

Aan de minister van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
Mevrouw J.C. Huizinga-Heringa
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 13 augustus 2010
KENMERK CGM/100813-02
ONDERWERP Advies classificatie van zes bacteriesoorten

Geachte mevrouw Huizinga-Heringa,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 10-046 met de titel 'Metabole engineering voor de productie van chemicaliën uit hernieuwbare grondstoffen' van de Technische Universiteit Delft, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van de bacteriesoorten *Burkholderia phytofirmans*, *Burkholderia phymatum*, *Burkholderia xenovorans*, *Burkholderia graminis*, *Cupriavidus basilensis* en *Dinoroseobacter shibae*. De aanvrager wil de micro-organismen geschikt maken voor de productie van chemicaliën, zoals ethanol en butanol. Tevens is de COGEM verzocht te adviseren over de mogelijke plaatsing van deze micro-organismen op Bijlage 1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo). Bijlage 1 bestaat uit een lijst van micro-organismen die in principe niet pathogeen zijn voor mens, dier of plant. Met de micro-organismen die in Bijlage 1 zijn opgenomen, mag onder bepaalde voorwaarden op het laagste inperkingsniveau ML-I gewerkt worden.

De endofytische bacteriën *B. phytofirmans*, *B. phymatum* en *B. graminis* komen voor in de rhizosfeer van planten. *B. xenovorans* en *C. basilensis* zijn bodembacteriën die betrokken zijn bij respectievelijk de afbraak van polychloorbifenyyl (PCB) en chloorfenolen. *D. shibae* leeft in symbiose met bepaalde algen en produceert vitamines die de gastheer niet zelf kan produceren.

In de wetenschappelijke literatuur is geen melding gemaakt van pathogene infecties door deze bacteriën bij mens, dier of plant. De COGEM adviseert deze zes bacteriesoorten in de laagste pathogeniteitsklasse (klasse 1) in te delen. Tevens acht de COGEM plaatsing van deze bacteriesoorten op Bijlage 1 gerechtvaardigd.

Concluderend acht de COGEM de risico's van de voorgenomen werkzaamheden op ML-I niveau voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

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 zes bacteriesoorten

COGEM advies CGM/100813-02

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren in welke pathogeniteitsklasse de bacteriën *Burkholderia phytofirmans*, *Burkholderia phymatum*, *Burkholderia xenovorans*, *Burkholderia graminis*, *Cupriavidus basilensis* en *Dinoroseobacter shibae*, ingedeeld dienen te worden. Tevens is de COGEM verzocht te adviseren over de plaatsing van deze micro-organismen op Bijlage 1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo) en inschaling van handelingen met de zes bacteriesoorten.

De aanvrager wil de micro-organismen geschikt maken voor de productie van chemicaliën, waaronder ethanol, butanol, melkzuur of 2,5 furandicarboxylzuur, met behulp van grondstoffen zoals enkelvoudige en meervoudige suikers en glycerol.

Burkholderia phytofirmans

B. phytofirmans is een Gram-negatieve, staafvormige aerobe bacterie. De bacterie werd voor het eerst geïsoleerd van de wortels van uien geïnfecteerd met de schimmel *Glomus vesiculiferum*.¹ De bacterie komt in de rhizosfeer van verschillende planten voor, waaronder aardappel, tomaat en druiven. De bacterie is in staat een endofytische relatie met deze planten aan te gaan.^{1,2}

B. phytofirmans staat bekend om zijn gunstige effecten op de bovengenoemde planten.¹ De bacterie is in staat de groei van deze planten te bevorderen door het niveau van het inhiberende hormoon ethyleen te verlagen met behulp van het enzym 1-aminocyclopropaan-1-carboxylzuurdeaminase. Daarnaast is de bacterie in staat de groei van de ziekteverwekker *Botrytis cinerea* (grijze schimmel) te remmen en het afweersysteem van de plant te induceren.^{1,2}

