

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

DATUM 08 januari 2015
KENMERK CGM/150108-01
ONDERWERP Advies: Classificatie en inschaling van werkzaamheden met gg-*P. brasilianum*

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag over een verzoek tot wijziging van de vergunning 'Genetische modificatie van micro-organisme A behorende tot groep IA' van Dyadic Nederland B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van de schimmelsoort *Penicillium brasilianum* en plaatsing van deze schimmel op Bijlage 1 van de Regeling genetische gemodificeerde organismen (ggo). Tevens is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) *P. brasilianum*.

P. brasilianum komt algemeen voor in de bodem. Deze schimmelsoort is in staat om onder bepaalde omstandigheden mycotoxines te produceren. De exacte omstandigheden waaronder deze productie plaatsvindt, zijn niet bekend. De mycotoxines kunnen in gezuiverde vorm nadelige effecten veroorzaken bij dieren en planten. De COGEM heeft echter geen aanwijzingen dat de aanwezigheid van *P. brasilianum* zelf, of de mycotoxines die deze schimmel onder natuurlijke omstandigheden produceert in mens, dier of plant ziekte veroorzaken.

Op grond van het bovenstaande concludeert de COGEM dat *P. brasilianum* niet pathogeen is. Zij adviseert daarom deze schimmelsoort in pathogeniteitsklasse 1 in te delen, en werkzaamheden met gg-*P. brasilianum* uit te voeren op ML-I inperkingsniveau. Gezien het sporulerende karakter van deze schimmel adviseert zij daarbij open handelingen in een veiligheidskabinet klasse-II uit te voeren.

Op dit inperkingsniveau en onder navolging van dit aanvullende voorschrift acht de COGEM de risico's voor mens en milieu van voorgenomen werkzaamheden met gg- *P. brasilianum* verwaarloosbaar klein.

Vooralsnog adviseert de COGEM deze schimmelsoort niet in Bijlage 1 van de Regeling ggo op te nemen.



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 van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Penicillium brasilianum*

COGEM advies CGM/150108-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd advies uit te brengen over een verzoek tot wijziging van de vergunning 'Genetische modificatie van micro-organisme A behorende tot groep IA' ingediend door Dyadic Nederland B.V. Het verzoek betreft een toevoeging van de schimmelsoort *Penicillium brasilianum* als gastheer en donororganisme aan de vergunning. Tevens is de COGEM verzocht te adviseren over de mogelijke plaatsing van *P. brasilianum* op Bijlage 1 van de huidig geldende Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo). De COGEM heeft niet eerder over *P. brasilianum* geadviseerd.

Dyadic Nederland is een biotechnologisch bedrijf dat onder meer onderzoek doet naar industriële toepassingen van (genetisch gemodificeerde) schimmels en de door deze schimmels geproduceerde stofwisselingsproducten.

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.

Bijlage 1 maakt deel uit van de Regeling ggo en bestaat uit een lijst van micro-organismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant.¹ Met de micro-organismen die op Bijlage 1 zijn opgenomen, mag onder bepaalde voorwaarden in laboratoria op het laagste inperkingsniveau ML-I, en in procesinstallaties op het laagste inperkingsniveau MI-I gewerkt worden.

Aspecten van belang voor de pathogeniteitsclassificatie van schimmels

Schimmels vormen taxonomisch gezien een zeer heterogene groep en zijn onderverdeeld in 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. Symbiotische schimmels leven met andere soorten organismen samen, waarbij ten minste één van de soorten voordeel ondervindt.² Indien de samenlevende soorten wederzijds voordeel van elkaar ondervinden, spreekt men van mutualisme. De meest bekende symbiose is die tussen schimmels en plantenwortels (ectomycorrhiza's en arbusculaire mycorrhiza's).

