

Aan de minister van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
Mevrouw dr. J.M. Cramer
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 31 januari 2008
KENMERK CGM/080131-05
ONDERWERP Advies Classificatie van een vijftal schimmelsoorten

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de classificatie van een vijftal schimmels (IG 05-113/04) deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren in welke pathogeniteitsklasse de schimmelsoorten *Aspergillus sojae*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Glarea lozoyensis* en *Chrysosporium lucknowense* ingedeeld moeten worden. Tevens is de COGEM verzocht te adviseren over het inperkingsniveau waarop werkzaamheden met deze schimmels ingeschaald dienen te worden en over de mogelijke plaatsing van deze micro-organismen in Bijlage 1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo). Bijlage 1 bestaat uit een lijst van micro-organismen die in principe niet pathogeen zijn voor mens, dier of plant. Met de micro-organismen die in Bijlage 1 zijn opgenomen, mag onder bepaalde voorwaarden op het laagste inperkingsniveau ML-I gewerkt worden.

De aanvrager wil de bovenstaande schimmelsoorten transduceren met verschillende genen, waarbij gezocht wordt naar genen die betrokken zijn bij DNA recombinatie. Eventuele genetische gevolgen die de introductie van deze genen teweegbrengt, zullen in kaart worden gebracht.

De COGEM is van mening dat de hierboven genoemde schimmelsoorten niet pathogeen zijn voor mens, dier en plant. Zij adviseert daarom deze vijf schimmels in de laagste pathogeniteitsklasse (klasse 1) in te delen. De COGEM acht het risico voor mens en milieu verwaarloosbaar klein bij uitvoering van de bovengenoemde werkzaamheden op het laagste inperkingsniveau ML-I.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,



Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c. Dr. D.C.M. Glandorf
Dr. I. van der Leij

Dit advies is mede tot stand gekomen door de inbreng van Dr. T. Boekhout werkzaam bij het Centraal Bureau voor Schimmelcultures.

Classificatie van een vijftal schimmelsoorten

COGEM advies CGM/080131-05

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren in welke pathogeniteitsklasse de schimmelsoorten: *Aspergillus sojae*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Glarea lozoyensis* en *Chrysosporium lucknowense* ingedeeld dienen te worden. Tevens is de COGEM verzocht te adviseren over het inperkingsniveau waarop de door de aanvrager voorgenomen werkzaamheden met deze schimmels ingeschaald moeten worden en over de plaatsing van deze micro-organismen op Bijlage 1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo) (1).

In de Regeling ggo worden 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.

Bijlage 1 is een lijst van micro-organismen die in principe niet pathogeen (apathogeen) zijn voor mens, dier of plant. Deze bijlage is voor vergunningaanvragers van belang omdat met deze micro-organismen onder bepaalde voorwaarden op het laagste inperkingsniveau, ML-I, gewerkt mag worden. Dit is toegestaan wanneer voor het vervaardigen van het ggo een veilig geachte vector gebruikt wordt en zich in deze vector geen insertie bevindt die een potentieel gevaar voor mens en milieu vormt (1). Voorbeelden van potentieel 'gevaarlijke' inserties zijn genen die coderen voor toxines, virulentie- of pathogeniteitsfactoren en virale en cellulaire oncogenen.

Organismen die op bijlage 1 vermeld staan, voldoen in ieder geval aan één van de volgende criteria (1):

- 1) Het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant.
- 2) Het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen zijn getroffen.
- 3) Het micro-organisme behoort tot een soort die wel vertegenwoordigers bevat van klasse 2, 3 of 4, maar de stam in kwestie bevat geen genetisch materiaal dat verantwoordelijk is voor de virulentie.
- 4) Het niet-virulente karakter van het micro-organisme is door middel van adequate tests aangetoond.

