

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

BEZOEKADRES:
A. VAN LEEUWENHOEKLAAN 9
3721 MA BILTHOVEN

POSTADRES:
POSTBUS 578
3720 AN BILTHOVEN

TEL.: 030 274 2777
FAX: 030 274 4476
INFO@COGEM.NET
WWW.COGEM.NET

DATUM 15 december 2014
KENMERK CGM/141215-02
ONDERWERP Advies classificatie drie insectenpathogene *Beauveria* schimmelsoorten

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de wijziging van de vergunning IG 02-108/05 met de titel 'Genetische analyses van adaptatie bij bacteriën en filamenteuze schimmels' ingediend door de Wageningen Universiteit, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de pathogeniteitsclassificatie en inschaling van werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde (gg-) schimmelsoorten *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii* en *B. pseudobassiana*.

De drie schimmelsoorten zijn overal in het milieu aanwezig, maar komen voornamelijk in de bodem voor. De COGEM is niet bekend met publicaties waaruit blijkt dat de drie soorten pathogeen zijn voor de mens, warmbloedige dieren, vissen, amfibieën en planten. Wel zijn *B. bassiana*, *B. brongniartii* en *B. pseudobassiana* pathogeen voor insecten en spinachtigen, en produceren ze toxines. De soorten *B. bassiana* en *B. brongniartii* worden in de landbouw als biologisch bestrijdingsmiddel tegen plaagorganismen toegepast.

Insecten en spinachtigen maken deel uit van het milieu en vervullen daarin een belangrijke ecologische functie. De COGEM is van mening dat *B. bassiana*, *B. brongniartii* en *B. pseudobassiana* dierpathogenen zijn en adviseert daarom de drie soorten op te nemen in pathogeniteitsklasse 2. Gebaseerd op deze indeling adviseert zij werkzaamheden met de drie gg-schimmelsoorten uit te voeren op ML-II inperkingsniveau. Indien wordt voldaan aan aanvullende voorschriften is de COGEM evenwel van mening dat de werkzaamheden ook op ML-I inperkingsniveau uitgevoerd kunnen worden.

Op voornoemde inperkingsniveau's en met inachtneming van bijbehorende voorschriften acht de COGEM het risico van de beschreven werkzaamheden met gg-*B. bassiana*, gg-*B. brongniartii* en gg-*B. pseudobassiana* verwaarloosbaar klein.



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

Classificatie en inschaling werkzaamheden van insectenpathogene schimmelsoorten *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii* en *B. pseudobassiana*

COGEM advies CGM/141215-02

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de pathogeniteitsclassificatie en inschaling van werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde (gg-) schimmelsoorten *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii* en *B. pseudobassiana*. Het betreft een vergunningsaanvraag ingediend door de Wageningen Universiteit. De aanvrager wil onder meer de virulentiegeenen van deze schimmelsoorten bestuderen.

Pathogeniteitsclassificatie Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in oenschouw genomen. Daartoe worden in de Regeling ggo micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen.¹ 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:

- 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.

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.

Aspecten van belang voor de pathogeniteitsclassificatie van schimmels

Schimmels vormen taxonomisch gezien een zeer heterogene groep en zijn onderverdeeld over verschillende fyta, waaronder de ascomyceten en basidiomyceten. Op grond van hun leefwijze in het ecosysteem worden schimmels onder meer verdeeld in saprotrofe (ook wel saprofytische), parasitaire en symbiotische schimmels.²

Saprotrofe schimmels leven van dood organisch materiaal terwijl parasitaire schimmels hun voeding uit levend organisch materiaal halen.² Parasitaire schimmels infecteren levende organismen en kunnen deze beschadigen of zelfs doden. Ze worden onderverdeeld in biotrofe en necrotrofe schimmels.³

Biotrofe schimmels leven op en ten koste van het levende weefsel van organismen. Necrotrofe schimmels leven op dood weefsel van levende organismen. Tijdens infectie worden op de plaats van binnendringing de gastheercellen gedood en leven de schimmels vervolgens van het beschikbaar gekomen dode organische materiaal.³

Symbiotische schimmels leven met andere organismen samen en hebben wederzijds voordeel van elkaar.²