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 bij 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

Schimmels produceren onder specifieke condities secundaire metabolieten. Sommige secundaire metabolieten hebben toxische eigenschappen.³ De synthese van deze mycotoxines vindt plaats via verschillende stofwisselingsroutes waarbij complexe reacties en veel enzymen betrokken zijn. De genen die voor deze enzymen coderen zijn in geclusterde vorm op het schimmelgenoom aanwezig. Deze genenclusters zijn enkele tientallen kilobasen groot, liggen naast elkaar en worden in onderlinge samenhang gereguleerd.³ Schimmelregulatorengenen kennen verschillende hiërarchische niveaus. Sommige transcriptiefactoren beïnvloeden alleen de expressie binnen hun eigen genencluster. Andere regulatoren beïnvloeden daarnaast ook fysiologische processen gecodeerd door andere genenclusters.³

Voor veel mycotoxines zijn de biochemische stofwisselingsroutes nog niet opgehelderd of is nog niet bekend welke genenclusters erbij betrokken zijn. Soms zijn de stofwisselingsroutes en de betrokken genenclusters wel beschreven, maar is niet bekend onder welke condities mycotoxineproductie tot stand komt. Sommige schimmelsoorten kunnen meerdere mycotoxines produceren, maar binnen een soort kan de productie per stam of zelfs per isolaat verschillen.³

Om in kaart te kunnen brengen of een bepaalde schimmelsoort mycotoxine(s) produceert, is het van belang te weten onder welke naam/namen de betreffende schimmel bekend is. De nomenclatuur van de schimmels is echter complex en mede door de toenemende informatie over de genoomsequenties is deze aan verandering onderhevig. Dit vraagt om een zorgvuldige identificatie van de te gebruiken schimmelsoort.

Penicillium brasilianum

Schimmels van het genus *Penicillium* behoren tot het fyllum van de ascomyceten. Er zijn 354 *Penicillium* soorten bekend.⁴ *P. brasilianum* is voor het eerst in 1957 beschreven en kende tot voor kort als synoniem de naam *P. paraherquei*.^{5,6} Op basis van de sequenties van verschillende DNA loci worden *P. paraherquei* en *P. brasilianum* tegenwoordig als verschillende soorten beschouwd.^{4,7} Tot op heden is van *P. brasilianum* geen geslachtelijk stadium (teleomorf) beschreven. Voortplanting en verspreiding vinden plaats via de productie van aseksuele conidiosporen.⁸

P. brasilianum komt van nature in de bodem voor (onder meer waargenomen in Nederland, Japan, Brazilië en Argentinië), en is als symbiotische schimmel (endofyt) in de wortels van de Indische sering (*Melia azerdarach*) aangetroffen.^{6,9,10,11}

Recent is gerapporteerd dat *P. brasilianum* pathogeen is voor uienbollen.¹² Pathogeniteit werd vastgesteld op basis van *in vitro* experimenten op uien die in het laboratorium met *P. brasilianum* geïnoculeerd waren.¹² Daartoe werd van de uien, nadat deze gehalveerd waren, zowel de buitenste als de binnenste rok geïnoculeerd. De gebruikte *P. brasilianum* stam was geïsoleerd uit zieke uien die op verschillende markten in Korea verzameld waren.

P. brasilianum produceert verschillende secundaire metabolieten. Sommige bij de stofwisseling betrokken metabolieten en enzymen kennen interessante commerciële toepassingen (antimicrobiële middelen, industrieel toepasbare enzymen).^{13,14,15,16} De secundaire metabolieten met antimicrobiële activiteit betreffen - naast de hieronder vermelde mycotoxines penicillinezuur en viridicatumtoxine - het fungicide griseofulvine en het antibioticum spirohexaline.^{15,16} *P. brasilianum* kan tevens de mycotoxines verrucologen, fumitremorgin A en B, ergosterol peroxide en bepaalde derivaten van austine produceren. De productie van de secundaire metabolieten is stamafhankelijk en vindt alleen onder specifieke condities plaats, waarbij niet alle metabolieten gelijktijdig geproduceerd worden.

