

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Waterstaat  
drs. V.L.W.A. Heijnen  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 10 juli 2023  
**KENMERK** CGM/230710-02  
**ONDERWERP** Advies pathogeniteitsclassificatie van de bacterie *Komagataeibacter rhaeticus*

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een van een adviesvraag betreffende een 2.13 verzoek voor het plaatsen van de bacteriesoort *Komagataeibacter rhaeticus* (*Gluconacetobacter rhaeticus*), op bijlage 2, lijst A1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo), ingediend door de Technische Universiteit Delft (IG 23-103\_2.13-000), deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriesoort *Komagataeibacter rhaeticus*, en de plaatsing van deze soort op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

*K. rhaeticus* is een gramnegatieve bacterie die voor het eerst is geïsoleerd uit biologisch appelsap, maar ook op rottend fruit is aangetroffen. De soort wordt tevens regelmatig aangetroffen in gefermenteerde thee (komboecha). *K. rhaeticus* is een azijnzuurproducerende bacterie en wordt veel onderzocht vanwege de eigenschap om bacteriële cellulose te produceren. Bacteriële cellulose wordt onder andere toegepast in de voedingsmiddelenindustrie en in medische apparatuur.

Er zijn in de wetenschappelijke literatuur geen aanwijzingen dat deze soort pathogeen is voor de mens of dieren. Ook zijn er bij de COGEM geen aanwijzingen bekend dat *K. rhaeticus* pathogeen is voor planten. Concluderend is de COGEM van oordeel dat de bacteriesoort *Komagataeibacter rhaeticus* apathogeen is, en adviseert zij om deze bacteriesoort 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. Y de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
- Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG Milieu en Internationaal

# **Pathogeniteitsclassificatie van de bacteriesoort *Komagataeibacter rhaeticus***

## **COGEM advies CGM/230710-02**

### **1. Inleiding**

Naar aanleiding van een verzoek van de Technische Universiteit Delft (IG 23-103) is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriesoort *Komagataeibacter rhaeticus* (voorheen *Gluconacetobacter rhaeticus*) en plaatsing van deze soort 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.

### **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.

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.

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 of een onderliggend ziektebeeld, 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. Informatie over *Komagataeibacter rhaeticus*

*K. rhaeticus* (type stam DSM 16663<sup>T</sup>) is in 2005 voor het eerst beschreven als cellulose-producerende bacterie. De bacterie is geïsoleerd uit biologisch appelsap bereid van appels uit de Val Venosta (Vinschgau) streek in Italië.<sup>2</sup> *K. rhaeticus* stammen zijn later ook geïsoleerd uit komboecha, een thee die verkregen is door fermentatie van suiker door azijnzuurbacteriën- en gistculturen,<sup>3,4,5,6,7</sup> en uit rottend fruit, waaronder loquat (Japanse mispel),<sup>8</sup> granaatappels,<sup>9</sup> en sinaasappelschillen.<sup>10</sup>

Bacteriën uit het genus *Komagataeibacter* zijn niet-beweeglijke, gramnegatieve staafvormige bacteriën die ethanol kunnen omzetten in azijnzuur. In sommige stammen is azijnzuur strikt noodzakelijk voor hun groei,<sup>12</sup> maar *K. rhaeticus* gedijt ook goed in afwezigheid van azijnzuur.<sup>2</sup> Er zijn groeitemperaturen gerapporteerd van 28-30°C, *K. rhaeticus* wordt daarmee als mesofiele bacterie aangeduid.<sup>11</sup>

Bij de eerste omschrijving werd de bacteriesoort aangeduid als *Gluconacetobacter rhaeticus* sp. nov. Echter, op basis van 16S rRNA gensequentie-analyses is deze soort, samen met verscheidene andere *Gluconacetobacter*-soorten, in 2012 ondergebracht in het nieuwe genus *Komagataeibacter* (familie *Acetobacteraceae*).<sup>12,13,14</sup> De soorten die zijn ondergebracht in het nieuwe genus, onderscheiden zich ook op ecologisch gebied van de *Gluconacetobacter*. Zo worden de huidige soorten uit het genus *Gluconacetobacter* aangetroffen op planten, met name op bloemen, vruchten, suikerriet en koffieplanten, terwijl de soorten die ondergebracht zijn in het genus *Komagataeibacter* niet altijd plantgeassocieerd zijn en ook op gefermenteerde producten worden aangetroffen, zoals azijn, fruit of vruchtensappen, komboecha en 'nata de coco'.<sup>12</sup>

