

Aan de minister van  
Volkshuisvesting, Ruimtelijke  
Ordening en Milieubeheer  
Mevrouw dr. J.M. Cramer  
Postbus 30945  
2500 GX Den Haag

**DATUM** 14 april 2009  
**KENMERK** CGM/090414-01  
**ONDERWERP** Classificatie van vier bacteriesoorten

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag over de vergunningaanvraag (IG 09-012) van het Nederlands Instituut voor Ecologie te Heteren betreffende de classificatie van vier bacteriën deelt de COGEM u het volgende mee.


#### **Samenvatting**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van de bacteriesoorten *Erwinia herbicola*, *Arthrobacter chlorophenolicus*, *Alcanivorax borkumensis* en *Sphingomonas wittichii*. Tevens is de COGEM verzocht te adviseren over de mogelijke plaatsing van deze micro-organismen in 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 aanvrager wil de stam 299R van *Erwinia herbicola* gebruiken als modelorganisme voor het meten van fitness van individuele bacteriën op het bladoppervlak van planten. De overige bacteriesoorten worden gebruikt als modelorganismen in een studie naar de biodegradatie van verschillende klassen van organische vervuilingen van het milieu.

De bacteriesoort *Erwinia herbicola* omvat verschillende stammen die pathogeen zijn voor mens, dier of plant. Welke elementen van belang zijn bij deze pathogeniteit en in hoeverre de stam 299R over deze elementen beschikt, is niet bekend. De COGEM kan derhalve niet uitsluiten dat de stam 299R over vergelijkbare pathogene eigenschappen beschikt. Zij adviseert derhalve deze stam in pathogeniteitsklasse 2 te handhaven.

Uit de literatuurgegevens kan worden opgemaakt dat de bacteriesoorten *Arthrobacter chlorophenolicus*, *Alcanivorax borkumensis* en *Sphingomonas wittichii* niet gekend pathogeen zijn voor mens, dier en plant. De COGEM adviseert daarom deze drie bacteriesoorten in de laagste pathogeniteitsklasse (klasse 1) in te delen en op Bijlage 1 te plaatsen.



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

Hoogachtend,



Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman

Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs  
Dr. I. van der Leij

*Dit advies is mede tot stand gekomen door de inbreng van Prof. dr. P. de Vos werkzaam aan de universiteit van Gent, België.*

# Classificatie van vier bacteriesoorten

## COGEM advies CGM/090414-01

### Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren in welke pathogeniteitsklasse de bacteriën: *Erwinia herbicola* stam 299R, *Arthrobacter chlorophenolicus* stam A6, *Alcanivorax borkumensis* stam SK2 en *Sphingomonas wittichii* stam RW1 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) (1).

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 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 (1). 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):

- 1) Het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant.
- 2) Het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen zijn getroffen.
- 3) 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.
- 4) 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 immuuncompetente mensen een ziekte kan veroorzaken. Opportunistische pathogenen, die een ziekte kunnen veroorzaken bij immuungecompromiteerde individuen, worden als niet pathogeen (apathogeen) beschouwd en kunnen op Bijlage 1 geplaatst worden.

## **Overweging**

In de onderstaande overweging wordt voor elk micro-organisme uiteengezet of het desbetreffend organisme volgens de COGEM op Bijlage 1 thuishoort.

In de praktijk is het onderscheid tussen een pathogeen en een opportunistisch pathogeen niet scherp gedefinieerd. Een opportunistisch pathogeen kan een ziekte veroorzaken in personen met een verzwakt immuunsysteem. De vraag is echter wanneer er sprake is van een daadwerkelijk verzwakt immuunsysteem.

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 er van veel bacteriën weinig literatuur over pathogeniteit 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 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 bij afwezigheid van expliciete aanwijzingen voor pathogeniteit bij langdurig gebruik micro-organismen als apathogeen beschouwd.

De onderstaande overwegingen zijn gemaakt op basis van de literatuurgegevens én de inschattingen van (externe) experts.