Schimmels vermenigvuldigen zich via sporen die gevormd worden tijdens geslachtelijke (generatieve) of ongeslachtelijke (vegetatieve) voortplanting.² Geslachtelijke sporen worden onder meer in zakjes, of exogeen op knotsvormige structuren gevormd (respectievelijk de ascomycete en basidiomycete schimmels).² Ongeslachtelijke of aseksuele sporen worden onder meer gevormd door de fragmentatie of afsnoering van de filamenteuze schimmeldraad, en worden veelal aangeduid als conidiosporen. Zowel geslachtelijke als ongeslachtelijke sporen kunnen zich via lucht en water verspreiden.²

***Beauveria* spp.**

Schimmels van het genus *Beauveria* (anamorfe naam) behoren tot het fylum van de ascomyceten.⁴ Er zijn een tiental *Beauveria* soorten bekend waaronder *B. bassiana*, *B. brongniartii* en *B. pseudobassiana*.⁵ Bepaalde soorten binnen het geslacht *Beauveria* zijn ook onder de teleomorfe geslachtsnaam *Cordyceps* bekend, waaronder *Cordyceps bassiana* en *C. brongniartii*, maar deze naamgeving wordt nauwelijks gebruikt.^{4,5,6,7,8,9}

B. bassiana en *B. pseudobassiana* zijn morfologisch moeilijk van elkaar te onderscheiden. Alleen op basis van moleculaire technieken kan identificatie plaats vinden.⁶ In vergelijking met *B. bassiana* en *B. brongniartii*, is *B. pseudobassiana* pas recent in de literatuur beschreven.^{8,9}

Kenmerken *Beauveria* spp.

B. bassiana, *B. brongniartii* en *B. pseudobassiana* komen over de gehele wereld in de bodem voor. Daarnaast wordt *B. bassiana* ook waargenomen op bladeren en boomschors, en als symbiont van planten.^{5,6} Incidenteel zijn *B. bassiana* conidiosporen in drinkwater verkregen uit oppervlaktewater

aangetroffen.⁵ Verspreiding van *Beauveria* spp. vindt in de vorm van kleine conidiosporen plaats via de lucht en door middel van regenval.^{5,6} Daarnaast dragen insecten en bodemorganismen (mijten en springstaartjes) de schimmel met zich mee.⁵

Pathogeniteit Beauveria spp.

B. bassiana, *B. brongniartii* en *B. pseudobassiana* zijn pathogeen voor een breed spectrum aan insectenordes zoals keverachtigen en vlinderachtigen.^{5,6} Daarnaast zijn *B. bassiana* en *B. brongniartii* ook pathogeen voor bepaalde soorten spintmijten.^{5,10}

Bij insecten vindt infectie plaats doordat sporen zich aan de buitenkant vasthechten, bij voorkeur de zachtere delen, waarna deze ontkiemen en de huid doordringen. Vervolgens worden kleine fragmenten van het mycelium, zogenaamde 'hyphal bodies' via de hemolymfe in het insect verspreid. Deze infecteren andere weefsels en resulteren in het ontstaan van schimmeldraden. De schimmeldraden kunnen verschillende toxines produceren, onder meer de mycotoxines beauvericine en oosporeïne.⁵ Na enkele dagen tot weken overlijdt het insect en vormt de schimmel conidiosporen die zich verder in het milieu verspreiden.

Wegens hun pathogene eigenschappen en productie van mycotoxines, worden *B. bassiana* en *B. brongniartii* in de landbouw veelvuldig ingezet als biologisch bestrijdingsmiddel tegen plaagorganismen (bepaalde soorten insecten en spintmijten).^{5,10}

B. (Cordyceps) bassiana, *B. (Cordyceps) brongniartii* en *B. pseudobassiana* zijn niet pathogeen voor planten, vissen, amfibieën en warmbloedigen, waaronder de mens.^{5,11} Sporadisch zijn hoornvliesontsteking bij gezonde mensen en systemische infecties bij patiënten met een verzwakte weerstand beschreven (*B. bassiana*).^{5,11} Daarnaast is in de literatuur een keer melding gemaakt van hoornvliesontsteking bij een konijn, en van longontsteking bij een in gevangenschap gehouden alligator en schildpad.⁵