Burkholderia phymatum

B. phymatum is een Gram-negatieve, staafvormige aerobe bacterie die voorkomt in de wortelknolletjes bij tropische planten uit de vlinderbloemfamilie (*Leguminosae*).⁵ *B. phymatum* werd in 2001 voor het eerst beschreven en blijkt in staat verschillende planten uit het geslacht *Mimosa* van de vlinderbloemfamilie tot wortelknolvorming aan te zetten. De bacterie bindt stikstof uit de atmosfeer, waardoor de plant op stikstofarme grond kan leven.^{5,6}

Burkholderia xenovorans

B. xenovorans is een Gram-negatieve, staafvormige aerobe bodembacterie. *B. xenovorans* is een van de meest bestudeerde en actieve aerobe polychloorbifenylnyl (PCB) afbrekers.⁸ De bacterie werd geïsoleerd uit met PCB's verontreinigde grond in Moreau, New York en kreeg achtereenvolgens de namen *Pseudomonas cepacia*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia spp.*, en *Burkholderia fungorum* toebedeeld.¹⁰ Uiteindelijk werd de bacterie in 2004 geclassificeerd als *Burkholderia xenovorans*.⁸ De bacterie kan de stof bifenylnyl als enige koolstofbron gebruiken en is via co-metabole afbraak in staat een grote reeks aan PCB's af te breken.

Burkholderia graminis

B. graminis werd in 1994 geïsoleerd uit maïswortels in La Côte-Saint-André, Frankrijk. Het is een Gram-negatieve, staafvormige aerobe bacterie die voorkomt in de rhizosfeer van grassen en mais.¹¹ In een publicatie uit 2008 beschrijven Barriuso *et al* een tweetal *B. graminis* stammen die ongeveer 16 verschillende zogenoemde *N*-acyl-homoserine lactonen produceren. Deze signaalmoleculen bleken een positief effect te hebben op de groei van tomatenplanten en de bescherming van de planten tegen zoutstress.¹⁹

Cupriavidus basilensis

C. basilensis is een Gram-negatieve, staafvormige aerobe bacterie die voorheen bekend was onder de naam *Ralstonia basilensis* en *Wautersia basilensis*.¹² De bacterie is lid van de familie *Burkholderiaceae*, genus *Cupriavidus* en werd voor het eerst geïsoleerd uit zoetwatersediment in Amponville, Frankrijk. De bacterie is in staat om bepaalde schadelijke bodemverontreinigende chloorfenolen af te breken welke via het gebruik van bijvoorbeeld insecticiden en herbiciden in het milieu terecht komen.¹³ Ook kan *C. basilensis* giftige bijproducten (furanen), die ontstaan bij de voorbewerking van lignocellulose, onschadelijk maken.¹⁶

Dinoroseobacter shibae

D. shibae is een Gram-negatieve, aerobe fototrofe bacterie behorend tot de familie *Rhodobacteraceae*, genus *Dinoroseobacter*.¹⁴ *D. shibae* is in staat tot anoxygene fotosynthese, ofwel fotosynthese waarbij geen zuurstof wordt gevormd. De bacterie werd voor het eerst geïsoleerd van *Prorocentrum lima*, een toxische mariene dinoflagelaat (eencellige alg met twee verschillende flagellen). *P. lima* produceert okadazuur wat accumuleert in schaaldieren en bij mensen voedselvergiftiging kan veroorzaken.¹⁵

D. shibae gaat een symbiotische relatie aan met *P. lima* en andere toxische en niet-toxische dinoflagellaten. De bacterie produceert vitamines die de gastheer niet zelf kan produceren, zoals thiamine (B₁) en cyanocobalamine (B₁₂). Deze vitamines zijn essentieel voor de groei van de gastheer.¹⁴

Classificatie

In de Regeling ggo worden 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.

