

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/220602-03
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie *Flavobacterium anhuiense*

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een verzoek van de Universiteit Leiden om de bacteriesoort *Flavobacterium anhuiense* op Bijlage 2, lijst A1 te plaatsen (IG 22-076_2.13-000), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

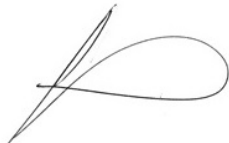
De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriesoort *Flavobacterium anhuiense* en de plaatsing van deze bacterie op Bijlage 2, lijst A1 (apathogene gastheerorganismen) van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen'. Flavobacteriën komen wereldwijd voor in grond, in zoet- en zoutwater en worden vaak aangetroffen in koudere omgevingen. Een aantal flavobacteriumsoorten zijn bekende ziekteverwekkers voor vissen.

De soort *F. anhuiense* is geïsoleerd uit een bodemmonster in China en uit wortels van een komkommerplant die gekweekt werd in Zuid-Korea. De bacterie kan groeien bij temperaturen tussen de 5 en 37°C, maar de optimale groeitemperatuur bevindt zich tussen de 25 en 35°C. De *F. anhuiense* stam GSE09, geïsoleerd uit de wortels van een komkommerplant, kan de groei van de oomyceet (*Phytophthora capsici*) en de door deze oomyceet veroorzaakte ziektesymptomen in paprikaplanten, verminderen.

Er zijn bij de COGEM geen aanwijzingen dat *F. anhuiense* pathogeen is voor mens, dier of plant. Alles in overweging nemende is de COGEM van oordeel dat de bacteriesoort *F. anhuiense* 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

Pathogeniteitsclassificatie van de bacteriesoort

Flavobacterium anhuiense

COGEM advies CGM/220602-03

1. Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van Universiteit Leiden (IG 22-076) is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse (zie Appendix I) van de bacteriesoort *Flavobacterium anhuiense* en plaatsing van deze bacterie op Bijlage 2, lijst A1 van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen' (Regeling ggo).¹ Deze bijlage bestaat uit een lijst van gastheerorganismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant. Opname op Bijlage 2, lijst A1 betekent dat onder ML-I laboratoriumcondities met het betreffende 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

2. Het genus *Flavobacterium*

Het genus *Flavobacterium* behoort tot de familie van de *Flavobacteriaceae* en het fylum *Bacteroidota*,² en dankt zijn naam aan de gele of oranjekleurige kolonies die de bacteriën door de productie van carotenoïde en/of flexirubine vormen. Flavobacteriën zijn gramnegatieve, staafvormige, doorgaans aerobe bacteriën die geen flagellen hebben of endosporen vormen. Sommige soorten zijn motiel en kunnen glijdende bewegingen maken. Soorten uit dit genus komen wereldwijd voor in grond, en met name in aquatische ecosystemen (zoet- en zoutwater).³ De meeste flavobacteriumsoorten lijken een voorkeur te hebben voor koele en koude omgevingen met een laag zoutgehalte. Veel soorten zijn koudetolerant (psychrotolerant) of koudeminnend (psychrofiel ofwel cryofiel) en hebben optimale groeitemperaturen tussen de 15 en 20°C. Er bestaan echter ook soorten die kunnen groeien bij temperaturen van 37°C, zoals *Flavobacterium granuli*, *Flavobacterium columnare*, *Flavobacterium suncheonse* en *Flavobacterium succinicans*, of zelfs bij temperaturen tussen de 40 en 45°C, zoals *Flavobacterium defluvi*, *Flavobacterium indicum* en *Flavobacterium croceum*.⁴ Verschillende flavobacteriumsoorten zijn vispathogenen, waaronder *Flavobacterium branciophilum*, *Flavobacterium psychrophilum* en *F. columnare*. Naast bekende pathogene soorten zijn er ook een groot aantal andere flavobacteriën geïsoleerd uit dode, zieke en gezonde vissen afkomstig uit meren en viskwekerijen.^{5,6,7,8,9}

3. Informatie over *Flavobacterium anhuiense*

F. anhuiense (destijds aangewezen als stam D3^T) is geïsoleerd uit een bodemmonster in de Anhui provincie in China.¹⁰ Het is een aerobe bacterie van 1 - 2,5 µm lang met een doorsnede van 0,2 - 0,4 µm, die motiel is en zich glijdend beweegt door aanwezigheid van filamenten op het oppervlakte van de bacterie. Groei van de bacterie wordt waargenomen bij temperaturen tussen de 5 en 37°C, waarbij de optimale groeitemperatuur zich tussen de 25 en 30°C bevindt. De sequentie van de stam D3^T is gepubliceerd en het genoom is 5,34 Mbp lang.¹¹ Op basis van fylogenetische analyses gericht op 16S

rRNA gensequenties en fenotypische eigenschappen, is de stam D3^T in 2008 beschouwd als nieuwe soort in het genus *Flavobacterium*.¹⁰ Stam D3^T is de type-stam van de soort.

