

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

DATUM 13 februari 2023
KENMERK CGM/230213-01
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie van de bacteriesoort *Pseudomonas taiwanensis*

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een verzoek van Delft Advanced Biofuels B.V. om de bacteriesoort *Pseudomonas taiwanensis* op Bijlage 2, lijst A1 te plaatsen (IG 22-174_2.13-000), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriesoort *Pseudomonas taiwanensis*. Bacteriën behorend tot het genus *Pseudomonas* komen wereldwijd in uiteenlopende omgevingen voor.

P. taiwanensis is voor het eerst geïsoleerd uit een bodemmonster in Taiwan. Van een aantal *P. taiwanensis* stammen is beschreven dat aanwezigheid van deze bacterie de groei van planten kan bevorderen. Daarnaast vertoont *P. taiwanensis* antagonistische activiteit tegen andere schimmels en bacteriën, bijvoorbeeld door het wegnemen van belangrijke voedingsstoffen zoals ijzer. Tevens is beschreven dat *P. taiwanensis* dodelijk is voor larven van bepaalde vlinderachtigen en fruitvliegen wanneer zij deze bacterie toegediend krijgen.

Er zijn bij de COGEM geen aanwijzingen bekend dat deze soort pathogeen is voor de mens, andere zoogdieren, of planten.

Concluderend is de COGEM van oordeel dat de bacteriesoort *Pseudomonas taiwanensis* pathogeen is voor bepaalde insectensoorten, en adviseert zij om deze bacteriesoort in te delen in pathogeniteitsklasse 2 en op te nemen in bijlage 4, lijst 4.2 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

Pseudomonas taiwanensis

COGEM advies CGM/230213-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van Delft Advanced Biofuels B.V. (IG 22-174) is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriesoort *Pseudomonas taiwanensis* en plaatsing van deze soort 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.

2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in oenschouw 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. Het genus *Pseudomonas*

Het genus *Pseudomonas* (familie *Pseudomonadaceae*) is zeer divers en bevat meer dan 200 soorten die zich goed aan verschillende omgevingen kunnen aanpassen.² Pseudomonassoorten zijn Gramnegatieve, aerobe staafvormige bacteriën die onder andere geïsoleerd zijn uit water, grond, planten, dieren en mensen. Ook kunnen pseudomonassoorten worden aangetroffen onder extreme omstandigheden, zoals in heetwaterbronnen, woestijnen of op Antarctica.³

Binnen het genus komen soorten voor die pathogeen zijn voor mensen (zoals *Pseudomonas aeruginosa*). Er zijn ook enkele soorten die als opportunistisch pathogeen alleen ziekte veroorzaken bij immuungecompromitteerde of verzwakte individuen. Binnen het genus komen daarnaast plant-pathogene soorten voor, zoals *Pseudomonas syringae*. Ook kunnen pseudomonassoorten bescherming bieden voor de plant door de groei van andere plantpathogenen te voorkomen (biocontrole organisme).

4. Informatie over *Pseudomonas taiwanensis*

De soort *P. taiwanensis* (typestam CMS^T = DSM 21245^T) is voor het eerst beschreven in 2010, nadat de bacterie is geïsoleerd uit een bodemmonster verkregen bij de Tamkang universiteit in Taiwan in 2005 tijdens een screening naar chitine-degraderende soorten.⁴ *P. taiwanensis* groeit bij temperaturen tussen de 5°C en 42°C, waarbij het optimum zich tussen 30-37°C bevindt.⁴ Op basis van 16S rRNA gensequenties is de soort het meest verwant aan *Pseudomonas monteilii*, *Pseudomonas plecoglossicida* en *Pseudomonas mosselii* (sequentieovereenkomst van 99,6-99,8%). De overeenkomst tussen *P. taiwanensis* en deze soorten op basis van de *gyrB* gensequentie was echter lager dan 90%.⁴ Fylogenetische analyses op basis van 'whole genome optical BamHI-restriction mapping' en 'multilocus sequence typing' op basis van zeven huishoudgenen tonen aan dat *P. taiwanensis* het meest verwant is aan de *Pseudomonas putida* stam KT2400.⁷ In het genoom van *P. taiwanensis* ontbreken structurele genen voor een type IV pilus, die wel in andere pseudomonassoorten aangetroffen worden.⁵ Bij pseudomonassoorten zijn minstens zes verschillende secretiesystemen (SS) beschreven. In *P. taiwanensis* zijn geen genen aangetroffen die coderen voor een 'type 3 secretion system' (T3SS), maar wel voor een 'type 6 secretion system' (T6SS). In drie klinische *Pseudomonas*-isolaten (*P. monteilii*, *P. mosselii* en *P. plecoglossicida*) zijn sequenties aangetroffen voor zowel een T3SS als een T6SS.⁵

