

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

DATUM 08 februari 2022
KENMERK CGM/220208-01
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie *Pseudomonas simiae* WCS417

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier (IG 22-005_2.13-000) getiteld 'Pseudomonas simiae WCS417' ingediend door de Universiteit Utrecht, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriestam *Pseudomonas simiae* WCS417. Bacteriën behorend tot het genus *Pseudomonas* komen wereldwijd in uiteenlopende omgevingen voor. De soort *Pseudomonas simiae* is voor het eerst aangetroffen in zieke apen en is geclassificeerd als een pathogene bacteriesoort van pathogeniteitsklasse 2.

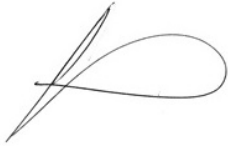
De bacteriestam *P. simiae* WCS417 was voorheen bekend als *Pseudomonas fluorescens* WCS417, maar is door genetisch onderzoek ondergebracht bij de soort *P. simiae*. De bacteriestam WCS417 is geïsoleerd uit wortels van de tarweplant. De *P. simiae* WCS417 bacteriën bevorderen de groei van de plant en hebben een antagonistisch effect op ziekteverwekkende schimmels en bacteriën, bijvoorbeeld door het wegnemen van belangrijke voedingsstoffen zoals ijzer. Ook kunnen *P. simiae* WCS417 bacteriën de plant stimuleren om zichzelf te verdedigen tegen ziekteverwekkers.

Er wordt al vele jaren onderzoek verricht naar *P. simiae* WCS417 en diens interacties met planten. Er zijn geen aanwijzingen dat *P. simiae* WCS417 pathogeen is voor mens, dier of plant. Alles in overweging nemende is de COGEM van oordeel dat de bacteriestam *P. simiae* WCS417 ingedeeld dient te worden in pathogeniteitsklasse 1, en opgenomen kan worden op 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

Met het oog op eventuele belangenverstremgeling is COGEM lid dr. J.J.P.A. de Cock niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies

Pathogeniteitsclassificatie van de bacteriestam

Pseudomonas simiae WCS417

COGEM advies CGM/220208-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriestam *Pseudomonas simiae* WCS417 en plaatsing van deze stam op bijlage 2, lijst A1 van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen' (Regeling ggo).¹ Het verzoek is afkomstig van de Universiteit Utrecht (IG 22-005). *P. simiae* WCS417 werd tot 2015 beschouwd als *Pseudomonas fluorescens* WCS417. De soort *P. fluorescens* is opgenomen in de Regeling ggo als apathogeen in klasse 1, de soort *P. simiae* is opgenomen als pathogeen in klasse 2. De onderhavige adviesvraag betreft de pathogeniteitsclassificatie van de stam *P. simiae* WCS417.

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 ggo1 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. De soort *Pseudomonas simiae*

Het genus *Pseudomonas* bestaat uit een zeer diverse groep bacteriën, waaronder dier-, humaan- en plantpathogenen, die wereldwijd in zeer verschillende omgevingen voorkomen.² De soort *P. simiae* is een Gram-negatieve, staafvormige en strikt-aerobe bacteriesoort van 1 tot 1.5 micron groot.³ Deze bacterie groeit bij temperaturen tussen 4 en 37 graden Celsius en optimaal bij 30 graden Celsius.³ *P. simiae* is voor het eerst aan de hand van 16s RNA analyses geïdentificeerd in de longblaasjes van apen (*Callithrix geoffroyi*) die waren gestorven aan acute bacteriëmie en bronchopneumonie (ontsteking van de longblaasjes en luchtwegen).³ De bacteriën zijn ook aangetroffen in de lever en het brein van de zieke apen. De aanwezigheid van de bacteriën in de longen kan duiden op *P. simiae* als de veroorzaker van de longontsteking, dit is echter niet vastgesteld.³ Pseudomonassoorten, waaronder verwanten van *P. simiae*, zouden mogelijk circuleren in apenpopulaties in Brazilië.⁴ Eén studie beschrijft de pathogeniteit van *P. simiae* isolaten voor planten: bij een screening van meer dan 1.000 bacterie-isolaten, geïsoleerd uit zieke citrusplanten, zijn ook zeven *P. simiae* isolaten geïdentificeerd die bij reinoculatie in gezonde citrusplanten ziekte veroorzaakten.⁵

