Az. 45270_c aktualisiert Februar 2023

# Stellungnahme der ZKBS zur Eignung von *Pseudomonas alloputida* KT2440 (ehemals *P. putida* KT2440) als Teil biologischer Sicherheitsmaßnahmen gemäß § 8 Absatz 1 GenTSV

## 1. Allgemeines

Mit dem Inkrafttreten der Novelle der Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) zum März 2021 ist es erforderlich, dass entsprechend § 7 Abs. 5 GenTSV das Fortbestehen bereits anerkannter biologischer Sicherheitsmaßnahmen (hier: Vektor- und Empfängersysteme) durch die Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit bestätigt wird. Unter § 8 Abs. 1 der novellierten GenTSV wird ausgeführt, nach welchen Voraussetzungen die Verwendung eines Empfängerorganismus als Teil einer biologischen Sicherheitsmaßnahme anerkannt werden kann. Diese sind erfüllt, wenn 1. eine wissenschaftliche Beschreibung und eine taxonomische Einordnung des Empfängerorganismus vorliegen, 2. die Vermehrung des Empfängerorganismus nur unter Bedingungen möglich ist, die außerhalb gentechnischer Anlagen selten oder nicht angetroffen werden, 3. der Empfängerorganismus für Mensch, Tier und Pflanzen nicht pathogen ist und keine umweltgefährdenden Eigenschaften aufweist und 4. der Empfängerorganismus nur einen geringen horizontalen Genaustausch mit anderen Spezies betreibt.

In dieser Stellungnahme wird geprüft und bewertet, ob *Pseudomonas alloputida* KT2440 (ehemals *P. putida* KT2440) die o. g. Voraussetzungen erfüllt.

*P. alloputida* KT2440 wurde bereits 1990 mit dem Inkrafttreten der GenTSV als geeigneter Empfängerorganismus für biologische Sicherheitsmaßnahmen anerkannt. In den Jahrzehnten der breiten Nutzung als Empfängerorganismus für biologische Sicherheitsmaßnahmen hat *P. alloputida* KT2440 sich als sicher erwiesen.

### 1.1. Wissenschaftliche Beschreibung

Die Spezies *P. alloputida* gehört zur Familie der *Pseudomonadaceae.* Die Familie umfasst Gram-negative, nicht sporulierende, chemoorganotrophe, aerobe Stäbchen [1]. *P. alloputida* ist ein weltweit vorkommender saprophytischer Bewohner von Böden, insbesondere der Rhizosphäre von Pflanzen [2]. Einige pathogene Vertreter der Spezies können Krankheiten bei Menschen und Tieren auslösen [3].

Bei *P. alloputida* KT2440 handelt es sich um ein Derivat des Stammes *P. alloputida* mt-2, der im Jahr 1960 aus dem Boden eines Gemüsegartens in Japan isoliert wurde [4]. *P. alloputida* KT2440 wurde 1981 im Labor von Kenneth Timmis etabliert und unterscheidet sich von

BVL_FO_05_4100_402_V1.7

*P. alloputida* mt-2 dadurch, dass der Stamm spontan das TOL-Plasmid pWW0 verloren hat [5]. Beide Stämme wurden seit ihrer Etablierung ausschließlich außerhalb des natürlichen Habitates kultiviert. Bis 2019 wurden *P. alloputida* mt-2 und KT2440 der Spezies *Pseudomonas putida* zugeordnet [6]. Das Genom des Stammes *P. alloputida* KT2440 wurde innerhalb der letzten 20 Jahre mehrfach vollständig sequenziert [7, 8]. Dadurch konnte gezeigt werden, dass in Folge der dauerhaften Kultivierung spontane Mutationen in dem Stamm auftreten [7]. In seinem Genom liegen vier chromosomal integrierte Prophagen vor, die jedoch nicht in der Lage sind, infektiöse Phagenpartikel zu generieren [9]. Der Stamm *P. alloputida* KT2440 ist gut charakterisiert und wird vielseitig in der Biotechnologie verwendet.

