

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 27 mei 2014
KENMERK CGM/140527-02
ONDERWERP Advies: Classificatie van *Pseudomonas fluorescens*

Geachte mevrouw Mansveld,

De COGEM heeft de classificatie van *Pseudomonas fluorescens* heroverwogen. Dit naar aanleiding van signalen dat de soort mogelijk ziekteverwekkend zou zijn.

Samenvatting:

De bacteriesoort *Pseudomonas fluorescens* is in 2007 door de COGEM geclassificeerd als een opportunistische ziekteverwekker en ingedeeld in de laagste pathogeniteitsklasse. De soort is niet opgenomen in de herziene classificatielijsten uit 2011, omdat er onduidelijkheid bestond over zijn (niet-)ziekteverwekkende karakter. De COGEM heeft daarom besloten de soort opnieuw te classificeren.

P. fluorescens komt voor in de bodem en is alom in het milieu aanwezig. In de landbouw worden sommige stammen ingezet als antagonist om ziekteverwekkers van planten, zoals schimmels, te bestrijden. *P. fluorescens* kan bij mensen met een verzwakt immuunsysteem infecties veroorzaken en wordt daarom gezien als een opportunistisch pathogeen.

In de literatuur zijn stammen beschreven die geassocieerd worden met pathogeniteit bij koudbloedige dieren, insecten en planten. Er bestaat echter veel onduidelijkheid over de taxonomie van *P. fluorescens*. In een aantal gevallen lijkt er sprake van onjuiste identificaties. Ook wordt er soms verwezen naar *P. fluorescens* als soort, terwijl de subgroep *P. fluorescens* bedoeld wordt. Daarnaast moeten bepaalde stammen beschouwd worden als opportunistisch pathogeen en kunnen beschreven nadelige effecten vaak niet toegeschreven worden aan het veronderstelde ziekteverwekkend vermogen van *P. fluorescens*.

Alles in overweging nemende adviseert de COGEM de soort *P. fluorescens* in te delen in pathogeniteitsklasse 1.

Classificatie van *Pseudomonas fluorescens*

COGEM advies CGM/140527-02

Inleiding

De bacteriesoort *Pseudomonas fluorescens* is in 2007 door de COGEM geclassificeerd als een opportunistisch pathogeen en ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. Tevens heeft de COGEM geadviseerd om de bacteriesoort op te nemen in Bijlage 1.¹ Door onduidelijkheid over zijn (a)pathogene karakter is *P. fluorescens* niet opgenomen in de herziene classificatielijsten met (a)pathogene bacteriën uit 2011.^{2,3} In het onderhavige advies wordt de hele soort *P. fluorescens* opnieuw geclassificeerd.

Pseudomonas fluorescens

P. fluorescens is een gramnegatieve, staafvormige bacterie die geen sporenvormende eigenschappen bezit. De bacterie komt voor in de bodem en is alom in het milieu aanwezig.⁴

Bepaalde *P. fluorescens* stammen komen als commensaal voor bij planten en kunnen in de landbouw toegepast worden voor de biologische bestrijding van plantpathogenen, zoals schimmels (waaronder *Fusarium oxysporum*), oomyceten (met name *Pythium* spp.) en in mindere mate bacteriën (*Pectobacterium carotovorum*) en nematoden (*Meloidogyne* spp.).^{5,6}

De werking tegen plantpathogenen wordt gekenmerkt door antagonisme en concurrentie.⁵ *P. fluorescens* heeft een brede metabole capaciteit en is in staat om een breed scala aan secundaire metabolieten te produceren die schadelijk zijn voor verschillende groepen organismen. Bekende voorbeelden zijn 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), waterstofcyanide, proteasen, mupirocine en zogenoemde sideroforen (moleculen die selectief ijzerionen binden en daarmee het ijzer dat nodig is voor de groei van andere organismen, zoals pathogenen verminderen).⁵

Het door *P. fluorescens* geproduceerde antibioticum mupirocine ('pseudomonaszuur') wordt in de vorm van neuszalf toegepast bij de behandeling van methicilline-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA).⁷ Ook is er een stam die de stof 4-formyl-aminooxyvinylglycine produceert. Deze zogenoemde *germination-arrest factor* (GAF) remt de kieming van zaden van bepaalde onkruiden, zoals zwenkdravik (*Bromus tectorum*) en straatgras (*Poa annua* L.).^{5,8}

P. fluorescens kan bij mensen met een verzwakt immuunsysteem infecties veroorzaken en wordt daarom gezien als een opportunistisch pathogeen.^{9,10} Als *P. fluorescens* aanwezig is in klinisch patiëntmateriaal, is er doorgaans sprake van contaminatie tijdens een ingreep of een andere medische handeling.