P. taiwanensis wordt in de wetenschappelijke literatuur ook wel aangemerkt als potentieel biocontrole organisme, vanwege toxiciteit voor insecten, en antagonistische activiteit tegen bepaalde schimmels⁶ en de rijspathogeen *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (*Xoo*).^{7,8,9} Productie van pyoverdine, een siderofoor ofwel ijzer-bindend molecuul, door *P. taiwanensis* remt de groei van het rijspathogeen *Xoo*. Mogelijk is het T6SS betrokken bij de secretie van pyoverdine.^{7,9} *P. taiwanensis* fungeert als insecticide tegen bekende plaaginsecten zoals *Plutella xylostella* (Koolmot), *Spodoptera exigua* (Florida-uil), *Trichoplusia ni* (Ni-uil) en *Drosophila melanogaster* (de fruitvlieg of bananenvlieg).^{8,10} Een component van het toxinecomplex (Tc), het TccC eiwit, speelt hierbij waarschijnlijk een belangrijke rol. Toediening van het geïsoleerde eiwit aan *D. melanogaster* veroorzaakte sterfte in 60% van de vliegen binnen 72 uur.¹⁰ Orale toediening van *P. taiwanensis* zorgt voor darmkolonisatie in larven van *P. xylostella* en veroorzaakt daar schade aan het weefsel door het induceren van apoptose. De mortaliteit na toediening van *P. taiwanensis* bedraagt 92,7% - 96,4% afhankelijk van de concentratie.⁸ Toediening van een Δ TccC *P. taiwanensis* mutant resulteerde in een lagere mortaliteit (42,2%). Dit is een indicatie dat TccC een rol speelt bij de virulentie, maar dat er waarschijnlijk ook andere virulentiefactoren of cofactoren bij betrokken zijn.⁸

Verschillende *P. taiwanensis* stammen zijn in de wetenschappelijke literatuur beschreven en onderzocht vanwege eigenschappen die van belang kunnen zijn voor verschillende biotechnologische processen. Met name *P. taiwanensis* stam VLB120 (voorheen *Pseudomonas* sp. VLB120^{5,11}) wordt veel onderzocht, onder andere vanwege de mogelijkheid om alternatieve koolstofbronnen te gebruiken. Deze stam is geïsoleerd uit bosgrond in Duitsland.¹² Op basis van een aangeleverd ongepubliceerd (vertrouwelijk) manuscript waarin een genomanalyse van de stam VLB120 is uitgevoerd, is beschreven dat deze stam niet over een fytotoxineproductie-route beschikt, en zijn er geen genen die coderen voor exo-enzymen aangetroffen in het genoom van deze stam.¹¹

Van de stam *P. taiwanensis* WRS8, geïsoleerd van de wortels van tarwe (*Triticum aestivum*) in China, is beschreven dat deze de plantengroei stimuleert.^{13,14} Deze stam is cadmium-tolerant en is ook wel onderzocht vanwege de eigenschap om cadmium te immobiliseren en opname van cadmium door tarweplanten te verminderen.¹⁴ Ook van *P. taiwanensis* isolaat BCRC 17751 is beschreven dat de stam in combinatie met nano-gypsum het microbioom van de rhizosfeer en de gezondheid van maïsplanten verbeterd.¹⁵ Van isolaat *P. taiwanensis* MOSEL-RD23 is beschreven dat extract van deze stam de groei van de plantpathogene oomyceet *Phytophthora parasitica*¹⁶ en de pathogene schimmels *Aspergillus niger* en *Fusarium oxysporum* remt.⁶ Ook wordt aanwezigheid van deze stam geassocieerd met groeibevorderende eigenschappen bij *Brassica napus* (Koolzaad).⁶

5. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in haar overzichtslijst van pathogeniteitsclassificaties van pathogene en apathogene bacteriën meerdere soorten uit het genus *Pseudomonas* opgenomen.¹⁷ Een aantal pseudomonassoorten, waaronder *Pseudomonas jessenii* (waaronder stam RU47 en UW4)^{17,18}, *Pseudomonas stutzeri*¹⁹ en *Pseudomonas fluorescences* (waaronder stam DC454 en MB101)²⁰ zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. Daarnaast zijn meerdere pseudomonassoorten, waaronder *P. aeruginosa*, ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. De soorten *P. anguilliseptica* en *P. protegens* zijn tevens als dierpathogeen aan-

gemerkt.¹⁷ Voor *P. protegens* is deze indeling geadviseerd wegens pathogeniteit voor blad-etende insecten.²¹