Bei *P. alloputida* KT2440 handelt es sich um einen wissenschaftlich sehr gut charakterisierten Modellorganismus mit einer taxonomisch eindeutigen Einordnung.

### 1.2. Pathogenes Potential von *P. alloputida* KT2440

*P. alloputida* ist in der Vergangenheit selten als opportunistischer humanpathogener Erreger in Erscheinung getreten. Bei Erkrankungen mit *P. alloputida* handelte es sich zumeist um Katheter-assoziierte Bakteriämien und Harnwegsinfektionen [3]. Daher wurde *P. alloputida* nach § 6 i. V. m. § 5 Abs. 1 GenTSV der Risikogruppe 2 zugeordnet (Az. 6790-05-01-099; aktualisiert Februar 2023).

In *P. alloputida* KT2440 sind die meisten Virulenzfaktorgene abwesend, die in pathogenen *P. alloputida*- und *P. putida*-Isolaten oder in der pathogenen, nah verwandten Spezies *Pseudomonas aeruginosa* vorkommen [8, 14, 15]. Dazu zählen Gene zur Expression von Exotoxinen, spezifischen hydrolytischen Enzymen, Typ-III-Sekretionssystemen, O-Antigensyntheseenzymen und andere Virulenzfaktoren [8, 16]. Das pathogene Potential von *P. alloputida* KT2440 wurde in Tiermodellen untersucht. Im Mausmodell ist die intraperitoneale Injektion von $10^9$ koloniebildenden Einheiten (KBE) von *P. alloputida* KT2440 nicht gesundheitsschädlich [17]. Die Inokulation von gesunder und geschädigter Haut von Ratten mit $10^5$ KBE *P. alloputida* KT2440 hatte keine schädlichen Auswirkungen. Pathogene *P. alloputida*-Isolate waren dagegen in der Lage, bei gleicher Inokulationsdosis die Haut stark zu schädigen [18]. Es liegen keine Berichte über Infektionen mit *P. alloputida* KT2440 beim Tier und Menschen vor. Der Stamm *P. alloputida* KT2440 wird der Risikogruppe 1 zugeordnet.

Unter Labor- und Gewächshausbedingungen ist *P. alloputida* KT2440 in der Lage, die Wurzeln vieler Pflanzen zu kolonisieren [19, 20]. Die Inokulation der Wurzeln von Mais-, Soja- und Paprikapflanzen mit *P. alloputida* KT2440 führte zu einer Aktivierung der systemischen Resistenz gegenüber Blattkrankheitserregern und förderte das Wurzelwachstum [17, 19, 21]. Phytopathogene Effekte sind für *P. alloputida* KT2440 nicht beschrieben.

*P. alloputida* KT2440 ist apathogen und ohne Gefährdungspotential für Mensch, Tier und Pflanze.

BVL_FO_05_4100_402_V1.7

### 1.3. Vermehrungsfähigkeit von *P. alloputida* KT2440 außerhalb von gentechnischen Anlagen

Vielfältige Studien mit Boden- und Wasserproben zeigen, dass *P. alloputida* KT2440 sich nicht außerhalb von gentechnischen Anlagen verbreiten kann. In Feldversuchen war *P. alloputida* KT2440 in Böden nach 50 Tagen bei einer Inokulation von $10^7$ KBE pro g Erde nicht mehr nachweisbar [19, 21]. In bepflanzten Böden persistierte *P. alloputida* KT2440 in der

Rhizosphäre bis zum Ende des Versuchszeitraumes von 60 Tagen [20, 22]. Die Bakteriendichte nahm in diesem Zeitraum nur gering ab. Das Überleben in Gewässern wurde mit dem Parentalstamm *P. alloputida* mt-2 untersucht. In unsterilen Süßwasserproben reduzierte sich die Bakteriendichte innerhalb von 10 Tagen um das Hundertfache und bis zum Ende des Versuchszeitraumes von 70 Tagen um das Tausendfache [23]. In Abwässern reduzierte sich die Bakteriendichte von *P. alloputida* KT2440 innerhalb von 55 Tagen um das Zehntausendfache [24].

Zusammengefasst zeigt dies, dass eine Ausbreitung von *P. alloputida* KT2440 in der Umwelt nicht nachgewiesen werden konnte.