In de wetenschappelijke literatuur zijn isolaten beschreven die geassocieerd worden met ziekte bij vissen (waaronder karpers), weekdieren (bepaalde mosselsoorten) en insecten.^{11,12,13,14} Ook is er een

stam (NZ17) beschreven die in verband wordt gebracht met de ontwikkeling *brown blotch disease* in champignons.^{15,16}

Taxonomie

De taxonomie van het genus *Pseudomonas* is voortdurend in beweging en heeft sinds de eerste beschrijving in 1894 vele veranderingen ondergaan. Sequencing van het 16S rDNA gen heeft er onder andere toe geleid dat soorten die eerder tot het genus *Pseudomonas* werden gerekend naar andere genera zijn verplaatst. Door de voortschrijdende technieken worden er steeds meer bacteriesoorten geïdentificeerd. Hierdoor neemt het aantal *Pseudomonas* soorten ook ieder jaar toe. Op dit moment zijn er in de *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN)* meer dan 200 soorten opgenomen.¹⁷

In 2010 zijn de sequenties van 4 zogenoemde *housekeeping genes* (16 sRNA, *gyrB*, *rpoB* en *rpoD*) afkomstig uit 107 *Pseudomonas type strains* geanalyseerd om een completer beeld te krijgen van de fylogenetische relaties binnen het genus. Uit deze analyse blijkt dat er twee *intrageneric groups* (IG) onderscheiden kunnen worden: IG *P. aeruginosa* en IG *P. fluorescens*. De *P. fluorescens* IG is verder onder te verdelen in een *P. fluorescens*, *P. syringae*, *P. lutea*, *P. putida*, *P. anguilliseptica* en *P. straminea* groep. De *P. fluorescens* groep bestaat uit 9 subgroepen en de *P. fluorescens* subgroep uit 20 soorten, waaronder *P. fluorescens*.^{18,19}

De volledige genoomsequenties van tenminste elf *P. fluorescens* stammen zijn beschikbaar in het publieke domein. Het genoom van *P. fluorescens* mist genen voor de meest bekende virulentiefactoren, maar het is niet uit te sluiten dat horizontale genoverdracht kan leiden tot evolutie richting virulente stammen. Zo produceert de eerder genoemde stam NZ17 een lipodepsipeptide dat vergelijkbaar is met het extracellulaire toxine tolaasin. Het gencluster coderend voor dit lipodepsipeptide is mogelijk via horizontale genoverdracht vanuit andere bacteriepopulaties in de stam terecht gekomen.^{15,16}

Pathogeniteitsclassificatie

De inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen is mede afhankelijk van de pathogeniteitsklasse van het organisme. Daarom is het voor een correcte inschaling van de werkzaamheden van belang te weten tot welke pathogeniteitsklasse een organisme behoort.

Volgens de 'Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen' worden micro-organismen (virussen, bacteriën, schimmels) ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen.²⁰ 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. De criteria voor indeling in pathogeniteitsklassen zijn als volgt gedefinieerd:

Een indeling in pathogeniteitsklasse 1 is van toepassing op een micro-organisme dat in ieder geval

voldoet aan een van de volgende voorwaarden:

- het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant;
- het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen;
- 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;
- van het micro-organisme is het niet-virulente karakter middels adequate tests aangetoond.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 2 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat die zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat, alsmede een micro-organisme dat bij planten of dieren ziekte kan veroorzaken.