Naar *K. rhaeticus* wordt veel onderzoek gedaan in het kader van de synthese van biopolymeren. Daarbij gaat het voornamelijk om de productie van bacteriële cellulose, een natuurlijk nanomateriaal dat gebruikt wordt in onder andere de voedselindustrie (vezels), in textiel, of in medische apparatuur.<sup>4,10,15,16,17</sup> De Amerikaanse 'Food and Drug Administration' (FDA) beschouwt bacteriële cellulose al lange tijd als een veilig voedingsmiddelenadditief ('Generally Regarded As Safe', GRAS).<sup>18</sup> De EFSA heeft in 2019 de verwante soort *Komagataeibacter sucrofermentans* op de zogenoemde 'qualified presumption of safety' (QPS) lijst gezet, waarmee de bacterie toegepast mag worden voor de productie van voedingsmiddelen.<sup>19</sup>

Zoals vrijwel alle prokaryoten bevat *K. rhaeticus* de genetische informatie voor toxine-antitoxine (TA) systemen.<sup>20</sup> Deze systemen reguleren de groei en sterfte van bacteriën binnen een populatie.<sup>21</sup> De toxines van een TA-systeem zijn stabiele eiwitten die essentiële cellulaire processen, zoals translatie en replicatie, remmen in bacteriële cellen.<sup>22</sup> De antitoxines zijn instabiele eiwitten die een complex vormen met het toxine en de werking van het toxine tegengaan.<sup>23</sup> Onder stressvolle omstandigheden, bijvoorbeeld voedselschaarste, worden minder toxines en antitoxines geproduceerd. De in de cel aanwezige antitoxines worden als eerste afgebroken, waardoor de toxines de groei van de bacteriepopulatie kunnen beperken of zorgen voor celsterfte in een populatie. Er zijn, voor zover bij de COGEM bekend, geen aanwijzingen dat de toxines van een TA-systeem schadelijk zijn voor andere organismen.

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

De COGEM heeft nog niet eerder geadviseerd over bacteriesoorten uit het genus *Komagataeibacter*. Wel heeft zij in haar overzichtslijst van pathogeniteitsclassificaties van pathogene en apathogene bacteriën het gehele genus *Gluconacetobacter* in pathogeniteitsklasse 1 opgenomen.<sup>24</sup> In een onderzoeksproject uit 2018 dat in opdracht van de COGEM is uitgevoerd om de overzichtslijsten taxonomisch te actualiseren, is aangegeven dat een aantal taxa uit dit genus naar het nieuwe genus *Komagataeibacter* zijn geplaatst. Over (soorten uit) dit nieuwe genus is echter nog geen advies uitgebracht betreffende de pathogeniteitsklasse-indeling.

#### **5. Pathogeniteitsclassificaties andere beoordelende instanties**

Het Duitse ‘Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin’ (BAUA) die pathogeniteit voor de mens beoordeelt, heeft in de ‘Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe’ (TRBA) 466 (‘Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen’ de soort *Komagataeibacter rhaeticus* (*Gluconacetobacter rhaeticus*) ingedeeld in risicogroep 1.<sup>25</sup> De Duitse ‘Sammlung von Mikroorganismen und Zellculturen’ (DSMZ), die pathogeniteit voor mens, dier en plant in ogenschouw nemen, heeft eveneens de soort *K. rhaeticus* in risicogroep 1 ingedeeld.<sup>26</sup> De ‘American Type Culture Collection’ (ATCC) heeft het uitvoeren van werkzaamheden met *K. rhaeticus* ingedeeld op het laagste veiligheidsniveau, BSL1.<sup>27</sup> Deze classificatie van de ATCC is gebaseerd op pathogeniteit voor de mens.

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 bacteriën weinig literatuur over apathogeniteit voorhanden.

De bacteriesoort *K. rhaeticus* is voor het eerst geïsoleerd uit biologisch appelsap, maar is ook op ander rottend fruit aangetroffen. De soort wordt tevens regelmatig aangetroffen in komboecha. *K. rhaeticus* is een azijnzuur-producerende bacterie en wordt daarnaast veel onderzocht vanwege de eigenschap om

bacteriële cellulose te produceren. Bacteriële cellulose wordt onder andere toegepast in de voedingsmiddelenindustrie en in medische apparatuur. Er zijn in de wetenschappelijke literatuur geen aanwijzingen dat deze soort pathogeen is voor de mens of andere dieren. Ook zijn er bij de COGEM geen aanwijzingen bekend dat *K. rhaeticus* pathogeen is voor planten. *K. rhaeticus* staat ook niet vermeld in de databases van de American Phytopathological Society<sup>28</sup> en de ‘European and Mediterranean Plant Protection Organization’ (EPPO).<sup>29</sup>

Concluderend is de COGEM van oordeel dat de bacteriesoort *Komagataeibacter rhaeticus* apathogeen is, en adviseert zij om deze bacteriesoort in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en op te nemen in bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

