

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Milieu  
Mevrouw S.A.M. Dijkma  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 24 januari 2017  
**KENMERK** CGM/170124-01  
**ONDERWERP** Advies pathogeniteitsclassificatie van de schimmel *Melanocarpus albomyces*

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een verzoek van Dutch DNA Biotech B.V. om de schimmel *Melanocarpus albomyces* op Bijlage 2, lijst A1 (apathogene organismen) te plaatsen (IG 16-385\_2.13-000), deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsclassificatie van de schimmelsoort *Melanocarpus albomyces* en de plaatsing van deze schimmel op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

*M. albomyces* is voor het eerst geïsoleerd in 1964 in India en is aangetroffen in bodem en compost. De schimmel produceert enzymen die bij hoge temperaturen stabiel blijven en betrokken zijn bij de afbraak van organisch materiaal. *M. albomyces* wordt gebruikt als bron voor verscheidene enzymen voor industrieel gebruik en staat onder andere bekend om de productie van xylanases en cellulases die (hemi)cellulose en andere polysachariden af kunnen breken.

Onder bepaalde omstandigheden kan de schimmel het mycotoxine myriocin produceren. De exacte omstandigheden waaronder deze productie plaatsvindt, zijn niet bekend. Het mycotoxine kan in gezuiverde geconcentreerde vorm nadelige effecten veroorzaken bij dieren. De COGEM heeft geen aanwijzingen dat het door *M. albomyces* uitgescheiden toxine een concentratie kan bereiken waarbij het een ziekte in mens, dier of plant veroorzaakt. Verder kent de soort een lange historie van veilig gebruik.

Op grond van het bovenstaande concludeert de COGEM dat *M. albomyces* niet pathogeen is. Zij adviseert daarom *M. albomyces* in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en op te nemen in 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. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo  
                  Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

# Pathogeniteitsclassificatie van de schimmel *Melanocarpus albomyces*

## COGEM advies CGM/170124-01

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de schimmelsoort *M. albomyces* en over de plaatsing van deze soort op Bijlage 2, lijst A1 (IG 16-385). Bijlage 2, lijst A1 maakt deel uit van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen' (Regeling ggo) en bestaat uit een lijst van micro-organismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant.<sup>1</sup> Opname op Bijlage 2, lijst A1 betekent dat onder ML-I laboratorium-condities met het betreffende micro-organisme ggo's vervaardigd mogen worden met vectoren en inserties die voorkomen op de A-lijsten (veilige vectoren en inserties).

### 2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling ggo

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie van een micro-organisme de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden de 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.

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.

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. Taxonomie schimmels**

Schimmels vormen het rijk der Fungi. Het merendeel van de beschreven schimmels valt binnen de fyta van de Ascomyceten en Basidiomyceten.<sup>2</sup> Omdat er veel schimmels zijn die zowel een geslachtelijk (teleomorf) als een ongeslachtelijk (anamorf) stadium hebben en er in deze stadia verschillend uitzien, hebben verscheidene schimmels in het verleden verschillende soortnamen gekregen. De taxonomie van schimmels is daardoor complex. Mede door de toenemende informatie over genoomsequenties is de taxonomie aan verandering onderhevig. Dit vraagt om een zorgvuldige identificatie van de te gebruiken schimmelsoort.

### **4. Mycotoxineproducerende schimmels**

Sommige schimmels produceren metabolieten met toxische eigenschappen.<sup>3</sup> De synthese van deze mycotoxines vindt plaats via verschillende stofwisselingsroutes waarbij complexe reacties en veel enzymen betrokken zijn. De genen die voor deze enzymen coderen zijn in geclusterde vorm op het schimmelgenoom aanwezig. Deze genenclusters zijn enkele tientallen kilobasen groot, liggen naast elkaar en worden in onderlinge samenhang gereguleerd.<sup>3</sup> Schimmelregulatorengenen kennen verschillende hiërarchische niveaus. Sommige transcriptiefactoren beïnvloeden alleen de expressie binnen hun eigen genencluster. Andere regulatoren beïnvloeden daarnaast ook fysiologische processen gecodeerd door andere genenclusters.<sup>3</sup>

Voor veel mycotoxines zijn de biochemische stofwisselingsroutes nog niet opgehelderd of is nog niet bekend welke genenclusters erbij betrokken zijn. Soms zijn de stofwisselingsroutes en de betrokken genenclusters wel beschreven, maar is niet bekend onder welke condities mycotoxineproductie tot stand komt. Sommige schimmelsoorten kunnen meerdere mycotoxines produceren, maar binnen een soort kan de productie per stam verschillen.<sup>3</sup>