Eerdere COGEM adviezen

P. fluorescens is in 2007 door de COGEM geclassificeerd als een opportunistisch pathogeen micro-organisme en ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. Tevens is geadviseerd de bacteriesoort op te nemen in bijlage 1.¹ Op basis van een in opdracht van de COGEM uitgevoerd onderzoeksproject, heeft de COGEM in 2011 twee adviezen uitgebracht met pathogeniteitsclassificaties van (a-) pathogene bacteriën.^{2,3} In deze adviezen en in het corresponderende onderzoeksrapport is *P. fluorescens* niet opgenomen. In 2013 zijn de *P. fluorescens* stammen DC45415 en MB101 ingedeeld in klasse 1 en op bijlage 1 geplaatst.²¹

Classificaties wereldwijd

Het Belgisch Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV) beschouwt *P. fluorescens* als een klasse 2 plantpathogeen.²² In de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen is *P. fluorescens* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1 (apathogeen).²³ Hierbij wordt opgemerkt dat er bij ongewervelde dieren, pathogene stammen beschreven zijn en dat er infectie kan optreden in mensen met een verzwakte afweer. Ook de Public Health Agency of Canada beschouwt *P. fluorescens* als een klasse 1 pathogeen.²⁴

Overweging

Verschillende *P. fluorescens* stammen komen als commensaal voor bij planten en worden al jarenlang toegepast als biologisch bestrijdingsmiddel tegen plantpathogenen. Sinds de classificatie door COGEM in 2007 van *P. fluorescens* in pathogeniteitsklasse 1, zijn er verschillende publicaties verschenen over *P. fluorescens* stammen die mogelijk pathogeen zijn voor koudbloedige dieren, zoals vissen, insecten en mosselen.

P. fluorescens als vispathogeen

In een publicatie van Zhang *et al* uit 2009 wordt gesproken van stam (TSS) die pathogeen is voor bepaalde vissoorten (waaronder karpers). Deze stam veroorzaakt de zogenoemde *red skin disease* bij vissen die in aquacultuur worden gehouden. De ziekte komt vooral voor bij vissen die verwond zijn als gevolg van onzorgvuldig handelen of transport. Volgens de auteurs zijn studies naar de pathogenese van aquacultuur-geassocieerde *P. fluorescens* stammen schaars en zijn de virulentie mechanismen van de bacterie onduidelijk.^{12,25} Vermoedelijk speelt een calcium afhankelijk extracellulair protease (AprX homoloog) een rol in de pathogenese.

In het boek *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish* wordt *P. fluorescens*, naast ander *Pseudomonas* soorten beschouwd als een vispathogeen.²⁶ Deze vermeende pathogeniteit is echter voornamelijk gebaseerd op publicaties uit de jaren zestig en zeventig van de vorige eeuw. Het is onduidelijk of de classificatie van de soort *P. fluorescens* als vispathogeen nog correct is. In de publicatie van Zhang *et al* wordt verwezen naar Chinese literatuur die niet voor de COGEM inzichtelijk is. Hierdoor is de aard en mate van pathogeniteit van *P. fluorescens* niet duidelijk. Daarnaast wordt *P. fluorescens* in andere publicaties aangeduid als opportunistisch vispathogeen.^{27,28} Zoals eerder genoemd hebben vooral vissen die beschadigingen of stress ondervinden last van de bacterie.

Alles in overweging nemende is de COGEM van mening dat *P. fluorescens* stam TSS een opportunistisch pathogeen is voor vissen.

P. fluorescens stam CHA0

Stam CHA0 wordt al jarenlang gebruikt als modelorganisme voor de bestudering van de biosynthese van secundaire metabolieten, waaronder 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) en waterstofcyanide.²⁹ Daarnaast wordt de stam ingezet voor de biologische bestrijding van verschillende fytopathogenen. Onderzoek heeft uitgewezen dat de stam onder laboratoriumomstandigheden een nadelig effect op de termietensoort *Odontotermes obesus* kan hebben als gevolg van de productie van waterstofcyanide.¹³ Er zijn echter geen aanwijzingen voor pathogeniteit van deze stam.