### ***Erwinia herbicola* stam 299R**

*Pantoea agglomerans*, een Gram-negatieve aerobe bacterie was voorheen bekend onder de naam *Erwinia herbicola* of *Enterobacter agglomerans* en behoort tot de familie der *Enterobacteriaceae*. Alle soorten die behoren tot het genus *Pantoea* worden aangetroffen op planten en in de bodem. De soort *P. agglomerans* omvat verschillende stammen, waarvan de aanvrager alleen 299R wil gaan gebruiken (4,5,6).

Van de *Pantoea* soorten wordt *P. agglomerans* het meest aangetroffen in de mens. Infectie met deze bacterie ontstaat veelal na verwondingen aan doornen van planten of houtsplinters en resulteert in ontsteking van gewrichten en zogenaamd zacht weefsel (7,8,9). Daarnaast is *P. agglomerans* veelvuldig in verband gebracht met bacteriëmie als gevolg van onder andere de vervuiling van infusievloeistof, bloedproducten en het anaestheticum propofol (7,10,11). Over het algemeen genezen de patiënten van een dergelijke infectie.

Een *P. agglomerans* infectie is tevens waargenomen bij premature baby's waarvan het immuunsysteem relatief zwak is (12,13). Met antibiotica lijkt deze groep goed te behandelen, alhoewel in één publicatie het tegenovergestelde wordt waargenomen (12). Het was in deze laatste studie echter niet geheel duidelijk of de infectie werd

veroorzaakt door *P. agglomerans*. *P. agglomerans* is ook aangetroffen bij bacteriëmie in jonge veulens met diarree (14).

De *P. agglomerans* bacteriën komen algemeen voor op de bladeren en knoppen van planten en worden beschouwd als commensalen. Er zijn echter twee stammen van *P. agglomerans* beschreven die tumorvorming, de zogenaamde gallen in gipskruid en bieten veroorzaken. Het betreft respectievelijk *P. agglomerans* pv. *gyssphila* en *P. agglomerans* pv. *betae* (15,16). Daarentegen wordt een andere stam van *P. agglomerans* (C9-1) al lange tijd gebruikt als biologisch bestrijdingsmiddel om bacterievuur bij appels en peren te voorkomen (17).

De *P. agglomerans* stammen die beschikbaar zijn bij de 'American Type Culture Collection' (ATCC) worden ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1 (2). Door de 'Deutsche Sammlung des Mikroorganismen und Zellkulturen' (DSMZ) wordt *P. agglomerans* beschouwd als micro-organisme van pathogeniteitsklasse 2 (3).

Gezien de pathogeniteit van verscheidene *P. agglomerans* stammen in mens, dier en plant is de COGEM van mening dat *P. agglomerans* ingedeeld dient te worden in pathogeniteitsklasse 2. De *P. agglomerans* stam 299R die de aanvrager verzoekt te mogen gebruiken, is in de wetenschappelijke literatuur niet geassocieerd met ziekte bij mens, dier of plant. Identificatie van de stam, die in klinische monsters wordt waargenomen, blijft echter veelal achterwege. De rol van de stam 299R in humane infecties met *P. agglomerans* is hierdoor onduidelijk.

*P. agglomerans* 299R wordt al verschillende jaren in laboratoria gebruikt, maar is in de wetenschappelijke literatuur niet uitvoerig gekarakteriseerd (4,5,6). Bovendien heeft de aanvrager geen gegevens overlegd waaruit apathogeniteit blijkt.

Op basis van de bovenstaande overweging kan de COGEM niet uitsluiten dat *P. agglomerans* stam 299R pathogeen is voor mens, dier of plant.

