

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 25 juni 2019
KENMERK CGM/190625-01
ONDERWERP Advies over de bacteriën *Pseudomonas protegens* en *Burkholderia cepacia*

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van twee adviesvragen betreffende de dossiers 'Burkholderia cepacia' (IG 19-115_2.13-000) en 'Pseudomonas protegens' (IG 19-120_2.13-000), ingediend door de Koninklijke Nederlandse Academie van Wetenschappen (KNAW), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de bacteriesoorten *Pseudomonas protegens* en *Burkholderia cepacia*.

P. protegens komt in de bodem voor rondom plantenwortels en heeft plant-beschermende eigenschappen. Daarnaast is *P. protegens* pathogeen voor bladete insecten.

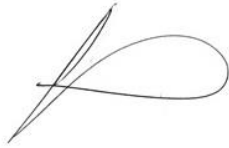
De COGEM heeft eerder geadviseerd over *B. cepacia* en deze soort ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. De bacterie is pathogeen voor planten. De COGEM concludeert dat er geen nieuwe informatie beschikbaar is en dat er daarom geen aanleiding is om de classificatie van *B. cepacia* te herzien.

Concluderend is de COGEM van oordeel dat *P. protegens* pathogeen is en adviseert om deze bacteriesoort in te delen in pathogeniteitsklasse 2 en op te nemen in bijlage 4, lijst 4.2 van de Regeling ggo. Tevens adviseert zij de indeling van *B. cepacia* in pathogeniteitsklasse 2 te handhaven.



De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Vorzitter COGEM

c.c. Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW

Advies over de bacteriesoorten

Pseudomonas protegens* en *Burkholderia cepacia

COGEM advies CGM/190625-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van twee verzoeken van de Koninklijke Nederlandse Academie van Wetenschappen is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacterie *Pseudomonas protegens* (IG-120) en of classificatie van *Burkholderia cepacia* (IG 19-115) op bijlage 4 noodzakelijk is.

Bijlage 4 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen' (Regeling ggo) ¹ betreft de indeling in klassen van pathogene micro-organismen. Bijlage 2, lijst A1 bestaat uit een lijst van micro-organismen die apathogeen zijn voor mens, dier en plant. Opname op Bijlage 2, lijst A1 betekent dat onder ML-I laboratoriumcondities met het betreffende micro-organisme genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) vervaardigd mogen worden indien hierbij vectoren worden gebruikt die wél, of inserties die níet, op de A-lijsten staan (respectievelijk 'lijst A2 veilige vectoren' en 'lijst A3 inserties'). Activiteiten met deze ggo's kunnen, zonder dat een aanvrager daar een milieurisicobeoordeling voor hoeft aan te leveren, direct na kennisgeving gestart worden.

1.1 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

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.

2. *Pseudomonas protegens*

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsclassificatie van *Pseudomonas protegens* (IG 19-120).

Het genus *Pseudomonas* is zeer divers en bevat meer dan 200 soorten die wijdverspreid voorkomen.² Pseudomonassoorten zijn Gramnegatieve, aerobe staafvormige bacteriën die onder andere geïsoleerd zijn uit water, grond, planten, dieren en mensen. Ook kunnen pseudomonassoorten worden aangetroffen worden onder extreme omstandigheden, zoals in heetwaterbronnen, woestijnen of op Antarctica.³

Binnen het genus komen soorten voor die pathogeen kunnen zijn voor mensen (zoals *Pseudomonas aeruginosa*). Er zijn ook enkele soorten die als opportunistisch pathogeen alleen ziekte veroorzaken bij immuungecompromitteerde of verzwakte individuen. Binnen het genus komen daarnaast plantpathogene soorten voor, zoals *Pseudomonas syringae*. Pseudomonassoorten kunnen ook echter bescherming bieden voor de plant door de groei van andere plantpathogenen te voorkomen (biocontrol organisme).²¹

De tpeestam van *P. protegens*, CHA0, is in 1985 geïsoleerd uit de wortels van de tabakspant in Zwitserland.⁴ In 2011 is de soortnaam *P. protegens* ingesteld.⁵ Deze soortnaam is gekozen vanwege het vermogen van de bacterie om planten te beschermen tegen in de bodem voorkomende plantpathogenen.^{5,6} Van verschillende stammen van deze soort is het genoom gesequenced, waaronder CHA0, Pf-5, Cab57 en H78.^{7,8,9,10}

P. protegens komt voor in de bodem, koloniseert de rhizosfeer en beschermt de plantenwortel tegen plantpathogene schimmels en oomyceten.^{6,11} De bacterie produceert secundaire metabolieten met brede antibiotische activiteit (zoals waterstofcyanide en 2,4-diacetylphloroglucinol), en sideroforen.^{7,9,10}

