

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

DATUM 7 mei 2008
KENMERK CGM/080507-01
ONDERWERP Werkzaamheden met *Aspergillus vadensis*

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag met de titel “Klonering van DNA uit Klasse I (niet-pathogene) fungi en zoogdieren in *Aspergillus* species en *Mucor miehei*” van DSM Anti-Infectives B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met de schimmel *Aspergillus vadensis*. Gevraagd wordt of deze soort beschouwd kan worden als een zogenaamd klasse 1 organisme; dit zijn niet-ziekteverwekkende organismen. Daarnaast wordt gevraagd of een mutant van *A. vadensis* erkend kan worden als IAB gastheer. Werkzaamheden (bijvoorbeeld grootschalige productie) met gastheren met een dergelijke erkenning mogen op een laag inperkingniveau plaatsvinden.

A. vadensis is nauw verwant aan *A. foetidus*, *A. tubingensis* en *A. niger* en is pas enkele jaren geleden als aparte soort beschreven. *A. vadensis* vormt geen mycotoxines. Daarnaast behoort deze soort tot een groep van Aspergilli die in het algemeen geen virulent karakter bezitten. Slechts van *A. niger* is in de literatuur beschreven dat deze secundaire of opportunistische infecties bij de mens kan veroorzaken. De COGEM is daarom van mening dat *A. vadensis* als klasse 1 organisme beschouwd kan worden. Derhalve kunnen handelingen met deze soort op inperkingniveau ML-I plaatsvinden.

De mutant van *A. vadensis* is voor zijn overleving en reproductie afhankelijk van toevoeging van uridine, dat belangrijk is bij de vorming van erfelijk materiaal. Wanneer de schimmel in het milieu terecht zou komen, is deze niet in staat om zelf uridine te verkrijgen. De COGEM is daarom van mening dat deze mutant biologisch ingeperkt is. Zodoende acht zij het mogelijk om deze mutant te erkennen als IAB gastheer zonder dat bij werkzaamheden de veiligheid van mens en milieu in gevaar komt.

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

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

Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs
Dr. I. van der Leij

Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Aspergillus vadensis*

COGEM advies CGM/080507-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met de schimmel *Aspergillus vadensis*. De aanvrager beschikt reeds over een vergunning voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Aspergillus* soorten onder inperkingsniveau ML-I en wil daar twee stammen van *A. vadensis* aan toevoegen. De aanvrager verzoekt tevens één van deze stammen te erkennen als zogenaamd IAB organisme. Verderop in het advies zal nader op deze erkenning ingegaan worden.

Kenmerken van het micro-organisme

A. vadensis wordt pas recentelijk als aparte soort onderscheiden. Hieronder wordt daarom in eerste instantie kort ingegaan op enkele kenmerken van het geslacht *Aspergillus*. Hierbij worden ook enkele kenmerken van nauw verwante soorten van *A. vadensis* besproken. Daarna wordt de soort *A. vadensis* behandeld, waarbij tevens de door de aanvrager gehanteerde mutant van *A. vadensis* aan de orde komt.

Het *Aspergillus* geslacht

Het geslacht *Aspergillus* bestaat uit vele verschillende soorten die sporenvormend zijn. Via sporen is een schimmel in staat om zich asexueel voort te planten. In de natuur komen Aspergilli veelvuldig voor, alwaar ze groeien op organisch materiaal, zoals grond of compost. Hoewel *Aspergillus* soorten over het algemeen geen plantpathogenen zijn, zijn ze wel in staat om op planten te groeien (5).

Het geslacht *Aspergillus* wordt op basis van de kleur van de kolonies onderverdeeld in verschillende groepen. *A. vadensis* behoort tot de zogenaamde zwarte sectie, de *Aspergillus* sectie *Nigri*. Ook de aan *A. vadensis* nauw verwante soorten *A. niger*, *A. tubingensis* en *A. foetidus* behoren tot deze sectie (2;6). Schimmels uit deze groep zijn over het algemeen niet virulent voor de mens (5). *A. niger* wordt bijvoorbeeld beschouwd als niet-pathogeen. In gezonde personen is de *port d'entree* het ademhalings- en het darmstelsel. De mens wordt elke dag blootgesteld aan de sporen van deze schimmel, bijvoorbeeld doordat de schimmel overleeft op vochtige muren in binnenmilieus, zonder dat ziekteverschijnselen opgemerkt worden (2). Echter, in uitzonderlijke gevallen kan de schimmel via wonden in de huid of het slijmvlies het lichaam binnenkomen en infecties veroorzaken (2). In dit geval treden vooral secundaire of opportunistische infecties op (2). Voor zover bekend bij de COGEM, zijn er geen gevallen beschreven van infecties

veroorzaakt door *A. tubingensis* en *A. foetidus*, welke morfologisch identiek zijn aan elkaar (5).

