

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
Mr. drs. A.W.H. Bertram
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 07 augustus 2026
KENMERK CGM/260807-01
ONDERWERP Advies Veldexperimenten met een bacteriële biosensor

Geachte mevrouw Bertram,

Naar aanleiding van een adviesvraag over het dossier IM 260008_001 getiteld 'Field experiments with a biosensor containing genetically modified *Pseudomonas putida* EM42 strains', ingediend door het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over voorgenomen werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-)bacteriën (*Pseudomonas putida* stam EM42) die als biosensoren verontreinigingen in water kunnen detecteren. De gg-bacteriën worden hiertoe in een meetopstelling geplaatst waar oppervlaktewater doorheen wordt geleid. Het betreft een vaste meetopstelling in een bestelauto waarmee op verschillende locaties metingen uitgevoerd zullen worden. De gg-bacteriën komen via een membraan in contact met het oppervlaktewater dat door de opstelling wordt gepompt, het membraan laat wel water maar geen bacteriën door.

De gg-bacteriën zijn niet-ziekteverwekkend (apathogeen) en sterk verzwakt, onder andere door verwijdering van genen die een rol spelen in de beweeglijkheid van de bacteriën. De ingebrachte sequenties zijn, met uitzondering van het pyocyanine-gen (een bekende virulentiefactor), niet schadelijk. De COGEM is van oordeel dat het toevoegen van één virulentiefactor aan een zeer verzwakt, apathogeen organisme er niet toe leidt dat dit organisme pathogeen wordt.

Alles overwegende is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu bij de voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein zijn. De COGEM merkt op dat de aanvraag een ambigu karakter heeft: betreft het een vergunning voor het introduceren van een ggo in het milieu, terwijl anderzijds diverse inperkingsmaatregelen worden genomen die er juist op gericht zijn te voorkomen dat het ggo in het milieu terechtkomt.

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.

- Bureau ggo, Afdeling Gentechnologie en Biologische Veiligheid, RIVM
- Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG Milieu en Internationaal, Ministerie van IenW

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is het COGEM-lid Dr. N. Beerens niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Advies Veldexperimenten met een bacteriële biosensor

COGEM-advies CGM/260807-01

1. Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren (IM 260008_001) over de voorgenomen werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-)bacteriën (*Pseudomonas putida* stam EM42) in een gesloten systeem, die als levende microbiële biosensoren verontreinigingen in water kunnen detecteren. Het doel van het onderzoek is het testen van deze biosensor in een praktijksituatie. De gg-bacteriën geven een signaal af wanneer specifieke verontreinigingen (nitraat, fosfaat of estradiol) gedetecteerd worden. Omdat de werkzaamheden buiten een ingeperkte ruimte waar werkzaamheden met ggo's uitgevoerd mogen worden plaatsvinden, betreft het een aanvraag voor een vergunning voor doelbewuste introductie in het milieu.

2. Achtergrondinformatie *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida (Trevisan 1889) Migula 1895 is een Gram-negatieve, staafvormige bacterie die algemeen voorkomt in uiteenlopende habitats, waaronder in water en in de bodem. Het wijdverspreide voorkomen van *P. putida* hangt samen met haar brede, weinig specifieke nutriëntenbehoefte, snelle groeidynamiek en grote weerbaarheid tegen oxidatieve stress en toxische stoffen.¹

Pseudomonas putida wordt beschouwd als een opportunistische pathogeen en behoort tot de *fluorescens*-groep binnen het geslacht *Pseudomonas*.² Katheter-gerelateerde bacteriëmie is één van de meest voorkomende infecties waarbij *P. putida* is aangetoond. Daarnaast is *P. putida* gedetecteerd bij ontstekingen van de galwegen.³ Infecties treden met name op bij immuungecompromiteerde personen. In de meeste gevallen kan de infectie worden behandeld met passende antimicrobiële therapie in combinatie met het verwijderen van de invasieve hulpmiddelen.

