

**Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von  
*Pseudomonas putida* und *Pseudomonas alloputida*  
als Spender- oder Empfängerorganismus  
für gentechnische Arbeiten gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV**

### Allgemeines

*Pseudomonas putida* und *Pseudomonas alloputida* sind Gram-negative, aerobe und saprotroph lebende Bodenbakterien aus der Familie der *Pseudomonadaceae* und gehören zur Gruppe der fluoreszierenden *Pseudomonas* sp.. Bis 2019 wurde *P. alloputida* der morphologisch sehr ähnlichen Spezies *P. putida* zugeordnet [1]. Einzelne *P. putida*-Stämme, darunter der KT2440-Stamm und klinische Isolate, wurden erst nach Differenzierung anhand von Genomsequenzen als *P. alloputida* identifiziert [1–4].

*P. putida* ist ein Teil der pflanzlichen Rhizosphäre, wo es sich von Exsudaten der Pflanzenwurzeln ernährt und im Gegenzug durch die Bildung von Toxinen und Siderophoren die Besiedlung der Wurzeln mit phytopathogenen Keimen verhindert [5]. Daher kann *P. putida* zur Stärkung der Pflanzenabwehr eingesetzt werden [6].

Seine Fähigkeit, aromatische Kohlenwasserstoffe wie Toluol oder Phenol als Kohlenstoffquelle zu nutzen, lässt eine biologische Reinigung von kontaminierten Böden und Behandlung von Abwasser möglich erscheinen [7, 8]. Ebenso könnte *P. putida* beim Recycling von Polystyrol genutzt werden, das zum biologisch abbaubaren Biopolymer Polyhydroxyalkanoat abgebaut wird [9].

Der Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe hat 2012 *P. putida* von der Risikogruppe 1 in die Risikogruppe 2 hochgestuft, mit der Begründung, dass Infektionen zu dieser Zeit gehäuft aufgetreten seien [10]. Nach § 5 GenTSV galt für *P. putida* bis 2012 die Einstufung in die Risikogruppe 1.

*P. putida* ist als vergleichsweise seltener Erreger von Infektionen vorwiegend bei immunsupprimierten Menschen wie Krebskranken und Frühgeborenen in Erscheinung getreten, wobei der größte Risikofaktor dabei die Verwendung von invasiven medizinischen Gerätschaften wie Harnwegs- oder Venenkathetern ist [11]. Infektionen umfassen hauptsächlich Bakteriämien, Harnwegsinfektionen und Lungenentzündungen und seltener Infektionen der Haut, des Bauchfells, des Zentralen Nervensystems, der Ohren und der Gelenke (zusammengefasst in [12]). Bei immunkompetenten Patienten verursachte *P. putida* Meningitis [13], postoperative Wundinfektionen [12] und Bakteriämie und Entzündung des Unterhautgewebes oberhalb beider Knöchel bei Patienten, die durch ein Überflutungsgebiet gewatet war [14].

Die Heilungschancen bei durch *P. putida* ausgelösten Bakteriämien gelten mit ~ 93 % als gut [11].

In Aquakulturen wurden vereinzelt durch *P. putida* hervorgerufene Weichteilinfektionen von Fischen beobachtet [15]. Diese scheinen durch Stressfaktoren wie zu großer Besatzdichte begünstigt zu werden (zitiert in [16]). Die Virulenz ist stamm- und wirtsspezifisch unterschiedlich. So starben 45 % der Regenbogenforellen an Infektionen der Flossen und des Rückens nach der Belastung des Beckenwassers mit einer Endkonzentration von  $5 \times 10^6$  koloniebildende Einheiten (KBE)  $\text{ml}^{-1}$  für 1 h [15], während die LD50 einer intraperitonealen Verabreichung eines anderen Umweltisolates an Flundern und Steinbutte mit  $1,5 \times 10^9$  KBE beträchtlich höher war [17].

*P. alloputida* ist Teil der pflanzlichen Rhizosphäre und kommt in Böden und Gewässern vor [18]. Das Bakterium trägt durch Lösung von mineralischen Phosphat durch Pyrrolochinolinchinon zum Pflanzenwachstum und durch den Abbau aromatischer Kohlenwasserstoffe zur Dekontamination von belasteten Böden bei [18, 19]. Es ist aber auch als humanpathogener Erreger von Bakteriämien, Harnwegsinfektionen und einer Pneumonie in Erscheinung getreten [20, 21]. Blut- und Harnwegsinfektionen traten häufig in immunsupprimierten Patienten und/oder nach Verwendung von invasiven medizinischen Gerätschaften wie Harnwegs- oder Venenkathetern auf [21]. Der Immunstatus des Pneumoniepatienten ist unbekannt [20]. Es ist nicht ausgeschlossen, dass weitere Infektionen mit *P. alloputida* fälschlicherweise dem Erreger *P. putida* zugeordnet wurden bzw. werden, wenn auf eine Differenzierung anhand von Genomsequenzen verzichtet wird. Es liegen Berichte über Resistenzen gegenüber einzelnen Antibiotika der Gruppen  $\beta$ -Laktame und Aminoglykoside, sowie gegenüber Chloramphenicol und Fosfomycin vor [18]. Der Erreger besitzt verschiedene Virulenzfaktoren, darunter Exotoxine (u. a. Exolysin), Typ-II- und Typ-III-Sekretionssysteme und Effektorproteine [18].