P. protegens maakt deel uit van het *P. fluorescens* soortencomplex.¹² Binnen het *P. fluorescens* soortencomplex behoort *P. protegens* tot de fylogenetische subgroep *P. chlororaphis*.¹² De subgroep *P. chlororaphis* bevat bacteriën die pathogeen zijn voor insecten.^{6,13,14,15,16} Stammen van deze subgroep beschikken over orale toxiciteit tegen larven van Lepidoptera, en tegen *Drosophila melanogaster*.^{6,14,16,17,18} *P. protegens* is pathogeen voor bladetende insectensoorten.⁶ Andere insectensoorten die aanwezig zijn in de rhizosfeer door *P. protegens* worden als vector gebruikt zonder dat dit geassocieerd lijkt met pathogeniteit.⁶ *P. protegens* kan dus op verschillende manieren interacteren met insecten.⁶

2.1 Eerder COGEM advies

De COGEM heeft de pseudomonassoorten *Pseudomonas fluorescens* (en stammen DC454 en MB101), *Pseudomonas jessenii* (en stammen RU47 en UW4), en *P. putida* geassocieerd als apathogene bacteriën. Daarnaast zijn meerdere pseudomonassoorten, waaronder *P. aeruginosa*, ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.¹⁹ Van *Pseudomonas stutzeri* is later in een apart advies de pathogeniteitsclassificatie heroverwogen, waarbij deze bacterie als opportunistisch pathogeen ingedeeld is in pathogeniteitsklasse 1.²⁰ Recent heeft de COGEM geadviseerd om *P. capeferrum*, *P. brassicacearum* en *P. thivervalensis* als apathogene bacteriën in te delen in pathogeniteitsklasse 1.²¹

2.2 Classificaties door andere beoordelende instanties

De Duitse ‘Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin’ (BAUA) en ‘Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen’ (DSMZ) die pathogeniteit voor de mens beoordelen, hebben *P. protegens* als apathogeen ingedeeld in de laagste risicogroep (groep 1).^{22,23} De ‘American Type Culture Collection’ (ATCC) die pathogeniteit voor de mens beoordeelt, heeft het uitvoeren van werkzaamheden met *P. protegens* ingedeeld op het laagste veiligheidsniveau BSL1.²⁴ De inschalingen door deze instanties gelden als referentie en achtergrondinformatie bij de risicobeoordeling die door de COGEM wordt uitgevoerd.

2.3 Overweging

P. protegens komt voor in de rhizosfeer en heeft plant-beschermende eigenschappen. Daarnaast is *P. protegens* pathogeen voor bladetende insecten.

3. Burkholderia cepacia

De COGEM is gevraagd te adviseren over *Burkholderia cepacia* (IG 19-115).

De plantenpatholoog Burkholder beschreef in 1950 een fytopathogene bacterie die ‘sour skin’, een bacteriële rottingsziekte van uien veroorzaakte, en gaf aan deze soort de naam ‘cepacia’.²⁵ Daarna werd naar deze soort gerefereerd als *Pseudomonas cepacia*, maar in 1992 is de Gramnegatieve

bacterie in het nieuwe genus *Burkholderia* (familie *Burkholderiaceae*) ondergebracht en herbenaemd tot *Burkholderia cepacia*.²⁶ *B. cepacia* veroorzaakt rot bij uien en bananen.

B. cepacia is een opportunistisch pathogeen die ernstige luchtweginfecties bij patiënten met cystische fibrose (CF) kan veroorzaken.^{28,29,30} Er bestaat heterogeniteit onder 'B. cepacia' stammen. Stammen van deze bacterie die geïsoleerd werden uit CF patiënten bleken tot vijf zogenaamde genomovars (genomische soorten) te behoren.²⁷ Deze genomovars worden tezamen het *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) genoemd.²⁷

Inmiddels is de naamgeving van deze vijf genomovars gewijzigd in: *B. cepacia* (voorheen: *B. cepacia* genomovar I), *B. multivorans* (voorheen: *B. cepacia* genomovar II), *B. cepacia* genomovar III, *B. stabilis* (voorheen: *B. cepacia* genomovar IV) en *B. vietnamiensis* (voorheen: *B. cepacia* genomovar V). Ook zijn genomovar VI, *B. ambifaria* (voorheen *B. cepacia* genomovar VII) en *B. pyrrocinia* later nog toegevoegd aan het Bcc.^{28,29}