### **5. *Melanocarpus albomyces***

*Melanocarpus albomyces* (syn: *Myriococcum albomyces*, *Thielavia albomyces*) is een filamenteuze thermofiele schimmel behorend tot het fylum Ascomycota.<sup>4,5</sup> *M. albomyces* is voor het eerst geïsoleerd in India als schimmel die bio-afbrekbare eigenschappen bezit.<sup>6</sup> *M. albomyces* is aangetroffen in bodem en compost. Oorspronkelijk is de schimmel geclassificeerd als *Myriococcum albomyces* en stond ook bekend als *Thielavia albomyces*. Tegenwoordig is de schimmel ondergebracht in het genus *Melanocarpus*, met als nieuwe soortnaam *Melanocarpus albomyces*.<sup>5,7</sup>

*Melanocarpus albomyces* wordt gebruikt om verscheidene enzymen voor industrieel gebruik te produceren.<sup>4</sup> De schimmel staat onder andere bekend om de productie van xylanases en cellulases met thermische stabiliteit en activiteit bij een alkalische pH die (hemi)cellulose en andere polysachariden af kunnen breken.<sup>4,8</sup>

Verder produceert het een thermostabiele laccase met een optimale activiteit bij een neutrale pH, wat een ongebruikelijke combinatie van eigenschappen is voor laccases afkomstig van schimmels. Laccases zijn koperbevattende oxidoreductasen die oxidatie van fenolachtige moleculen katalyseren.<sup>9,10</sup>

Ook produceert *M. albomyces* een thermostabiele steryl-esterase met een brede substraatspecificiteit die naast steryl-esters ook triacylglycerolen en p-nitrophenyl esters kan hydrolyseren.<sup>4,11</sup>

Daarnaast produceert het, onder bepaalde maar niet goed gekarakteriseerde omstandigheden, net als een aantal andere thermofiele schimmels, het antibioticum myriocin (ISP-1; thermozytocidin).<sup>12</sup> Dit mycotoxine is een atypisch aminozuur en heeft een sterke remmende werking op serine-palmitoyltransferase (SPT), het enzym dat de eerste stap in sphingosine-biosynthese katalyseert.<sup>13,14</sup> Vanwege deze eigenschap wordt myriocin in biochemisch onderzoek gebruikt om het niveau van cellulaire sphingolipides te verlagen. Myriocin is een sterk immuunsuppressivum en remt de proliferatie van een IL-2-afhankelijke cytotoxische T-cel lijn afkomstig van muizen.<sup>14</sup> De LD50 voor muizen is bij intraperitoneale toediening vastgesteld op 5-10 mg/kg en bij orale toediening op 300-400 mg/kg.<sup>12</sup> Een derivaat van myriocin genaamd fingolimod wordt als medicijn tegen multiple sclerose toegepast.<sup>15</sup>

## **6. Eerder COGEM advies en classificaties andere beoordelende instanties**

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over (handelingen met) *M. albomyces*. In een eerder COGEM advies zijn een aantal *Thielavia* soorten in pathogeniteitsklasse 1 ingedeeld.<sup>16</sup> Vroeger stond *M. albomyces* ook wel bekend als *Thielavia albomyces*.

De 'American Type Culture Collection' (ATCC) en het Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS-KNAW) hebben werkzaamheden met *M. albomyces* ingeschaald op het laagste veiligheidsniveau BSL-1.<sup>17,18</sup> De classificatie van beide instanties is gebaseerd op pathogeniteit voor de mens.

## **7. 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 micro-organismen weinig literatuur over apathogeniteit voorhanden.

In de 'Atlas of Clinical Fungi', het naslagwerk met alle klinisch relevante schimmels, staat *M. albomyces* niet vermeld als pathogene schimmel.<sup>19</sup> Verder staat de schimmel niet vermeld in 'online databases' met informatie over schimmelsoorten die ziekten bij planten veroorzaken.<sup>20,21,22,23</sup> *M.*

*albomyces* is in staat om onder bepaalde omstandigheden het mycotoxine myriocin te produceren.<sup>12</sup> De specifieke omstandigheden en de betrokken stofwisselingsroutes waaronder het productieproces van het mycotoxine bij *M. albomyces* plaatsvindt, zijn niet bekend. Het mycotoxine kan in gezuiverde geconcentreerde vorm toxische of nadelige effecten veroorzaken bij dieren.<sup>12</sup> Er zijn geen gevallen in de literatuur bekend van toxische of nadelige effecten bij de mens of bij planten. De COGEM heeft geen aanwijzingen dat het door *M. albomyces* uitgescheiden toxine een concentratie kan bereiken waarbij het een ziekte in mens, dier of plant veroorzaakt. Verder kent de schimmel een lange historie van veilig gebruik en wordt gebruikt als bron van verscheidene enzymen voor industrieel gebruik.