2.1 *Pseudomonas putida* stam EM42

Pseudomonas putida stam EM42 is een genetisch gemodificeerde variant van de *P. putida* stam KT2440.⁴ Ten opzichte van stam KT2440 zijn in de *P. putida* stam EM42 tien genetische loci en/of genen verwijderd die coderen voor profagen, transposons, endonucleasen en de flagel (Δ prophage 1, Δ prophage 4, Δ prophage 3, Δ prophage 2, Δ Tn7, Δ endA-1, Δ endA-2, Δ hsdRMS, Δ flagellum, Δ Tn4652). Door het verwijderen van de profagen en transposons kan *P. putida* stam EM42 niet actief genetische sequenties overdragen naar andere bacteriën.⁴ Het verwijderen van de endonucleasen resulteert in een grotere genomische stabiliteit, waardoor additionele genetische modificaties van de stam eenvoudiger kunnen worden gerealiseerd.⁵ Door het verwijderen van het flagel-gen is de motiliteit van de bacteriestam verminderd, waardoor de bacterie zich niet meer richting voedingsstoffen kan bewegen. Dit heeft een negatief effect op de overleving van de bacterie.⁴

De optimale groeitemperatuur van *P. putida* stam EM42 is volgens de aanvrager 30 °C bij een pH van 7. De stam is saprotoof, niet pathogeen en produceert geen toxines. Zij vormt geen sporen of ruststadia zoals cysten of akineten. Uit studies naar de doelbewuste introductie van *P. putida* stam KT2440,

waarop stam EM42 is gebaseerd, in zowel bodem als water, blijkt dat er weinig tot geen vermeerdering van de bacterie plaatsvindt.^{6,7}

2.2 Genetisch gemodificeerde varianten van *Pseudomonas putida* stam EM42

De aanvrager is voornemens om zes varianten (1-6) van de *P. putida* stam EM42 te ontwikkelen om verschillende verontreinigingen in water te kunnen detecteren. Het vervaardigen van deze varianten valt niet binnen de reikwijdte van de onderhavige vergunningsaanvraag, maar de eigenschappen van de varianten zijn wel relevant voor de milieुरisicobeoordeling.

2.2.1 Deleties

In alle varianten is het *pvdS*-gen verwijderd. Hierdoor wordt een factor uitgeschakeld die de transcriptie reguleert van genen die onder ijzerbeperkte omstandigheden betrokken zijn bij de vorming en opname van pyoverdine. Als gevolg hiervan zijn de stammen niet langer in staat het fluorescente pyoverdine te produceren, wat leidt tot verlies van het fluorescentiefenotype.

In de varianten 2, 4 en 6 zijn daarnaast de genen *hisZ*, *argH* en *thrB* verwijderd. Deze genen spelen een sleutelrol bij de aanmaak van de aminozuren histidine, arginine en threonine. Door deze drie genen gelijktijdig te verwijderen, kan de resulterende $\Delta hisZ \Delta argH \Delta thrB$ -stam deze aminozuren niet meer zelf synthetiseren en is de stam voor groei afhankelijk van toevoeging van deze stoffen aan het medium (auxotrofie). Dit wordt gebruikt als herbruikbare selectiemarker binnen een Cre-lox-systeem voor gerichte recombinatie. De verwijderde loci worden daarbij gebruikt als invoersites: door het betreffende gen opnieuw in te brengen, wordt de eigen aanmaak (prototrofie) hersteld en kan op basis van groei worden geselecteerd op correcte cassette-integratie.

In de varianten 5 en 6 is daarnaast de transcriptionele regulator TtgR uitgeschakeld. Dit eiwit, behorend tot de LysR-familie van transcriptiefactoren, reguleert het *ttgABC*-effluxpomp-operon. Deze knock-out is aangebracht om de ongewenste basale activiteit ('lekkage') van het TtgR:EdcR-systeem te verminderen.

