

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. V.L.W.A. Heijnen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 13 juli 2022
KENMERK CGM/220713-01
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie van de schimmelsoort *Byssochlamys fulva*

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een verzoek van Ginkgo Bioworks Netherlands B.V. om de schimmelsoort *Byssochlamys fulva* op Bijlage 2, lijst A1 te plaatsen (IG 22-087_2.13-000), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de schimmelsoort *Byssochlamys fulva* en de plaatsing van deze schimmel op Bijlage 2, lijst A1 (apathogene gastheerorganismen) van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen'.

B. fulva komt voor in de grond, vaak op plaatsen waar ook fruit geteeld wordt. De sporen van deze schimmel kunnen hoge temperaturen weerstaan. Ook kan *B. fulva* groeien onder condities met weinig (<0,5%) zuurstof, en produceert de schimmel bepaalde enzymen die fruitproducten aantasten. Deze combinatie van eigenschappen maakt dat de schimmel vaak geassocieerd is met het bederf van fruitproducten en -sappen.

Verschillende *Byssochlamys*-soorten, waaronder *B. fulva*, produceren mycotoxines. Van deze schimmels zijn echter geen aanwijzingen bekend dat zij ziekte veroorzaken in mensen of dieren. Ook zijn er bij de COGEM geen aanwijzingen dat *B. fulva* pathogeen is voor planten.

Alles in overweging nemende adviseert de COGEM de schimmelsoort *B. fulva* in te delen in pathogeniteitsklasse 1, en op te nemen op 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.

Hoogachtend,

Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c.

- Drs. Y de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
- Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG Milieu en Internationaal

Pathogeniteitsclassificatie van de schimmelsoort *Byssochlamys fulva*

COGEM advies CGM/220713-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van Ginkgo Bioworks Netherlands B.V. (IG 22-087) is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsclassificatie van de schimmelsoort *Byssochlamys fulva*, en over de plaatsing van deze schimmel op Bijlage 2, lijst A1, lijst A1 van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen' (Regeling ggo).¹ Deze bijlage bestaat uit een lijst van gastheerorganismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant. Opname op Bijlage 2, lijst A1 betekent dat onder ML-I laboratoriumcondities met het betreffende organisme genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) vervaardigd mogen worden indien hierbij vectoren worden gebruikt die wél, of inserties die níet, op de A-lijsten staan (respectievelijk 'lijst A2 veilige vectoren' en 'lijst A3 inserties'). Activiteiten met deze ggo's kunnen, zonder dat een aanvrager daar een milieurisicobeoordeling voor hoeft aan te leveren, direct na kennisgeving gestart worden.

2. Classificatie van micro-organismen volgens de Regeling 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, 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 microorganisme 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. Taxonomie en naamgeving van schimmels

De taxonomie van schimmels is complex. Mede door de toenemende informatie over genoomsequenties is de taxonomie aan verandering onderhevig. Dit vraagt om een zorgvuldige identificatie van de te gebruiken schimmelsoort. Veel schimmels hebben zowel een geslachtelijk (teleomorf) als een ongeslachtelijk (anamorf) stadium. Omdat zij er in deze stadia verschillend uitzien, hebben verscheidene schimmels in het verleden meerdere soortnamen gekregen. In 2011 is door het 'International Botanical Congress' besloten dat het tot dan toe gebruikelijke duale nomenclatuursysteem van schimmels komt te vervallen en dat vanaf januari 2013 één schimmel slechts één naam mag hebben.² De nieuwe naamgeving is nog niet altijd consistent doorgevoerd.

4. De schimmelsoort *Byssochlamys fulva*

Byssochlamys fulva (anamorfe naam: *Paecilomyces fulvus*)³ is een filamenteuze schimmel die behoort tot het fylum *Ascomycota* en de familie *Trichocomaceae*, en die voor het eerst is beschreven in 1933.^{4,5} De schimmel komt voor in de grond, en wordt vaak aangetroffen op grond waar ook fruit geteeld wordt. Vruchten die laag bij de grond groeien, kunnen via de grond, of tijdens het oogsten, gecontamineerd raken met de schimmel.⁶ Soorten uit het genus *Byssochlamys* staan erom bekend dat zij kunnen groeien onder bijzondere omstandigheden, zoals lage concentraties zuurstof, hoge zuurgraad of hoge CO₂ concentraties. Zo is voor *B. fulva* gevonden dat deze soort onder CO₂ concentraties tot 60%, in combinatie met lage O₂ concentraties (<0,5%), kunnen overleven.⁷ *Byssochlamys*-schimmels (met name *B. fulva* en *Byssochlamys nivea*) worden wereldwijd aangetroffen in (ingeblikte) fruitproducten of -sappen. Deze schimmels produceren ascosporen die verhitting boven de 85°C, bijvoorbeeld tijdens de verwerking van fruitproducten, kunnen doorstaan.^{8,9,10} Deze schimmels zijn vaak verantwoordelijk voor het bederf van deze producten, onder andere vanwege de productie van pectinolytische enzymen die het vruchtwefsel zachter maken en een vieze smaak kunnen geven aan het product.⁶