1.4. Horizontaler Gentransfer von *P. alloputida* KT2440 mit anderen Organismen

Horizontaler Gentransfer bei Bakterien kann durch Prozesse wie Transformation, Transduktion, Konjugation und Mobilisierung von genetischem Material stattfinden, deren molekulare Abläufe umfassend untersucht wurden [25].

Im Unterschied zu verschiedenen anderen Bakterienspezies ist *P. alloputida* KT2440 wie *P. alloputida* generell nicht in der Lage, DNA aktiv aus der Umgebung aufzunehmen, und weist somit keine natürliche Kompetenz für die Transformation mit freier DNA auf [26, 27]. DNA gelangt nur unter solchen experimentellen Bedingungen in *P. alloputida*-Zellen, die die äußere und innere Membran der Bakterien hierfür durchlässig machen, z. B. durch die Anwendung physikalischer Methoden (Elektroporation) [28].

Zum horizontalen Gentransfer bei Bakterien tragen generell transduzierende Phagen mit breitem Wirtsbereich bei. Solche Phagen können gelegentlich ausschließlich DNA bakteriellen Ursprungs (Chromosomale- oder Plasmid-DNA) in infektiöse Phagenpartikel verpacken und Wirte aus mehreren Bakterienfamilien infizieren. Es sind jedoch bislang keine Phagen bekannt, die *P. alloputida* KT2440 infizieren können [9]. Von den vier Prophagen von *P. alloputida* KT2440 können zwei nach Prophagen-induzierenden Behandlungen aus dem Chromosom ausgeschnitten werden. Jedoch kommt es in keinem Fall zur Bildung infektiöser Phagenpartikel [9].

Ein anderer Prozess des horizontalen Gentransfers ist die Übertragung von Plasmiden mittels Konjugation. Die bakterielle Konjugation ist ein Vorgang, in dem es zum physikalischen Kontakt zwischen Donor- und Rezipientenzellen und anschließend zum Transfer eines DNA-Einzelstranges kommt. Der Stamm *P. alloputida* mt-2 enthält das konjugative TOL-Plasmid pWW0, welches in *Escherichia coli*, *Erwinia chrysanthemi*, *Hydrogenophaga palleronii*, *Serratia* spp. und *Burkholderia* spp. replizieren kann und somit einen breiten Wirtsbereich hat [29]. Der Stamm *P. alloputida* KT2440 hat dieses Plasmid jedoch verloren und enthält auch keine weiteren Plasmide [8], so dass ein Gentransfer mithilfe der Konjugation einschließlich der Mobilisierung ausgeschlossen ist.

BVL_FO_05_4100_402_V1.7

## 2. Empfehlung

Nach § 8 Absatz 1 GenTSV wird *P. alloputida* KT2440 und davon abgeleitete Stämme als Teil einer biologischen Sicherheitsmaßnahme anerkannt, in denen weder konjugative Plasmide mit breitem Wirtsbereich und Fähigkeit zur Mobilisierung noch generell transduzierende Prophagen mit breitem Wirtsbereich vorliegen.

## 3. Begründung

*P. alloputida* KT2440 erfüllt die Vorrausetzungen des § 8 Abs. 1 GenTSV für die Anerkennung als Empfängerorganismus für biologische Sicherheitsmaßnahmen. Der Stamm ist wissenschaftlich sehr gut beschrieben und apathogen für Mensch, Tier und Pflanze. *P. alloputida* KT2440 stellt somit keine Gefahr für die Rechtsgüter nach § 1 Abs. 1 GenTG dar. Das Überleben von *P. alloputida* KT2440 außerhalb gentechnischer Anlagen ist gut untersucht und es ist gezeigt, dass sich *P. alloputida* KT2440 in Böden und Gewässern nicht ausbreitet, jedoch in der Rhizosphäre von Pflanzen persistiert. Horizontaler Gentransfer von *P. alloputida* KT2440 auf andere Bakterien ist nicht zu erwarten.