2.2.2 Inserties

Naast de bovenstaande deleties zijn in elke variant drie genetische elementen geïntroduceerd. Ten eerste is een 'sensorunit' ingebouwd, die de specifieke stof (nitraat, fosfaat of estradiol) in het water kan detecteren. Deze sensor bestaat uit een transmembraaneiwit met twee functionele delen: een sensordomein dat de aanwezigheid van de betreffende stof waarneemt en een responsdomein dat bij detectie wordt geactiveerd. Het responsdomein activeert vervolgens de 'verwerkingsunit'. Deze verwerkingsunit zet het waargenomen signaal om in een meetbaar signaal. Dit signaal kan met optische sensoren worden gedetecteerd en vormt daarmee het daadwerkelijke meetsignaal van de biosensor.

Voor detectie van nitraat worden de *Escherichia coli* K-12 *NarX/NarL*-genen gebruikt. *NarX* en *NarL* coderen voor een nitraat/nitriet-sensorsysteem. In de aanwezigheid van nitraat fosforyleert *NarX* het regulatoreiwit *NarL*, waarna *NarL* bindt aan de *P_{pyeA}*-promotor, die de expressie van het 'green fluorescent protein' (GFP) uit *Aequorea victoria* reguleert. Fosfaat wordt met een sensorunit uit *P. putida* gedetecteerd, het *PhoB/PhoR*-systeem, dat in de aanwezigheid van fosfaat de *phoA*-promotor activeert. Deze promotor reguleert de expressie van GFP in de bacterie. Voor detectie van estradiol

wordt een samengestelde sensorunit toegepast, bestaande uit sequenties uit *E. coli* K-12, *P. putida* en *Caenibius tardaugs* NBRC 167225. Het chimere TtgR:EdcR-eiwit kan na detectie van estradiol de PttgA-promotor activeren, hetgeen resulteert in expressie van GFP. In een aantal varianten is het GFP-eiwit vervangen door pyocyanine, een blauw-groen pigment en een bekende virulentiefactor van *Pseudomonas aeruginosa* PAO14.⁸

Daarnaast is in alle varianten een 'kalibratie-unit' geïntroduceerd. Deze geeft informatie over de vitaliteit van de cellen en wordt gebruikt om de gemeten fluorescentierespons van de biosensor te normaliseren. Hiermee kan onderscheid worden gemaakt tussen veranderingen in het meetsignaal door de aanwezigheid van de doelstof en veranderingen die samenhangen met de conditie of dichtheid van de cellen. Als kalibratie-unit wordt mCherry, afkomstig van *Discosoma* tot expressie gebracht onder controle van een 'Anderson'-promoter uit *E. coli* K-12, toegepast.

3. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens op meerdere locaties in Nederland nitraat, fosfaat en estradiol in oppervlaktewater te meten. Hiertoe worden de gg-*P. putida*-stam EM42-varianten afzonderlijk opgeslagen in een volume van 10–20 µl in een afgesloten 'ggo chamber' in een 'assembly box'. De 'ggo chamber' betreft een kleine ruimte tussen een glasplaatje en een membraan. Het membraan heeft een poriegrootte van 0,2 micron, waardoor de gg-bacteriën niet aan de andere kant van het membraan, waar het oppervlaktewater langs zal stromen, terecht kunnen komen. Het vullen van de 'ggo chamber' vindt plaats in een biologisch veiligheidskabinet. In sommige experimenten zullen de gg-bacteriën worden omgeven met een polymeer-alginate-matrix, wat volgens de aanvrager een extra barrière naar het milieu vormt. Na het vullen worden 10 'ggo chambers' getest op lekkage en vervolgens in de 'assembly box' geplaatst en vastgezet.

Vanuit het laboratorium wordt de 'assembly box' in een plastic bak, afgesloten met een deksel, verplaatst naar een locatie voor de veldproef. Tijdens het vervoer wordt de bak vastgezet zodat deze niet kan bewegen. Eenmaal op de locatie wordt een watermonster met een pompsysteem naar de 'ggo chambers' in de bestelauto geleid en stroomt daar langs het membraan, waar aan de andere kant de gg-bacteriën zich bevinden. Elke 'ggo chamber' is voorzien van een eigen aan- en afvoerslang. Het watervolume dat door de 'ggo chamber' stroomt, bedraagt per kamer maximaal 0,1 ml/min. Dit betekent een maximale totale flow van 1 ml/min voor de tien 'ggo chambers'.

