

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

**DATUM** 10 augustus 2017  
**KENMERK** CGM/170810-01  
**ONDERWERP** Advies pathogeniteitsclassificatie gisten *B. bruxellensis* en *S. stipitis*

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een verzoek van de Technische Universiteit Delft om de gisten *Brettanomyces bruxellensis* en *Scheffersomyces stipitis* op Bijlage 2, lijst A1 (apathogene organismen van de Regeling ggo) te plaatsen (IG 17-115\_2.13-000 en IG 17-116\_2.13-000), deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de gisten *Brettanomyces bruxellensis* en *Scheffersomyces stipitis* en de plaatsing van deze gisten op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

*B. bruxellensis* staat bekend als bederver van wijn. Aanwezigheid van deze gist kan leiden tot een onappetijtelijke geur en smaak van wijn. Deze gist kan groeien onder zuurstofarme condities en tolereert hoge temperaturen (rond 42°C) en lage zuurgraden.

*S. stipitis* is beter bekend onder de oude naam *Pichia stipitis*. Deze gist kan onder andere xylose, xylaan en cellobiose fermenteren. *S. stipitis* groeit vrijwel niet onder zuurstofarme condities en tolereert temperaturen van maximaal 35°C.

Beide gisten kunnen koolhydraten (zoals cellulose en xylose) fermenteren. Door deze eigenschap worden *B. bruxellensis* en *S. stipitis* geschikt geacht voor industriële productie van bio-ethanol.

Er zijn bij de COGEM geen aanwijzingen bekend dat *B. bruxellensis* en *S. stipitis* pathogeen zijn voor mens, dier of plant. Zij adviseert daarom om *B. bruxellensis* en *S. stipitis* 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

*Dit advies is mede tot stand gekomen met inbreng van Dr. J. Houbraken van het Westerdijk Fungal Biodiversity Institute.*

# Pathogeniteitsclassificatie van de gisten *Brettanomyces bruxellensis* en *Scheffersomyces stipitis*

## COGEM advies CGM/170810-01

### 1. Inleiding

De COGEM is naar aanleiding van een verzoek van de Technische Universiteit Delft (IG 17-115 en IG 17-116) gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de gisten *Brettanomyces bruxellensis* en *Scheffersomyces stipitis* en over de plaatsing van deze soort op Bijlage 2, lijst A1.

Bijlage 2, lijst A1 maakt deel uit van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen' (Regeling ggo)<sup>1</sup> en bestaat uit een lijst van micro-organismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant. Opname op Bijlage 2, lijst A1 betekent dat onder ML-I laboratorium-condities met het betreffende micro-organisme ggo's vervaardigd mogen worden indien hierbij vectoren worden gebruikt die wél, of inserties die níet, op de A-lijsten staan (lijst A2 veilige vectoren en lijst A3 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 gisten

Gisten behoren tot het rijk van de schimmels (Fungi). Het merendeel van de schimmels, waaronder *B. bruxellensis* en *S. stipitis*, valt binnen de fylya van de Ascomyceten en Basidiomyceten.<sup>2</sup>

Gisten planten zich doorgaans ongeslachtelijk voort en zijn in het giststadium ééncellig. De voortplanting vindt plaats door middel van splijting of knopvorming. Bij knopvorming ('budding') stulpt het cytoplasma van de moedercel uit, en vormt het een knop die verder uitgroeit en uiteindelijk afsnoert. Bepaalde gistsoorten vormen daarnaast ook meercellige schimmeldraden (hyfen). Hieruit kunnen arthroconidia of blastoconidia ontstaan wanneer deze zich in individuele cellen opsplitsen.

Sommige gistsoorten kunnen zich niet alleen ongeslachtelijk, maar onder bepaalde omstandigheden ook geslachtelijk via asco- of basidiosporen voortplanten. Omdat de geslachtelijke (teleomorfe) en ongeslachtelijke (anamorfe) stadia er verschillend uitzien, hebben deze gisten in het verleden verschillende soortnamen gekregen. In 2011 is door het 'International Botanical Congress' besloten dat het tot dan toe gebruikelijke duale nomenclatuursysteem van schimmels zou komen te vervallen en dat vanaf januari 2013 een schimmel slechts één naam mag hebben.<sup>3</sup> Momenteel bevindt het nomenclatuursysteem van schimmels zich in een overgangssituatie waarbij de nieuwe naamgeving nog niet altijd consistent is doorgevoerd. Ook is er nog geen duidelijkheid over welke naam de voorkeur heeft. Meestal wordt de teleomorfe naam aangehouden, maar wanneer de anamorfe naam meer bekendheid heeft, wordt daar soms de voorkeur aan gegeven.