Het mycotoxine penicillinezuur heeft naast een antibacteriële werking cytotoxische eigenschappen.^{17,18,19} In een wetenschappelijke studie met kippen als proefdiermodel bleek de acute toxiciteit van penicillinezuur na orale toediening beperkt (LD50: 92 ± 9 mg/kg).²⁰

Ook het mycotoxine viridicatumtoxine kent antibacteriële activiteit.²¹ De toxiciteit is in muizen en ratten onderzocht. Zowel na orale als na subcutane toediening waren de hoogst gebruikte doses niet

lethaal. Bij intraperitoneale toediening werd de LD50 van viridicatumtoxine voor muizen bepaald op 70 mg/kg en voor ratten op 80 mg/kg.²²

De mycotoxines verruculogen en fumitremorgin A en B zijn een groep van metabolieten die op het centraal zenuwstelsel aangrijpen. Deze mycotoxines kunnen in dieren, waaronder vee en muizen, tremoren, stuip- en zenuwtrekkingen veroorzaken, en leiden tot de dood.^{10,13,23,24,25,26} De LD50 voor muizen is bij intraperitoneale toediening vastgesteld op 2,4 mg/kg en bij orale toediening 126 mg/kg.²⁷ Van verruculogen en fumitremorgin B is tevens aangetoond dat ze genotoxisch zijn. Daarnaast is verruculogen cytotoxisch.^{28,29}

Beschreven is dat het mycotoxine ergosterolperoxide een fytotoxisch effect heeft op een onkruidsoort die voorkomt in de nabijheid van rijstplanten.¹⁶ De austine-derivaten, die door *P. brasilianum* geproduceerd worden zijn toxisch voor insecten. In een wetenschappelijke studie naar de werking van de austine-derivaten op kakkerlakken, is aangetoond dat ze op het zenuwstelsel van deze insecten aangrijpen.^{30,31}

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil eerder vergunde donorsequenties in de schimmelsoort *P. brasilianum* kloneren met behulp van al eerder vergunde vectoren. De donorsequenties zijn afkomstig van de schimmelsoorten *Thielavia terrestris* en *P. funicolosum*, en de bacteriesoort *Spingopyxis macrogoltabida*. Het betreffen onder meer genen en regulatoire DNA-sequenties betrokken bij metabolietproductie en genexpressie.

Eerdere COGEM adviezen

In 2011 heeft de COGEM een aantal adviezen over de classificatie van een groot aantal (a)pathogene schimmels en bacteriën uitgebracht. Recent is een update van deze lijsten verschenen.^{32,33} Hierin zijn de schimmelsoorten *Thielavia terrestris* en *P. funicolosum*, en de bacteriesoort *Spingopyxis macrogoltabida*, die de aanvrager wil gebruiken als apathogeen aangemerkt. Tevens zijn hierin één pathogene en zeven apathogene *Penicillia* soorten opgenomen.

Begin 2014 heeft de COGEM een advies uitgebracht over de pathogeniteitsclassificatie van mycotoxine producerende schimmels.³ In dit advies zijn de factoren benoemd die essentieel zijn voor het classificeren van dergelijk schimmels.

Classificaties andere beoordelende instanties

De 'American Type Culture Collection' (ATCC) die haar indeling louter baseert op pathogeniteit voor de mens, heeft werkzaamheden met *P. brasilianum* ingedeeld in het laagste veiligheidsniveau 'biosafety level 1'.³⁴

Overwegingen

P. brasilianum komt algemeen vrijlevend voor in de bodem en wordt ook aangetroffen als endofyt. In de 'Atlas of Clinical Fungi', het naslagwerk met alle klinisch relevante schimmels, staat *P. brasilianum* niet vermeld als pathogene schimmel.³⁵ Hoewel de mycotoxines, die deze schimmel kan produceren in gezuiverde vorm toxische effecten teweeg kunnen brengen, is de COGEM niet bekend

met wetenschappelijke publicaties waarin de aanwezigheid van deze schimmelsoort zelf is geassocieerd met ziekte in mens of dier.