#### ***Arthrobacter chlorophenolicus* stam A6**

Het genus *Arthrobacter* omvat een heterogene groep van aerobe Gram-positieve bacteriën, die wijdverspreid voorkomt en in de bodem tot de meest voorkomende bacteriën behoort. Ook de *A. chlorophenolicus* A6 stam is geïsoleerd uit een bodem monster (18). Dit micro-organisme kan groeien op een relatief hoge concentratie 4-chlorophenol en is in staat deze giftige verbinding af te breken. Deze stam wordt hierdoor als een interessante kandidaat beschouwd in de bestrijding van bodemvervuiling.

Over het algemeen wordt het pathogene potentieel van *Arthrobacter* soorten als laag bestempeld aangezien mensen onophoudelijk worden blootgesteld aan deze bacteriën en deze bacteriën slechts beperkt worden aangetroffen in klinische monsters. Van alle *Arthrobacter* soorten worden *A. cumminsii* en *A. oxydans* het meest gevonden in klinische monsters. Daarnaast zijn ook infecties met *A. aurescens*, *A. albus*, *A. creatinolyticus*, *A. luteolus* en *A. woluwensis* in mensen waargenomen

(19,20,21,22,23). Een *Arthrobacter* infectie kan over het algemeen goed worden behandeld met antibiotica. *A. chlorophenolicus* is tot op heden niet aangetroffen in klinische monsters.

*A. chlorophenolicus* wordt door zowel de ATCC als de DSMZ beschouwd als een organisme van pathogeniteitsklasse 1 (2,3).

Hoewel *Arthrobacter* bacteriën algemeen voorkomen in de bodem, blijkt de frequentie waarmee mensen met deze bacteriën besmet raken laag. In de afgelopen tien jaar zijn humane klinische specimens veelvuldig gecontroleerd op de aanwezigheid van *Arthrobacter* bacteriën. Bij de analyse van deze monsters is *A. chlorophenolicus* nooit aangetroffen. Er zijn bij de COGEM geen publicaties bekend waaruit blijkt dat *A. chlorophenolicus* pathogeen is voor dieren of planten. De COGEM is daarom van mening dat *A. chlorophenolicus* beschouwd dient te worden als apathogeen.

#### ***Alcanivorax borkumensis* stam SK2**

*A. borkumensis* is een Gram-negatieve aerobe, staaf-vormige bacterie die geïsoleerd is uit een zeewater/sediment monster verkregen nabij het eiland Borkum in de Noordzee (18). Inmiddels is *A. borkumensis* wereldwijd aangetroffen in verschillende marine en kust habitats (26,27). In een 'schone' omgeving komt deze bacterie slechts in lage aantallen voor, maar in met olie-vervuilde zee- of kustwateren wordt deze bacterie binnen korte tijd het meest dominante micro-organisme. De bacterie is aangewezen op in olie aanwezige koolwaterstofmoleculen als koolstofbron en energiebron. Het betreft hierbij met name *n*-alkanen en vertakte alkanen. Suikermoleculen en aminozuren zijn ongeschikt als koolstofbron (25). *A. borkumensis* groeit bij temperaturen tussen de 4 en 35°C, met een optimum tussen de 25 en 30°C (18).

Sinds de beschrijving van deze stam in 1998 zijn er in de wetenschappelijke literatuur geen studies gepubliceerd, die *A. borkumensis* in verband brengen met ziekte in mensen, dieren of planten. Gezien de groeitemperatuur en benodigde koolstofbronnen acht de COGEM het niet waarschijnlijk dat deze bacteriën mens en dier kunnen koloniseren.

*A. borkumensis* wordt door zowel de ATCC als de DSMZ ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1 (2,3).

Sinds de ontdekking van *A. borkumensis* kent deze bacterie een periode van veilig gebruik en heeft de COGEM geen aanwijzingen waaruit blijkt dat deze bacterie (opportunistisch) pathogeen zou kunnen zijn voor mens, dier of plant. Gezien deze afwezigheid van pathogeniteit en de strikte groeivoorwaarden van deze bacteriën is de COGEM van mening dat *A. borkumensis* beschouwd moet worden als apathogeen.

