

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 07 april 2014
KENMERK CGM/140407-01
ONDERWERP Advies: Classificatie van de schimmel *Sodiomyces alkalinus*

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag over een wijzigingsverzoek van de vergunning IG 02-108 met de titel “*Genetische analyses van adaptatie bij bacteriën en filamenteuze schimmels*” van de Wageningen Universiteit, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van de schimmel *Sodiomyces alkalinus*. Tevens is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met deze schimmelsoort en over de eventuele plaatsing van *S. alkalinus* op 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 gewerkt worden.

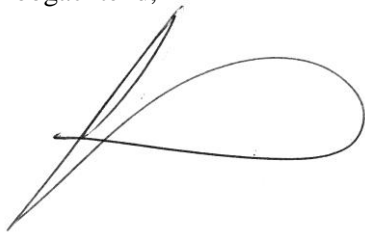
S. alkalinus is geïsoleerd uit sterk alkalische bodems in Centraal Azië en Afrika. De schimmel groeit optimaal onder fysiologisch extreme omstandigheden (pH 10). Er zijn bij de COGEM geen aanwijzingen bekend dat *S. alkalinus* pathogeen is voor mens, dier of plant.

Gezien het niet pathogene karakter van *S. alkalinus* adviseert de COGEM deze schimmel in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en acht zij opname in Bijlage 1 van de Regeling ggo gerechtvaardigd. Gebaseerd op deze indeling acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein, indien de voorgenomen werkzaamheden met *gg-S. alkalinus* plaatsvinden op ML-I inperkingsniveau, onder naleving van een aanvullend voorschrift om verspreiding van sporen te voorkomen.



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
 Dr. I. van der Leij, Ministerie van IenM

Dit advies is mede tot stand gekomen met inbreng van Dr. T. Boekhout van het Centraal bureau voor Schimmelcultures (CBS).

Classificatie van de schimmel *Sodiomyces alkalinus*

COGEM advies CGM/140407-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een wijzigingsverzoek van de vergunning IG 02-108 met de titel “*Genetische analyses van adaptatie bij bacteriën en filamenteuze schimmels*” van Wageningen Universiteit. De adviesvraag betreft de pathogeniteitsclassificatie van de schimmel *Sodiomyces alkalinus*. Tevens is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met gg-varianten van deze schimmel en over de eventuele plaatsing van *S. alkalinus* op Bijlage 1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo). De aanvrager wil met behulp van een *gene replacement* techniek bepaalde genen uitschakelen om de extremofiele eigenschappen van *S. alkalinus* te onderzoeken.

Sodiomyces alkalinus

De ascomyceet *S. alkalinus* is in 2005 geïsoleerd uit sterk alkalische bodems (+/- pH 10) in Centraal Azië en Afrika.¹ In eerste instantie werd deze filamenteuze schimmel op basis van zijn morfologische en ecologische kenmerken gerekend tot het genus *Heleococcum* en kreeg het de naam *Heleococcum alkalinum*.¹ Recent moleculair fylogenetisch onderzoek door Grum-Grzhimaylo *et al.* heeft uitgewezen dat de schimmel waarschijnlijk tot een nieuw genus behoort in de familie van de *Plectosphaerellaceae*. De auteurs hebben de naam *Sodiomyces alkalinus* voorgesteld.²

De schimmel kent zowel een geslachtelijk (teleomorf) als ongeslachtelijk (anamorf) levensstadium. Tijdens het geslachtelijke levensstadium produceert de schimmel zogenoemde ascosporen en tijdens het ongeslachtelijke stadium zogenoemde conidiosporen. Deze sporen blijken in grote hoeveelheden gevormd te worden wanneer complex plantmateriaal aan het kweekmedium wordt toegevoegd.² Dit wekt volgens de auteurs de suggestie dat de schimmel een saprofiet is die leeft van rottend organisch plantmateriaal in alkalische bodemecosystemen.²

De aanvrager geeft aan dat er voor deze schimmel geen pathogeniteit is beschreven. Daarnaast is er volgens de aanvrager geen gastheer bekend en zijn er geen toxines en schadelijke genproducten aangetoond.

Pathogeniteitsclassificatie

In de Regeling ggo worden micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen.³ Deze indeling start met pathogeniteitsklasse 1, die gevormd wordt door niet pathogene (apathogene) micro-organismen en loopt op tot pathogeniteitsklasse 4, de groep van hoog pathogene micro-organismen.

