

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
dhr. J.J. Atsma
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 12 september 2012
KENMERK CGM/120912-01
ONDERWERP Advies classificatie van de schimmel *Mortierella alpina*

Geachte heer Atsma,

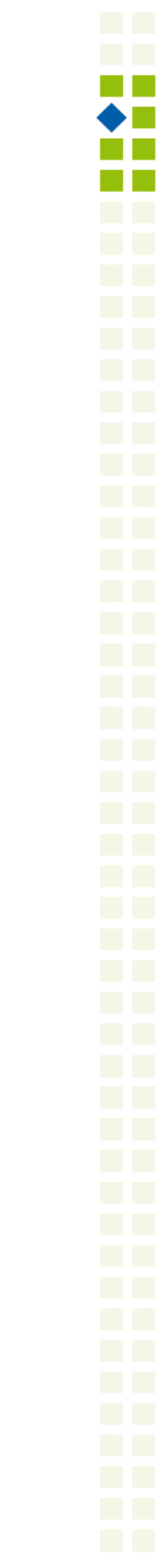
Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 12-059 met de titel 'Genetische modificatie van *Mortierella alpina* stammen (PUF lineage)' van DSM Food Specialities B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over de indeling in pathogeniteitsklasse van de schimmelsoort *Mortierella alpina*. Tevens is zij verzocht te adviseren over het inperkingsniveau waarop de vervaardiging van genetisch gemodificeerde (gg) *M. alpina* ingeschaald dient te worden. De aanvrager wil nieuwe stammen ontwikkelen voor de productie van vetzuren.

M. alpina is een veelvoorkomende bodemschimmel. De schimmel wordt al bijna twintig jaar gebruikt voor de productie van vetzuren. Het organisme is nog nooit in verband gebracht met ziekteverwekkende eigenschappen bij mens, dier of plant. De veiligheid van de schimmel is in ratten geëvalueerd middels orale toxiciteitstudies. Uit deze studies kwamen geen schadelijke effecten naar voren. In de internationale vakliteratuur zijn geen aanwijzingen dat de schimmel toxines produceert. De schimmel produceert een antimicrobiële stof die onder andere werkzaam is tegen bacteriën en schimmels.

Vanwege het jarenlange veilige gebruik van *M. alpina* bij de commerciële productie van vetzuren en het feit dat *M. alpina* niet wordt geassocieerd met ziekteverwekkende eigenschappen bij mens, dier of plant, adviseert de COGEM deze schimmel in te delen in pathogeniteitsklasse 1. De COGEM is verder van mening dat voorgenomen werkzaamheden op ML-I niveau uitgevoerd kunnen worden. Op dit inperkingsniveau acht de COGEM het risico van de beschreven werkzaamheden met *M. alpina* voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.



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. Drs. H.P. de Wijs
Hoofd Bureau GGO

Dr. I. van der Leij
Ministerie IenM

Dit advies is mede tot stand gekomen met inbreng van prof. dr. G.S. de Hoog van het Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Classificatie van de schimmel *Mortierella alpina*

COGEM advies CGM/120912-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd advies uit te brengen over een vergunningaanvraag getiteld 'Genetische modificatie van *Mortierella alpina* stammen (PUF lineage)' van DSM Food Specialties B.V. te Delft. De aanvrager wil nieuwe *M. alpina* productiestammen ontwikkelen voor de productie van vetzuren en andere oleochemische producten. Oleochemische producten zijn hernieuwbare grondstoffen, gemaakt van plantaardige en dierlijke oliën en vetten. De aanvrager wil de handelingen met genetisch gemodificeerd (gg) *M. alpina* op ML-I inperkingsniveau uitvoeren.

De COGEM is gevraagd te adviseren in welke pathogeniteitsklasse de schimmelsoort *M. alpina* ingedeeld dient te worden. Tevens is zij verzocht te adviseren over het inperkingsniveau waarop de vervaardiging van gg- *M. alpina* ingeschaald dient te worden.

Mortierella

M. alpina is een schimmel die behoort tot de familie van de *Mortierellaceae*, genus *Mortierella*. Het genus omvat ongeveer 85 soorten waarvan er 43 geregistreerd staan in het Nederlands soortenregister.¹ De soorten worden niet geassocieerd met pathogeniteit voor mensen, dieren of planten met uitzondering van *Mortierella wolffi*. Deze schimmel is betrokken bij een groot deel van mycotische (door schimmels veroorzaakte) abortussen bij runderen in bepaalde gebieden in Nieuw-Zeeland.²

M. alpina is een veelvoorkomende bodemschimmel die bekend staat om zijn hoge productie van verschillende vetzuren, waaronder arachidonzuur.³ Dit meervoudig onverzadigde vetzuur is essentieel voor de opbouw van membranen van zenuwcellen en daarom belangrijk voor de ontwikkeling van de hersenen. Daarnaast is arachidonzuur een voorloper van verschillende signaalstoffen, waaronder prostaglandinen en leukotriënen.⁴ *M. alpina* wordt sinds 1994 door DSM (voorheen Gist-brocades) gebruikt voor de grootschalige productie van arachidonzuur.

Recent is het genoom van *M. alpina* gesequenced en heeft men verschillende metabole routes in kaart gebracht om een beter begrip te krijgen van het mechanisme van lipide biosynthese in *M. alpina*. Het genoom is ongeveer 38 megabasenparen groot en bevat meer dan 12.000 genen die in 25 functionele categorieën onderverdeeld kunnen worden. Ongeveer 4% van het totale aantal genen codeert voor eiwitten die betrokken zijn bij lipidentransport en metabolisme.⁵

De schimmel produceert voor zover bekend geen mycotoxinen. Wel is sinds een aantal jaar bekend dat de schimmel een secundaire metaboliet genaamd calpinactam produceert.⁶ Deze stof is werkzaam tegen verschillende micro-organismen, waaronder bacteriën en schimmels. Calpinactam remt bijvoorbeeld de groei van *Mycobacterium smegmatis* en *Mycobacterium tuberculosis*.

