

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

**DATUM** 02 juni 2022  
**KENMERK** CGM/220602-01  
**ONDERWERP** Advies classificatie *Paraburkholderia terrae*, *P. nodosa* en *P. caballeronis*

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier getiteld 'Paraburkholderia terrae, Paraburkholderia nodosa, Paraburkholderia caballeronis' (IG 22-073\_2.13-000) van de Universiteit Leiden, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van drie bacteriesoorten: *Paraburkholderia terrae*, *Paraburkholderia nodosa* en *Paraburkholderia caballeronis*. Paraburkholderia-bacteriën komen voornamelijk in de bodem of water voor, of zijn geassocieerd met planten. *P. terrae* leeft in de bodem en maakt gebruik van bodemschimmels om zijn leefgebied uit te breiden. *P. nodosa* is een stikstofbindende bacterie en vormt wortelknolletjes bij planten, waarbij de plant en de bacterie van elkaar profiteren. *P. caballeronis* is eveneens stikstofbindend en kan vrij leven in de aarde rondom het wortelgestel van planten, zonder wortelknolletjes te vormen. Er zijn bij de COGEM geen literatuurgegevens of aanwijzingen bekend waarin de bacteriesoorten *P. terrae*, *P. nodosa* en *P. caballeronis* in verband wordt gebracht met ziekte in mens, dier of plant. Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat *P. terrae*, *P. nodosa* en *P. caballeronis* ingedeeld kunnen worden in pathogeniteitsklasse 1 als apathogene bacteriesoorten. Zij adviseert deze bacteriesoorten op te nemen 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

# **Pathogeniteitsclassificatie van de bacteriesoorten *Paraburkholderia terrae*, *Paraburkholderia nodosa* en *Paraburkholderia caballeronis***

## **COGEM advies CGM/220602-01**

### **1. Inleiding**

De COGEM is door het Bureau GGO gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van *Paraburkholderia terrae*, *Paraburkholderia nodosa* en *Paraburkholderia caballeronis* (IG 22-073). De Universiteit Leiden verzoekt deze drie bacteriesoorten op te nemen op Bijlage 2, Lijst A1, van de Regeling ggo (apathogene micro-organismen).<sup>1</sup> Deze bijlage bestaat uit een lijst van micro-organismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant. Opname op Bijlage 2, lijst A1 betekent dat onder ML-I laboratoriumcondities met het betreffende micro-organisme ggo's vervaardigd mogen worden indien hierbij vectoren worden gebruikt die wél, of inserties die níet, op de A-lijsten staan (lijst A2 veilige vectoren en lijst A3 inserties).

### **2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling ggo**

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie van een micro-organisme de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden de 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.

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.

### **Opportunisten**

Opportunistische pathogenen, die uitsluitend ziekte kunnen veroorzaken bij individuen met een verzwakt immuunsysteem, 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 ggo geplaatst worden.

### **3. Het genus *Paraburkholderia***

Het genus *Paraburkholderia* behoort tot de familie van de *Burkholderiaceae*.<sup>2</sup> *Paraburkholderia*-bacteriën zijn Gramnegatieve staafvormige bacteriën die eerder tot het genus *Burkholderia* behoorden, maar in 2015, onder meer vanwege sequentieverschillen, in het nieuwe genus *Paraburkholderia* zijn ondergebracht.<sup>3,4</sup> Deze bacteriën komen voornamelijk in de bodem of water voor, of zijn geassocieerd met planten.<sup>5</sup> Van verschillende *Paraburkholderia*-soorten is bekend dat zij stikstof binden, betrokken zijn bij de vorming van wortelknollen, of de groei van planten stimuleren. Bacteriën uit het *Paraburkholderia*-genus zouden mogelijk toegepast kunnen worden voor biologische bestrijding of bemesting.<sup>6</sup>

#### **3.1 De soort *Paraburkholderia terrae***

*Paraburkholderia terrae* is geïsoleerd uit de bodem van een bos in Daejeon, Zuid-Korea.<sup>7</sup> De bacteriën zijn 1,6 tot 2,0 micron in lengte, en 0,6 tot 0,8 micron breed. De bacteriën groeien bij een temperatuur tussen de 25 en 30°C, bij 42°C vindt er geen groei plaats.