4. De stam *Pseudomonas simiae* WCS417

P. simiae WCS417 werd tot 2015 beschouwd als *Pseudomonas fluorescens* WCS417.⁶ De bacteriestam WCS417 is in 1988 geïsoleerd uit de wortels van tarweplanten in de Nederlandse Flevopolder.⁷ WCS417 bleek ziekte door de bodemschimmel (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) in tarweplanten te onderdrukken.⁷ Ook in diverse andere gewassen kan WCS417 als antagonist bescherming bieden tegen pathogene bodemschimmels.^{6,8} WCS417 is tevens een antagonist voor plantpathogene bacteriën en wordt, zoals meerdere pseudomonassoorten, ingezet tegen bijvoorbeeld de bacteriesoort *Ralstonia solanacearum* die een breed waardplantspectrum heeft.⁹ En WCS417 induceert resistentie tegen blad-etende insecten, zoals tegen rupsen van de Kooluil (*Mamestra brassicae*).^{10,11} Daarnaast is met een *in vitro* assay aangetoond dat WCS417 een antagonistisch effect kan hebben op de nematodesoort *Xiphinema index*.¹²

WCS417, maar ook andere pseudomonassoorten geïsoleerd uit de rhizosfeer, zou de groei van planten bevorderen, een antagonistisch effect hebben op pathogenen door het wegnemen van ijzer en door het induceren van systemische resistentie in de plant.^{6,8,13} Pseudomonaden bezitten sideroforen met een hoge affiniteit voor ijzer, waardoor het ijzer wordt weggenomen en niet meer beschikbaar is voor andere micro-organismen zoals plantpathogenen in de omgeving.^{8,14} Het fenomeen van pseudomonasgeïnduceerde systemische resistentie in de plant, waarbij de plant wordt gestimuleerd om zich te verdedigen tegen plantpathogenen, is in één van de eerste studies met de stam WCS417 experimenteel aangetoond.^{15,16}

Net als andere pseudomonassoorten bevat ook WCS417 eiwitsecretiesystemen, waaronder een type 3 secretiesysteem (T3SS).¹⁷ De effectoren die worden uitgescheiden met dit systeem kunnen bijvoorbeeld lokaal het immuunsysteem van een gastheer onderdrukken, zodat kolonisatie mogelijk is. De rol van effectoren die door het T3SS van WCS417 worden uitgescheiden, is nog niet bekend.¹⁷

P. simiae WCS417 is nauw verwant aan de *P. simiae* stam R81, eveneens geïsoleerd uit de wortels van tarwe.^{6,18} Ook deze stam zou eigenschappen hebben die de groei van planten bevorderen.¹⁹ Een andere *P. simiae* stam is PICF7, deze stam is geïsoleerd uit de rhizosfeer van olijfplanten (*Olea europaea*) en zou de planten beschermen tegen de bodemschimmel *Verticillium dahliae*.²⁰ De stam *P. simiae* MB751, geïsoleerd uit de aarde van een wijngaard, produceert stoffen die lethaal zijn voor de nematodesoort *Meloidogyne incognita* (wortelknobbelaaltje), bevordert daarnaast de groei van planten en induceert systemische resistentie.²¹

5. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft over de pathogeniteitsklasse van enkele pseudomonassoorten geadviseerd. Onder andere over de indeling van *Pseudomonas jessenii*²², *Pseudomonas stutzeri*²³ en *P. fluorescences*²⁴ in pathogeniteitsklasse 1 en *P. protegens*²⁵ op pathogeniteitsklasse 2 wegens pathogeniteit voor blad-etende insecten. De soort *P. simiae* is naar aanleiding van een COGEM onderzoeksrapport in 2011 beschreven als pathogeen en ingedeeld in klasse 2.^{26,27}

6. Overweging

Er is al vele jaren onderzoek verricht naar de bacteriestam WCS417 en diens effecten op de groei van diverse gewassen.⁸ Er zijn geen publicaties bekend die de bacteriestam *P. simiae* WCS417 in verband brengen met pathogeniteit voor mens of dier. In de wetenschappelijke literatuur is, zover bij de COGEM bekend, niet gerapporteerd dat de bacteriestam *P. simiae* WCS417 plantpathogeen is. De stam *P. simiae* WCS417 bevordert daarentegen de groei van de plant en heeft een antagonistische werking tegen plantpathogenen.^{7,8,10,11,13} Bescherming van plantensoorten tegen pathogene schimmels en bacteriën vindt met name plaats door het wegnemen van ijzer uit de omgeving en het induceren van het verdedigingsmechanisme van de plant zelf.^{8,14}

