

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 31 mei 2021
KENMERK CGM/210531-01
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie van de slijmzwam *Polysphondylium pallidum*

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,


Naar aanleiding van een verzoek van de Stichting Hogeschool Leiden om *Polysphondylium pallidum* op Bijlage 2, lijst A1 (apathogene organismen) van de Regeling ggo te plaatsen (IG 21-085-2.13-000), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de slijmzwam *Polysphondylium pallidum* en de plaatsing van deze soort op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

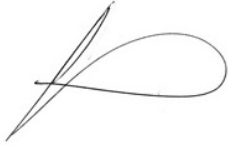
P. pallidum is een amoëbe: een eencellig micro-organisme, maar wordt ook wel een slijmzwam genoemd. Deze amoëbesoort leeft in aarde en rottend organisch materiaal, en voedt zich met bacteriën. Bij een tekort aan voedingsstoffen ontwikkelt *P. pallidum* een vruchtlichaam, dat bestaat uit meerdere eencelligen. In het vruchtlichaam ontwikkelen sommige eencelligen zich tot een sporendragende structuur en andere eencelligen zich tot sporen. De sporen worden verspreid via water en aarde door middel van regenwormen en rolpissebedden, op de grond voedende vogels en wellicht via het schoeisel van de mens, maar niet door de lucht. De COGEM is niet bekend met publicaties betreffende pathogeniteit van *P. pallidum* voor mens, dier of plant.

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat *P. pallidum* niet pathogeen is voor mens, dier en plant. Zij adviseert daarom deze soort in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en tevens op te nemen in Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.



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

Met vriendelijke groet,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. - Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
 - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG
 Milieu en Internationaal

Dit advies is mede tot stand gekomen met de inbreng van Prof. dr. P. Schaap van de University of Dundee, Verenigd Koninkrijk.

Pathogeniteitsclassificatie van de slijmzwam *Polysphondylium pallidum*

COGEM advies CGM/210531-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van de Stichting Hogeschool Leiden, is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de slijmzwam *Polysphondylium pallidum* (IG 21-085) en de plaatsing van deze soort op Bijlage 2, lijst A1 van de ‘Regeling genetisch gemodificeerde organismen’ (Regeling ggo).¹ Deze bijlage bestaat uit een lijst van micro-organismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant. Opname op Bijlage 2, lijst A1 betekent dat onder ML-I laboratoriumcondities met het betreffende micro-organisme ggo’s vervaardigd mogen worden indien hierbij vectoren worden gebruikt die wél, of inserties die níet, op de A-lijsten staan (lijst A2 veilige vectoren en lijst A3 inserties). Tevens is de COGEM gevraagd te adviseren over aanvullende voorschriften voor werkzaamheden met *P. pallidum*, betreffende de mogelijke verspreiding van sporen via de lucht.

2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo)

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

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

Opportunistische pathogenen, die uitsluitend ziekte kunnen veroorzaken bij individuen met een verzwakt immuunsysteem of een onderliggend ziektebeeld, worden in de regel als niet-pathogeen beschouwd en kunnen, als aan één van de bovengenoemde voorwaarden van pathogeniteitsklasse 1 is voldaan, op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo geplaatst worden.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 2 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt,

terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is, alsmede een micro-organisme dat bij planten een ziekte kan veroorzaken.

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

Een indeling in pathogeniteitsklasse 4 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

3. *Polysphondylium pallidum*

Polysphondylium pallidum is een eencellige slijmzwam die behoort tot het fylum Amoebozoa en de familie *Dictyosteliidae*.² *P. pallidum* is een amoebesoot en is, anders dan de naam slijmzwam doet vermoeden, niet verwant aan schimmels. *P. pallidum* is ook bekend onder het synoniem *Heterostelium pallidum*.² *P. pallidum* is voor het eerst beschreven aan de hand van isolaten uit mest van ezels, muskusratten en konijnen.³ De amoebesoot leeft in aarde en rottend organisch materiaal, en voedt zich met bacteriën en schimmelsporen.⁴ *P. pallidum* heeft een genoom van 30 megabaseparen groot, verdeeld over 7 chromosomen.⁵ De slijmzwam *P. pallidum* kan als eencellige amoebe een microcyste vormen, die door zijn ondoordringbare celwandstructuur een grotere overlevingskans heeft in ongunstige omstandigheden.^{8,6,7}

