

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. B. Visser
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 28 december 2021
KENMERK CGM/211228-01
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie van het archaeon *Ignicoccus hospitalis*

Geachte mevrouw Visser,


Naar aanleiding van een verzoek van de Stichting Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee (NIOZ) (IG 21-184_2.13-000) om *Ignicoccus hospitalis* op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo te plaatsen, deelt de COGEM u hierover het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van het eencellige organisme *Ignicoccus hospitalis* en de plaatsing van dit organisme op lijst A1 van Bijlage 2 van de Regeling ggo.

I. hospitalis is een archaeon, een organisme dat overeenkomsten heeft met bacteriën. Dit archaeon is tijdens een duikexcursie geïsoleerd van rotsen bij een hydrothermale bron ten noorden van IJsland. *I. hospitalis* groeit alleen in een omgeving waar de temperatuur tussen de 70°C en 98°C is, geen zuurstof aanwezig is, en elementair zwavel en moleculair waterstof aanwezig is om energie te kunnen produceren. De cellen bevatten 2 membranen die verschillen in vet- en eiwitcompositie, en de soort heeft de unieke eigenschap dat het als gastheer fungeert voor de archaeon-soort *Nanoarchaeum equitans*. Er wordt veel onderzoek gedaan naar *I. hospitalis* vanwege deze bijzondere eigenschappen.

Voor zover bij de COGEM bekend, zijn er geen publicaties waarin melding wordt gemaakt dat *I. hospitalis* ziekteverwekkend is voor mensen, dieren of planten. Vanwege de specifieke groeiomstandigheden, zoals de hoge temperatuur en vereiste aanwezigheid van zwavel en waterstof en het feit dat dit archaeon alleen onder zuurstofarme omstandigheden kan groeien, kan uitgesloten worden dat dit archaeon kan overleven in mens, dier of plant. De COGEM is van oordeel dat *I. hospitalis* niet ziekteverwekkend is en adviseert deze soort in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en op te nemen in lijst A1 van Bijlage 2 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 Y. de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
 - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's
 DG Milieu en Internationaal

Pathogeniteitsclassificatie van het archaeon *Ignicoccus hospitalis*

COGEM advies CGM/211228-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van de Stichting Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee (NIOZ) (IG 21-184), is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de archaeobacterie *Ignicoccus hospitalis* (strain KIN4/I) en over plaatsing van deze soort op lijst A1 van Bijlage 2 van de Regeling ggo.¹ Deze bijlage bestaat uit een lijst van micro-organismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant. Opname op Bijlage 2, lijst A1 betekent dat onder ML-I laboratoriumcondities met het betreffende micro-organisme ggo's vervaardigd mogen worden indien hierbij vectoren worden gebruikt die wél, of inserties die níet, op de A-lijsten staan (lijst A2 veilige vectoren en lijst A3 inserties).

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.

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 één van de bovengenoemde voorwaarden van pathogeniteitsklasse 1 is voldaan, op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo geplaatst worden.

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. *Ignicoccus hospitalis*

Ignicoccus hospitalis is een eencellige prokaryoot die onder het domein van de *Archaea* valt. Hoewel deze organismen in het verleden ook wel als archaeobacteriën aangeduid werden, worden de *Archaea* tegenwoordig als apart domein gezien dat onderscheiden wordt van het domein *Bacteria* op basis van ribosomaal RNA.^{2,3} *I. hospitalis* behoort tot het fylum *Crenarchaeota*, familie *Desulfurococcaceae*, en is tijdens een duikexcursie geïsoleerd van rotsen bij een hydrothermale bron ten noorden van IJsland in de 'Kolbeinsey Ridge'.⁴ Er zijn naast *I. hospitalis* nog twee andere soorten beschreven van het genus *Ignicoccus*; *Ignicoccus islandicus* en *Ignicoccus pacificus*. *I. hospitalis* wordt op basis van de 16S rRNA sequenties onderscheiden van *I. islandicus* en *I. pacificus*. *Ignicoccus*-soorten zijn strikt anaerobe organismen die een chemolithoautotrofe levenswijze hebben, waarbij CO₂-fixatie plaatsvindt met energie die uitsluitend wordt opgewekt door de reductie van elementair zwavel met H₂ als elektron-donor. Hierbij wordt H₂S geproduceerd. Tevens zijn de soorten uit dit genus hyperthermofiel: zij groeien bij temperaturen tussen de 70°C en 98°C, met een optimum van 90°C.^{4,5} Er wordt geen groei waargenomen bij temperaturen onder de 70°C en bij (meer dan) 100°C, of bij een pH van 4 of lager, of 7,5 of hoger.⁴