Stam CL145A

Stam CL145A is giftig voor zebra- en quaggamosselen. Deze invasieve mosselsoorten kunnen grote schade toebrengen aan zoetwaterleidingen in elektriciteitscentrales. Stam CL145A is bij de U.S. Environmental Protection Agency geregistreerd als biopesticide voor de bestrijding van bovengenoemde mosselsoorten.¹¹ De mate van toxiciteit van de stam blijkt zeer afhankelijk te zijn van de kweekmethode in het lab en is het gevolg van een secundair metaboliet dat zich in het celmembraan bevindt. Een hoge mate van toxiciteit kon alleen bereikt worden onder zeer specifieke kweekomstandigheden.¹¹ En bij blootstelling aan zeer hoge dosissen die niet in de natuur voorkomen.

Dode *P. fluorescens* bacteriën blijken even lethaal te zijn voor mosselen als levende bacteriën. Dit impliceert dat stam CL145A wel een schadelijk effect heeft, maar geen ziekteverwekkend vermogen

bezit. De werking van CL145A berust op onnatuurlijk hoge dosissen toxine die de mosselen via de bacterie binnenkrijgen. Op basis van deze gegevens kan niet gesteld worden dat stam CL145A onder natuurlijke omstandigheden pathogeen is voor mosselen.

P. fluorescens Stam NZ17

Stam NZ17 wordt in verband gebracht met de ontwikkeling van *brown blotch disease* in de commerciële champignonenteelt.^{15,16} Deze aandoening wordt gekenmerkt door de vorming van bruine laesies op de champignons. Opgemerkt moet worden dat het hier om oppervlakkige aantasting gaat die leidt tot ontsiering van de champignons en daardoor ernstige economische consequenties kan hebben voor de champignonenteelt. De vermeende pathogeniteit van stam NZ17 is waarschijnlijk het gevolg van de productie van een lipodepsipeptide gelijkend aan het extracellulaire toxine tolaasin. Het gencluster coderend voor dit lipodepsipeptide is vermoedelijk via horizontale genoverdracht vanuit andere bacteriepopulaties, die aanwezig zijn in champignonkwekerijen, in stam NZ17 terechtgekomen.¹⁶

Hoewel stam NZ17 tot de soort *P. fluorescens* wordt gerekend, lijkt er onduidelijkheid te bestaan over de taxonomische kwalificatie van deze stam. Uit navraag bij de auteurs van het artikel onder referentie 15 blijkt dat het genoom van stam NZ17 inmiddels verder is geanalyseerd. Er is onder andere een *multi-locus sequence analysis* van de vier housekeeping genes 16 sRNA, *gyrB*, *rpoB* en *rpoD* uitgevoerd. Deze analyse plaatst de stam in het *P. fluorescens* complex (nauw verwant aan de biocontrole stam *P. protegens Pf-5*), maar een kwalificatie in de soort *P. fluorescens* is niet eenduidig te maken. Hierdoor kan niet geconcludeerd worden dat de vermeende pathogeniteit van de stam gekoppeld is aan de soort *P. fluorescens*.

Advies

P. fluorescens komt voor in de bodem en is alom in het milieu aanwezig. In het verleden heeft de COGEM *P. fluorescens* geclassificeerd als een opportunistisch pathogeen voor mensen en ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. In de literatuur zijn stammen beschreven die geassocieerd worden met pathogeniteit bij koudbloedige dieren, insecten en paddenstoelen. Er bestaat echter veel onduidelijkheid over de taxonomie van *P. fluorescens*. In sommige gevallen wordt bijvoorbeeld verwezen naar *P. fluorescens* als soort terwijl de subgroep *P. fluorescens* bedoeld wordt. Verder moeten bepaalde stammen beschouwd worden als opportunistisch pathogeen, terwijl andere stammen een schadelijk effect hebben zonder dat hier sprake is van ziekteverwekkend vermogen.

Alles in overweging nemende adviseert de COGEM de soort *P. fluorescens* in te delen in pathogeniteitsklasse 1.