Voorgenomen werkzaamheden

Voor de ontwikkeling van gg-*M. alpina* worden genen in de schimmel gebracht die coderen voor enzymen die betrokken zijn bij de productie van vetzuren en andere oleochemische producten. Deze genen coderen volgens de aanvrager niet voor schadelijke eiwitten.

Classificatie

De inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen is mede afhankelijk van de pathogeniteitsklasse van het organisme. Derhalve is het voor een correcte inschaling van de werkzaamheden van belang te weten tot welke pathogeniteitsklasse een organisme behoort. Volgens de 'Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen' worden micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen.⁷ 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. De criteria voor indeling in pathogeniteitsklassen zijn als volgt gedefinieerd:

- Een indeling in pathogeniteitsklasse 1 is van toepassing op een micro-organisme dat in ieder geval voldoet aan een van de volgende voorwaarden:
 - het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant;
 - het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen;
 - 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;
 - van het micro-organisme is het niet-virulente karakter middels adequate tests aangetoond.

- Een indeling in pathogeniteitsklasse 2 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat die zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat, alsmede een micro-organisme dat bij planten of dieren ziekte kan veroorzaken.

- Een indeling in pathogeniteitsklasse 3 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen een ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat die zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat.

- Een indeling in pathogeniteitsklasse 4 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich

onder de bevolking verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat.

Eerdere COGEM adviezen

Eind 2011 heeft de COGEM geadviseerd over de classificatie van (a)pathogene schimmels.^{8,9} Hierbij zijn alleen *M. polycephala* en *M. wolfii* meegenomen. Deze soorten werden geclassificeerd als respectievelijk klasse 1 en klasse 2 pathogeen. Door de *American Type Culture Collection* (ATCC) wordt *M. alpina* ingedeeld in risk group 1, en *M. wolfii* in risk group 2.^{10,11} Door de Belgische Bioveiligheidsadviesraad wordt *M. wolfii* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2, de overige *Mortierella* soorten worden hier niet genoemd.¹²

Overweging en advies

M. alpina is alomtegenwoordig in de bodem.¹³ Mensen, dieren en planten worden daardoor veelvuldig blootgesteld aan de schimmel. Het organisme is in de huidige wetenschappelijke literatuur nog nooit in verband gebracht met pathogeniteit voor mens, dier of plant. De maximale overlevingstemperatuur van de schimmel ligt rond de 30 graden Celsius,¹³ terwijl de lichaamstemperatuur van mensen en andere warmbloedige dieren hoger ligt. De schimmel kan zich niet handhaven bij deze hogere temperaturen. In 2009 is de veiligheid van *M. alpina* geëvalueerd middels acute orale en subchronische orale toxiciteitstudies in albino Wistar ratten. Uit deze studie blijkt dat de ratten geen negatieve gevolgen ondervinden na consumptie van verschillende concentraties aan *M. alpina* biomassa gedurende langere tijd.

De schimmel is niet opgenomen in het naslagwerk met alle klinisch relevante schimmels, de 'Atlas of Clinical Fungi'. Er zijn in de internationale vakliteratuur ook geen aanwijzingen dat de schimmel mycotoxinen produceert. Verder wordt *M. alpina* al bijna twintig jaar gebruikt voor de commerciële productie van arachidonzuur als ingrediënt van speciale zuigelingenvoeding. Voor zover bekend is hierbij nog nooit melding gemaakt van *M. alpina* infecties.

Gebaseerd op bovenstaande gegevens beschouwt de COGEM *M. alpina* als apathogeen en adviseert zij deze schimmel in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Gezien de aard van de voorgenomen werkzaamheden is de COGEM van mening dat deze op ML-I niveau uitgevoerd kunnen worden. Op dit inperkingsniveau acht zij het risico van de beschreven werkzaamheden met *M. alpina* voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Nederlands soortenregister. <http://www.nederlandsesoorten.nl/nsr/concept/0FHCYFBDZTQF> (september 2012)
2. Davies JL *et al.* (2010) Systemic infection with *Mortierella wolfii* following abortion in a cow. *Can Vet J.* 51: 1391-3
3. Sakuradani E *et al.* (2009). Improved production of various polyunsaturated fatty acids through filamentous fungus *Mortierella alpina* breeding. *Appl Microbiol Biotechnol.* 84: 1-10

4. Wang L *et al.* (2011). Biochemical characterization of the tetrahydrobiopterin synthesis pathway in the oleaginous fungus *Mortierella alpina*. *Microbiology* 157: 3059-3070
5. Wang L *et al.* (2011). Genome Characterization of the Oleaginous Fungus *Mortierella alpina*. *PLoS One*. 6
6. Koyama N *et al.* (2010). Calpinactam, a new anti-mycobacterial agent, produced by *Mortierella alpina*. *J Antibiot.* 63: 183-6
7. VROM (2004). Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen.
8. COGEM (2011). Classificatie apathogene schimmels. CGM/111024-02
9. COGEM (2011). Classificatie pathogene schimmels. CGM/111024-03
10. ATCC: <http://bit.ly/PKRdKZ> (september 2012)
11. ATCC: <http://bit.ly/PKSj9T> (september 2012)
12. Belgian Biosafety Server: http://www.biosafety.be/PDF/2009_classification_lists/fyto_fungi.pdf (september 2012)
13. Streekstra H (1997). On the safety of *Mortierella alpina* for the production of food ingredients, such as arachidonic acid. *J Biotechnol.* 56: 153-165