Van schimmels uit het genus *Byssochlamys* is gerapporteerd dat deze verschillende mycotoxines kunnen produceren in gecontamineerde voedselproducten, waaronder 'mycophenolic acid' (gerapporteerd voor *B. nivea*), patuline, byssotoxine A en 'byssochlamic acid'.⁶ Van *B. fulva* is gerapporteerd dat deze

patuline, ‘byssochlamic acid’ en byssotoxine A kan produceren. Van deze drie mycotoxines is bekend dat deze toxische effecten kunnen hebben in proefdieren, waaronder muizen en cavia’s.^{6,11}

Patuline is geassocieerd met immunologische, neurologische en gastro-intestinale effecten.¹² Dit toxine wordt onder andere aangetroffen in appelproducten en -sappen en voor de aanwezigheid van dit mycotoxine gelden Europese limieten.¹³ Over de productie van patuline door *B. fulva* heerst enige discussie in de wetenschappelijke literatuur. In 1977 is de productie van patuline door twee van de tien onderzochte *B. fulva* stammen in medium en in verschillende vruchtensappen beschreven.¹⁴ In een latere publicatie (2014) is aangegeven dat *B. fulva* ten onrechte als patuline-producerende schimmel is gekenmerkt,¹¹ en is in verschillende experimenten de productie van patuline door verschillende *B. fulva* isolaten in culturen niet gedetecteerd.^{6,15} Hierbij is ook één van de twee patuline-producerende *B. fulva* stammen uit 1977 onderzocht en is ook voor deze stam geen patuline-productie waargenomen. Tevens is gerapporteerd dat twee genen die betrokken zijn bij de biosynthese van patuline (polyketide synthase (*pks*) en isoepoxydon dehydrogenase (*idh*)), ontbreken in *B. fulva*.¹⁵ Een studie in 2010 rapporteert echter dat een *B. fulva* isolaat IOC 4518 geïnculeerd in troebele en heldere appelsap, wel patuline produceert.¹³

Verder is beschreven dat *B. fulva* de mycotoxines ‘byssochlamic acid’^{6,11} en byssotoxine A¹⁶ kan produceren.³ Een studie uit 1972 naar de toxiciteit van ‘byssochlamic acid’ in ratten toonde aan dat de effecten van orale toediening in ratten mild waren; het gewicht van de lever was toegenomen, het lichaamsgewicht was afgenomen en er was een verlaging van het hemoglobine gehalte waarneembaar.¹⁷ Tevens werd in de studie opgemerkt dat in tomatensap en druivensap die voorafgaand aan een hitte behandeling geïnculeerd zijn met *B. fulva*, tot een jaar later geen ‘byssochlamic acid’ werd gedetecteerd. In 1976 is byssotoxine A geëxtraheerd uit *B. fulva* kweekmedium en is in experimenten toxisch bevonden voor kippenembryo’s en pekelgarnalen (*artemia*).¹⁶

5. Eerdere relevante COGEM adviezen

B. fulva is nog niet eerder door de COGEM geclassificeerd. Het genus *Byssochlamys* wordt wel genoemd in een appendix van een onderzoeksrapport waarin gescreend wordt op mogelijke plantpathogeniteit van schimmels.¹⁸ De appendix is tot stand gekomen door een screening van de database van de ‘American Phytopathological Society’ (APS) op schimmels (en bacteriën) die daar zijn opgenomen omdat ze geassocieerd worden met ziekten in planten. Ook wordt het genus *Byssochlamys* genoemd in een onderzoeksrapport waarin gekeken is naar toxine-producerende schimmels.¹⁹ Hierin wordt vermeld dat *Byssochlamys*-schimmels de mycotoxines ‘mycophenolic acid’ en patuline kunnen produceren.