In 2002 is een andere stam van *F. anhuiense*, GSE09, geïsoleerd uit de wortels van een komkommerplant (*Cucumis sativus*) die gekweekt werd in een veld in Gunsan, Zuid-Korea.¹² Deze stam is in 2012 op basis van 16S rRNA sequentieanalyse en biochemische, fysiologische en morfologische testen getypeerd als *F. johnsoniae*.¹³ De ‘Fatty acid-methyl ester’ (FAME) analyse liet echter weinig overeenkomsten zien met *F. johnsoniae*. In 2019 is de stam GSE09 door dezelfde onderzoeksgroep op basis van nieuwe fylogenetische analyses met 16S rRNA-sequenties, waarbij ook stam D3^T is meegenomen, geherclassificeerd als *F. anhuiense*.¹² Voor *F. anhuiense* stam GSE09 is beschreven dat deze bacteriën groeien bij temperaturen tussen 10 en 35°C met een optimum tussen de 25 en 35°C. Ook vormen zij biofilms en produceren zij indolen en de ‘volatile compound’ 2,4-di-*tert*-butylfenol. Mede door deze eigenschappen is gebleken dat stam GSE09 antagonistisch is voor de plantpathogene oomyceet *Phytophthora capsici*, die ziekte in paprikaplanten (*Capsicum annuum*) veroorzaakt. Toediening van GSE09 zorgde voor een significante afname in ziektesymptomen door *P. capsici* in de paprikaplanten.¹³

4. Gerelateerde COGEM adviezen

De COGEM heeft in haar overzichtslijst van pathogeniteitsclassificaties van pathogene en apathogene bacteriën meerdere soorten uit het genus *Flavobacterium* opgenomen.¹⁴ De soorten *F. psychrolimnae* en *F. weaverense* zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.¹⁵ De soorten *F. branchiophilum*, *F. columnare*, *F. hydatis*, *F. johnsoniae*, en *F. psychrophilum* heeft zij ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2, waarbij de soorten *F. branchiophilum*, *F. columnare*, *F. johnsoniae*, en *F. psychrophilum* als dierpathogeen zijn geïsoleerd.

5. Pathogeniteitsclassificaties van andere beoordelende internationale instanties

Het Duitse ‘Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin’ (BAUA) heeft in de ‘Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe’ (TRBA) 466 (‘Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen’ de soort *Flavobacterium anhuiense* ingedeeld in de laagste risicogroep (1).¹⁶

6. 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.

F. anhuiense is geïsoleerd uit een bodemmonster in China en uit wortels van een komkommerplant in Zuid-Korea. Uit onderzoek blijkt dat de *F. anhuiense* stam GSE09 als antagonist de plantpathogene oomyceet *P. capsici* kan bestrijden en de ziektesymptomen veroorzaakt door deze oomyceet significant kan verminderen in paprikaplanten. In de beperkt aanwezige wetenschappelijke literatuur over *F.*

anhuiense zijn bij de COGEM geen aanwijzingen bekend dat deze soort pathogeen is voor mens, dier of plant.

Het bovenstaande in overweging nemende, adviseert de COGEM de bacteriesoort *Flavobacterium anhuiense* in te delen in pathogeniteitsklasse 1, en op te nemen in 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 24 mei 2022)
2. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - *Flavobacterium*
<https://lpsn.dsmz.de/genus/flavobacterium> (bezocht op 20 mei 2022)
3. Bernardet JF & Bowman JP (2006). The Genus *Flavobacterium*. In: *Prokaryotes* 7: 481–531. DOI: 10.1007/0-387-30747-8_17
4. Loch TP & Faisal M (2015). Emerging flavobacterial infections in fish: A review. *J. Adv. Res.* 6: 283-300
5. Loch TP *et al.* (2013). Diversity of fish-associated flavobacteria of Michigan. *Journal of Aquatic Animal Health* 25: 149–164.
6. Verma DK & Rathore G (2015). New host record of five *Flavobacterium* species associated with tropical fresh water farmed fishes from North India. *Brazilian Journal of Microbiology* 46: 969-976.
7. Flemming L *et al.* (2007). Phenotypic and molecular characterisation of fish-borne *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates from aquaculture systems in South Africa. *Res Microbiol.* 158: 18–30
8. Karatas S *et al.* (2010). First isolation of a *Flavobacterium johnsoniae* like bacteria from cultured Russian sturgeon in Turkey. *J Anim. Vet. Adv.* 9: 1943–1946.
9. Suebsing RK & Kim JH (2012). Isolation and Characterization of *Flavobacterium johnsoniae* from Farmed Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 15: 83–89
10. Liu H *et al.* (2008). *Flavobacterium anhuiense* sp. nov., isolated from field soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 756-760
11. García-López M *et al.* (2019). Analysis of 1000 type-strain genomes improves taxonomic classification of *Bacteroidetes*. *Front. Microbiol.* 10:2083
12. Jeong J *et al.* (2019). Complete genome sequence data of *Flavobacterium anhuiense* strain GSE09, a volatile-producing biocontrol bacterium isolated from cucumber (*Cucumis sativus*) root. *Data Brief* 25: 104270
13. Sang MK & Kim KD (2012). The volatile-producing *Flavobacterium johnsoniae* strain GSE09 shows biocontrol activity against *Phytophthora capsici* in pepper. *J. Appl. Microbiol.* 113: 383-398
14. COGEM (2021). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van apathogene en pathogene bacteriën (2021). COGEM advies CGM/211025-01
15. COGEM (2021). Pathogeniteitsclassificatie van dertien bacteriesoorten. COGEM advies CGM/190612-01

16. Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA) 466 „Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen“ (2015). https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/pdf/TRBA-466.pdf?__blob=publicationFile&v=8 (bezocht op 24 mei 2022)