In de huidige inschalingspraktijk wordt een micro-organisme als pathogeen gezien als deze bij immuuncompetente mensen een ziekte kan veroorzaken. Opportunistische

pathogenen, die een ziekte kunnen veroorzaken bij immuungecompromiteerde individuen, worden als niet pathogeen (apathogeen) beschouwd en kunnen op bijlage 1 geplaatst worden.

Overweging

In onderstaande overweging wordt voor ieder schimmelsoort afzonderlijk uiteengezet waarom desbetreffende schimmels volgens de COGEM in de aangegeven pathogeniteitsklasse thuishoren. In de praktijk is het onderscheid tussen een apathogeen en een opportunistisch pathogeen niet scherp gedefinieerd. Een opportunistisch pathogeen kan een ziekte veroorzaken in personen met een verzwakt immuunsysteem. De vraag is echter wanneer er sprake is van een daadwerkelijk verzwakt immuunsysteem. In onderstaand advies zijn deze overwegingen meegewogen in het uiteindelijke oordeel.

Aspergillus sojae

Aspergillus sojae behoort binnen de *Ascomycota* tot de familie van de *Trichocomaceae*. Binnen het genus *Aspergillus* treft men soorten aan die toxines produceren, zogenaamde aflatoxines, maar ook soorten die deze aflatoxines niet produceren. Aflatoxines worden in verband gebracht met carcinogenese (2). *Aspergillus* soorten staan aan de ene kant bekend om hun giftige bederf van voedsel en veevoeder en worden aan de andere kant algemeen gebruikt voor de productie van enzymen en chemicaliën.

A. sojae behoort tot de soorten die geen aflatoxines kunnen produceren. Deze schimmelsoort bezit weliswaar het genencluster dat verantwoordelijk is voor de productie van aflatoxine, maar het is door een puntmutatie in het regulatoire gen (*AflR*), dat betrokken is bij de productie van aflatoxine niet meer in staat aflatoxine te produceren (3).

Azië kent een lange traditie van veilig gebruik van schimmelcultures zoals *A. sojae* voor de productie van gefermenteerd voedsel als sake en sojasaus. De consumptie van deze gefermenteerde producten wordt in Japan als veilig beschouwd (4).

In de literatuur bestaan geen aanwijzingen dat *A. sojae* pathogeen is voor planten, dieren of mensen.

De 'American Type Culture Collection' (ATCC) en de 'Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen' (DSMZ) heeft *A. sojae* ingedeeld als een organisme van pathogeniteitsklasse 1 (5, 6).

Gezien het bovenstaande adviseert de COGEM *A. sojae* als apathogeen micro-organisme te classificeren (pathogeniteitsklasse 1).

Trichoderma harzianum

De ascomyceet *Trichoderma harzianum* behoort tot de familie van de *Hypocreaceae*. Deze schimmel komt algemeen voor in de bodem, op plantenmateriaal, ontbindende

vegetatie en hout (7). In huizen wordt *T. harzianum* algemeen aangetroffen op muren en in stof op de grond (8). De schimmel wordt echter nauwelijks aangetroffen in de lucht. Het organisme komt voornamelijk voor als saprofyt, maar kan ook parasiteren op andere schimmels. *T. harzianum* wordt veel gebruikt als zogenaamd bio-control agens voor verschillende plantpathogene schimmels (9).

Er zijn bij de COGEM geen publicaties bekend waaruit blijkt dat *T. harzianum* pathogeen is voor planten.

Voor zoogdiercellen zijn er *in vitro* enkele nadelige effecten van een infectie door *T. harzianum* waargenomen (10, 11 en 12). *In vivo* heeft een kortdurende blootstelling van mensen aan een hoge concentratie sporen van deze schimmel echter geen klinisch effect (13). Een infectie van mensen door *Trichoderma* is zeer zeldzaam en beperkt zich tot gelocaliseerde infecties (14 en 16). In de literatuur zijn slechts twee gevallen gerapporteerd van een schimmelinfectie door *T. harzianum* in mensen. In het eerste geval veroorzaakte de schimmel een buikvliesontsteking in een patiënt die door nierproblemen een continue buikdialyse onderging (17). In het andere geval betrof het een infectie van een immuungecompromiteerde patiënt na een niertransplantatie (18). In beide gevallen zijn de patiënten overleden.