6. Classificaties van andere beoordelende instanties

Door de American Type Culture Collection (ATCC) wordt *B. fulva* ingedeeld in biosafety level 1, gebaseerd op pathogeniteit voor de mens.²⁰ In de ‘Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen’ (DSMZ) is *B. fulva* ingedeeld in risicogroep 1, gebaseerd op de Duitse ‘Technische Regel für Biologische Arbeitsstoffe’ (TRBA).^{21,22}

7. Overweging en advies

B. fulva is een schimmel die oorspronkelijk in de grond voorkomt. De sporen van de schimmel kunnen hoge temperaturen weerstaan en de schimmel kan onder afwijkende atmosferische concentraties groeien. Ook produceert de schimmel pectinolytische enzymen die het vruchtvlies van fruitproducten aan kunnen tasten. Deze combinatie van eigenschappen maakt dat de schimmel vaak geassocieerd wordt met het bederf van fruitproducten en -sappen.

De schimmel kan ook verschillende mycotoxines produceren, namelijk patuline, ‘byssochlamic acid’ en byssotoxine A. Met betrekking tot de productie van het mycotoxine patuline zijn tegenstrijdige berichten gepubliceerd in de wetenschappelijke literatuur. Het is niet geheel uit te sluiten dat bepaalde isolaten mogelijk patuline kunnen produceren. De productie van patuline neemt toe naarmate het rottingsproces van het fruit toeneemt.¹² Rottende producten mogen echter niet voor voedingsmiddelen worden gebruikt en het is onwaarschijnlijk dat deze geconsumeerd worden, waardoor de kans op blootstelling aan patuline klein is.

De productie van mycotoxines hoeft niet per definitie gerelateerd te zijn aan pathogeniteit. Verschillende *Byssochlamys*-soorten produceren mycotoxines, maar van deze schimmels zijn geen aanwijzingen bekend dat zij infecties veroorzaken in mensen of dieren.^{23,24} In een enkele publicatie is een *Byssochlamys* schimmelinfectie aangetroffen in een hond die een immunosuppressieve behandeling onderging.²⁴ Het is niet bekend om welke *Byssochlamys*-soort het specifiek gaat. Infecties in immungecompromitteerde dieren of mensen worden echter in de regel niet als aanwijzing voor pathogeniteit gezien. Ook voor *B. fulva* zijn bij de COGEM geen aanwijzingen voor pathogeniteit voor mens en dier bekend. De schimmelsoort *B. fulva* staat ook niet vermeld in de Atlas of Clinical Fungi, het naslagwerk voor klinische relevante schimmels.²⁵

In de wetenschappelijke literatuur wordt *B. fulva* veelal aangeduid als ‘spoilage’ organisme.^{e.g. 26,27} In de ‘American Phytopathological Society’ (APS) database wordt *B. fulva* genoemd in associatie met ‘Byssochlamys rot’ in aardbeien. Hierbij wordt aangegeven dat de ziekte niet bekend is in Noord-Amerika,²⁸ en er wordt niet vermeld of dit daadwerkelijke pathogeniteit betreft of aantasting van het fruit na het oogsten (bewaarz ziekte, door de COGEM als apathogeen beschouwd²⁹). In de ‘European and Mediterranean Plant Protection Organization’ (EPPO) database is *B. fulva* ook opgenomen, maar wordt geen verdere informatie gegeven over deze schimmelsoort of mogelijke pathogeniteit.³⁰ In de ‘USDA Fungal database’ is *B. fulva* opgenomen als schimmel die is aangetroffen op *Tectona grandis* (Teakboom).^{31,32} Bij de COGEM zijn geen aanwijzingen bekend dat *B. fulva* pathogeen is voor fruitsoorten of andere planten.

Al het bovenstaande in overweging nemende, adviseert de COGEM *B. fulva* in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en op te nemen in Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

Referenties

1. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013.
<https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2022-01-01> (bezocht op 30 juni 2022)