### ***Sphingomonas wittichii* stam RW1**

*S. wittichii* RW1 is in 1992 geïsoleerd uit een watermonster van de rivier de Elbe en is een lid van het genus *Sphingomonas* (28). De soorten behorend tot dit genus zijn aerobe, Gram-negatieve, staaf-vormige bacteriën die zogenaamde sphingoglycolipiden produceren. Deze bacteriën worden aangetroffen in een verscheidenheid aan habitats en spelen een rol in de afbraak van grote aromatische verbindingen in rottend plantenmateriaal en chemische vervuiling (30). De stam *S. wittichii* RW1 is bekend als bacterie die meervoudig gechloroerde dibenzo-*p*-dioxines kan afbreken (29,28).

Binnen het genus *Sphingomonas* wordt alleen *S. paucimobilis* in verband gebracht met ziekte bij mensen. *S. paucimobilis* veroorzaakt hoofdzakelijk zogenaamde ziekenhuis-infecties en besmet de patiënten via de aangebrachte katheters (31,32). De infecties zijn niet levensbedreigend en kunnen goed worden bestreden met antibiotica. In tegenstelling tot *S. paucimobilis* is *S. wittichii* tot op heden niet aangetroffen in mensen en wordt derhalve niet geassocieerd met humane pathogeniteit.

*S. wittichii* wordt door de DSMZ ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1 (3).

De COGEM heeft geen aanwijzingen dat *S. wittichii* in verband kan worden gebracht met infecties van dieren of mensen. Tevens zijn er geen aanwijzingen gevonden om aan te nemen dat *S. wittichii* als plantenpathogeen aangemerkt dient te worden.

Concluderend is de COGEM van mening dat *S. wittichii* een apathogeen micro-organisme is.

### **Advies**

Op basis van de wetenschappelijke literatuur kan de COGEM niet uitsluiten dat *P. agglomerans* stam 299R pathogeen is in mens, dier of plant. Bovendien levert de aanvrager geen gegevens aan waaruit blijkt dat deze stam apathogeen is. De COGEM adviseert daarom deze stam te handhaven in pathogeniteitsklasse 2. Conform de regeling ggo behoren werkzaamheden met micro-organismen van pathogeniteitsklasse 2 ingeschaald te worden op inperkingsniveau ML-II.

Gezien het niet pathogene karakter van *Arthrobacter chlorophenolicus*, *Alcanivorax borkumensis* en *Sphingomonas wittichii* acht de COGEM het gerechtvaardigd om deze organismen in pathogeniteitsklasse 1 in te delen en tevens in Bijlage 1 van de Regeling GGO op te nemen.