T. harzianum wordt door de ATCC, de DSMZ en het 'Centraalbureau voor Schimmelcultures' (CBS) in Nederland beschouwd als een organisme van pathogeniteitsklasse 1 (5, 6 en 15).

Hoewel *T. harzianum* algemeen voorkomt in onze woonomgeving, blijkt de frequentie waarmee mensen met deze schimmels geïnfecteerd worden zeer laag. Bovendien worden alleen mensen met een verzwakte gezondheid getroffen door een dergelijke infectie. De COGEM is daarom van mening dat *T. harzianum* beschouwd dient te worden als een opportunistisch pathogeen. Zij merkt hierbij op dat *T. harzianum* wel pathogeen is voor andere schimmelsoorten. Micro-organismen in de Regeling ggo worden echter ingeschaald op basis van pathogeniteit voor mens, dier of plant. Pathogeniteit voor micro-organismen valt hier buiten. Derhalve adviseert de COGEM *T. harzianum* in te delen in pathogeniteitsklasse 1.

Trichoderma viride

Net als *T. harzianum* behoort de ascomycete *T. viride* tot de familie van de *Hypocreaceae* en kan het worden gebruikt als antagonist om gewassen te beschermen tegen schimmels (8, 19 en 20). *T. viride* wordt vaak aangetroffen in de lucht en is een van de meest wijdverspreid voorkomende bodemschimmels. Deze saprofytische schimmel komt voor op plantenmateriaal zoals hooi, stro en zaden (8).

Er zijn de COGEM geen wetenschappelijk studies bekend waaruit blijkt dat *T. viride* pathogeen is voor planten.

In de literatuur zijn vier gevallen gerapporteerd van *T. viride* infecties in mensen. Het betreft twee patiënten met een infectie van de longen, één patiënt met een buikvliesontsteking en één met een leverontsteking (14). De longontsteking werd aangetroffen in een patiënt met leukemie en in een patiënt met een chronische longaandoening. Beiden konden worden genezen van deze schimmelinfectie door medische behandeling. De buikvliesontsteking als gevolg van een *T. viride* infectie betrof een 47-jarige man met een continue buikdialyse (16). In het geval van de gerapporteerde leverontsteking was de patiënt immuungecompromiteerd als gevolg van een levertransplantatie.

T. viride wordt door de ATCC, het DSMZ en het CBS beschouwd als een organisme van pathogeniteitsklasse 1 (5, 6 en 15).

T. viride wordt algemeen in onze omgeving aangetroffen. Dit heeft slechts in een beperkt aantal gevallen tot een infectie bij mensen geleid, waarbij het menselijk lichaam met aanwijsbare gezondheidsproblemen. Hierbij vraagt de COGEM zich tevens af of de beschreven infecties ook daadwerkelijk door *T. viride* zijn veroorzaakt, aangezien het groei-optimum van deze schimmelsoort bij 30°C ligt. Bovendien lijken de *Trichoderma* soorten morfologisch sterk op elkaar en is er in geen van de beschreven gevallen moleculaire diagnostiek uitgevoerd om de identiteit van de schimmel te bepalen.

Gezien het bovenstaande concludeert de COGEM dat *T. viride* beschouwd dient te worden als opportunistisch pathogeen. Zij adviseert deze schimmelsoort daarom in te delen in pathogeniteitsklasse 1.