Bijlage 1 van de Regeling ggo is een lijst van micro-organismen die in principe niet pathogeen (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. Dit is toegestaan wanneer voor het vervaardigen van het ggo een veilig geachte vector gebruikt wordt en zich in deze vector geen insertie bevindt die een potentieel gevaar voor mens en milieu vormt.²⁰ Voorbeelden van potentieel 'gevaarlijke' inserties zijn genen die coderen voor toxines, virulentie- of pathogeniteitsfactoren en virale en cellulaire oncogenen.

Micro-organismen die op Bijlage 1 vermeld staan, voldoen in ieder geval aan één van de volgende criteria:¹

- 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 zijn getroffen.
- Het micro-organisme behoort tot een soort die wel vertegenwoordigers bevat van klasse 2, 3 of 4, maar de stam in kwestie bevat geen genetisch materiaal dat verantwoordelijk is voor de virulentie.
- Het niet-virulente karakter van het micro-organisme is door middel van adequate tests aangetoond.

In de huidige inschalingspraktijk wordt een micro-organisme als pathogeen gezien als deze bij mensen met een normaal functionerend immuunsysteem ziekte kan veroorzaken. Opportunistische pathogenen, die uitsluitend ziekte kunnen veroorzaken bij individuen met een verzwakt immuunsysteem, worden in de regel als niet pathogeen (apathogeen) beschouwd en kunnen, als aan een van de bovengenoemde voorwaarden is voldaan op Bijlage 1 geplaatst worden.

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. Een lange historie van veilig gebruik, waarbij geen nadelige effecten zijn gerapporteerd, vormt in dit opzicht een belangrijk referentiekader voor apathogeniteit. Als kanttekening moet hierbij opgemerkt worden dat effecten mogelijk anderszins moeilijk worden opgemerkt als zij niet erg uitgesproken van aard zijn en er niet gericht naar wordt gezocht. Anderzijds zijn veruit de meeste micro-organismen apathogeen. Daarom worden micro-organismen bij afwezigheid van expliciete aanwijzingen voor pathogeniteit bij langdurig gebruik als apathogeen beschouwd.

B. phytofirmans, *B. phymatum*, *B. xenovorans* en *B. graminis* komen vooral voor in associatie met consumptie- en siergewassen zoals ui, aardappel, rijst, mais, koffie en *Mimosa*.¹⁷ Volgens de aanvrager betekent dit dat mensen en dieren veelvuldig in contact komen met deze bacteriesoorten en deze zelfs consumeren. De aanvrager stelt dat het zeer aannemelijk is dat deze bacteriesoorten veilig zijn voor mens en milieu. In de wetenschappelijke literatuur worden bovengenoemde *Burkholderia* bacteriën niet geassocieerd met pathogeniteit voor mens, dier of plant.

De bacteriën *B. phytofirmans*, *B. phymatum*, *B. xenovorans* en *B. graminis* zijn door de 'Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (BCCM/LMG)' ingedeeld in risicoklasse 1.⁴ Tevens worden *B. phymatum*, *B. xenovorans* en *B. graminis* door de 'Technische Regeln für

Biologische Arbeitsstoffe 466 (TRBA)' en *B. phytofirmans* door de 'Deutsche Sammlung von Microorganism und Zellkulturen (DSMZ)' beschouwd als klasse 1 pathoogeen.^{3,4,7}

C. basilensis is een bacteriestam waar al geruime tijd experimenten mee worden gedaan in het laboratorium. Volgens de aanvrager wordt de bacterie tevens regelmatig gebruikt in installaties voor de zuivering van bijvoorbeeld afvalwater. Voorzover bekend bij de COGEM is *C. basilensis* niet geassocieerd met pathogeniteit in mens, dier of plant. Ook de soort *C. metallidurans* is veelvuldig gebruikt voor wetenschappelijk onderzoek zonder melding van pathogeniteit.