P. pallidum vertoont overeenkomsten met de bekendere amoebesoot *Dictyostelium discoideum*, welke als modelorganisme wordt gebruikt voor cytoskeletonderzoek en in het ontwikkelingsbiologieonderzoek.⁵ Net als *D. discoideum*, zullen meerdere eencellige *P. pallidum* amoebes bij een tekort aan voedingsstoffen met elkaar aggregeren en een meercellig vruchtlichaam vormen.^{8,9,10} Het vruchtlichaam bestaat uit cellen die zich specialiseren tot een sporendragende structuur ('stalk') en cellen aan het uiteinde van de sporendrager die zich ontwikkelen tot sporen.^{8,9,10} Het vruchtlichaam van *P. pallidum* kan zijtakken en kransen vormen (lijkend op een dennenboom), waardoor het complexer van vorm is vergeleken met het vruchtlichaam van *D. discoideum*, dat bestaat uit één sporendragende structuur met één groot sporenaggregaat aan het uiteinde.^{9,11} Bij het openbreken van de vruchtlichamen kunnen de slijmzwamsporen worden verspreid en uitgroeien tot eencellige amoeben. De sporen van *P. pallidum* en andere Dictyostelia zijn niet hydrofoob (*persoonlijke communicatie externe deskundige*) en kunnen meegevoerd worden door water.^{12,13,14} De sporen kunnen ook meegenomen en verspreid worden via de aarde door onder meer regenwormen en rolpissebedden¹⁵, insecten¹⁶, op de grond voedende vogels¹⁷ en wellicht via het schoeisel van de mens.¹⁸

4. Eerder COGEM advies en internationale classificaties

De COGEM heeft eerder geadviseerd over de pathogeniteitsklasse van de amoebesoot *Acanthamoeba castellanii*.¹⁹ *A. castellanii* kan het hoornvlies infecteren wat kan leiden tot blindheid en kan bij immuungecompromitteerde personen een fatale hersenontsteking teweeg brengen. De COGEM heeft hierom geadviseerd *A. castellanii*, te beschouwen als een klasse 2 pathogeen. Tevens heeft de COGEM

geadviseerd over werkzaamheden met de amoebes *A. castellanii* en *D. discoideum* in combinatie met genetisch gemodificeerde varianten van de schimmels *Aspergillus fumigatis* en *Aspergillus niger*.¹⁹ *Dictyostelium* spp. staan in de Regeling ggo vermeld op de lijst met apathogene gastheren.^{1,19}

De ‘American Type Culture Collection’ (ATCC), die pathogeniteit voor de mens beoordeelt, beschouwt *P. pallidum* als ‘biosafety level 1’ organisme.²⁰ De Duitse ‘Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen’ (DSMZ) heeft *P. pallidum* ingedeeld in risico groep 1.²¹ Deze inschaling door buitenlandse instanties geldt als referentie en achtergrondinformatie bij de pathogeniteitsclassificatie die door de COGEM wordt uitgevoerd.

5. Overweging en advies

De COGEM is door het Bureau GGO gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van *P. pallidum*, diens plaatsing op Bijlage 2, Lijs A1 van de Regeling ggo.¹ Wetenschappelijk gezien is de pathogeniteit van een micro-organisme in het algemeen goed aan te tonen. De afwezigheid van pathogeniteit is echter moeilijk te bewijzen. Daarbij worden gevallen van pathogeniteit gepubliceerd, terwijl er nauwelijks wordt gerapporteerd over de apathogeniteit van micro-organismen. Hierdoor is van veel micro-organismen weinig literatuur over apathogeniteit voorhanden.

P. pallidum komt voor in rottend organisch materiaal en vormt in ongunstige omstandigheden als eencellige amoebe een microcyste, of vormt met meerdere eencelligen tezamen een vruchtlichaam en ontwikkelt sporen die zich middels water kunnen verspreiden.^{2,4,6,7,8,9,10,12,13} Het cyste-vormende potentieel van *P. pallidum* maakt dat deze soort wordt gebruikt als apathogeen modelorganisme, voor de cystevormende amoebesoorst *A. castellanii* (klasse 2 pathogeen, zie ook paragraaf 4).⁸ De COGEM is niet bekend met publicaties betreffende pathogeniteit van *P. pallidum* voor mens, dier of plant.