Van *Penicillium* soorten is gerapporteerd dat zij na beschadiging de bollen van uien kunnen infecteren, bijvoorbeeld nadat het loof op het veld is afgestorven, of nadat ter voorbereiding van de oogst het loof van de uien is afgesneden.³⁶ Vervolgens kunnen schimmels het binnenste deel van de ui binnendringen en ziekte veroorzaken. Ook niet-beschadigde bollen van uien kunnen door *Penicillium* soorten geïnfecteerd worden.³⁶

In Korea is *P. brasilianum* geïsoleerd van zieke uien die op markten verkocht werden.¹² De COGEM merkt op dat uit de publicatie niet herleid kan worden of de infectie bij deze uien voor de oogst of na de oogst heeft plaats gevonden. De publicatie toont wel aan dat *P. brasilianum* onder laboratoriumomstandigheden gehalveerde uien kan infecteren.

Er zijn de COGEM geen publicaties bekend waarin *P. brasilianum* beschreven wordt als een ziekteverwekker van uienplanten op het veld. De COGEM concludeert dat *P. brasilianum* een verwekker is van een 'post-harvest disease', en beschouwt *P. brasilianum* in de context van de ggo-regelgeving daarom als een verwekker van een bewaarziekte en niet als een plantpathogeen.

P. brasilianum kan onder bepaalde omstandigheden verschillende soorten mycotoxines produceren. Deze zijn bij orale opname schadelijk voor dieren (vee, muizen, kakkerlakken), en schadelijk voor tenminste één onkruidsoort. *P. brasilianum* is ook in staat meerdere antimicrobiële middelen te produceren. Wanneer antimicrobiële middelen in hoge concentraties in het milieu als restafval van een productieproces worden geloosd, is er een antimicrobieel effect op de microbiota in het milieu mogelijk. Dit kan resistentievorming, selectie en verspreiding van resistente bacterie- en schimmelstammen tot gevolg hebben. Het is daarom gewenst grootschalige lozing van mycotoxines en antimicrobiële verbindingen in het milieu te voorkomen.

De specifieke omstandigheden en de betrokken stofwisselingsroutes waaronder de productieprocessen van mycotoxines en antimicrobiële middelen bij *P. brasilianum* plaatsvinden, zijn niet bekend. Daarnaast is binnen de schimmelsoort de productie van de verschillende metabolieten stamafhankelijk, en vindt mycotoxineproductie alleen onder specifieke condities plaats waarbij niet alle mycotoxines tegelijkertijd geproduceerd worden.

De aanvrager wil genen en regulatoire DNA-sequenties betrokken bij metabolietproductie en genexpressie, en afkomstig van verschillende bacterie- en schimmelsoorten, in *P. brasilianum* kloneren. De COGEM heeft geen reden om aan te nemen dat deze werkzaamheden de productie van mycotoxines en antimicrobiële middelen zal verhogen. Echter, omdat schimmelregulatorengenen verschillende hiërarchische niveaus kennen, zouden sommige van de te insereren DNA-sequenties de fysiologische processen van genenclusters coderend voor mycotoxines en antimicrobiële middelen kunnen beïnvloeden. De COGEM kan daarom niet uitsluiten dat bij de voorgenomen werkzaamheden de productie van deze metabolieten toeneemt.

Advies

Pathogeniteitsclassificatie en inschaling werkzaamheden

P. brasilianum komt algemeen voor in de bodem. Deze schimmelssoort is in staat om onder bepaalde omstandigheden mycotoxines te produceren. De exacte omstandigheden waaronder deze productie plaatsvindt, zijn niet bekend. De mycotoxines kunnen in gezuiverde vorm toxische of nadelige effecten veroorzaken bij dieren en planten. De COGEM heeft echter geen aanwijzingen dat de aanwezigheid van *P. brasilianum* zelf, of de mycotoxines die deze schimmel onder natuurlijke omstandigheden produceert in mens, dier of plant, ziekte veroorzaakt. Op grond van bovenstaande concludeert de COGEM dat *P. brasilianum* niet pathogeen is. Zij adviseert daarom deze schimmelsoort in pathogeniteitsklasse 1 in te delen, en werkzaamheden met gg-*P. brasilianum* uit te voeren op ML-I inperkingsniveau.