Informationen dazu, ob einzelne *P. alloputida* KT2440 abgeleitete Stämme entsprechend der in dieser Stellungnahme festgelegten Kriterien als Empfängerstämme für biologische Sicherheitsmaßnahmen geeignet sind, werden in der Datenbank der Empfängerstämme für biologische Sicherheitsmaßnahmen gesammelt und zur Verfügung gestellt, die von der ZKBS-Geschäftsstelle geführt wird.

## Literatur


1. **Palleroni NJ** (1981). Introduction to the Family *Pseudomonadaceae*. *In* Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A, Schlegel HG (Hrsg.), The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria, S. 655–65. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
2. **Costa-Gutierrez SB, Adler C, Espinosa-Urgel M, Cristóbal RE de** (2022). *Pseudomonas putida* and its close relatives: mixing and mastering the perfect tune for plants. *Appl Microbiol Biotechnol* **106**(9):3351–67.
3. **Urbanowicz P, Izdebski R, Biedrzycka M, Literacka E, Hryniewicz W, Gniadkowski M** (2022). Genomic Epidemiology of MBL-Producing *Pseudomonas putida* Group Isolates in Poland. *Infect Dis Ther* **11**(4):1725–40.
4. **Nakazawa T** (2002). Travels of a *Pseudomonas*, from Japan around the world. *Environ Microbiol* **4**(12):782–6.
5. **Bagdasarian M, Lurz R, Rückert B, Franklin FCH, Bagdasarian MM, Frey J, Timmis KN** (1981). Specific-purpose plasmid cloning vectors II. Broad host range, high copy number, RSF 1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* **16**(1):237–47.
6. **Keshavarz-Tohid V, Vacheron J, Dubost A, Prigent-Combaret C, Taheri P, Tarighi S, Taghavi SM, Moënne-Loccoz Y, Muller D** (2019). Genomic, phylogenetic and catabolic re-assessment of the *Pseudomonas putida* clade supports the delineation of *Pseudomonas alloputida* sp. nov., *Pseudomonas inefficax* sp. nov., *Pseudomonas persica* sp. nov., and *Pseudomonas shirazica* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* **42**(4):468–80.
7. **Belda E, van Heck RGA, Lopez-Sanchez MJ, Cruveiller S, Barbe V, Fraser C, Klenk H-P, Petersen J, Morgat A, Nikel PI, Vallenet D, Rouy Z, Sekowska A, Martins dos Santos, VAP, Lorenzo V de, Danchin A, Medigue C** (2016). The revisited genome of *Pseudomonas putida* KT2440 enlightens its value as a robust metabolic chassis. *Environ Microbiol* **18**(10):3403–24.
8. **Nelson KE, Weinel C, Paulsen IT, Dodson RJ, Hilbert H, Martins dos Santos, VAP, Fouts DE, Gill SR, Pop M, Holmes M, Brinkac L, Beanan M, DeBoy RT, Daugherty S, Kolonay J, Madupu R, Nelson W, White O, Peterson J, Khouri H, Hance I, Chris Lee P, Holtzapple E, Scanlan D, Tran K, Moazzez A, Utterback T, Rizzo M, Lee K, Kosack D, Moestl D, Wedler H, Lauber J, Stjepandic D, Hoheisel J, Straetz M, Heim S, Kiewitz C, Eisen JA, Timmis KN, Düsterhöft A, Tümmler B, Fraser CM** (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**(12):799–808.