De taxonomie van schimmels (inclusief die van gisten) is hierdoor complex en mede door de toenemende informatie over genoomsequenties aan verandering onderhevig. Dit vraagt om een zorgvuldige identificatie van de te gebruiken schimmelsoort.

### 4. *Brettanomyces bruxellensis*

De ascomycete gist *Brettanomyces bruxellensis* (anamorf) is voor het eerst beschreven als soort nadat het geïsoleerd is uit bier in 1921.<sup>4</sup> Er worden vijf soorten erkend onder het genus *Brettanomyces*; *B. custersianus*, *B. naardenensis*, *B. nanus*, *B. anomalus* en *B. bruxellensis*. Twee van deze vijf soorten, *B. bruxellensis* en *B. anomalus*, hebben een teleomorfe variant (genus *Dekkera*).<sup>5,4</sup> De teleomorfen *Dekkera bruxellensis* en *Dekkera anomalus* kunnen ascosporen produceren.<sup>5,4</sup> De gist *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* staat echter het meest bekend onder de anamorfe naam *Brettanomyces bruxellensis*. Tot op heden zijn er zes verschillende stammen van *B. bruxellensis* gesequenced en geannoteerd (AWRI1499, CBS2499, AWRI1608, AWRI1613, ST05.12/22 en LAMAP2480). De genoomgrootte, chromosoomaantallen en de ploïdie verschillen per stam.<sup>6,7</sup> Verschillende isolaten hebben tussen de 4-9 chromosomen, en een totale genoomgrootte van 20 tot 30

Mbp.<sup>5</sup> *B. bruxellensis* deelt een gemeenschappelijke voorouder met *Saccharomyces cerevisiae*, met een vergelijkbare ecologische niche.<sup>7</sup>

*B. bruxellensis* staat bekend als bederver van wijn. Contaminatie met deze gist tijdens de wijnproductie zorgt voor een nare geur en smaak van de wijn, zelfs in lage concentraties ( $10^3$  cfu/mL)<sup>8</sup>, door de productie van vluchtige fenolen en vinyl-afgeleiden. De gist kan van nature aanwezig zijn op druiven, of aanwezig zijn in de vaten waarin de wijn wordt gemaakt.<sup>5,9</sup> *B. bruxellensis* kan ook in andere alcoholische dranken voorkomen, zoals bier en cider. Voor bier heeft aanwezigheid van de gist echter een positieve uitwerking op de smaak van het product.<sup>5</sup> *B. bruxellensis* bezit bepaalde eigenschappen waardoor deze gist goed kan functioneren en groeien in de omstandigheden die nodig zijn voor de wijnproductie. Zo kan *B. bruxellensis* onder andere groeien onder anaerobe condities, als koolstofbron zowel koolhydraten (voor fermentatie onder aerobe condities), als ethanol gebruiken (wanneer koolhydraten schaars zijn<sup>4</sup>), en lage zuurgraden (pH 3-4) tolereren. De gist kan poly-, di-, en monosacchariden afbreken en fermenteren, zoals cellulose, cellobiose, maltose en glucose.<sup>5,6</sup> *B. bruxellensis* heeft een optimale groeitemperatuur tussen de 19-35°C, maar tolereert ook hogere temperaturen van 40°C.<sup>10,11</sup> Door deze eigenschappen wordt *B. bruxellensis* bestempeld als een mogelijk alternatief voor de productie van bioethanol.<sup>5,6</sup>

### 5. *Scheffersomyces stipitis*

De ascomycete gist *Scheffersomyces stipitis* staat voornamelijk bekend onder de oude naam *Pichia stipitis*. Gebaseerd op overeenkomsten in ribosomale RNA sequenties zijn *P. stipitis* samen met *Pichia segobiensis*, en een aantal *Candida* soorten geclustered en ingedeeld in het nieuwe genus *Scheffersomyces*.<sup>12,13</sup> Het genoom van *S. stipitis* is in 2007 gepubliceerd.<sup>14</sup> *S. stipitis* heeft 8 chromosomen en een genoom van ongeveer 15,4 Mbp.<sup>15</sup>