Referenties

1. COGEM (2007). Classificatie van enkele micro-organismen van bijlage 1 van de Regeling ggo. COGEM advies CGM/070917-02

2. COGEM (2011). Classificatie apathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-02
3. COGEM (2011). Classificatie pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-03
4. Zago A & Cgugani S (2009). *Pseudomonas*. In: Encyclopedia of Microbiology. Third edition. Eds Schaechter M *et al.* Academic Press, Elsevier, Oxford (UK)
5. Couillero O *et al* (2009). *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Lett Appl Microbiol.* 48:505-512
6. Silby *et al* (2011) *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS microbial Rev* 652-680
7. Gunery R & Thomas CM (2011). Mupirocin: biosynthesis, special features and applications of an antibiotic from a Gram-negative bacterium. *Appl Microbiol Technol* 90: 11-21
8. Halgren A *et al.* (2013). Genetics of germination-arrest factor (GAF) production by *Pseudomonas fluorescens* WH6: identification of a gene cluster essential for GAF biosynthesis. *Microbiology* 159: 36-45.
9. Gershman MD *et al.* (2006). Multistate outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bloodstream infection after exposure to contaminated heparinized saline flush prepared by a compounding pharmacy. *Clin Infect Dis.* 47: 1372-1379
10. Benito N *et al.* (2012). Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bloodstream infection in a coronary care unit. *J Hosp Infect.* 82: 286-289
11. Molloy DP *et al* (2013). *Pseudomonas fluorescens* strain CL145A - a biopesticide for the control of zebra and quagga mussels (*Bivalvia: Dreissenidae*). *J Invertebr Pathol.* 113: 104-114
12. Zhang WW *et al.* (2009). Identification and characterization of a virulence-associated protease from a pathogenic *Pseudomonas fluorescens* strain. *Vet Microbiol.* 139: 183-188
13. Devi KK & Kothamasi D (2009). *Pseudomonas fluorescens* CHA0 can kill subterranean termite *Odontotermes obesus* by inhibiting cytochrome c oxidase of the termite respiratory chain. *FEMS Microbiol Lett.* 300(2):195-200
14. Murugesan N & Kavitha A (2009). Seed treatment with *Pseudomonas fluorescens*, plant products and synthetic insecticides against the leafhopper, *Amrasca devastans* (Distant) in cotton.
15. Burlinson P. *et al* (2013). *Pseudomonas fluorescens* NZI7 repels grazing by *C. elegans*, a natural predator. *ISME J.* 7(6): 1126-1138
16. Godfrey S.A.C *et al.* Genetic characterization of *Pseudomonas* 'NZI7' - a novel pathogen that results in a brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *J Appl Microbiol.* 91: 412-20
17. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature <http://www.bacterio.net/> (bezoekt mei 2014)
18. Mulet M *et al.* (2010). DNA sequence-based analysis of *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology* 12(6): 1513-1530
19. Loper JE *et al.* (2012). Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *Plos Genetics* e1002784
20. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. <http://bggo.rivm.nl/Documenten/Documenten%20regelgeving/Regeling-genetisch-gemodificeerde-organismen.pdf>
21. COGEM (2013). Grootschalige productie palmitase m.b.v. gg-*Pseudomonas fluorescens*. COGEM

advies CGM/130502-02

22. Het Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP). Biosafety and Biotechnology Unit (SBB), Belgian Biosafety Server www.biosafety.be/PDF/2009_classification_lists/fyto_bact.pdf
23. Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe (2010). Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe; Einstufung von prokaryonten in Risikogruppen (TRBA 466) http://www.baua.de/nn_15268/de/Themen-von-A-Z/Biologische-Arbeitsstoffe/TRBA/pdf/TRBA-466.pdf (mei 2014)
24. Screening Assessment *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. <http://bit.ly/1u8AJ5N> (bezocht mei 2014)
25. Wang H *et al.* (2009). Construction of an attenuated *Pseudomonas fluorescens* strain and evaluation of its potential as a cross-protective vaccine. *Vaccine* 27: 4047–4055
26. Austin B & Austin DA (2007). *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*. Fourth edition. Springer ISBN 978-1-4020-6069-4
27. Altinok *et al.* (2006). *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout. *Aquaculture* 261: 850-855
28. Von Siebenthal (2009). Tolerance of whitefish embryos to *Pseudomonas fluorescens* linked to genetic and maternal effects and reduced by previous exposure. *Fish and Shellfish Immunol.* 26: 531-535
29. Weller DM. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology.* 97:250-256.