Na passage door de 'ggo chamber' wordt het water via de afvoerslang opgevangen in een afvalcontainer. Een opstelling van 10 'ggo chambers' genereert maximaal 60 ml afvalwater per uur. Dit komt neer op circa 1,5 liter water bij een opstelling van één dag. Bij een opstelling van 2–5 dagen wordt maximaal 7,5 liter afvalwater gegenereerd. Het afvalwater bevat normaliter geen ggo's, omdat een membraan in de 'ggo chamber' wordt gebruikt als scheiding tussen de gg-bacteriën en het water. Het afvalwater wordt echter wel behandeld als zijnde ggo-bevattend: het wordt vanaf de testlocatie in afgesloten containers naar een ML-I-laboratorium vervoerd en aldaar bij aankomst direct geautoclaveerd.

Gedurende de dag van het experiment is er te allen tijde een onderzoeker aanwezig bij de bestelauto, als het experiment op openbaar terrein plaatsvindt. Soms zal het experiment op privé-terrein plaatsvinden, de bestelauto met daarin de meetopstelling zal dan op een afgesloten plek geparkeerd

worden wanneer er geen onderzoeker aanwezig is. Daarnaast zal een bord met ‘verboden toegang voor onbevoegden’ op de deur van de bestelauto worden bevestigd.

4. Eerder COGEM-advies

Pseudomonas putida is door de COGEM ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.⁹ Andere *Pseudomonas*-soorten – *P. brassicacearum*, *P. brassicacearum*, *P. fluorescens*, *P. jessenii*, *P. simiae* stam WCS417, *P. stutzeri* en *P. thivervalensis* – zijn eveneens door de COGEM ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.⁹ 34 *Pseudomonas*-soorten, waaronder *P. aeruginosa*, waarvan het pyocanine-responsdomein in een aantal varianten afkomstig is, zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2, waarvan sommige als strikt plant- of dierpathogeen.

In 2007 heeft de COGEM geadviseerd over een veldproef met een bacteriële biosensor gebaseerd op *Escherichia coli* K12.¹⁰ Deze bacteriën gaven een fluorescentierespons bij blootstelling aan toxische stoffen en op grond van deze eigenschap wilde de aanvrager mogelijke vervuiling van rivierwater monitoren. Deze veldproef betrof eveneens een vergunningaanvraag voor introductie in het milieu, omdat in de monitoringstations geen gekwalificeerde laboratoriumruimte aanwezig was. De COGEM concludeerde dat de beschreven werkzaamheden onder de voorgestelde aanvullende inperkende maatregelen een verwaarloosbaar klein risico vormden voor mens en milieu.

5. Overweging

De aanvrager is voornemens op meerdere locaties in Nederland nitraat, fosfaat en estradiol in oppervlaktewater te meten. Deze metingen worden gedaan met behulp van gg-bacteriën die een signaal produceren na contact met één van de stoffen. De aanvraag betreft een vergunningaanvraag voor introductie in het milieu omdat de meetopstelling niet in een laboratorium staat, maar in een bestelauto op locatie.

5.1 Eigenschappen van de gg-bacteriën

De zes gg-*P. putida* varianten zijn gebaseerd op stam EM42, een verzwakte variant van de *P. putida*-stam KT2440. *P. putida*-stam KT2440 staat bekend als apathogeen; er zijn geen gevallen van ziekte bij mens of dier bekend die door deze stam zijn veroorzaakt. Daarnaast tonen experimenten waarin wortels van maïs (*Zea mays*) en peperplanten (*Capsicum annuum*) werden geïnoculeerd met *P. putida*-stam KT2440 geen pathogeniteit aan voor deze planten.^{11,12} Gezien de afwezigheid van pathogeniteit van *P. putida*-stam KT2440 acht de COGEM het niet waarschijnlijk dat de verzwakte *P. putida*-stam EM42 wel pathogeen is voor mens, dier of plant.