6. Pathogeniteitsclassificaties andere beoordelende instanties

Het Duitse ‘Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin’ (BAUA) die pathogeniteit voor de mens beoordeelt, heeft in de ‘Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe’ (TRBA) 466 (‘Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen’ de soort *P. taiwanensis* ingedeeld in risicogroep 1.²² Ook het Duitse ‘Berufsgenossenschaft Rohstoffen und Chemische Industrie (BG RCI) die eveneens pathogeniteit voor de mens beoordeelt, heeft de soort ingedeeld in risicogroep 1.²³ De Duitse ‘Sammlung von Mikroorganismen und Zellculturen’ (DSMZ), die pathogeniteit voor mens, dier en plant in ogenschouw nemen, hebben twee stammen van de soort *Pseudomonas taiwanensis* opgenomen, de typestam DSM 21245 en de stam DSM 3263 (25-3).²⁴ De typestam DSM 21245 is ingedeeld in risicogroep 1, en de stam 25-3 (DSM 3263) is ingedeeld in risicogroep 2. De soort wordt niet vermeld op de lijst van het Zwitserse ‘Federal Office for the Environment’ (FOEN)²⁵, de ‘Belgian Biosafety Server’²⁶ en in de database van de ‘American Type Culture Collection’ (ATCC).²⁷

De inschaling door deze buitenlandse instanties geldt als referentie en achtergrondinformatie bij de risicobeoordeling die door de COGEM wordt uitgevoerd

7. Overweging en advies

De bacteriesoort *P. taiwanensis* is voor het eerst geïsoleerd uit een bodemmonster uit Taiwan. Van een aantal *P. taiwanensis* stammen is beschreven dat zij de groei van planten kunnen stimuleren en antagonistische activiteit vertonen tegen andere micro-organismen. Het exacte mechanisme achter de antagonistische activiteit is nog niet geheel duidelijk, maar lijkt met name te berusten op competitie om nutriënten. Ook is voor *P. taiwanensis* orale toxiciteit gerapporteerd voor larven van bepaalde vlinderachtigen en de fruitvlieg *D. melanogaster*. Er zijn bij de COGEM geen aanwijzingen bekend dat deze soort pathogeen is voor de mens, andere zoogdieren, of planten. In de DSMZ database (en de bacdiv database waarin een koppeling is opgenomen naar de DSMZ en TRBA classificatie²⁸), wordt één *P. taiwanensis* stam aangehaald als dier- en huumanpathogeen. Deze stam in kwestie (*P. taiwanensis* DSM 3263) is echter niet terug te vinden in de wetenschappelijke literatuur, en de literatuurreferentie die op de DSMZ website bij de stam DSM 3263 gegeven wordt, verwijst naar een publicatie over de soort *Pseudomonas putida* DSM 3263.²⁹ Het is aannemelijk dat het hier een fout in de database betreft. *P. taiwanensis* staat ook niet vermeld in de databases van de American Phytopathological Society³⁰ en de ‘European and Mediterranean Plant Protection Organization’ (EPPO).³¹

Concluderend is de COGEM van oordeel dat de bacteriesoort *Pseudomonas taiwanensis* pathogeen is voor bepaalde insectensoorten, en adviseert zij om deze bacteriesoort in te delen in pathogeniteitsklasse 2 en op te nemen in bijlage 4, lijst 4.2 van de Regeling ggo.