2. Hawksworth DL (2011). A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *IMA Fungus* 2: 155-162
3. Samson RA *et al.* (2009). Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssoschlamys* and its *Paecilomyces* anamorphs. *Persoonia* 22: 14-27
4. Nederlands Soortenregister. Overzicht van de Nederlandse Biodiversiteit. *Byssoschlamys fulva*.
5. Mycobank. *Byssoschlamys fulva* <https://www.mycobank.org/page/Simple%20names%20search> (bezocht op 30 juni 2022)
6. Houbraken J *et al.* (2006). *Byssoschlamys*: significance of heat resistance and mycotoxin production. In: *Advances in Food Mycology - Advances in Experimental Medicine and Biology* Vol. 571 Eds.: Hocking *et al.* pp. 211-225
7. Taniwaki MH *et al.* (2009). Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. *Int. J. food Microbiol.* 132: 100-108
8. Santos JLP *et al.* (2018). Inter- and intra-species variability in heat resistance and the effect of heat treatment intensity on subsequent growth of *Byssoschlamys fulva* and *Byssoschlamys nivea*. *Int. J. Food Microbiol.* 279: 80–87
9. Salomão BCM *et al.* (2014). Survey of molds, yeast and *Alicyclobacillus* spp. from a concentrated apple juice productive process. *Braz. J. Microbiol.* 45: 49-58
10. Panagou EZ *et al.* (2010). Modelling the effect of temperature and water activity on the growth rate and growth/ no growth interface of *Byssoschlamys fulva* and *Byssoschlamys nivea*. *Food Microbiol.* 27: 618-627
11. Rico-Munoz E *et al.* (2014). Detection and Enumeration of Heat-resistant Molds. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, Chapter 22.
12. Altomare C *et al.* (2021). Mycotoxins and mycotoxigenic fungi: risk and management. a challenge for future global food safety and security. In: *Encyclopedia of Mycology*, Volume 1. Pp. 64-93
13. Sant'Ana AS *et al.* (2010). Influence of package, type of apple juice and temperature on the production of patulin by *Byssoschlamys nivea* and *Byssoschlamys fulva*. *Int. J. Food Microbiol.* 142: 156:163
14. Rice SL *et al.* (1977). Patulin production by *Byssoschlamys* spp. in fruit juices. *Appl. Environ. Microbiol.* 34: 791-796
15. Puel O *et al.* (2007). The inability of *Byssoschlamys fulva* to produce patulin is related to absence of 6-methylsalicylic acid synthase and isoeopoxydon dehydrogenase genes. *Int. J. Food Microbiol.* 115: 131-139
16. Kramer RK *et al.* (1976). Byssotoxin A, a secondary metabolite of *Byssoschlamys fulva*. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 249-253
17. King Jr AD *et al.* (1972). *Byssoschlamys fulva*, metabolite toxicity in laboratory animals. *J. Food Sci.* 37: 86-89
18. Van der Vlugt RAA *et al.* (2015). Screening of the COGEM lists of non-pathogenic bacteria and fungi for postharvest diseases and plant pathogens. COGEM onderzoeksrapport CGM 2015-06
19. Waalwijk C & de Nijs M (2014). Mycotoxins and assessment of environmental risks in laboratory conditions in The Netherlands. COGEM onderzoeksrapport CGM 2013-01
20. American Type Culture Collection (ATCC). *Byssoschlamys fulva* <https://www.atcc.org/products/28799> (bezocht op 30 juni 2022)

21. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) – German collection of microorganisms and cell cultures GmbH.
<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-1808> (bezocht op 30 juni 2022)
22. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAUA) . TRBA 460 "Einstufung von Pilzen in Risikogruppen" <https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-460.html> (bezocht op 30 juni 2022)
23. Moreira CD *et al.* (2018). Human pathogenic Paecilomyces from food. *Microorganisms* 64: doi:10.3390/microorganisms6030064
24. Atencia S *et al.* (2014). Systemic fungal infection in a dog: a unique case in Ireland. *Ir. Vet. J.* 67: 17
25. Atlas of Clinical Fungi. <https://www.clinicalfungi.org/> (bezocht op 30 juni 2022)
26. Silva FVM & Evelyn (2020). Resistant moulds as pasteurization target for cold distributed high pressure and heat assisted high pressure processed fruit products. *J. Food Eng.* 282: 109998
27. Taniwaki MH *et al.* (2006). Comparison of hyphal length, ergosterol, mycelium dry weight, and colony diameter for quantifying growth of fungi from foods. In: *Advances in Food Mycology - Advances in Experimental Medicine and Biology* Vol. 571 Eds.: Hocking *et al.* pp. 49-67
28. American Phytopathological Society (APS). Diseases of Strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) <https://www.apsnet.org/edcenter/resources/commonnames/Pages/Strawberry.aspx> (bezocht op 30 juni 2022)
29. COGEM (2015). Adviserende en signalerende aanbiedingsbrief bij rapport 'Screening of the COGEM lists of non-pathogenic bacteria and fungi for postharvest diseases and plant pathogens'. COGEM aanbiedingsbrief CGM/151126-01
30. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). <https://gd.eppo.int/taxon/BYSCFU> (bezocht op 30 juni 2022)
31. United States Department of Agriculture (USDA). Fungal Databases – Quick Search. https://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/new_allView.cfm?whichone=all&thisName=Byssochlamys%20fulva&organismtype=Fungus&fromAllCount=yes (bezocht op 30 juni 2022)
32. Doilom M *et al.* (2016). Checklist of fungi on teak. *Mycosphere* 7: 656–678