## Referenties

1. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013.  
<https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2023-04-01> (bezocht op 26 juni 2023)
2. Dellaglio F *et al.* (2005). Description of *Gluconacetobacter swingsii* sp. nov. and *Gluconacetobacter rhaeticus* sp. nov., isolated from Italian apple fruit. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 55: 2365-2370
3. Dos Santos RAC *et al.* (2014). Draft genome sequence of *Komagataeibacter rhaeticus* Strain AF1, a high producer of cellulose, isolated from kombucha tea. *Genome Announc.* 2: e00731-14
4. Machado RTA *et al.* (2016). *Komagataeibacter rhaeticus* as an alternative bacteria for cellulose production. *Carbohydr. Polym.* 152: 841-849
5. Li ZY *et al.* (2021). Bio-conversion of kitchen waste into bacterial cellulose using a new multiple carbon utilizing *Komagataeibacter rhaeticus*: Fermentation profiles and genome-wide analysis. *Int. J. Biol. Macromol.* 191: 211-221
6. Semjonovs P *et al.* (2017). Cellulose synthesis by *Komagataeibacter rhaeticus* strain P 1463 isolated from Kombucha. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101: 1003-1012
7. Antolak H *et al.* (2021). Kombucha Tea—A Double Power of Bioactive Compounds from Tea and Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts (SCOBY). *Antioxidants* 10: 1541
8. Ye Jet *et al.* (2023). Bacterial cellulose production by a strain of *Komagataeibacter rhaeticus* isolated from residual loquat. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 107: 1551-1562
9. Thorat MN & Dastager SG (2018). High yield production of cellulose by a *Komagataeibacter rhaeticus* PG2 strain isolated from pomegranate as a new host. *RSC Adv.* 8: 29797-29805
10. He X *et al.* (2020). Novel bacterial cellulose membrane biosynthesized by a new and highly efficient producer *Komagataeibacter rhaeticus* TJPU03. *Carbohydr. Res.* 493: 108030
11. Bacdive. <https://bacdive.dsmz.de/strain/94> (bezocht: 29 juni 2023)
12. Yamada Y *et al.* (2012). Subdivision of the genus *Gluconacetobacter* Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998: the proposal of *Komagatabacter* gen. nov., for strains accommodated to the *Gluconacetobacter xylinus* group in the  $\alpha$ -*Proteobacteria*. *Ann. Microbiol.* 62: 849-859
13. Yamada Y *et al.* (2012). Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae). *J. Gen. Appl. Microbiol.* 58: 397-404

14. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). *Komagataeibacter rhaeticus* <https://lpsn.dsmz.de/species/komagataeibacter-rhaeticus> (bezocht: 6 juli 2023)
15. Gupte Y *et al.* (2021). Characterization of nanocellulose production by strains of *Komagataeibacter* sp. isolated from organic waste and Kombucha. *Carbohydr Polym* 266: 118176
16. Vigentini I *et al.* (2019). Set-up of bacterial cellulose production from the genus *Komagataeibacter* and its use in a gluten-free bakery product as a case study. *Front. Microbiol.* 10: 1953
17. Moradali MF & Rehm HA (2020). Bacterial biopolymers: from pathogenesis to advanced materials. *Nat. Rev. Microbiol.* 18: 195-210
18. Shi Z *et al.* (2014). Utilization of bacterial cellulose in food. *Food Hydrocolloids* 35: 539-545
19. Koutsoumanis K *et al.* (2019). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 9: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2018. *EFSA Journal* 17: 5555
20. Ryngajllo M *et al.* (2019). Comparative genomics of the *Komagataeibacter* strains— efficient bionanocellulose producers. *MicrobiologyOpen* 8: e731.
21. Gerdes K *et al.* (2005). Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 371-382.
22. Hayes F (2003). Toxins-antitoxins: Plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* 301: 1496-1499.
23. Fernández-García L *et al.* (2016). Toxin-antitoxin systems in clinical pathogens. *Toxins.* 8
24. COGEM (2021). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van apathogene en pathogene bacteriën (2021). COGEM advies CGM/211025-01
25. Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA) 466 „Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen“ (2015). [https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/pdf/TRBA-466.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=8](https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/pdf/TRBA-466.pdf?__blob=publicationFile&v=8) (bezocht: 26 juni 2023)
26. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellculturen (DSMZ). *Komagataeibacter rhaeticus* <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-16663> (bezocht: 26 juni 2023)
27. American Type Culture Collection (ATCC). <https://www.atcc.org/> (bezocht: 31 januari 2023)
28. American Phytopathological Society (APS). <https://www.apsnet.org/Pages/default.aspx> (bezocht: 26 juni 2023)
29. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). EPPO Global Database <https://gd.eppo.int/> (bezocht: 26 juni 2023)