Verschillende *P. terrae* stammen zijn geassocieerd met bodemschimmels. Zo is de stam *P. terrae* BS001 en diens interactie met de saprofytische schimmel *Lyophyllum* sp. stam Karsten, uitgebreid onderzocht.<sup>8</sup> De bacteriën bewegen zich richting bodemschimmels door een chemotactische respons op de moleculen die bodemschimmels uitscheiden, waaronder oxaalzuur.<sup>9</sup> Via hyfe-vormende bodemschimmels kunnen bodembacteriën zoals *P. terrae* zich over grotere afstanden verplaatsen, de zogeheten 'fungal highway'.<sup>10</sup> De *P. terrae* bacteriën bewegen zich voort via de polaire flagel, het zogeheten 'zwemmen', en via de type 4 pili waarmee de bacteriën 'twitchen'. Voor zijn beweging via de schimmelhyfen gebruikt *P. terrae* voornamelijk zijn flagel, en niet de type 4-pili.<sup>11</sup> *P. terrae* kan de bodemschimmels ook beschermen tegen de antischimmelstof cycloheximide en tegen bacteriën die een antagonistische werking hebben op de bodemschimmels.<sup>12</sup>

#### **3.2 De soort *Paraburkholderia nodosa***

*Paraburkholderia nodosa* is geïsoleerd uit stikstofwortelknolletjes op de wortels van *Mimosa bimucronata* en *Mimosa scabrella*, twee Braziliaanse vlinderbloemige plantensoorten.<sup>13</sup> De bacteriën zijn

0,8 tot 2,2 micron in lengte, en 0,5 tot 0,8 micron breed. Groei van deze bacteriën is waargenomen bij een temperatuur van 28, 30 en 37 °C.

Er is aangetoond dat *P. nodosa* de stikstofwortelknolletjes induceert bij Mimosa-soorten en andere plantensoorten van de nauwverwante 'Piptadenia groep'.<sup>13,14</sup> Vanwege zijn stikstofbindende eigenschappen speelt *P. nodosa* ook een rol in het herstellen van voedingstofarme grond.<sup>15,16</sup> De interactie tussen *P. nodosa* en de planten is van symbiotische aard.

### **3.3 De soort *Paraburkholderia caballeronis***

*Paraburkholderia caballeronis* is eveneens een stikstofbindende bacterie, die groeit bij een temperatuur tussen de 15 en 42°C.<sup>17</sup> *P. caballeronis* is in tegenstelling tot *P. nodosa* niet geïsoleerd uit wortelknolletjes, maar uit de rhizosfeer van een tomatenplant in Mexico.<sup>17</sup> *P. caballeronis* bacteriën kunnen stikstof binden en zijn 'vrij-levende' bacteriën.<sup>17</sup> Alhoewel is aangetoond dat *P. caballeronis* in staat is wortelknolletjes te vormen, bleek uit nader onderzoek dat deze eigenschap onstabiel is.<sup>17,18</sup> Analyse van het genoom toonde aan dat de genen die verantwoordelijk zijn voor wortelknolvorming (de nod-genen<sup>19</sup>) ontbraken in het genoom van *P. caballeronis*.<sup>18</sup>

## **4. Eerder COGEM advies**

De COGEM heeft tot op heden acht *Paraburkholderia*-soorten ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.<sup>20,21</sup> Eén daarvan, *Paraburkholderia caryophylli* is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2, als plantpathoog.<sup>22</sup>

## **5. Classificatie door andere organisaties**

Het Duitse BAUA heeft *P. terrae*, *P. nodosa* en *P. caballeronis* ingedeeld in risicogroep 1.<sup>23</sup> Er bestaan tevens diverse databases die een overzicht bieden van plantpathogene bacteriesoorten. In de database van de 'European and Mediterranean Plant Protection Organization' (EPPO) worden de soorten *Paraburkholderia caryophylli* en *Paraburkholderia andropogonis* genoemd als plantpathoog, waarbij *P. andropogonis* tegenwoordig *Robbsia andropogonis* wordt genoemd.<sup>24,25</sup> De 'American Phytopathological Society' (APS) noemt enkel de soort *Paraburkholderia andropogonis* pathoog voor *Sorghum bicolor*.<sup>26</sup> De inschaling door deze buitenlandse instanties geldt als referentie en achtergrondinformatie bij de risicobeoordeling die door de COGEM wordt uitgevoerd.

## **6. Overweging**

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.

*Paraburkholderia*-bacteriën komen voornamelijk in de bodem of water voor, of zijn geassocieerd met planten. *P. terrae* leeft in de bodem en maakt gebruik van bodemschimmels om zijn leefgebied uit te breiden, waarbij het de schimmel bescherming biedt.<sup>8,9,12</sup> *P. nodosa* is een stikstofbindende bacterie en vormt wortelknolletjes bij planten.<sup>13</sup> *P. caballeronis* is eveneens stikstofbindend, maar is vrijlevend in de rhizosfeer.<sup>17,18</sup> Er zijn bij de COGEM geen literatuuurgegevens of aanwijzingen bekend waarbij de

bacteriesoorten *P. terrae*, *P. nodosa* en *P. caballeronis* in verband wordt gebracht met ziekte in mens, dier of plant.