C. basilensis is door de TRBA en de BCCM/LMG ingedeeld in risicoklasse 1.^{4,7}

In 2010 is de complete genomesequentie van *D. shibae* gepubliceerd.¹⁵ Er zijn in het genoom geen aanwijzingen te vinden dat *D. shibae* toxisch of pathoogeen is voor mens, dier of plant. Ook voor *D. shibea* is er in de wetenschappelijke literatuur geen melding gemaakt van pathogene infecties bij mens, dier of plant.

D. shibae is door de DSMZ ingedeeld in risicoklasse 1.³

Conclusie

Op basis van bovenstaande gegevens adviseert de COGEM alle zes bacteriesoorten in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en acht zij de opname van de genoemde zes bacteriesoorten op Bijlage 1 van de Regeling ggo gerechtvaardigd.

Gebaseerd op de indeling van de bacteriesoorten in pathogeniteitsklasse 1 en conform de Regeling ggo acht de COGEM de risico's van de voorgenomen werkzaamheden op ML-I niveau voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Sessitsch A *et al* (2005). *Burkholderia phytofirmans* sp. Nov., a novel plant associated bacterium with plant-beneficial properties. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 1187-1192
2. Compant S *et al* (2005). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth promoting bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. *Appl. Environ. Microbiol* Apr: 1685-1693
3. Deutsche Sammlung von Microorganism und Zellkulturen (DSMZ). http://www.dsmz.de/microorganisms/bacteria_catalogue.php (20-07-2010)
4. Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms. <http://bccm.belspo.be/index.php>. (20-07-2010)
5. Vandamme P *et al* (2002). *Burkholderia tuberum* sp. Nov. And *Burkholderia phymatum* sp.nov., Nodulate the roots of tropical legumes. *System. Appl. Microbiol.* 25: 507-512
6. Moulin L *et al* (2001). Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature* vol 411
7. Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe 466. <http://www.baua.de/cae/servlet/contentblob/672886/publicationFile/48583/TRBA-466.pdf> (20-07-2010)
8. Goris J *et al* (2004). Classification of the PCB- and biphenyl degrading strain LB400 and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. Nov. *Intl J. Syst Evol Microbiol.* 54: 1677-1681
9. PCB's en PCT's. rivm.nl/rvs/Images/PCB%26PCT%2008%20f_tcm35-54949.pdf (21-07-2010)

10. DOE Joint Genome Institute. <http://genome.jgi-psf.org/burfu/burfu.home.html> (20-07-2010)
11. Viallard *et al* (1998). *Burkholderia graminis* sp. Nov., a rhizospheric *Burkholderia* species, and reassessment of [*Pseudomonas*] *phenazinium*, [*Pseudomonas*] *pyrrocinia* and [*Pseudomonas*] *glathei* as *Burkholderia*
12. Vandamme P & Coenye T (2004). Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Intl J. Syst Evol Microbiol* 54: 2285-2289.
13. Steinle *et al* (2000). Effect of environmental factors on the degradation of 2,6-dichlorophenol in soil. *Environ. Sci. Technol* 34: 771-775
14. Biebl *et al* (2005). *Dinoroseobacter shibae* gen. nov., sp. Nov., a new aerobic phototrophic bacterium isolated from dinoflagellates. *Intl J. Syst Evol Microbiol* 55:1089-1096
15. Wagner-Dobler *et al* (2010). The complete genome sequence of the algal symbiont *Dinoroseobacter shibae*: a hitchhiker's guide to life in the sea. *The ISME Journal* 4: 61-77
16. Wierckx *et al* (2010). Isolation and characterization of *Cupriavidus basilensis* HMF14 for biological removal of inhibitors from lignocellulosic hydrolysate. *Microbial Biotechnology* 3: 336-343
17. Compant *et al* (2008). Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. In the natural environment. *FEMS Microbiol Rev* 32: 607-626
18. DOE Joint Genome Institute. <http://genome.jgi-psf.org/dinsh/dinsh.home.html> (10-08-10)
19. Barriuso *et al* (2008). Transgenic tomato plants alter quorum sensing in plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Biotechnol J* 6: 442-52
20. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. Mei 2004