Volgens de Regeling ggo is een indeling in pathogeniteitsklasse 1 van toepassing als het micro-organisme minimaal aan één van de volgende criteria voldoet:

- het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant.
- het heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen zijn getroffen.
- het 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.
- het niet-virulente karakter van het micro-organisme is door middel van 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.

Bijlage 1 Regeling ggo

Bijlage 1 van de Regeling ggo is een lijst van micro-organismen die in principe niet pathogeen zijn voor mens, dier of plant (pathogeniteitsklasse 1). 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.³ Voorbeelden van potentieel ‘gevaarlijke’ inserties zijn genen die coderen voor toxines, virulentie- of pathogeniteitsfactoren en virale en cellulaire oncogenen.

In de huidige inschalingspraktijk wordt een micro-organisme als pathogeen gezien als deze bij mensen met een normaal functionerend immuunsysteem ziekte kan veroorzaken. Opportunistische pathogenen, die uitsluitend ziekte kunnen veroorzaken bij individuen met een verzwakt immuunsysteem, worden in de regel als niet pathogeen beschouwd en kunnen, als aan een van de bovengenoemde voorwaarden is voldaan, op Bijlage 1 geplaatst worden.

Eerdere COGEM adviezen

Eind 2011 heeft de COGEM geadviseerd over de classificatie van (a)pathogene schimmels.^{4,5} *S. alkalinus* maakt geen onderdeel uit van deze lijsten.

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil de extremofiele eigenschappen van *S. alkalinus* nader onderzoeken door via een *gene replacement* techniek bepaalde genen uit te schakelen. Bij deze techniek worden kleine fragmenten van een beoogd gen van interesse geamplificeerd en via een zogenoemde *overlap-extension PCR* aan een specifieke selectiemarker gekoppeld. In dit geval zijn dat de antibioticaresistentiegenen *hph*, coderend voor hygromycine B resistentie of *nat*, coderend voor nourseothricin resistentie. De nieuwe constructen worden in de schimmel gebracht om via homologe recombinatie de genen van interesse te vervangen.

Overweging en advies

S. alkalinus is een recent beschreven schimmelsoort die geïsoleerd is uit sterk alkalische bodems in Centraal Azië en Afrika. Onderzoek heeft aangetoond dat de schimmel onder laboratoriumomstandigheden kan groeien bij pH 7, maar optimaal groeit bij pH 10. Extreme fysiologische omstandigheden als pH 10 komen in levende organismen niet voor. Er zijn bij de COGEM geen aanwijzingen bekend dat de schimmel virulentiefactoren bezit. De COGEM acht het onwaarschijnlijk dat *S. alkalinus* pathogeen is voor mens, dier of plant.

Gezien het niet pathogene karakter van *S. alkalinus* adviseert de COGEM deze schimmel in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en acht zij opname in Bijlage 1 van de Regeling ggo gerechtvaardigd. Gezien de aard van de voorgenomen werkzaamheden is de COGEM van mening dat deze op ML-I niveau uitgevoerd kunnen worden met een aanvullend voorschrift. De schimmel is in staat om onder kweekomstandigheden sporen te produceren. Om mogelijke verspreiding van deze sporen te voorkomen, adviseert de COGEM om de (gg-) schimmelcultures alleen in een veiligheidskabinet van klasse-II te openen en te hanteren.

Gebaseerd op de indeling in pathogeniteitsklasse 1 en onder naleving van het aanvullende voorschrift acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein indien de voorgenomen werkzaamheden met *S. alkalinus* plaatsvinden op ML-I inperkingsniveau.

Referenties

1. Bilanenko E *et al* (2005). *Heleococcum alkalinum*, a new alkali-tolerant ascomycete from saline soda soils. *Mycotaxon* 91: 497-507
2. Grum-Grzhimaylo AA *et al* (2013). *Sodiomyces alkalinus*, a new holomorphic alkaliphilic ascomycete within the *Plectosphaerellaceae*. *Persoonia* 31, 2013: 147–158
3. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. Mei 2004
4. COGEM (2011). Classificatie apathogene schimmels. Advies CGM/111024-02
5. COGEM (2011). Classificatie pathogene schimmels. Advies CGM/111024-03