## 7. Advies

Het bovenstaande in overweging nemende, adviseert de COGEM om de drie bacteriesoorten *Paraburkholderia terrae*, *Paraburkholderia nodosa* en *Paraburkholderia caballeronis* in te delen in pathogeniteitsklasse 1 als apathogene bacteriesoorten. Zij adviseert deze soorten op te nemen op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

## Referenties

1. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013.  
<https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2022-01-01> (bezocht op 23/0/2022)
2. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. *Paraburkholderia*  
<https://lpsn.dsmz.de/genus/paraburkholderia> (bezocht op 23/05/2022)
3. Sawana A *et al.* (2014). Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Front. Genet.* 5: 429
4. Oren A & Garrity GM (2015). List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 65: 2017–2025
5. Dorbritsa AP & Samadpour M (2016). Transfer of eleven species of the genus *Burkholderia* to the genus *Paraburkholderia* and proposal of *Caballeronia* gen. nov. to accommodate twelve species of the genera *Burkholderia* and *Paraburkholderia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 2836-2846. DOI: 10.1099/ijsem.0.001065
6. Eberl L & VanDamme P (2016). Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. *F1000 Res.* 5: 1007
7. Yang HC *et al.* (2006). *Burkholderia terrae* sp. nov., isolated from a forest soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 453–457
8. Warmink JA & van Elsas JD (2009). Migratory response of soil bacteria to *Lyophyllum* sp. strain Karsten in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 2820–2830
9. Haq IU *et al.* (2018). The response of *Paraburkholderia terrae* strains to two soil fungi and the potential role of oxalate. *Front. Microbiol.* 9: 989
10. Kohlmeier S *et al.* (2005). Taking the fungal highway: mobilization of pollutant-degrading bacteria by fungi. *Environ. Sci. Technol.* 39: 4640–4646
11. Yang P, Zhang M & van Elsas JD (2017). Role of flagella and type four pili in the co-migration of *Burkholderia terrae* BS001 with fungal hyphae through soil. *Sci. Rep.* 7: 2997
12. Nazir R Tazetdinova DI & van Elsas JD (2014). *Burkholderia terrae* BS001 migrates proficiently with diverse fungal hosts through soil and provides protection from antifungal agents. *Front. Microbiol.* 5: 598
13. Chen WM *et al.* (2007). *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 1055–1059

14. Bournaud C *et al.* (2013). *Burkholderia* species are the most common and preferred nodulating symbionts of the Piptadenia group (tribe Mimoseae). *PloS One* 8: e63478
15. Dall'Agnol RF *et al.* (2016). *Paraburkholderia nodosa* is the main N<sub>2</sub>-fixing species trapped by promiscuous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Brazilian 'Cerradão'. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92: fiw108
16. Tang A *et al.* (2020). Effects of selected functional bacteria on maize growth and nutrient use efficiency. *Microorganisms* 8: 854
17. Martínez-Aguilar L *et al.* (2013). *Burkholderia caballeronis* sp. nov., a nitrogen fixing species isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum*) with the ability to effectively nodulate *Phaseolus vulgaris*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 104: 1063–1071
18. Rojas-Rojas FU *et al.* (2017). Draft genome of *Paraburkholderia caballeronis* TNe-841T, a free-living, nitrogen-fixing, tomato plant-associated bacterium. *Stand. Genomic Sci.* 12: 80
19. Kidaj D *et al.* (2020). Biological activity of Nod factors. *Acta Biochim. Pol.* 67: 435–440
20. COGEM (2018). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal apathogene en pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/181112-03
21. COGEM (2019). Pathogeniteitsclassificatie van dertien bacteriesoorten. COGEM advies CGM/190612-01
22. COGEM (2021). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van apathogene en pathogene bacteriën (2021). COGEM advies CGM/211025-01
23. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAUA).  
<https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-466.html> (bezocht op 20/05/2022)
24. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) .  
[https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant\\_quarantine/A2\\_list](https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A2_list) (bezocht op 23/05/2022)
25. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). Global Database <https://gd.eppo.int/> (bezocht op 31/05/2021)
26. American Phytopathological Society (APS).  
<https://www.apsnet.org/edcenter/resources/commonnames/Pages/Sorghum.aspx> (bezocht op 23/05/2022)