Studies waarin de overleving van *P. putida*-stam KT2440 is onderzocht, rapporteren dat de bacterie zich weinig tot niet vermeerderd in bodem en water.^{6,7} Gezien de aanvullende modificaties die in *P. putida*-stam EM42 zijn aangebracht ten opzichte van stam KT2440, acht de COGEM het niet waarschijnlijk dat stam EM42 een betere fitness heeft dan stam KT2440.

De aanvrager geeft aan dat alle ingebrachte sequenties in de zes gg-*P. putida*-stam EM42 varianten niet coderen voor schadelijke producten, met uitzondering van de *phz*-genen die zijn ingebracht in varianten 2, 4 en 6. Deze genen, afkomstig uit *P. aeruginosa*, coderen voor eiwitten die ervoor zorgen dat de bacterie pyocyanine kan produceren. Pyocyanine is een bekende virulentiefactor; uit onderzoek blijkt dat pyocyanine bijdraagt aan chronische luchtweginfecties en schadelijk is voor trilhaartjes en

longepitheelcellen in vitro.^{13, 14} De COGEM is echter van oordeel dat de insertie van één virulentiefactor niet voldoende is om de sterk verzwakte *gg-P. putida*-stam EM42 pathogeen te maken.

Pyocyanine staat bekend om de antimicrobiële werking doordat het reactieve zuurstofverbindingen vormt, waardoor micro-organismen zonder goede verdediging tegen zuurstofradicalen kunnen worden gedood.¹⁵ De expressie van de *phz*-genen in de drie *gg-P. putida*-stam EM42-varianten is echter afhankelijk van activering van het sensordomein in de variant en zal daarom alleen plaatsvinden als de verontreiniging aanwezig is in het water. Gelet op de geringe hoeveelheid bacteriën in de meetopstelling (10–20 µl per ‘ggo chamber’) en het verzwakte karakter van de bacteriën, zullen de *phz*-genen in de bacteriën volgens de aanvrager geen negatief effect hebben op het natuurlijke microbiom bij eventuele lekkage in het milieu. De COGEM onderschrijft deze conclusie van de aanvrager.

5.2 Inperking van de gg-bacteriën

Omdat de meetopstelling niet in een laboratorium staat, maar in een bestelauto op locatie, betreft dit een vergunningaanvraag voor introductie in het milieu. De aanvrager treft echter diverse maatregelen om introductie van de *gg*-bacteriën in het milieu te voorkomen. Zo wordt de opstelling geprepareerd in een biologisch veiligheidskabinet in een laboratorium; er vinden derhalve geen open handelingen met de *gg*-bacteriën plaats in de bestelauto.

Voorafgaand aan het verlaten van het laboratorium wordt de opstelling getest op lekkage, alleen wanneer geen lekkage wordt gedetecteerd, wordt de meetopstelling in de bestelauto geplaatst. De aanvrager geeft aan dat in geval van lekkage van een ‘ggo chamber’ in de bestelauto de vloeistof met bacteriën in de ‘assembly box’ terechtkomt en, vanwege de kleine hoeveelheid (10–20 µl), zal opdrogen. Indien de onderzoeker bij het aansluiten van de meetopstelling vloeistof op de meetopstelling ziet, bijvoorbeeld bij het aansluiten van de aan- en afvoerbuizen, zal deze vloeistof worden verwijderd met een tissue met isopropanol.

De *gg*-bacteriën komen wel in contact met het oppervlaktewater, maar komen door het scheidende membraan niet uit de ‘ggo chamber’. In het geval van het losraken van een aan- of afvoerbuis zal de onderzoeker het pompsysteem stoppen en het water opruimen, dit water zal geen *gg*-bacteriën bevatten. De containers die het water opvangen dat door de meetopstelling is geweest, zijn in plastic bakken geplaatst, zodat eventueel lekkende vloeistof vanuit de opvangcontainer wordt opgevangen. Het afvalwater uit de meetopstelling wordt geautoclaveerd, zodat eventuele *gg*-bacteriën die onverhoopt toch in het water terecht zouden zijn gekomen, worden afgedood.