9. **Martínez-García E, Jatsenko T, Kivisaar M, Lorenzo V de** (2015). Freeing *Pseudomonas putida* kt 2440 of its proviral load strengthens endurance to environmental stresses. *Environ Microbiol* **17**(1):76–90.
10. **Chen C-H, Hsiu R-H, Liu C-E, Young T-G** (2005). *Pseudomonas putida* bacteremia due to soft tissue infection contracted in a flooded area of central Taiwan: a case report. *J Microbiol Immunol Infect* **38**(4):293–5.
11. **Carpenter RJ, Hartzell JD, Forsberg JA, Babel BS, Ganesan A** (2008). *Pseudomonas putida* war wound infection in a US Marine: a case report and review of the literature. *J Infect* **56**(4):234–40.
12. **Toru S, Maruyama T, Hori T, Gocho N, Kobayashi T** (2008). *Pseudomonous putida* meningitis in a healthy adult. *J Neurol* **255**(10):1605–6.
13. **Altinok I, Kayis S, Capkin E** (2006). *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout. *Aquaculture* **261**(3):850–5.
14. **Duque E, La Torre J de, Bernal P, Molina-Henares MA, Alaminos M, Espinosa-Urgel M, Roca A, Fernández M, Bentzmann S de, Ramos J-L** (2013). Identification of reciprocal adhesion genes in pathogenic and non-pathogenic *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* **15**(1):36–48.
15. **Molina L, Udaondo Z, Duque E, Fernández M, Bernal P, Roca A, La Torre J de, Ramos JL** (2016). Specific Gene Loci of Clinical *Pseudomonas putida* Isolates. *PLoS One* **11**(1):1-24.
16. **Martins dos Santos, VAP, Heim S, Moore ERb, Strätz M, Timmis KN** (2004). Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **6**(12):1264–86.
17. **Vílchez JI, Navas A, González-López J, Arcos SC, Manzanera M** (2016). Biosafety test for plant growth-promoting bacteria: Proposed environmental and human safety index (EHSI) protocol. *Front Microbiol* **6**:1–14.
18. **Fernández M, Porcel M, La Torre J de, Molina-Henares MA, Daddaoua A, Llamas MA, Roca A, Carriel V, Garzón I, Ramos JL** (2015). Analysis of the pathogenic potential of nosocomial *Pseudomonas putida* strains. *Front Microbiol* **6**:1–11.
19. **Planchamp C, Glauser G, Mauch-Mani B** (2015). Root inoculation with *Pseudomonas putida* KT2440 induces transcriptional and metabolic changes and systemic resistance in maize plants. *Front Plant Sci* **5**:1–10.
20. **Fernández M, Conde S, Duque E, Ramos J-L** (2013). In vivo gene expression of *Pseudomonas putida* KT2440 in the rhizosphere of different plants. *Microb Biotechnol* **6**(3):307–13.
21. **Costa-Gutierrez SB, Lami MJ, Santo MCC-D, Zenoff AM, Vincent PA, Molina-Henares MA, Espinosa-Urgel M, Cristóbal RE de** (2020). Plant growth promotion by *Pseudomonas putida* KT2440 under saline stress: role of eptA. *Appl Microbiol Biotechnol* **104**(10):4577–92.
22. **Molina L, Ramos C, Duque E, Ronchel MC, García JM, Wyke L, Ramos JL** (2000). Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biol Biochem* **32**(3):315–21.
23. **Brettar I, Ramos-Gonzalez MI, Ramos JL, Höfle MG** (1994). Fate of *Pseudomonas putida* after release into lake water mesocosms: Different survival mechanisms in response to environmental conditions. *Microb Ecol* **27**(2):99–122.
24. **McClure NC, Weightman AJ, Fry JC** (1989). Survival of *Pseudomonas putida* UWC1 containing cloned catabolic genes in a model activated-sludge unit. *Appl Environ Microbiol* **55**(10):2627–34.
25. **Dreiseikelmann B** (1994). Translocation of DNA across bacterial membranes. *Microbiol Rev* **58**(3):293–316.
26. **Lorenz MG, Wackernagel W** (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev* **58**(3):563–602.
27. **Carlson CA, Pierson LS, Rosen JJ, Ingraham JL** (1983). *Pseudomonas stutzeri* and related species undergo natural transformation. *J Bacteriol* **153**(1):93–9.
28. **Cho J-H, Kim E-K, So J-S** (1995). Improved transformation of *Pseudomonas putida* KT2440 by electroporation. *Biotechnology Techniques* **9**(1):41–4.
29. **Lambertsen LM, Molin S, Kroer N, Thomas CM** (2004). Transcriptional regulation of pWW0 transfer genes in *Pseudomonas putida* KT2440. *Plasmid* **52**(3):169–81.

BVL_FO_05_4100_402_V1.7