De voortplanting en verspreiding van *P. brasilianum* vindt plaats via de productie van aseksuele conidiosporen. De COGEM kan niet uitsluiten dat gg-*P. brasilianum* onder de laboratoriumcondities sporen zal vormen. Vanwege het sporulerende karakter van *P. brasilianum*, dienen open handelingen in een veiligheidskabinet van klasse-II uitgevoerd te worden ten einde verspreiding van sporen naar het milieu te voorkomen. Daarnaast merkt de COGEM op dat de schimmelsporen mycotoxines kunnen bevatten en bij blootstelling aanleiding kunnen geven tot allergische reacties in de mens. Door het gebruik van genoemd veiligheidskabinet kan dit worden voorkomen.

Plaatsing op Bijlage 1

Door plaatsing van *P. brasilianum* op Bijlage 1 kunnen grootschalige productiewerkzaamheden met gg-*P. brasilianum* onder bepaalde voorwaarden op het laagste inperkingsniveau MI-I uitgevoerd worden. Aangezien er nog weinig bekend is over de condities waaronder *P. brasilianum* mycotoxines produceert, gezien de andersoortige aard van grootschalige productiewerkzaamheden in vergelijking met werkzaamheden die op laboratoriumschaal plaatsvinden, en door het korte tijdsbestek en de ongelukkige timing voor advisering, kan de COGEM op dit moment geen uitspraak doen over de milieugevolgen bij grootschalige toepassingen met *P. brasilianum*. Zij adviseert daarom de schimmelsoort op dit moment niet op te nemen in Bijlage 1 van Regeling ggo.

Conclusie

Op voornoemd inperkingsniveau en met inachtneming van het aanvullende werkvoorschrift, acht de COGEM het risico van de beschreven werkzaamheden met (gg-) *P. brasilianum* verwaarloosbaar klein.

Aanvullende opmerking

De COGEM zal u op een later moment adviseren over de vraag of micro-organismen, waarvan niet precies bekend is onder welke condities zij mycotoxines produceren, op Bijlage 1 van de Regeling ggo geplaatst kunnen worden.

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. COGEM (2014). Pathogeniteitsclassificatie van mycotoxineproducerende schimmels. COGEM advies CGM/140121-01
4. Visagie CM *et al.* (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in mycology* 8: 343-371
5. Batista AC *et al.* (1957). Alguns *Penicillia* de contaminação. *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco* 15: 149-180
6. Mycobank. International Mycological Association.
www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Page=200&ViewMode=Basic. Websitebezoek 05/01/2015
7. Houbraken J *et al.* (2011) Five new *Penicillium* species, *P. araracuaraense*, *P. ellenii*, *P. penarojaense*, *P. vanderhammenii* and *P. wotroi*, from Colombian leaf litter. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 1462-1475
8. Ramirez C (1982). *Manual and Atlas of the Penicillia*. Elsevier Biomedical Press
9. Nederlands soortenregister. www.nederlandsesoorten.nl. Websitebezoek 19/12/2014
10. Fill TP *et al.* (2009). Co-production of bisphenylpropanoid amides and meroterpenes by an endophytic *Penicillium brasilianum* found in the root bark of *Melia azedarach*. *Z. Naturforsch.* 64 c: 355-360
11. Geris dos Santos RM *et al.* (2002). Meroterpenes from *Penicillium* sp found in association with *Melia azedarach*. *Phytochemistry* 61: 907-912
12. Sang MK *et al.* (2014). *Penicillium brasilianum* as a novel pathogen of onion (*Allium cepa* L.) and other fungi predominant on market onion in Korea. *Crop Protection* 65: 138-142
13. Fill TP *et al.* (2010). Biosynthesis of phenylpropanoid amides by an endophytic *Penicillium brasilianum* found in root bark of *Melia azedarach*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 622-629
14. Panagiotou G *et al.* (2007). *Penicillium brasilianum* as an enzyme factory; the essential role of feruloyl esterases for the hydrolysis of the plant cell wall. *J. of Biotechnology* 130: 219-228
15. Inokoshi J *et al.* (2013). Spirohexalines, new inhibitors of bacterial undecaprenyl pyrophosphate synthetase, produced by *Penicillium brasilianum* FKI-3368. *J. of antibiotics* 66: 37-41
16. Tang HY *et al.* (2014). Antimicrobial and allelopathic metabolites produced by *Penicillium brasilianum*. *Natural Product Research* 29: 345-348
17. Zheng CJ *et al.* (2013). Cytotoxic metabolites from the cultures of endophytic fungi from *Panax ginseng*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 7617-25
18. Gräbsch C *et al.* (2006). Cytotoxicity assessment of gliotoxin and penicillic acid in *Tetrahymena pyriformis*. *Environ. Toxicol.* 21: 111-117
19. Sorenson WG & Simpson J (1986). Toxicity of penicillic acid for rat alveolar macrophages *in vitro*. *Environ. Res.* 41: 505-513
20. Huff WE *et al.* (1980). Evaluation of penicillic acid for toxicity in broiler chickens. *Poult. Sci.* 59: 1203-7
21. Zheng CJ *et al.* (2008). Viridicatumtoxin B, a new anti-MRSA agent from *Penicillium* sp. FR11. *J. Antibiot.* 61: 633-637