Op dit moment omvat het Bcc ~20 verschillende soorten.³⁰ Het is lastig om soorten binnen het Bcc van elkaar te differentiëren omdat ze fenotypisch erg op elkaar lijken en commerciële bacteriële identificatiesystemen geen betrouwbaar onderscheid kunnen maken.²⁸

Soorten behorende tot het Bcc hebben diverse levensstijlen en kunnen een grote variëteit aan habitats koloniseren en infecteren zoals rhizosfeer, wortelknollen van planten, zoetwatersedimenten, industriële producten en medische instrumenten.³⁰ Het Bcc omvat stammen die pathogeen zijn voor planten, kunnen ernstige luchtweginfecties bij CF patiënten veroorzaken en staan bekend als oorzaak van ziekenhuisinfecties.^{28,29,30}

3.1 Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in 2011 geadviseerd over *B. cepacia* en deze bacterie als pathogeen ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.³¹ De bacterie is pathogeen voor planten.^{31,32} Ook een aantal andere *Burkholderia* soorten behorende tot het Bcc zijn door de COGEM ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.¹⁹

3.2 Classificaties door andere beoordelende instanties

De BAUA heeft *B. cepacia* als pathogeen ingedeeld in risicogroep 2 met daarbij de aantekening dat de bacterie pathogeen is voor planten, mensen en gewervelden.²² De DSMZ heeft *B. cepacia* ingedeeld in risicogroep 2.³³ Het Zwitserse 'Federal Office for the Environment' (FOEN) die pathogeniteit voor mens, dier en plant in ogenschouw neemt, heeft *B. cepacia* ingedeeld in risicogroep 2 met daarbij de aantekening dat de bacterie pathogeen is voor planten.³⁴ De ATCC heeft het uitvoeren van werkzaamheden met *B. cepacia* ingedeeld op het veiligheidsniveau BSL2.³⁵

3.3 Overweging

De COGEM is door Bureau ggo gevraagd om aan te geven of *Burkholderia cepacia* naast plantpathogeen ook pathogeen is voor andere organismen, omdat dan naamsvermelding op bijlage 4 noodzakelijk is.

De COGEM merkt op dat *B. cepacia* al is opgenomen op bijlage 4 in tabel 4.2.a van de Regeling ggo. In deze tabel staat vermeld dat plantpathogene bacteriën, micro-organismen van pathogeniteitsklasse 2 zijn.¹

De COGEM heeft *B. cepacia* in 2011 als pathogeen ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.³¹ Op het moment van indeling was al bekend dat *B. cepacia* een opportunistisch pathogeen is. De COGEM concludeert dat er geen nieuwe informatie beschikbaar is en dat er daarom geen aanleiding is om de classificatie van *B. cepacia* te herzien.

4. Advies

Concluderend is de COGEM van oordeel dat *P. protegens* pathogeen is voor bepaalde soorten van insecten en adviseert om deze bacteriesoort in te delen in pathogeniteitsklasse 2 en op te nemen in bijlage 4, lijst 4.2 van de Regeling ggo. Tevens adviseert zij de indeling van *B. cepacia* in pathogeniteitsklasse 2 te handhaven, omdat de bacterie pathogeen is voor planten.

4.1 Aanvullend advies

Voor plantpathogene virussen geldt dat dit taxonomisch goed te onderscheiden groepen zijn, die goed te onderscheiden zijn van virussen die andere organismen infecteren. De soortnamen van plantpathogene virussen hoeven om deze reden niet specifiek genoemd te worden in de Regeling ggo.¹ De COGEM wijst er op dat dit niet geldt voor plantpathogene bacteriën, die vormen geen taxonomisch goed te onderscheiden groepen. Om in de toekomst onnodige 2.13(a) verzoeken, als gevolg van onduidelijkheid bij vergunningaanvragers, te voorkomen adviseert de COGEM om de soortnamen van plantpathogene bacteriën te vermelden op bijlage 4 van de Regeling ggo.¹

Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2019-04-01> (bezocht: 11 juni 2019)
2. Jun S *et al.* (2016). Diversity of *Pseudomonas* Genomes, Including *Populus*-Associated Isolates, as Revealed by Comparative Genome Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 82: 375-383
3. Peix A *et al.* (2018). The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infect. Genet. Evol.* 57:106-116.
4. Stutz EW *et al.* (1986). Naturally occurring fluorescent *pseudomonads* involved in suppression of black root-rot of tobacco. *Phytopathology* 76: 181–185
5. Ramette A *et al.* (2011). *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst. Appl. Microbiol.* 34: 180-188
6. Flury P *et al.* (2019). Persistence of root-colonizing *Pseudomonas protegens* in herbivorous insects throughout different developmental stages and dispersal to new host plants. *ISME J.* 13: 860-872
7. Jousset A *et al.* (2014). Full-Genome Sequence of the Plant Growth-Promoting Bacterium *Pseudomonas protegens* CHA0. *Genome Announc.* 24: 2