*S. stipitis* kan onder andere xylose, xylaan en cellobiose fermenteren. Omdat deze fermentatie een belangrijk proces is in de omzetting van (ligno)cellulose naar ethanol, kan deze gist mogelijk voor biotechnologische toepassingen ingezet worden.<sup>14</sup> *S. stipitis* kan vrijwel niet onder anaerobe omstandigheden groeien<sup>15,16</sup> en tolereert temperaturen van 35°C.<sup>17</sup> De meeste *S. stipitis* en andere giststammen zijn geïsoleerd uit darmstelsels van larven en insecten die op hout voorkomen. Er wordt gedacht dat deze gisten in het darmstelsel van de insecten poly-, di-, en monosacchariden fermenteren.<sup>14,18</sup>

### 6. Eerder COGEM advies en classificaties van andere instanties

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over handelingen met *Brettanomyces bruxellensis* en *Scheffersomyces stipitis*. Ook is er niet eerder geadviseerd over andere soorten in het genus *Brettanomyces*, *Dekkera* of *Scheffersomyces*. Wel heeft de COGEM meerdere soorten uit het genus *Pichia*, waartoe *S. stipitis* voorheen behoorde, ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.<sup>19</sup>

Enkele buitenlandse instanties hebben deze twee gisten reeds geclassificeerd. De 'American Type Culture Collection' (ATCC) heeft werkzaamheden met *B. bruxellensis* en *S. stipitis* ingeschaald op het laagste veiligheidsniveau BSL-1.<sup>20</sup> De ATCC stelt dat organismen ingedeeld in BSL-1 niet pathogeen zijn voor de mens. Het 'Westerdijk Institute Fungal Biodiversity Centre' heeft werkzaamheden met *D. bruxellensis* en *S. stipitis* ingeschaald op BSL-1 niveau.<sup>21</sup> De Duitse 'Bundesanstalt für Arbeitsschutz

und Arbeitsmedizin' (BAuA, federaal instituut) heeft beide gisten ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.<sup>22</sup> De inschaling door deze buitenlandse instanties geldt als referentie en achtergrondinformatie bij de risicobeoordeling die door de COGEM wordt uitgevoerd.

## 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.

Voor zover bij de COGEM bekend, zijn er geen publicaties waarin melding wordt gemaakt dat *B. of D. bruxellensis* en *P. of S. stipitis* pathogeen zijn voor mens, dier of plant. Ook zijn er bij de COGEM geen publicaties bekend waarin melding wordt gemaakt dat de gisten over toxische eigenschappen beschikken. Bekend is dat sommige stammen van *B. bruxellensis* biogene aminen kunnen produceren in lage concentraties.<sup>23,24</sup> Biogene aminen worden van nature aangemaakt in het menselijk lichaam (bijvoorbeeld histamine) en komen ook vaak voor als bijproduct van fermentatie in (bewerkte) voedingsmiddelen en alcoholische dranken, zoals bier. Deze stoffen kunnen in hoge concentraties gezondheidsklachten geven. Er is echter niet bekend in welke concentratie de aanwezigheid van biogene aminen toxisch is. *B. bruxellensis* komt voor in traditionele biersoorten, zoals Geuze en Lambiek, en wordt al jaren geconsumeerd.<sup>4</sup> Er zijn geen gevallen in de literatuur bekend van toxische of nadelige effecten van *B. bruxellensis* bij de mens of bij dieren. In de 'Atlas of Clinical Fungi', het naslagwerk met alle klinisch relevante schimmels, staan *B. of D. bruxellensis* en *P. of S. stipitis* ook niet vermeld als pathogene schimmels/gisten.<sup>25</sup> Verder staan de gisten niet vermeld als plantpathogenen in 'online databases' met informatie over schimmelsoorten die ziekten bij planten veroorzaken.<sup>26,27,28,29,30,31</sup>

Het voorgaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat *B. bruxellensis* en *S. stipitis* niet pathogeen zijn voor mens, dier en plant. Zij adviseert daarom deze gisten in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Tevens adviseert de COGEM om *B. bruxellensis* en *S. stipitis* 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: 1 augustus, 2017)
2. James TY *et al.* (2006). Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818-822
3. Hawksworth DL (2011). A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *IMA Fungus* 2:155-162
4. Steensels J *et al.* (2015). *Brettanomyces* yeasts – From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 206: 24-38