22. Bendele AM *et al.* (1984). Viridicatumtoxin mycotoxicosis in mice and rats. *Toxicol. Lett.* 22: 287-291
23. Nishiyama M & Kuga T (1989). Central effects of the neurotropic mycotoxin fumitremorgen A in the rabbit (I). Effects on the spinal cord. *Jpn. J. Pharmacol.* 50: 167-173
24. Suzuki S *et al.* (1984). Abnormal behavioral effects elicited by a neurotropic mycotoxin, fumitremorgen A in mice. *J. Pharmacobiodyn.* 7: 935-942
25. Gallagher RT *et al.* (1977). The role of fungal tremorgens in ryegrass staggers. *N. Z. J. Agricultural. Res.* 20: 431-440
26. Fill TP *et al.* (2013). Time course production of indole alkaloids by an endophytic strain of *Penicillium brasilianum* cultivated in rice. *Nat. Prod. Res.* 27: 967-974
27. Cole RJ & Cox RH (1981). *Handbook of toxic fungal metabolites.* Academic Press New York
28. Sabater-Vilar M *et al.* (2003). Genotoxicity assessment of five tremorgenic mycotoxins (fumitremorgen B, paxilline, penitrem A, verruculogen, and verrucosidin) produced by molds isolated from fermented meats. *J. Food. Prot.* 66: 2123-2129
29. Büniger J *et al.* (2004). Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins. *Toxicology* 202: 199-211
30. Kataoka S *et al.* (2011). Three austin family compounds from *Penicillium brasilianum* exhibit selective blocking action on cockroach nicotinic acetylcholine receptors. *Neurotoxicology* 32: 123-129
31. Schürmann BT *et al.* (2010). Austin, dehydroaustin and other metabolites from *Penicillium brasilianum*. *Quim Nova* 33: 1044-1046
32. COGEM (2014). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal apathogene en pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/141218-01
33. COGEM (2014). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal apathogene en pathogene schimmels. COGEM advies CGM/141218-03
34. American Type Culture Collection: Fungi and yeast. www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Fungi_and_Yeast/Fungi_and_Yeast_Alphanumeric.aspx. Websitebezoek 05/01/2015
35. Hoog de GS *et al.* (2004). *Atlas of Clinical Fungi*, Atlas version 2004.11. Computer Science II, University of Würzburg, Germany
36. Schwartz HF & Krishna M (2008). *Compendium of onion and garlic diseases and pests.* The American Phytopathological Society. APS Press, St. Paul MN