Chrysosporium lucknowense

De schimmel *Chrysosporium lucknowense* behoort binnen de *Ascomycota* tot de familie *Onygenaceae*. Deze schimmelsoort is voor het eerst aangetroffen in een bodemonster afkomstig uit Lucknow in India (21). Deze soort wordt ook aangetroffen op haren en veren van in het wild levende zoogdieren en vogels en wordt daardoor tot de keratinofiele schimmels gerekend (22). *C. lucknowense* produceert een breed scala aan enzymen die de biodegradatie van cellulose, hemicellulose en andere polysaccharides katalyseren. (23). Hierdoor vormt het een interessant alternatief voor bekende schimmels als *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* en *Trichoderma reesei* voor grootschalige eiwit productie (24). *C. lucknowense* wordt door de ATCC ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1 (5).

De COGEM heeft geen aanwijzingen dat *C. lucknowense* in verband kan worden gebracht met infecties van dieren of mensen. Tevens zijn er geen aanwijzingen gevonden om aan te nemen dat *C. lucknowense* als plantenpathogeen aangemerkt dient te worden.

Concluderend is de COGEM daarom van mening dat *C. lucknowense* geklassificeerd dient te worden als apathogeen microorganisme (pathogeniteitsklasse 1).

Glarea lozoyensis

Glarea lozoyensis behoort binnen de *Ascomycota* tot de familie van de *Incertae sedis* en was oorspronkelijk bekend onder de naam *Zalerion arboricola* (25). Deze schimmel werd als eerste geïsoleerd uit de stam van een conifeer (26). *G. lozoyensis* staat met name onder aandacht doordat deze schimmel zogenaamde pneumocandins produceert. Dit zijn anti-schimmel verbindingen die *in vivo* werken tegen schimmelinfecties van *Pneumocystis*, *Candida* en *Aspergillus* (27, 28).

G. lozoyensis wordt door de ATCC ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1 (5).

Bij de COGEM zijn geen gegevens bekend die *G. lozoyensis* in verband zouden kunnen brengen met pathogeniteit in plant, mens of dier. Zij is dan ook van mening dat deze schimmelsoort als apathogeen geclassificeerd dient te worden en adviseert deze schimmelsoort in te delen in pathogeniteitsklasse 1.

Advies

Op basis van bovenstaande overwegingen is de COGEM van mening dat geen van de schimmelsoorten: *A. sojae*, *T. harzianum*, *T. viride*, *G. lozoyensis* en *C. lucknowense* pathogeen is voor mens, dier of plant. Deze schimmels kunnen derhalve als micro-organismen van pathogeniteitsklasse 1 aangemerkt worden. Opgemerkt dient te worden dat *T. harzianum* wel pathogeen is voor andere schimmels. Uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden met deze vijf schimmels op het laagste inperkingsniveau (ML-I) acht de COGEM voldoende om het risico voor mens en milieu verwaarloosbaar klein te houden.

Gezien het niet pathogene karakter van *A. sojae*, *T. viride*, *G. lozoyensis* en *C. lucknowense* acht de COGEM het gerechtvaardigd om deze organismen in Bijlage 1 van de Regeling GGO op te nemen. Door het pathogene karakter van *T. harzianum* voor andere schimmels, doet de COGEM echter geen uitspraak over eventuele plaatsing van *T. harzianum* op Bijlage 1. De COGEM zal ingaan op deze vraag bij de voorgenomen herziening van Bijlage 1. Bij deze herziening zullen ook de criteria voor opname in Bijlage 1 worden betrokken.