Gezien hun geringe afmeting kunnen de conidiosporen na inhalatie in de lagere luchtwegen terecht komen. Vooral medewerkers die vanwege de aard van hun werkzaamheden met grote hoeveelheden sporen in aanraking komen, kunnen allergische reacties aan huid, ogen en ademhalingswegen ontwikkelen. In de literatuur is er echter nooit melding gemaakt dat dit tot ernstige ziekteverschijnselen heeft geleid.^{5,11} Incidenteel is er melding gemaakt dat het door *B. bassiana* en *B. brongniartii* geproduceerde mycotoxine oosporeïne jicht veroorzaakt bij pluimvee. De in de natuurlijke omgeving voorkomende hoeveelheden zijn echter zo laag, dat pluimvee er onder de normale omstandigheden geen schade van ondervindt.⁵

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil van *B. bassiana*, *B. brongniartii* en *B. pseudobassiana* de virulentiegenen die betrokken zijn bij de infectie van insecten in kaart brengen. Daartoe zullen de schimmels gelabeld worden met fluorescentiemarkers. Tevens zullen knock-out mutanten gemaakt worden door bepaalde genen, waaronder de virulentiegenen, uit te schakelen. Vervolgens zullen er complementatiestudies uitgevoerd worden met genen van andere *Beauveria* stammen met als doel de functie van de uitgeschakelde genen te herstellen. Er zullen geen activiteiten in associatie met planten of dieren

(inclusief insecten) worden uitgevoerd. De aanvrager is van mening dat de werkzaamheden op ML-I inperkingsniveau ingeschaald kunnen worden.

Eerdere COGEM adviezen

In 2011 heeft de COGEM twee adviezen over de classificatie van een groot aantal (a)pathogene schimmels uitgebracht.^{12,13} Hierin is *B. brongniartii* op de lijst van apathogenen vermeld. *B. bassiana* en *B. pseudobassiana* zijn toen niet geclassificeerd.

Begin 2014 heeft de COGEM een advies uitgebracht over de pathogeniteitsclassificatie van mycotoxine producerende schimmels.¹⁴ In dit advies zijn de factoren benoemd die essentieel zijn voor het classificeren van dergelijk schimmels.

Classificaties andere beoordelende instanties

Op de lijst met dierpathogenen van het Belgische Wetenschappelijke Instituut voor Volksgezondheid wordt *Beauveria* spp. aangeduid als een dierpathogeen van pathogeniteitsklasse 2.¹⁵ Het Zwitserse 'Federal Office for the Environment' beschouwt *B. bassiana* een klasse 2 pathogeen voor ongewervelde dieren.¹⁶ Door de American Type Culture Collection (ATCC) worden, gebaseerd op pathogeniteit voor de mens, werkzaamheden met *B. bassiana* en *B. brongniartii* ingedeeld in het laagste veiligheidsniveau 'biosafety level 1'.¹⁷ In de 'Atlas of Clinical Fungi', het naslagwerk met alle klinisch relevante schimmels, wordt *B. bassiana* eveneens aangeduid als 'biosafety level 1'.¹¹

Overweging en advies

B. (Cordyceps) bassiana, *B. (Cordyceps)* en *B. pseudobassiana* zijn alomtegenwoordig en komen voornamelijk voor in de bodem. De COGEM is niet bekend met publicaties waaruit blijkt dat de drie schimmelsoorten pathogeen zijn voor de mens, warmbloedige dieren, vissen, amfibieën en planten.

B. bassiana, *B. brongniartii* en *B. pseudobassiana* zijn pathogeen voor insecten en spinachtigen, en produceren toxines schadelijk voor insecten. De soorten *B. bassiana* en *B. brongniartii* worden in de landbouw als biologisch bestrijdingsmiddel tegen plaagorganismen gebruikt.

Insecten en spinachtigen maken deel uit van het milieu en vervullen daarin een belangrijke ecologische functie. De COGEM is van mening dat *B. bassiana*, *B. brongniartii* en *B. pseudobassiana* dierpathogenen zijn en adviseert daarom de drie schimmelsoorten op te nemen in pathogeniteitsklasse 2. Zij herzielt en corrigeert daarmee de eerdere abusievelijke indeling van *B. brongniartii* in klasse 1. Gebaseerd op deze indeling adviseert zij werkzaamheden met de drie gg-schimmelsoorten uit te voeren op ML-II inperkingsniveau.