5. Smith BD & Divol B (2016). *Brettanomyces bruxellensis*, a survivalist prepared for the wine apocalypse and other beverages. *Food Microbiol.* 59: 161-175
6. Godoy L *et al.* (2017). Genomics perspectives on metabolism, survival strategies, and biotechnological applications of *Brettanomyces bruxellensis* LAMAP2480. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 27: 147-158
7. Curtis CD & Pretorius IS (2014). Genomic insights into the evolution of industrial yeast species *brettanomyces bruxellensis*. *FEMS Yeast rev.* 14: 997-1005
8. Van Wyk S & Silva FVM (2017). High pressure inactivation of *Brettanomyces bruxellensis* in red wine. *Food Microbiol.* 63: 199-204
9. Renouf V *et al.* (2007). Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 149-164
10. Schifferdecker AJ *et al.* (2014). The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. *Yeast* 31: 323-332
11. Westerdijk Fungal Biodiversity Centre. CBS strain database. CBS 2499, *Dekkera bruxellensis*. [http://www.westerdijk.nl/Collections/BioloMICS.aspx?Table=CBS strain database&Rec=1324&Fields=All](http://www.westerdijk.nl/Collections/BioloMICS.aspx?Table=CBS%20strain%20database&Rec=1324&Fields=All) (bezoekt: 1 augustus, 2017)
12. Kurtzman CP & Suzuki M (2010). Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. *Mycoscience* 51: 2-14
13. Kurtzman CP & Robnett CJ (2013). Relationships among genera of the Saccharomycotina (Ascomycota) from multigene phylogenetic analysis of type species. *FEMS Yeast Res.* 13: 23-33
14. Jeffries TW *et al.* (2007). Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipites*. *Nat. Biotechnol.* 25: 319-326
15. Chung BKS *et al.* (2013). Metabolic reconstruction and flux analysis of industrial *Pichia* yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 1865-1873
16. Papini M *et al.* (2012). *Scheffersomyces stipitis*: a comparative systems biology study with the Crabtree positive yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* 11: 136. doi: 10.1186/1475-2859-11-136
17. Westerdijk Fungal Biodiversity Centre. CBS strain database. CBS 5774, *Scheffersomyces stipites*. [http://www.westerdijk.nl/Collections/BioloMICS.aspx?Table=CBS strain database&Rec=2573&Fields=All](http://www.westerdijk.nl/Collections/BioloMICS.aspx?Table=CBS%20strain%20database&Rec=2573&Fields=All) (bezoekt: 1 augustus, 2017)
18. Jeffries TW & van Vleet JR (2009). *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. *FEMS Yeast Res.* 9: 793-807
19. COGEM (2014). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal apathogene en pathogene schimmels. COGEM advies CGM/141218-03
20. American Type Culture Collection (ATCC). <https://www.lgcstandards-atcc.org/> (bezoekt: 31 juli, 2017)
21. Westerdijk Fungal Biodiversity Centre. CBS strain database. <http://www.westerdijk.nl/Collections/Biolomics.aspx?Table=CBS%20strain%20database> (bezoekt: 1 augustus, 2017)
22. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA). Technische Regel für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA 460) <https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische>

- [Regeln/Regelwerk/TRBA/pdf/TRBA-460.pdf?\\_blob=publicationFile&v=2](#) (bezocht: 10 augustus, 2017)
23. Vigentini I *et al.* (2008). Physiological and oenological traits of different *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strains under winde-model conditions. *FEMS Yeast Res.* 8: 1087–1096
  24. Caruso M *et al.* (2002). Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeast. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 159-163
  25. Hoog de GS *et al.* (2014). Atlas of Clinical Fungi, Atlas version 4.1.4, 4e editie
  26. USDA ARS Fungal database. <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> (bezocht: 31 juli, 2017)
  27. American Phytopathological Society (APS). [www.apsnet.org/SearchCenter/Pages/results.aspx](http://www.apsnet.org/SearchCenter/Pages/results.aspx) (bezocht: 31 juli, 2017)
  28. Animal and Plant health Inspection Service (APHIS). [www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome](http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome) (bezocht: 31 juli, 2017)
  29. Plant-Host Interactions, PHI-base. <http://www.phi-base.org/searchFacet.htm?queryTerm=brettanomyces+bruxellensis> (bezocht: 31 juli, 2017)
  30. Mycobank. Fungal Databases, Nomenclature & Species Banks. [www.mycobank.org](http://www.mycobank.org) (bezocht: 31 juli, 2017)
  31. Q-Bank. Comprehensive databases on quarantine plant pests and diseases. [www.q-bank.eu/Fungi/](http://www.q-bank.eu/Fungi/) (bezocht: 31 juli, 2017)