Referenties

1. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013.
<https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2022-07-01> (bezocht op 10 november 2022)
2. Jun S *et al.* (2016). Diversity of *Pseudomonas* genomes, including populus-associated isolates, as revealed by comparative genome analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 82: 375-383
3. Peix A *et al.* (2018). The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infect. Genet. Evol.* 57:106-116.
4. Wang LT *et al.* (2010). *Pseudomonas taiwanensis* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 60: 2094-2098
5. Pena A *et al.* (2019). High-quality draft genome sequences of *Pseudomonas monteilii* DSM 14164T, *Pseudomonas mosselii* DSM 17497T, *Pseudomonas plecoglossicida* DSM 15088T, *Pseudomonas taiwanensis* DSM 21245T and *Pseudomonas vranovensis* DSM 16006T: taxonomic considerations. *Access Micobiol.* 1: e000067
6. Afzal I *et al.* (2017). Plant growth-promoting potential of endophytic bacteria isolated from roots of wild *Dodonaea viscosa* L. *Plant Growth Regul.* 81: 399-408
7. Chen WJ *et al.* (2020). Whole Genome Sequencing and Tn5-insertion mutagenesis of *Pseudomonas taiwanensis* CMS to probe its antagonistic activity against rice bacterial blight disease/ *Int. J. Mol. Sci.* 21: 8639
8. Chen WJ *et al.* (2014). Characterization of an insecticidal toxin and pathogenicity of *Pseudomonas taiwanensis* against insects. *PLoS Pathogens* 10: e1004288
9. Chen WJ *et al.* (2016). Involvement of type VI secretion system in secretion of iron chelator pyoverdine in *Pseudomonas taiwanensis*. *Sci. Rep.* 6: 32950
10. Liu JR *et al.* (2010). Molecular Cloning and Characterization of an Insecticidal Toxin from *Pseudomonas taiwanensis*. *J. Agric. Food Chem.* 58: 12343-12349
11. Köhler KAK *et al.* (2023). Genome and physiology of *Pseudomonas taiwanensis* strain 1 VLB120 reveal a new chassis for industrial biotechnology. [ongepubliceerd manuscript]
12. Köhler KAK *et al.* (2013). Complete genome sequence of *Pseudomonas* sp. strain VLB120 a solvent tolerant, styrene degrading bacterium, isolated from forest soil. *J. Biotechnol.* 168: 729-730
13. Cheng C *et al.* (2021). Complete genome sequence of *Pseudomonas taiwanensis* WRS8, a plant growth-promoting and biotite-weathering strain. *Microbiol Resour Announc* 10: e00252-21.
14. Cheng C *et al.* (2021). Wheat-associated *Pseudomonas taiwanensis* WRS8 reduces cadmium uptake by increasing root surface cadmium adsorption and decreasing cadmium uptake and transport related gene expression in wheat. *Environ. Pollut.* 268: 115850
15. Chaudhary P *et al.* (2021). Cultivable and metagenomic approach to study the combined impact of nanogypsum and *Pseudomonas taiwanensis* on maize plant health and its rhizospheric microbiome. *PLoS ONE* 16(4): e0250574
16. Iqar I *et al.* (2021). Exploration of microbiome of medicinally important plants as biocontrol agents against *Phytophthora parasitica*. *Arch. Microbiol.* 203: 2475-2489
17. COGEM (2021). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van apathogene en pathogene bacteriën (2021). COGEM advies CGM/211025-01
18. COGEM (2014). Classificatie van *Pseudomonas jessenii*. COGEM advies CGM/141027-01

19. COGEM (2018). Heroverweging pathogeniteitsclassificatie *Pseudomonas stutzeri*. COGEM advies CGM/181122-01
20. COGEM (2014). Classificatie van *Pseudomonas fluorescens*. COGEM advies CGM/140527-02
21. COGEM (2019). Advies over de bacteriesoorten *Pseudomonas protegens* en *Burkholderia cepacia*. COGEM advies CGM/190625-01
22. 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: 31 januari 2023)
23. Berufsgenossenschaft Rohstoffe und Chemische Industrie (2015). Prokaryonten (Bacteria und Archaea). Einstufung biologische Arbeitstoffe.
24. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellculturen (DSMZ). *Pseudomonas taiwanensis*. https://www.dsmz.de/search?tx_kesearch_pi1%5Bsword%5D=Pseudomonas%20taiwanensis&cHash=8292b6abb823f35d7946e464748ffa40 (bezocht: 31 januari 2023)
25. Federal Office for the Environment (FOEN, 2013). Classification of Organisms. Part 1: Bacteria. Status January 2013. <https://www.bafu.admin.ch/bafu/en/home/topics/biotechnology/publications-studies/publications/classification-of-organisms.html> (bezocht: 31 januari 2023)
26. Belgian Biosafety Server. <https://www.biosafety.be/content/tools-belgian-classification-micro-organisms-based-their-biological-risks> (bezocht: 31 januari 2023)
27. American Type Culture Collection (ATCC). <https://www.atcc.org/> (bezocht: 31 januari 2023)
28. BacDive database. *Pseudomonas taiwanensis* <https://bacdive.dsmz.de/search?search=pseudomonas+taiwanensis&submit=> (bezocht: 6 februari 2023)
29. Bechtold M *et al.* (2007). Model-based characterization of an amino acid racemase from *Pseudomonas putida* DSM 3263 for application in medium-constrained continuous processes. *Biotechnol Bioeng* 98: 812-824
30. American Phytopathological Society (APS). <https://www.apsnet.org/Pages/default.aspx> (bezocht: 31 januari 2023)
31. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). EPPO Global Database <https://gd.eppo.int/> (bezocht: 31 januari 2023)