8. Paulsen IT *et al.* (2005). Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat. Biotechnol.* 23: 873-878
9. Takeuchi K *et al.* (2014). Complete genome sequence of the biocontrol strain *Pseudomonas protegens* Cab57 discovered in Japan reveals strain-specific diversity of this species. *PLoS One.* 9
10. Huang X *et al.* (2017). Complete Genome Sequence of *Pseudomonas protegens* H78, a Plant Growth-Promoting Rhizobacterium. *Genome Announc.* 20: 5
11. Kupferschmied P *et al.* (2014). Domain shuffling in a sensor protein contributed to the evolution of insect pathogenicity in plant-beneficial *Pseudomonas protegens*. *PLoS Pathog.* 10
12. Gomila M *et al.* (2015). Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Front Microbiol.* 6: 214
13. Kupferschmied P *et al.* (2013). Promise for plant pest control: root-associated pseudomonads with insecticidal activities. *Front Plant Sci.* 4: 287
14. Rangel LI *et al.* (2016). Characterization of Toxin Complex Gene Clusters and Insect Toxicity of Bacteria Representing Four Subgroups of *Pseudomonas fluorescens*. *PLoS One.* 11
15. Ruffner B *et al.* (2015). Evolutionary patchwork of an insecticidal toxin shared between plant-associated pseudomonads and the insect pathogens *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. *BMC Genomics* 16: 609
16. Flury P *et al.* (2016). Insect pathogenicity in plant-beneficial pseudomonads: phylogenetic distribution and comparative genomics. *ISME J.* 10: 2527-2542
17. Olcott MH *et al.* (2010). Lethality and developmental delay in *Drosophila melanogaster* larvae after ingestion of selected *Pseudomonas fluorescens* strains. *PLoS One* 5
18. Ruffner B *et al.* (2013). Oral insecticidal activity of plant-associated pseudomonads. *Environ. Microbiol.* 15: 751-763
19. COGEM (2018). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal apathogene en pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/181112-03
20. COGEM (2018). Heroverweging pathogeniteitsclassificatie *Pseudomonas stutzeri*. COGEM advies CGM/181122-01
21. COGEM (2019). Pathogeniteitsclassificatie van dertien bacteriesoorten. COGEM advies CGM/190612-01
22. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAUA). TRBA 466 "Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen". https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/pdf/TRBA-466.pdf?__blob=publicationFile&v=3 (bezocht: 13 juni 2019)
23. DSZM BacDive *Pseudomonas protegens* DOI: 10.13145/bacdive13154.20190402.4
24. American Type Culture Collection (ATCC). <https://www.atcc.org/search?q=Pseudomonas%20protegens&sort=relevancy> (bezocht: 13 juni 2019)
25. Burkholder WH (1950). Sour skin, a bacterial rot. *Phytopathol.* 40: 115-117
26. Yabuuchi E *et al.* (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbio. Immunol.* 36: 1251-1271

27. Vandamme P *et al.* (1997). Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int. j. Syst. Bacteriol.* 47: 1188-1200
28. Ragupathi NKD (2019). Accurate identification and epidemiological characterization of *Burkholderia cepacia* complex: an update. *Ann. Clin. Microbio. Antimicrob.* 18:7
29. Coenye T *et al.* (2001). Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3427-3436
30. Martina P *et al.* (2018). *Burkholderia puraquae* sp. nov., a novel species of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from hospital settings and agricultural soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68: 14-20
31. COGEM (2011). Classificatie pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-03
32. Van der Vlught RAA *et al.* (2015). Screening of the COGEM lists of non-pathogenic bacteria and fungi for postharvest diseases and plant pathogens. COGEM onderzoeksrapport CGM 2015-06
33. DSZM BacDive *Burkholderia cepacia* DOI: 10.13145/bacdive1906.20190402.4
34. Federal office for the Environment (FOEN). Classification of Organisms.
<https://www.bafu.admin.ch/bafu/en/home/topics/biotechnology/publications-studies/publications/classification-of-organisms.html> (bezocht: 14 juni 2019)
35. American Type Culture Collection (ATCC).
<https://www.atcc.org/search#q=Burkholderia%20cepacia&first=10&sort=relevancy> (bezocht: 14 juni 2019)