Sommige soorten die niet behoren tot de zwarte sectie, waaronder *A. fumigatus* en *A. flavus*, kunnen ernstige ziekten bij de mens veroorzaken (1). Gezonde mensen zijn echter weinig gevoelig voor infecties met *Aspergillus*; infecties zijn vooral opportunistisch van aard (1,2). Verder produceren sommige *Aspergillus* soorten mycotoxines, onder meer aflatoxines en ochratoxine. Bepaalde type aflatoxines zijn carcinogeen voor de mens (3). Daarnaast is het nefrotoxische, immunotoxische ochratoxine geïdentificeerd als mogelijk carcinogeen voor de mens (3;4). Ongeveer 6% van de isolaten van *A. niger* is in staat om ochratoxine A te produceren (2).

De ‘zwarte Aspergilli’ worden vaak gebruikt in de fermentatieindustrie, zoals bij de productie van wijn (8). Verder wordt een aantal van deze Aspergilli veelvuldig gebruikt voor de grootschalige productie van bijvoorbeeld metabolieten en extracellulaire eiwitten (7). Een probleem bij de industriële productie met behulp van *Aspergillus* soorten is de vorming van extracellulaire proteases welke het gewenste eiwit afbreken (7).

Kenmerken van *A. vadensis*

Pas in 2004 werd *A. vadensis* voor het eerst beschreven als afzonderlijke soort (6,7). De schimmel werd tot die tijd ingedeeld als *Aspergillus awamori* (5). Na een uitvoerige analyse, bleek dat stammen van deze soort bijna allemaal behoorden tot de soorten *A. niger*, *A. tubingensis* of *A. foetidus* (5). Op basis van moleculaire, biochemische en morfologische kenmerken bleek *A. vadensis* nauw verwant te zijn aan deze soorten, maar niet identiek (6). Sindsdien wordt *A. vadensis* gezien als een nieuwe soort (6).

A. vadensis is in staat om bij 37°C te groeien en kan sporen vormen (5,7). Of dit daadwerkelijk optreedt, is echter afhankelijk van de kweekcondities (5). *A. vadensis* vormt geen mycotoxines (5;7). *A. vadensis* is zeer aantrekkelijk voor de industrie onder meer vanwege de zeer lage (of zelfs afwezige) productie van proteases (7).

De aanvrager wil gebruik maken van twee *A. vadensis* stammen, te weten het wildtype CBS113.365 en de mutant CBS113.226. De laatste stam betreft een zogenaamde *pyrA* mutant welke verkregen is door UV bestraling (7). Deze schimmel mist daardoor een functioneel *pyrA* gen. Het *pyrA* gen codeert normaliter voor een enzym dat betrokken is bij de uridine synthese (7). Uridine is belangrijk voor de vorming van erfelijk materiaal. Om een dergelijke mutant goed te laten groeien dient uridine (of uracil) aan het kweekmedium te worden toegevoegd (5;7). Dit betekent dat de overlevings- en reproductiekansen buiten de specifieke kweekomstandigheden beperkt zijn.

De adviesvraag

De aanvrager verzoekt om handelingen met genetisch gemodificeerde *A. vadensis* te kunnen uitvoeren onder inperkingsniveau ML-I. Het betreft hier de stammen CBS113.365 (wildtype) en de mutant CBS113.226. De COGEM is gevraagd of één van de twee stammen óf de soort *A. vadensis* in aanmerking komt voor inschaling op ML-I niveau en/of erkenning als organisme van klasse 1. Organismen van klasse 1 worden als veilig beschouwd. Om tot deze klasse te behoren, moet een micro-organisme voldoen aan één van de volgende voorwaarden:

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 vertegenwoordigers bevat van klasse 2, 3 of 4, maar de stam in kwestie bevat geen genetisch materiaal dat verantwoordelijk is voor virulentie;
4. Van het micro-organisme is het niet-virulente karakter middels adequate tests aangetoond.

Verder verzoekt de aanvrager om de mutant CBS113.226 te erkennen als IAB gastheer¹. Gastheren met een dergelijke erkenning zijn geschikt bevonden als veilige organismen voor zowel klein- als grootschalige handelingen. Hieruit volgt dat werkzaamheden met een IAB gastheer kunnen plaatsvinden onder een lager inperkingsniveau dan in geval van handelingen met een niet-erkende gastheer. Het is bovendien niet noodzakelijk om een IAB organisme na werkzaamheden af te doden alvorens men zich ervan ontdoet.

Voor een IAB erkenning moet de gastheer voldoen aan de volgende criteria:

- a) De gastheer is veilig gebleken bij langdurig gebruik onder condities van fysische inperking die het GILSP niveau niet te boven gaan (met GILSP wordt bedoeld dat er voldoende blootstelling van medewerkers aan het organisme geweest moet zijn, zonder dat schadelijke gevolgen waargenomen zijn);
- b) De gastheer heeft, als aan a niet wordt voldaan, een ingebouwde, voor het milieu onschadelijke biologische inperking waardoor overleving- en reproductiekansen in het milieu beperkt zijn;
- c) De gastheer mag van nature geen bacteriesporen vormen of is defect sporulerend.