Vanwege het sporulerende karakter van de voornoemde schimmelsoorten, dienen open handelingen in een veiligheidskabinet van klasse-II uitgevoerd te worden ten einde verspreiding van sporen naar het milieu te voorkomen. Daarnaast kunnen de schimmelsporen bij de mens aanleiding geven tot allergische reacties, wat eveneens het gebruik van een dergelijk veiligheidskabinet noodzakelijk maakt. Op voornoemd inperkingsniveau en met inachtneming van het bovenstaande aanvullende

voorschrift, acht de COGEM het risico van de beschreven werkzaamheden met (gg-) *B. bassiana*, *B. brongniartii* en *B. pseudobassiana* verwaarloosbaar klein.

Aanvullende opmerking

De aanvrager heeft gevraagd de werkzaamheden met (gg-) *B. bassiana*, *B. brongniartii* en *B. pseudobassiana* onder ML-I inperkingsniveau te mogen uitvoeren.

De COGEM merkt op dat de drie schimmelsoorten strikt dierpathogeen zijn voor insecten. Zij is van mening dat, mits er aanvullende maatregelen in acht worden genomen ten einde verspreiding van de schimmel naar het milieu te voorkomen, de werkzaamheden onder ML-I inperkingsniveau uitgevoerd kunnen worden. Deze maatregelen bestaan uit de volgende aanvullende voorschriften:

- ramen in de werkruimte kunnen niet geopend worden
- de kraan van de wastafel en de dispenser met zeep kunnen bediend worden zonder dat daarbij de handen gebruikt worden
- (gg-)schimmelcultures worden alleen in een veiligheidskabinet van klasse-II geopend en gehanteerd
- het dragen van polshorloges en sieraden aan armen en handen is verboden
- de deuren van de werkruimte dienen altijd tijdens de werkzaamheden gesloten te zijn
- de werkkleding dient, voordat ze wordt gewassen, altijd te worden gedesinfecteerd of gesteriliseerd.

Op voornoemd inperkingsniveau en met inachtneming van de bovenstaande aanvullende voorschriften acht de COGEM het risico van de beschreven werkzaamheden met (gg-) *B. bassiana*, *-B. brongniartii* en *-B. pseudobassiana* verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Bureau GGO (december 2010). Regeling genetische gemodificeerde organismen
www.ggo-vergunningverlening.nl/dsresource?type=pdf&disposition=inline&objectid=rivmp:193514&versionid=&subobjectname=
2. James TY *et al.* (2006). Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818-822
3. Ozinga WA *et al.* (2013). Paddenstoelen in het natuurbeheer. OBN preadvies paddenstoelen – Deel 1: Ecologie, knelpunten en kennislacunes. Directie Agrokennis, Ministerie van Economische Zaken Rapport nr. 2013/OBN181-DZ
4. Mycobank. International Mycological Association.
www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Page=200&ViewMode=Basic
5. Zimmerman G (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology* 17 (5/6): 553-596
6. Rehner SA (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologica* 103(5): 1055-1073

7. Holder DJ *et al.* (2007). Surface characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. *Microbiology* 153: 3448–3457
8. Rehner SA & Buckley EP (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97: 84-98
9. Ghikas DV *et al.* (2010). Phylogenetic and biogeographic implications inferred by mitochondrial intergenic region analyses and ITS1-5.8S-ITS2 of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *B. brongniartii*. *BMC Microbiology* 10: 174-189
10. European and Mediterranean Plant Protection Organization (december 2014).
<https://gd.eppo.int/taxon/BEAUBA/documents>
11. Hoog de GS *et al.* (2004). Atlas of Clinical Fungi, Atlas version 2004.11. Computer Science II, University of Würzburg, Germany
12. COGEM (2011). Classificatie apathogene schimmels. COGEM advies CGM/111024-02
13. COGEM (2011). Classificatie pathogene schimmels. COGEM advies CGM/111024-03
14. COGEM (2014). Pathogeniteitsclassificatie van mycotoxineproducerende schimmels. COGEM advies CGM/140121-01
15. WIV-ISP. Wetenschappelijk Instituut voor de Volksgezondheid/ Institut Scientifique de Santé Public (december 2014). www.biosafety.be/PDF/2009_classification_lists/H_A_fungi.pdf
16. Federal Office for the Environment, Schweizerische Eidgenossenschaft (december 2014).
www.bafu.admin.ch/publikationen/publikation/01614/index.html?lang=en
17. American Type Culture Collection: Fungi and yeast (december 2014).
www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Fungi_and_Yeast/Fungi_and_Yeast_Alphanumeric.aspx