I. hospitalis is ongeveer 1 tot 6 µm in diameter, en bevat hoogstens negen extracellulaire flagella-achtige uitsteeksels, die zich aan één kant van de cel bevinden. Deze uitsteeksels worden niet gebruikt voor voortbeweging, maar spelen waarschijnlijk een rol bij de adhesie aan verschillende oppervlaktes. De soort is gekenmerkt als Gram-negatief. *Ignicoccus*-soorten hebben een unieke celstructuur die gekenmerkt wordt door 2 membranen die verschillen in vet- en eiwitcompositie. Tussen de membranen, in het zogenaamde 'intermembrane compartiment' (IMC), vinden metabole processen plaats, zoals de synthese van ATP.^{5,6} Het genoom van *I. hospitalis* bestaat uit een enkel circulair chromosoom van 1.297.538 baseparen, en wordt beschouwd als het kleinste bekende genoom van een vrij-levend organisme dat onafhankelijk kan repliceren.⁷

I. hospitalis fungeert als unieke gastheer voor de archaeon-soort *Nanoarchaeum equitans* en naar deze interactie wordt veel onderzoek gedaan.^{4,8,9,10,11,12} *N. equitans* heeft een zeer klein genoom (ongeveer 490 kb) en is afhankelijk van *I. hospitalis* om in een co-cultuur gekweekt te worden. Hierbij hechten een of meerdere *N. equitans* aan het oppervlak van *I. hospitalis* en verkrijgen deze membraanlipiden en aminozuren van *I. hospitalis*. *I. hospitalis* kan wel in afwezigheid van *N. equitans* gekweekt worden.^{4,5} Onder co-cultuur-condities worden er geen voordelige of schadelijke effecten ondervonden door aanhechting van *N. equitans* bij *I. hospitalis*, waardoor niet geheel duidelijk is of er gesproken dient te worden van symbiose, parasitisme of commensalime.⁹ Aanhechting van *N. equitans* kan de groeisnelheid van individuele *I. hospitalis* vertragen, maar de cellulaire dichtheid en optimale groeiparameters van de *I. hospitalis*-cultuur verschillen niet bij aan- of afwezigheid van *N. equitans*. De

reincultuur van *I. hospitalis*, waarbij met ‘optical tweezers’ een Nanoarchaeum-vrije subcultuur wordt verkregen, wordt aangeduid als ‘strain KIN4/I^T’ (=DSM 18386).⁴

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over *Archaea* die tot het geslacht *Ignicoccus* of de familie *Desulfurococcaceae* behoren. Wel heeft zij verscheidene keren geadviseerd over thermofiele schimmels en bacteriën, waaronder de schimmels *Thermoascus aurantiacus*¹³ en *Corynascus thermophilus*¹⁴ – met optimale groeitemperaturen van 45°C tot 53°C -, en de (strikt) anaerobe bacteriën *Clostridium thermosuccinogenes*¹⁵ en *Thermincola potens*¹⁶ – met optimale groeitemperaturen tussen de 55°C en 58°C. Deze schimmels en bacteriën zijn alle ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.

5. Classificatie door andere organisaties

In de Duitse ‘Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen’ (DSMZ) is *I. hospitalis* ingedeeld in risicogroep 1.¹⁷ Deze indeling wordt tevens gehanteerd in de ‘List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature’ (LPSN).¹⁸ De ‘Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin’ (BAUA) heeft *I. hospitalis* eveneens als apathogeen ingedeeld in risicogroep 1.¹⁹ Het Zwitserse ‘Federal Office for the Environment’ (FOEN), die de pathogeniteit voor mens, dier en plant beoordeelt, heeft alleen de verwante soorten *Ignicoccus islandicus* en *Ignicoccus pacificus* geclassificeerd, deze zijn ingedeeld in risicogroep 1.²⁰ De inschaling door deze 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 micro-organismen weinig literatuur over apathogeniteit voorhanden.

I. hospitalis is een hyperthermofiel archaeon met een optimale groeitemperatuur van 90°C die voorkomt in hydrothermale bronnen in de oceaan. Er wordt veel onderzoek gedaan naar dit archaeon vanwege zijn bijzondere biologische eigenschappen, zoals het dubbele celmembraan en de unieke associatie met het archaeon *N. equitans*. Voor zover bij de COGEM bekend, zijn er geen publicaties waarin melding wordt gemaakt dat *I. hospitalis* pathogeen is voor mensen, dieren of planten. Vanwege de hyperthermofiele eigenschap, de specifieke groeicondities (zoals de vereiste aanwezigheid van zwavel en moleculair waterstof)²¹, en het feit dat dit archaeon alleen onder strikt anoxische condities (obligaat anaeroob) kan groeien, kan uitgesloten worden dat dit archaeon kan overleven in mens, dier of plant.