De COGEM is van oordeel dat, gelet op de genomen inperkende maatregelen, de kans op introductie van de *gg*-bacteriën in het milieu verwaarloosbaar klein is.

6. Advies

Al het bovenstaande in overweging nemende is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu bij de voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein zijn.

7. Signalerende opmerking

De COGEM merkt op dat de aanvraag een ambigu karakter heeft. Enerzijds wordt, conform een aanvraag voor introductie in het milieu, beargumenteerd dat het ggo een verwaarloosbaar klein risico vormt voor mens en milieu, terwijl anderzijds een breed pakket aan inperkingsmaatregelen wordt voorgesteld dat er juist op is gericht te voorkomen dat het ggo in het milieu terechtkomt. Dit maakt de aanvraag nodeloos complex. De COGEM geeft in overweging om in toekomstige gevallen de focus van dit soort aanvragen op de eisen voor een vergunning voor introductie in het milieu te leggen.

Daarnaast merkt de COGEM op dat het plaatsen van een bord met daarop ‘verboden toegang voor onbevoegden’ op de bestelauto, gelet op het feit dat een bestelauto per definitie niet toegankelijk is voor onbevoegden en het hier een introductie in het milieu betreft, overbodig lijkt. Bovendien kan een dergelijk bord juist de interesse van derden wekken en mogelijk leiden tot een negatieve reactie, zoals inbraak of vandalisme.

Referenties

1. Weimer A et al. (2020). Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida*: advances and prospects. Appl. Microbiol. Biotechnol. 104: 7745-7766
2. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). Species *Pseudomonas putida*. <https://lpsn.dsmz.de/species/pseudomonas-putida> (bezocht: 24 juli 2026)
3. Yoshino Y et al. (2011). *Pseudomonas putida* bacteremia in adult patients: five case reports and a review of the literature. J. Infect. Chemother. 17: 278-282
4. Martínez-García E et al. (2014). *Pseudomonas* 2.0: genetic upgrading of *P. putida* KT2440 as an enhanced host for heterologous gene expression. Microb. Cell Fact. 13: 159
5. Williams JA et al. (1980). Role of nucleases in the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid from *Pseudomonas cepacia* 4G9. J. Bacteriol. 143: 1057-1059.
6. Molina L et al. (2000) Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. Soil Biol. Biochem. 3: 315-321
7. Brettar I et al. (1994). Fate of *Pseudomonas putida* after release into lake water mesocosms: Different survival mechanisms in response to environmental conditions. Microb. Ecol. 27: 99-122
8. Lau et al. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. Trends Mol. Med. 10: 599-606
9. COGEM (2025). Advies Actualisatie pathogeniteitsclassificatielijsten van (a)pathogene bacteriën. COGEM-advies CGM/251218-02
10. COGEM (2007). Biosensor voor de detectie van watervervuiling. COGEM-advies CGM/070706-01
11. Planchamp C et al. (2015). Root inoculation with *Pseudomonas putida* KT2440 induces transcriptional and metabolic changes and systemic resistance in maize plants. Front. Plant Sci. 5: 719
12. Vilchez JI et al. (2016). Biosafety test for plant growth-promoting bacteria: proposed environmental and human safety index (EHSI) protocol. Front. Microbiol. 6: 1514
13. Kanthakumar K et al. (1993). Mechanisms of action of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin on human ciliary beat in vitro. Infect. Immun. 61: 2848-2853
14. Chai W et al. (2014). *Pseudomonas* pyocyanin stimulates IL-8 expression through MAPK and NF-κB pathways in differentiated U937 cells. BMC Microbiol. 14: 26
15. Price-Whelan A et al. (2006). Rethinking 'secondary' metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. Nat. Chem. Biol. 2: 221