Referenties

1. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. Mei 2004
2. Creppy EE (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol. Lett.* **127**: 19-28
3. Chang PK, Matsushima K *et al.* (2007). Understanding nonaflatoxicogenicity of *Aspergillus sojae*: a windfall of aflatoxin biosynthesis research *Appl. Microbiol Biotechnol.* **76**: 977-984
4. European Food Safety Authority (2008-01-25) Annex 6: Assessment of filamentous fungi with respect to a Qualified Presumption of Safety http://efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753824_1178620759439.htm
5. American Type Culture Collection (2008-01-28) <http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/fungiYeast/fungiYeastIndex.cfm>
6. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (2008-01-28) http://www.dsmz.de/microorganisms/fungus_catalogue.php
7. Snavely SL and Hornby M (eds) (1996) Fundamentals of the fungi
8. Madsen AM, Hansen VM *et al.* (2007) Human exposure to airborne fungi from genera used as biocontrol agents in plant production. *Ann. Agric. Environ. Med.* **14**: 5-24
9. Harman GE, Howell CR *et al.* (2004) *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts *Nature reviews Microbiol.* **2**: 43-56
10. Allerman L, Wilkins CK *et al.* (2006) Inflammatory potency of dust from the indoor environment and correlation to content of NAGase and fungi. *Toxicol. In Vitro* **20**: 1522-1531
11. Peltola J, Andersson, MA *et al.* (2001) Toxic-metabolite-producing bacteria and fungus in an indoor environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3269-3274
12. Peltola J, Ritieni A *et al.* (2004) Biological effects of *Trichoderma harzianum* peptaibols on mammalian cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4996-5004
13. Meyer HW, Jensen KA *et al.* Double blind placebo controlled exposure to molds: exposure system and clinical results. *Indoor Air* **15(suppl 10)**: 73-80
14. De Miguel D, Gomez P *et al.* (2005) Nonfatal pulmonary *Trichoderma viride* infection in an adult patient with acute myeloid leukemia: report of one case review of the literature. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **53**: 33-37
15. Centraalbureau voor Schimmelcultures (2008-01-28) <http://www.cbs.knaw.nl/databases/>
16. Chouaki T, Lavarde V *et al.* (2002) Invasive infections due to *Trichoderma* species: report of 2 cases, findings of in vitro susceptibility testing, and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* **35**: 1360-1367

17. Guiserix J, Ramdane M *et al.* (1996) *Trichoderma harzianum* peritonitis in peritoneal dialysis. *Nephron* **74**: 473-474
18. Guarro J, Antolin-Ayala MI *et al.* (1999) Fatal case of *Trichoderma harzianum* infection in a renal transplant recipient *J. Clin. Microbiol.* **37**:3751-3755
19. Bankole SA en Adebajo A. (1996) Biocontrol of brown blotch of cowpea caused by *Colletotrichum truncatum* wit *Trichoderma viride*. *Crop. Protection* **15**: 633-636
20. Coventry A, Noble R *et al.* (2006) Allium whit rot suppression with composts and *Trichoderma viride* in relation to *Sclerotia* viability *Phytopathology* **96**: 1009-1020
21. Garg AK. (1966) An addition to the genus *Chrysosporium* corda. *Mycopath. Mycol. Appl.* **30**: 221-224
22. Kushwaha RKS en Guarro J. (eds) (2000) Biology of dermatophytes and other keratophilic fungi. *Revista Iberoamericana de Micología* 93-103
23. Gusakov AV, Antonov AI en Ustinov BB. (2007) N-Glycosylation in *Chrysosporium lucknowense* enzymes. *Carbohydr. Res.* doi:10.1016/j.carres.2007.10.014
24. Visser H, Punt P *et al.* (2007) *Chrysosporium lucknowense* is a versatile fungal host for gene discovery and protein production. *J. Biotechnol.* **131S**: S221
25. Bills GF, Platas G (1999) Reclassification of a pneumocandin-producing anamorph, *Glarea lozoyensis* gen. et sp. nov., previously identified as *Zalerion arboricola*. *Mycol. Res.* **103**: 179-192
26. Buczacki ST (1972) *Trans. Br. Mycol. Soc.* **59**: 159-161
27. Kelly R, Register E en Sosa M. (1994) Heterologous transformation of *Zalerion arboricola*. *Curr. Genet.* **26**: 217-224
28. Schmatz DM, Romancheck MA *et al.* (1990) Treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia with 1,3-beta-glucan synthesis inhibitors *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 5950-5954

Dit advies is mede tot stand gekomen door de inbreng van Dr. T. Boekhout werkzaam bij het Centraal Bureau voor Schimmelcultures.