Der Stamm *P. alloputida* KT2440 (ehemals *P. putida* KT2440) ist durch die ZKBS als Teil einer biologischen Sicherheitsmaßnahme anerkannt (Az. 45270; aktualisiert Februar 2023). Im Genom dieses Stammes wurden keine genetischen Informationen für Virulenzfaktoren wie Typ-II- und Typ-III-Sekretionssysteme, Exotoxine oder Zellwand-abbauende Enzyme gefunden [22].

## Empfehlung

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i.V.m. den Kriterien in Anlage 1 GenTSV werden *Pseudomonas putida* und *P. alloputida* als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten in die **Risikogruppe 2** eingestuft.

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i.V.m. den Kriterien in Anlage 1 GenTSV wird *P. alloputida* KT2440 als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten in die **Risikogruppe 1** eingestuft.

## Begründung

*P. putida* und *P. alloputida* sind Erreger von Infektionen beim Menschen, die im Allgemeinen gut behandelbar sind. Die Mehrzahl der Infektionen tritt bei Immunsupprimierten auf, es wurden jedoch auch Erkrankungen bei Menschen ohne Einschränkungen des Immunstatus beschrieben.

Daneben ruft *P. putida* Weichteilinfektionen bei Fischen hervor. Es liegen keine Hinweise vor, dass *P. putida* und *P. alloputida* phytopathogene Organismen sind.

Für den Stamm *P. alloputida* KT2440 liegen keine Hinweise auf eine Pathogenität für den Menschen, Tiere oder Pflanzen vor. Der Stamm kann weiterhin als Empfängerstamm für Biologische Sicherheitsmaßnahmen genutzt werden.

## Literatur

1. **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.
2. **Passarelli-Araujo H, Franco GR, Venancio TM** (2022). Network analysis of ten thousand genomes shed light on *Pseudomonas* diversity and classification. *Microbiol Res* **254**:1–7.
3. **Girard L, Lood C, Höfte M, Vandamme P, Rokni-Zadeh H, van Noort V, Lavigne R, Mot R de** (2021). The Ever-Expanding *Pseudomonas* Genus: Description of 43 New Species and Partition of the *Pseudomonas putida* Group. *Microorganisms* **9**(8):1–24.
4. **Morimoto Y, Tohya M, Aibibula Z, Baba T, Daida H, Kirikae T** (2020). Re-identification of strains deposited as *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in GenBank based on whole genome sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **70**(11):5958–63.
5. **Weller DM** (1988). Biological Control of Soilborne Plant Pathogens in the Rhizosphere with Bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **26**(1):379–407.
6. **Liu L, Kloepper JW, Tuzun S** (1995). Induction of systemic resistance in cucumber against Fusarium wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* **85**(6):695–8.
7. **EI-Bassi L, Iwasaki H, Oku H, Shinzato N, Matsui T** (2010). Biotransformation of benzothiazole derivatives by the *Pseudomonas putida* strain HKT554. *Chemosphere* **81**(1):109–13.
8. **Chung T-P, Tseng H-Y, Juang R-S** (2003). Mass transfer effect and intermediate detection for phenol degradation in immobilized *Pseudomonas putida* systems. *Process Biochemistry* **38**(10):1497–507.
9. **Ward PG, Goff M, Donner M, Kaminsky W, O'Connor KE** (2006). A Two Step Chemobiotechnological Conversion of Polystyrene to a Biodegradable Thermoplastic. *Environ Sci Technol* **40**(7):2433–7.
10. **TRBA** (2015). TRBA 466 Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen <https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-466.html>. Besucht am 19.01.2023.
11. **Yoshino Y, Kitazawa T, Kamimura M, Tatsuno K, Yotsuyanagi H, Ota Y** (2011). *Pseudomonas putida* bacteremia in adult patients: five case reports and a review of the literature. *J Infect Chemother* **17**(2):278–82.
12. **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.
13. **Toru S, Maruyama T, Hori T, Gocho N, Kobayashi T** (2008). *Pseudomonas putida* meningitis in a healthy adult. *J Neurol* **255**(10):1605–6.
14. **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.
15. **Altinok I, Kayis S, Capkin E** (2006). *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout. *Aquaculture* **261**(3):850–5.

16. **Smolowitz R, Wadman E, Chikarmane HM** (1998). *Pseudomonas putida* Infections of the Oyster Toadfish (*Opsanus tau*). *Biol Bull* **195**(2):229–31.
17. **Zhang W, Chen L, Liu D** (2012). Characterization of a marine-isolated mercury-resistant *Pseudomonas putida* strain SP1 and its potential application in marine mercury reduction. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**(3):1305–14.
18. **Passarelli-Araujo H, Jacobs SH, Franco GR, Venancio TM** (2021). Phylogenetic analysis and population structure of *Pseudomonas alloputida*. *Genomics* **113**(6):3762–73.
19. **Arora PK, Saroj RS, Mishra R, Omar RA, Kumari P, Srivastava A, Garg SK, Singh VP** (2021). Draft genome sequence data of a 4-nitrophenol- degrading bacterium, *Pseudomonas alloputida* strain PNP. *Data Brief* **38**:1–8.
20. **The Pseudomonas Genome Database** (2023). *Pseudomonas putida* 15420352 <https://www.pseudomonas.com/strain/show?id=17774>. Besucht am 19.01.2023.
21. **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.
22. **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, Lee PC, 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 J, Timmis KN, Dusterhöft 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.