7. Advies

Alles in overweging nemende is de COGEM van oordeel dat de bacteriestam *Pseudomonas simiae* WCS417 een apathogene bacteriestam is. De COGEM adviseert om *P. simiae* WCS417 in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en op te nemen in Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2022-01-01> (bezocht op 31-01-2022)
2. Peix A *et al.* (2018). The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infect. Genet. Invol.* 57: 106–116
3. Vela AI *et al.* (2006). *Pseudomonas simiae* sp. nov., isolated from clinical specimens from monkeys (*Callithrix geoffroyi*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2671–2676
4. Menezes-Costa A *et al.* (2013). Identification of bacterial infection in neotropical primates. *Microb. Ecol.* 66: 471–478
5. Beiki F *et al.* (2016). New *Pseudomonas* spp. Are Pathogenic to Citrus. *PLoS one.* 11: e0148796
6. Berendsen RL *et al.* (2015). Unearthing the genomes of plant-beneficial *Pseudomonas* model strains WCS358, WCS374 and WCS417. *BMC genom.* 16: 539
7. Lamers JG *et al.* (1988). Soil-borne diseases of wheat in the Netherlands and results of seed bacterization with pseudomonads against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, associated with disease resistance. Conference of the Cereal Section of EUCARPIA. 134-139
8. Pieterse CM *et al.* (2021). *Pseudomonas simiae* WCS417: star track of a model beneficial rhizobacterium. *Plant Soil* 461: 245-263
9. Ran LX *et al.* (2005). Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. in China. *Biol. Control.* 32: 111–120
10. Friman J *et al.* (2021). Differential effects of the rhizobacterium *Pseudomonas simiae* on above- and belowground chewing insect herbivores. *J. Appl. Entomol.* 145: 250-260
11. Pangesti N *et al.* (2016). Jasmonic acid and ethylene signalling pathways regulate glucosinolate levels in plants during rhizobacteria-induced systemic resistance against a leaf-chewing herbivore. *J. Chem. Ecol.* 42: 1212–1225
12. Canchignia H *et al.* (2017). Candidate nematocidal proteins in a new *Pseudomonas veronii* isolate identified by its antagonistic properties against *Xiphinema index*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 63: 11–21
13. Zamioudis C *et al.* (2013). Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. bacteria. *Plant Physiol.* 162: 304–318
14. Verbon EH *et al.* (2017) Iron and immunity. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55: 355–375
15. Van Peer R *et al.* (1991). Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS 417r. *Phytopathol.* 81: 728-734
16. Bakker PA *et al.* (2007). Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathol.* 97: 239–243
17. Stringlis IA *et al.* (2019). Type III Secretion System of Beneficial Rhizobacteria *Pseudomonas simiae* WCS417 and *Pseudomonas defensor* WCS374. *Front. Microbiol.* 10: 1631
18. Mathimaran N *et al.* (2012). Genome sequences of two plant growth-promoting fluorescent *Pseudomonas* strains, R62 and R81. *J. Bacteriol.* 194: 3272–3273
19. Roesti D *et al.* (2006). Plant growth stage, fertiliser management and bio-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria affect the rhizobacterial community structure in rain-fed wheat fields. *Soil Biol. Biochem.* 38: 1111-1120

20. Montes-Osuna N *et al.* (2021). Assessing the Involvement of Selected Phenotypes of *Pseudomonas simiae* PICF7 in Olive Root Colonization and Biological Control of *Verticillium dahliae*. *Plants* (Basel). 10: 412
21. Sun X *et al.* (2021). Biocontrol of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by a nematicidal bacterium *Pseudomonas simiae* MB751 with cyclic dipeptide. *Pest Manag. Sci.* 77: 4365–4374
22. COGEM (2014). Classificatie van *Pseudomonas jessenii*. COGEM advies CGM/141027-01
23. COGEM (2018). Heroverweging pathogeniteitsclassificatie *Pseudomonas stutzeri*. COGEM advies CGM/181122-01
24. COGEM (2014). Classificatie van *Pseudomonas fluorescens*. COGEM advies CGM/140527-02
25. COGEM (2019). Advies over de bacteriesoorten *Pseudomonas protegens* en *Burkholderia cepacia*. COGEM advies CGM/190625-01
26. COGEM (2011). Classificatie pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-03
27. Van Belkum (2011). Classification of bacterial pathogens. COGEM research report CGM/2011-07