significante homologie beschikken met bekende *Clostridium* toxinegenen. Daarnaast stelt hij dat het organisme bovendien niet beschikt over andere genen welke geassocieerd zijn met pathogeniteit van mens, dier en plant.

Verder meldt de aanvrager dat Amerikaanse onderzoekers reeds tien jaar met *C. phytofermentans* werken onder Biosafety level 1 condities zonder dat er gezondheids- of milieuproblemen zijn opgetreden. Bovendien vinden werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *C. phytofermentans* in de Verenigde Staten ook plaats onder Biosafety level 1 richtlijnen.

De adviesvraag

De aanvrager verzoekt om handelingen met genetisch gemodificeerde *C. phytofermentans* te kunnen uitvoeren onder inperkingsniveau ML-I. De COGEM is daarop door het ministerie van VROM gevraagd of de bacterie in aanmerking komt voor erkenning als organisme van klasse 1 en daarmee op de zogenaamde Bijlage 1 geplaatst kan worden.

Bijlage 1 is een lijst van micro-organismen die in principe 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.

Om tot de klasse 1 te behoren, moet een micro-organisme voldoen aan één van de volgende voorwaarden:

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

3. 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 virulentie;
4. Van het micro-organisme is het niet-virulente karakter middels adequate tests aangetoond (11).

In de huidige inschalingspraktijk wordt een micro-organisme als pathogeen gezien als deze bij immunocompetente mensen een ziekte kan veroorzaken. Opportunistische pathogenen, die een ziekte kunnen veroorzaken bij immuungecompromiteerde individuen, worden als niet pathogeen (apathogeen) beschouwd en kunnen op Bijlage 1 geplaatst worden.

Overweging en advies

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van de bacterie *Clostridium phytofermentans*. Voor een klasse 1 erkenning dient het organisme aan één van de eerder genoemde criteria te voldoen.

Bij de COGEM zijn geen aanwijzingen bekend dat *C. phytofermentans* pathogene eigenschappen voor mens, dier of plant bezit. Ook in de wetenschappelijke literatuur zijn hiervoor geen aanwijzingen te vinden.

Met behulp van een fylogenetische stamboom van verschillende clostridiumsoorten is mogelijk aanvullend inzicht te verkrijgen in de pathogeniteit van het organisme. De stamboom is opgesteld op basis van 16sRNA sequenties. De stamboom bevat verschillende clusters, waarbij *C. phytofermentans* behoort tot het cluster XIVa. Dit cluster bevat veel organismen die in het milieu voorkomen (12). Clostridia uit cluster XIVa zijn geïsoleerd uit planten, aarde, de humane feces en het darmkanaal van dieren en termieten. Gedacht wordt dat de cluster XIVa clostridia in symbiose leven met hun gastheer (12).

Naar de mening van de COGEM kan uit de fylogenetische stambomen beschreven in de literatuur en aangeleverd door de aanvrager geconcludeerd worden dat *C. phytofermentans* niet nauw verwant is aan pathogene clostridiumsoorten. Deze mening wordt ondersteund door Professor Leschine die in de Verenigde Staten werkzaam is met de bacterie. Hoewel zij niet kan bewijzen dat *C. phytofermentans* onder specifieke omstandigheden geen toxines produceert, geeft zij aan dat toxineproductie geen onderdeel schijnt te zijn van de evolutionaire geschiedenis of van levensomstandigheden van de bacterie.

In Duitsland heeft de bedrijfsvereniging van de chemische industrie (Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie) een lijst opgesteld waarop micro-organismen afhankelijk van hun pathogeniteit worden ingedeeld in klasse 1 (apathogeen) tot klasse 4 (zeer pathogeen) (13). Deze zogenaamde ‘Duitse lijst’ wordt bijgehouden door het Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie (IMMIP) in Bonn. In 1998 vormde de ‘Duitse lijst’ de basis van Bijlage 1. Deze ‘Duitse lijst’ classificeert *C. phytofermentans* als klasse 1 organisme (13). Verder vermeldt de American Type Culture Collection dat werkzaamheden met het organisme uitgevoerd mogen worden onder Biosafety level 1, dat vergelijkbaar is met ML-I omstandigheden. (14).

Op basis van de gegeven overwegingen en de vergelijking met indelingen in het buitenland is de COGEM van mening dat *C. phytofermentans* beschouwd kan worden als apathogeen. De COGEM adviseert daarom dat dit organisme erkend kan worden als klasse 1 en opgenomen kan worden op Bijlage 1.

Referenties

1. Warnick TA, Methé BA en Leschine SB (2002). *Clostridium phytofermentans* sp. nov., a cellulolytic mesophile from forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 1155-1160
2. Biopact. Sunethanol secures funding for cellulosic ethanol based on Q microbe. Internet: www.biopact.com/2007_08_14_archive.html (4 november 2008)
3. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS en Phaller MA (2002). *Medical microbiology*. Mosby, Inc. 4th edition
4. RIVM infectieziekten (2006). Botulisme. Internet: www.rivm.nl/cib/infectieziekten-A-Z/infectieziekten/botulisme/index.jsp (4 november 2008)
5. Universiteit van Amsterdam & Stichting Utopa. Iepziekte Internet: www.dutchelmdisease.org/DUTCH/IEPZIEKTE/CORE/00/01/F0.HTML (4 november 2008)
6. United States Department of Agriculture (2006). A field guide to insects and diseases of California oaks. Internet: www.nature.berkeley.edu/comtf/pdf/psw_gtr197.pdf (4 november 2008)
7. Scott ES (1983). Populations of bacteria in poplar stems. *Eur J For Pathol* 14(2): 103-112
8. Schink B, Ward JC en Zeikus JG (1981). Microbiology of wetwood: importance of pectin degradation and *Clostridium* species in living trees. *App Environ Microbio* 42(3): 526-532
9. Keyburn AL, Boyce JD, Vaz P *et al.* (2008). NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *Plos Pathog* 4(2): e26
10. Uzal FA en Songer JG (2008). Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *J Vet Diagn Invest* 20(3): 253-265

11. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. Mei 2004
12. Saito A, Kawahara M, Ikeda S *et al.* (2008). Broad distribution and phylogeny of anaerobic endophytes of cluster XIVa clostridia in plant species including crops. *Microbes Environ* 23(1): 73-80
13. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. Internet: <http://www.dsmz.de/index.htm> (4 november 2008)
14. American Type Culture Collection. Internet: www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=700394&Template=bacteria (4 november 2008)