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat *I. hospitalis* (strain KIN4/I^T) niet pathogeen is. Tevens is zij van oordeel dat dit archaeon een historie van veilig gebruik kent. Omdat *I. hospitalis* voldoet aan criteria a en b van pathogeniteitsklasse 1, adviseert de COGEM deze soort in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en op te nemen in lijst A1 van Bijlage 2 van de Regeling ggo.

Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2014). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2021-10-01> (bezoekt: 21 december 2021)
2. Woese CR *et al.* (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 4576-4579
3. Winker S & Woese CR (1991). A definition of the domains *Archaea*, *Bacteria* and *Eucarya* in terms of small subunit ribosomal RNA characteristics. *Syst. Appl. Microbiol.* 14: 305-310
4. Paper W *et al.* (2007). *Ignicoccus hospitalis* sp. nov., the host of '*Nanoarchaeum equitans*'. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 803-808
5. Huber H *et al.* (2012). The unusual cell biology of the hyperthermophilic Crenarchaeon *Ignicoccus hospitalis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 102: 203-219
6. Näther DJ & Rachel R (2004). The outer membrane of the hyperthermophilic archaeon *Ignicoccus*: dynamics, ultrastructure and composition. *Biochem. Soc. Trans.* 32: 199-203
7. Podar M *et al.* (2008). A genomic analysis of the archaeal system *Ignicoccus hospitalis*-*Nanoarchaeum equitans*. *Genome Biol.* 9: R158
8. Huber H *et al.* (2002). A new phylum of *Archaea* represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417: 63-67
9. Jahn U *et al.* (2008). *Nanoarchaeum equitans* and *Ignicoccus hospitalis*: new insights into a unique, intimate association of two archaea. *J. Bacteriol.* 190: 1743-1750
10. Junglas B *et al.* (2008). *Ignicoccus hospitalis* and *Nanoarchaeum equitans*: ultrastructure, cell-cell interaction, and 3D reconstruction from serial sections of freeze-substituted cells and by electron cryotomography. *Arch. Microbiol.* 190: 395-408
11. Giannone RJ *et al.* (2015). Life on the edge: functional genomic response of *Ignicoccus hospitalis* to the presence of *Nanoarchaeum equitans*. *ISME J.* 9: 101-114
12. Heimerl T *et al.* (2017). A Complex endomembrane system in the Archaeon *Ignicoccus hospitalis* Tapped by *Nanoarchaeum equitans*. *Front. Microbiol.* 8: 1072
13. COGEM (2019). Pathogeniteitsclassificatie van de schimmel '*Thermoascus aurantiacus*'. COGEM advies CGM/190122-01
14. COGEM (2017). Pathogeniteitsclassificatie van de schimmel *Corynascus thermophilus*. COGEM advies CGM/170313-01
15. COGEM (2018). Pathogeniteitsclassificatie van de anaerobe bacterie *Clostridium thermosuccinogenes*. COGEM advies CGM/180710-01
16. COGEM (2018). Pathogeniteitsclassificatie van de anaerobe thermofiele bacterie *Thermincola potens*. COGEM advies CGM/180110-01
17. German collection of microorganisms and cell cultures - 'Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen' (DSMZ). *Ignicoccus hospitalis*, DSM 18386, <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-18386> (bezoekt: 16 december 2021)
18. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Species *Ignicoccus hospitalis*. <https://lpsn.dsmz.de/species/ignicoccus-hospitalis> (bezoekt: 16 december 2021)

19. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAUA) – Technische regeln für Biologische Arbeitsstoffe. TRBA 466 Classification of prokaryotes (bacteria and archaea) into risk groups
<https://www.baua.de/EN/Service/Legislative-texts-and-technical-rules/Rules/TRBA/TRBA-466.html>
(bezocht: 16 december 2021)
20. Federal Office for the Environment (FOEN).
<https://www.bafu.admin.ch/bafu/de/home/themen/biotechnologie/publikationen-studien/publikationen/einstufung-von-organismen.html> (bezocht: 16 december 2021)
21. German collection of microorganisms and cell cultures - 'Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen' (DSMZ). 897. *Ignicoccus* medium.
https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium897.pdf (bezocht: 20 december 2021)