Op grond van bovenstaande concludeert de COGEM dat *M. albomyces* niet pathogeen is. De soort voldoet daar mee aan criterium 'a' als bovenstaand beschreven voor indeling in pathogeniteitsklasse 1. Zij adviseert daarom deze schimmelsoort in pathogeniteitsklasse 1 in te delen en op te nemen in Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

## Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2015). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <http://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2017-01-01> (bezocht: 12 januari 2017)
2. James TY *et al.* (2006). Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818-822
3. COGEM (2014). Pathogeniteitsclassificatie van mycotoxineproducerende schimmels. COGEM advies CGM/140121-01
4. Biswas R *et al.* (2010). Development of mutants of *Melanocarpus albomyces* for hyperproduction of Xylanase. *J. Biosci. Bioeng.* 110: 702-708
5. Guarro J *et al.* (1996). The genes *Melanocarpus*. *Mycol. Res.* 100: 75-78
6. Cooney DG & Emerson R (1964). Thermophilic Fungi. :1-188
7. Maheshwari R & Kamalam T (1985). Isolation and culture of a thermophilic fungus: *Melanocarpus albomyces*, and factors influencing the production and activity of Xylanase. *J. Gen. Microbiol.*131: 3017-3027
8. Jain A *et al.* (1998). Properties of a thermostable xylanase produced by *Melanocarpus albomyces* IIS-68 in solid state fermentation. *Biores. Technol.* 64: 225-228
9. Kiiskinen LL *et al.* (2002) Purification and characterisation of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 198-204
10. Kiiskinen LL *et al.* (2004). Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a laccase gene from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 137-144
11. Kontkanen H *et al.* (2006). Purification and characterisation of a novel steryl esterase from *Melanocarpus albomyces*. *Enz. Microb. Technol.* 39: 265-273
12. Kluepfel D. *et al.* (1972). Myriocin, a new antifungal antibiotic from *Myriococcum albomyces*. *J. Antibiot.* 25: 109-115
13. He Q *et al.* (2004). Inhibition of serine palmitoyltransferase by myriocin, a natural mycotoxin, causes induction of c-myc in mouse liver.

14. Miyake Y *et al.* (1995). Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211: 396-403
15. Ayzenberg I. *et al.* (2016). Fingolimod for multiple sclerosis and emerging indications: appropriate patient selection, safety precautions, and special considerations. *Ther. Clin. Risk Manag.* 12: 261-272
16. COGEM (2014). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal apathogene en pathogene schimmels. COGEM advies CGM/141218-03
17. American Type Culture Collection. Products. Fungi and yeasts. *Melanocarpus albomyces* [https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells\\_and\\_Microorganisms/Fungi\\_and\\_Yeast/Fungi\\_and\\_Yeast\\_Alphanumeric/6235\\_6.aspx](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Fungi_and_Yeast/Fungi_and_Yeast_Alphanumeric/6235_6.aspx) (bezoekt: 12 januari 2017)
18. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. <http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioloMICS.aspx?Table=CBSstraindatabase&Rec=36801&Fields=All> (bezoekt: 12 januari 2017)
19. Hoog de GS *et al.* (2014). Atlas of Clinical Fungi, Atlas version 4.1.4, 4e editie
20. USDA ARS Fungal database. [https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/new\\_allView.cfm?whichone=all&thisName=Melanocarpusalbomyces&organismtype=Fungus&fromAllCount=yes](https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/new_allView.cfm?whichone=all&thisName=Melanocarpusalbomyces&organismtype=Fungus&fromAllCount=yes) (bezoekt: 23 januari 2017)
21. American Phytopathological Society (APS) <http://www.apsnet.org/searchcenter/pages/results.aspx?k=melanocarpus%20albomyces> (bezoekt 23 januari 2017)
22. Animal and Plant health Inspection Service (APHIS). <https://usdasearch.usda.gov/search?utf8=%3F&affiliate=usda-aphis&query=melanocarpus+albomyces&commit=Search> (bezoekt: 23 januari 2017)
23. PHI-base <http://www.phi-base.org/searchFacet.htm?queryTerm=melanocarpus+albomyces> (bezoekt 23 januari 2017)