¹ Dit zijn prokaryoten, gisten en schimmels die geschikt zijn voor de vervaardiging van genetisch gemodificeerde organismen behorende tot groep I waarmee zowel activiteiten van categorie A (kleinschalig) als B (grootschalig) mogen plaatsvinden. VROM (2004). Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen.

Overweging en advies

De COGEM is gevraagd te adviseren over handelingen met en inschaling van de schimmel *A. vadensis*. Voor een klasse 1 erkenning dient het organisme aan één van de eerder genoemde criteria te voldoen.

Voorheen werd *A. vadensis* geassocieerd als *A. awamori*. Recentelijk werd *A. vadensis*, na uitvoerige analyse, voor het eerst als afzonderlijke soort beschreven. Verschillende andere stammen van *A. awamori* bleken te behoren tot de soorten *A. niger*, *A. tubingensis* of *A. foetidus*.

Van *A. vadensis* is bekend dat deze geen mycotoxines vormt. Verder treedt sporulatie slechts in beperkte mate op tijdens de kweek (5). Daarnaast behoort *A. vadensis* tot de groep zwarte Aspergilli die in het algemeen geen virulent karakter bezitten. Er zijn geen gevallen bekend van infecties veroorzaakt door *A. tubingensis* of *A. foetidus*; de soorten waarmee *A. vadensis* het sterkst verwant is. Slechts van *A. niger* is in de literatuur beschreven dat deze secundaire of opportunistische infecties bij de mens kan veroorzaken.

Op basis van het bovenstaande, is de COGEM van mening dat de beide tot nu toe beschreven stammen (het wildtype en de *pyrA* mutant) van *A. vadensis* kunnen worden beschouwd als klasse 1 organisme. Dientengevolge, kunnen handelingen met deze schimmel plaatsvinden op ML-I niveau.

De aanvrager verzoekt om de *pyrA* mutant van *A. vadensis* (CBS113.226) te erkennen als IAB gastheer. Dit maakt het mogelijk om het organisme te gebruiken als veilige gastheer voor grootschalige productie. Hierbij is het onder meer belangrijk dat het organisme geen schadelijk effecten veroorzaakt wanneer het in het milieu terechtkomt en/of dat het zich niet kan verspreiden in het milieu

Voor een IAB erkenning dient de *pyrA* stam te voldoen aan de eerder genoemde criteria. CBS113.226 mist het gen *pyrA*, waardoor het niet in staat is om uridine te maken. Voor overleving is een ruime hoeveelheid uridine noodzakelijk. Indien de mutant in het milieu terechtkomt, dient uridine ook daar voorradig te zijn. De *pyrA* mutant zou uridine slechts kunnen verkrijgen uit in het milieu aanwezige eiwitten (5). Echter, een geraadpleegde deskundige wijst erop dat *A. vadensis* geen of zeer lage concentraties proteases produceert, met als gevolg dat eiwitten niet afgebroken kunnen worden (5). De mutant is daarom niet in staat om uridine uit het milieu te verkrijgen (5). Bovendien is deze schimmel zonder uridine niet in staat om sporen te vormen (5). Hiermee wordt voldaan aan het derde criterium voor een IAB erkenning.

Het bovenstaande maakt dat de COGEM van mening is dat de *pyrA* mutant biologisch ingeperkt is. De COGEM acht de kans dat de *pyrA* mutant zich in het milieu zou kunnen

handhaven daarom verwaarloosbaar klein. Gezien dit alles, acht de COGEM het mogelijk om de pyrA mutant CBS113.226 te erkennen als IAB gastheer.

Concluderend is de COGEM van mening dat de soort *A. vadensis* beschouwd kan worden als klasse 1 organisme en dat de pyrA mutant erkend kan worden als IAB gastheer zonder bij werkzaamheden met deze organismen de mens en het milieu in gevaar te brengen.

Referenties

1. Murray, P.R. (2002). Medical microbiology. 4th edition. Mosby, Missouri, Verenigde Staten
2. Schuster, E. *et al.* (2002). On the safety of *Aspergillus niger* – a review. Appl Microbiol Biotechnol 59: 426-435
3. International Agency for Research on Cancer. Internet: <http://www.iarc.fr/> (23 april 2008)
4. Perrone, G. *et al.* (2006). Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. Appl Environ Microbiol. 72(1): 680-5
5. Geraadpleegde externe deskundigen (voor niet gepubliceerde data): R.P. de Vries (Universiteit Utrecht), J. Houbraken (Centraalbureau voor Schimmelcultures) en J.P. Meffert (Plantenziektenkundige Dienst)
6. De Vries, R.P. *et al.* (2005). *Aspergillus vadensis*, a new species of the group of black *Aspergilli*. Antonie Van Leeuwenhoek. 87(3):195-203
7. De Vries, R.P. *et al.* (2004). A new black *Aspergillus* species, *A. vadensis*, is a promising host for homologous and heterologous protein production. Appl Environ Microbiol. 70(7): 3954-9
8. Perrone, G. *et al.* (2006). AFLP characterization of Southern Europe population of *Aspergillus* Section *Nigri* from grapes. Int J Food Microbiol. 111:S22-7