Naar aanleiding van de door het Bureau GGO geraadpleegde bronnen^{22,23} is de COGEM gevraagd of een aanvullend inperkingsvoorschrift betreffende de luchtverspreiding van sporen passend is voor werkzaamheden met *P. pallidum*. Dit aanvullende voorschrift betreft ‘Activiteiten met gg micro-organismen die via de lucht sporen kunnen verspreiden worden in een veiligheidskabinet van klasse II (VK-II) uitgevoerd’. In de wetenschappelijke literatuur staat beschreven dat het onwaarschijnlijk is dat de slijmzwamsporen zich verspreiden via de wind, aangezien de sporenaggregaten niet makkelijk van de sporendragende structuren los komen en de sporen te zwaar zijn om door de lucht gedragen te worden.^{12,16} Daarnaast zijn sporen van *P. pallidum* en alle andere Dictyostelia, in tegenstelling tot schimmelsporen, niet hydrofoob waardoor zij niet via de lucht verspreid kunnen worden (*persoonlijke communicatie externe deskundige*).¹⁴

De COGEM is van oordeel dat *P. pallidum* niet pathogeen is voor mens, dier en plant. Zij adviseert daarom deze soort in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en tevens op te nemen in Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

Gezien de sporen van *P. pallidum* niet door de lucht verspreid kunnen worden, stemt de COGEM niet in met het aanvullende inperkingsvoorschrift om werkzaamheden met *P. pallidum* uit te voeren in

een veiligheidskabinet van klasse II (VK-II) om mogelijke verspreiding van sporen via de lucht te voorkomen.

Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2021-04-01> (bezoekt op 21-05-2021)
2. NCBI Taxonomy Browser – NCBI:txid13642h
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=13642> (bezoekt op 21-05-2021)
3. Olive E (1901). A Preliminary Enumeration of the Sorophoreæ. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences* 37:333-344
4. Uniprot Proteomes - *Polysphondylium pallidum* (strain ATCC 26659 / Pp 5 / PN500) (*Heterostelium pallidum*) <https://www.uniprot.org/proteomes/UP000001396> (bezoekt op 21-05-2021)
5. Heidel, A. J *et al.* (2011). Phylogeny-wide analysis of social amoeba genomes highlights ancient origins for complex intercellular communication. *Genome res.* 21:1882–1891
6. Toama MA & Raper KB (1967). Microcysts of the cellular slime mold *Polysphondylium pallidum*. II. Chemistry of the microcyst walls. *J Bacteriol.* 94:1150–1153
7. Budniak AA & O'Day DH (2012). Microcysts: the third developmental pathway of social amoebozoans. *Protist* 163:2–14
8. Du Q & Schaap P (2014). The social amoeba *Polysphondylium pallidum* loses encystation and sporulation, but can still erect fruiting bodies in the absence of cellulose. *Protist* 165:569–579
9. Kawabe Y *et al.* (1999). LbrA, a protein predicted to have a role in vesicle trafficking, is necessary for normal morphogenesis in *Polysphondylium pallidum*. *Gene* 239:75–79
10. Funamoto S *et al.* (2003). cAMP-dependent protein kinase regulates *Polysphondylium pallidum* development. *Differentiation* 71:51–61
11. Schilde C *et al.* (2014). Evolutionary reconstruction of pattern formation in 98 *Dictyostelium* species reveals that cell-type specialization by lateral inhibition is a derived trait. *EvoDevo.* 5:34
12. Swanson *et al.* (1999). Global distribution of forest soil dictyostelids. *J Biogeogr.* 26:133-148
13. O'Dell WD (1979). Isolation, enumeration and identification of amoebae from a Nebraska lake. *J. Protozool.* 26:265-269.
14. Geraadpleegde externe deskundige: prof. dr. P. Schaap, University of Dundee, Verenigd Koninkrijk.
15. Huss M (1989). Dispersal of cellular slime molds by two soil invertebrates. *Mycologia* 81:677-682
16. Smith J *et al.* (2014). Fruiting bodies of the social amoeba *Dictyostelium discoideum* increase spore transport by *Drosophila*. *BMC Evol. Biol.* 14:105
17. Suthers HB (1985). Ground-feeding migratory songbirds as cellular slime mold distribution vectors. *Oecologia* 65:526-530
18. Perrigo AL *et al.* (2012). What's on your boots: an investigation into the role we play in protist dispersal. *J. Biogeogr.* 39:998-1003
19. COGEM (2018). Classificatie en inschaling van werkzaamheden met amoebes en genetisch gemodificeerde Aspergillii. COGEM advies CGM/180313-01

20. American Type Culture Collection, *Polysphondylium pallidum* Olive ATCC 26659
https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/26659.aspx?geo_country=nl# (bezocht op 21-05-2021)
21. DSMZ ‘Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen’ *Polysphondylium pallidum* Olive DSM 1394
<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-1394> (bezocht op 21-05-2021)
22. Wikipedia *Polysphondium pallidum*. https://en.wikipedia.org/wiki/Polysphondylium_pallidum (bezocht op 27-05-2021)
23. MicrobeWiki *Polysphondium pallidum*.
https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Polysphondylium_pallidum (bezocht op 27-05-2021)