## Referenties

1. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. Mei 2004
2. American Type Culture Collection (2009-04-07). <http://www.lgcstandards-atcc.org/>
3. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (2009-04-07). [http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial\\_nomenclature.php?select=A](http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature.php?select=A)
4. Brandl MT & Lindow SE (1996). Cloning and characterization of a locus encoding an indolepyruvate decarboxylase involved in indole-3-acetic acid synthesis in *Erwinia herbicola*. *Appl Environ Microbiol* 62: 4121-4128
5. Brandl MT & Lindow SE (1997). Environmental signals modulate the expression of an indole-3-acetic acid biosynthetic gene in *Erwinia herbicola*. *MPMI* 10: 499-505
6. Brandl MT & Lindow SE (1998). Contribution of indole-3-acetic acid production to the epiphytic fitness of *Erwinia herbicola*. *Appl Environ Microbiol* 64: 3256-43263
7. Cruz AT *et al.* (2007). *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. *J Clin Microbiol* 45:1989-1992
8. Duerinckx JFH (2008). Subacute synovitis of the knee after a rose thorn injury. *Clin Orthop Relat Res* 466: 3138-3142
9. Kratz A *et al.* (2003). *Pantoea agglomerans* as a cause of septic arthritis after palm tree thorn injury; case report and literature review. *Arch Dis Child* 88: 542-544
10. Alvarez FE *et al.* (1995). Bacterial contamination of cellular blood components. A retrospective review at a large cancer center. *Ann Clin Lab Sci* 25: 283-290
11. Bennett SN *et al.* (1995). Postoperative infections traced to contamination of an intravenous anesthetic, propofol. *N Engl J Med* 333: 147-154
12. Van Rostenberghe H *et al.* (2006) The clinical picture of neonatal infection with *Pantoea* species. *Jpn J Infect Dis* 59: 120-121
13. Aly NY *et al.* (2008). *Pantoea agglomerans* bloodstream infection in preterm neonates. *Med Princ Pract* 17:500-503
14. Hollis AR *et al.* (2008). Bacteremia in equine neonatal diarrhea: a retrospective study (1990-2007). *J Vet Intern Med* 22:1203-1209
15. Cooksey DA (1986). Galls of *Gypsophila paniculata* caused by *Erwinia herbicola*. *Plant Dis* 70: 464-468
16. Burr TJ *et al.* (1991). Comparison of tumorigenic strains of *Erwinia herbicola* isolated from table beet with *E.h. gypsophilae*. *Plant Dis* 75: 855-858
17. Pusey PL (1997). Crab apple blossoms as a model for research on biological control of fire blight. *Phytopathology* 87: 1096-1102
18. Westerberg K *et al.* (2000). *Arthrobacter chlorophenolicus* sp. nov., a new species capable of degrading high concentrations of 4-chlorophenol. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 2083-2092
19. Funke G *et al.* (1996). Isolation of *Arthrobacter* spp. from clinical specimens and description of *Arthrobacter cumminsii* sp. nov. and *Arthrobacter woluwensis* sp. nov. *J Clin Microbiol* 34: 2356-2363



20. Mages IS *et al.* (2008). Identities of *Arthrobacter* spp. and *Arthrobacter*-like bacteria encountered in human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 46:2980-2986
21. Wauters G *et al.* (2000). Identification of *Arthrobacter oxydan*, *Arthrobacter luteolus* sp. nov., and *Arthrobacter albus* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 38: 2412-2415
22. Huang *et al.* (2005). *Arthrobacter scleromae* sp. nov. isolated from human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 43: 1451-1455
23. Funke G *et al.* (1998). Characteristics of *Arthrobacter cummingsii*, the most frequently encountered *Arthrobacter* species in human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 36: 1539-1543
24. Yakimov MM *et al.* (1998). *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 48: 339-348
25. Harayama S *et al.* (2004). Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Curr Opin Biotechnol* 15:205-214
26. Schneiker S *et al.* (2006). Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Nat Biotechnol* 24: 997-1004
27. Yakimov MM *et al.* (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. *Curr Opin Biotechnol* 18:257-266
28. Wittich RM *et al.* (1992). Metabolism of dibenzo-p-dioxin by *Sphingomonas* sp. strain RW1. *App Environ Microbiol* 58: 1005-1010
29. Yabuuchi E *et al.* (2001). Proposal of *Sphingomonas wittichii* sp. nov. for strain RW1, known as a dibenzo-p-dioxin metabolizer. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 281-292
30. Keum YS *et al.* (2008). Metabolism of nitrodiphenyl ether herbicides by dioxin-degrading bacterium *Sphingomonas wittichii* RW1. *J Agric Food Chem* 56: 9146-9151
31. Cheong HS *et al.* (2008). Clinical features and treatment outcomes of infectious caused by *Shingomonas paucimobilis*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 29: 990-992
32. Maragakis LL *et al.* (2009). *Shingomonas paucimobilis* bloodstream infections associated with contaminated intravenous fentanyl. *Emerg Infect Dis* 15: 12-18

*Dit advies is mede tot stand gekomen door de inbreng van Prof. dr. P. de Vos werkzaam aan de universiteit van Gent, België.*