

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

**DATUM** 30 november 2022  
**KENMERK** CGM/221130-01  
**ONDERWERP** Advies werkzaamheden met entomopathogene schimmelsoorten

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag over dossier IG 22-115\_2.8-000 getiteld 'Onderzoeken van levenscyclus van entomopathogene schimmelsoorten', ingediend door de Universiteit Utrecht, deelt de COGEM u het volgende mee.

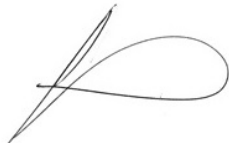
**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-)schimmelsoorten in combinatie met infectie-experimenten met mieren. *Ophiocordyceps unilateralis* en *Ophiocordyceps humberitii* zijn schimmels die respectievelijk tropische mieren en wespen infecteren en het gedrag van de insecten beïnvloeden. De aanvrager is voornemens om genen in deze schimmels uit te schakelen, en genen uit deze schimmels tot expressie te brengen in een andere schimmelsoort, *Beauveria bassiana*, die veel verschillende insecten kan infecteren. De drie schimmels produceren sporen, al zijn voor de sporulatie van *O. unilateralis* en *O. humberitii* specifieke omgevingscondities vereist. De drie gg-schimmels worden gebruikt om mieren, van de tropische soort *Camponotus floridanus* die voornamelijk in Florida voorkomt, te infecteren. Om verspreiding van geïnfecteerde mieren te voorkomen, zullen zij onder andere in afgesloten, met fluon of talkpoeder bewerkte, containers worden gehouden in een afgesloten incubator.

De COGEM kan niet uitsluiten dat de genetisch gemodificeerde *O. unilateralis* of *O. humberitii* onder laboratoriumomstandigheden sporen zouden kunnen vormen. De COGEM is van oordeel dat het inbrengen van sequenties van deze schimmels in *B. bassiana* kan leiden tot een verhoogde pathogeniteit. Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat het vervaardigen van de gg-schimmels op ML-II plaats kan vinden, met inachtneming van maatregelen om verspreiding van schimmelsporen te voorkomen. Tevens is de COGEM van oordeel dat werkzaamheden met *C. floridanus* met gg-schimmels kunnen plaatsvinden op ML-II, mits additionele voorschriften in acht worden genomen voor de inperking van geïnfecteerde *C. floridanus* mieren en bij werkzaamheden met zowel gg-*B. bassiana*, gg-*O. unilateralis* als gg-*O. humberitii* maatregelen worden genomen om verspreiding van schimmelsporen 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. Y de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
- Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG Milieu en Internationaal

*Dit advies is mede tot stand gekomen met inbreng van T. Bukovinszki PhD*

*Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is het COGEM lid dr. J.J.P.A. de Cock niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies*

# Werkzaamheden met genetisch gemodificeerde entomopathogene schimmelsoorten in combinatie met mieren

## COGEM advies CGM/221130-01

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) schimmelsoorten in combinatie met mieren. De aanvraag is afkomstig van de Universiteit Utrecht (IG 22-115) en betreft onderzoek naar entomopathogene schimmels uit het soortencomplex *Ophiocordyceps unilateralis* sensu lato en *Ophiocordyceps humberitii* sensu lato. Deze schimmelsoorten kunnen het gedrag van insecten manipuleren om zichzelf verder te verspreiden.

De werkzaamheden hebben als doel om genen die betrokken zijn bij infectie en gedragsmanipulatie, in kaart te brengen. De aanvrager zal dit doen door knock-outs te maken m.b.v. CRISPR-Cas9 en door genen van *O. unilateralis* en *O. humberitii* tot expressie te brengen in een entomopathogene schimmelsoort met een breed gastheerbereik, *Beauveria bassiana*. Mogelijk zullen er ook genen van *O. unilateralis* in *O. humberitii* tot expressie worden gebracht. De gg-schimmels worden gebruikt om mieren (*Camponotus floridanus* (Buckley), 'Florida carpenter ant'), te infecteren.

### 2. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft eerder geadviseerd over de schimmelsoorten *O. humberitii*, *B. bassiana* en het soortencomplex *O. unilateralis*.<sup>1,2,3</sup> Deze drie schimmelsoorten zijn insect-specifieke pathogenen en zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. Omdat de taxonomie van het soortencomplex *O. unilateralis* sensu lato niet geheel duidelijk is en aan verandering onderhevig, zijn alleen de soorten behorende tot de *O. unilateralis* 'core clade' geassocieerd.<sup>1</sup> Ook in dit onderhavige advies zal de COGEM zich beperken tot soorten behorende tot de 'core clade' van *O. unilateralis* en de soort *O. humberitii*.

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over werkzaamheden met *Camponotus floridanus*. Wel heeft zij naar aanleiding van een onderzoeksproject in 2013 een basisset inperkingsmaatregelen opgesteld voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerde geleedpotigen.<sup>4</sup> Deze inperkingsmaatregelen zijn opgesteld als handvatten, en kunnen casusgewijs worden uitgebreid of versoerd.

### 3. Omschrijving van de organismen

#### 3.1 De schimmelsoorten *O. unilateralis* en *O. humberitii*

Het genus *Ophiocordyceps* (voorheen bekend als *Cordyceps*) bevat meer dan 200 soorten entomopathogene schimmels die voorkomen in gematigde en (sub)tropische regio's over de hele wereld.<sup>5,6</sup> Soorten van het soortencomplex *O. unilateralis* sensu lato infecteren mierensoorten die voorkomen in tropische gebieden, met name Midden- en Zuid-Amerika (neo-tropisch). Dit zijn met name houtmieren ('carpenter ants') van het genus *Camponotus* en in enkele gevallen mieren van het genus *Polyrhachis*.<sup>7,8</sup> Bij *Ophiocordyceps*-schimmels dringen de sporen via de weke delen van het exoskelet het insect binnen. De *O. unilateralis* schimmel beïnvloedt het gedrag van de mier, waarna

deze het nest verlaat en ‘zombie-achtig’ gedrag vertoont. De mier bijt zich uiteindelijk aan de onderzijde van een blad of stok vast, en sterft daar.<sup>9</sup> Uit de kop van de dode mier ontwikkelt de schimmel een vruchtlichaam (ascocarp), waarin ascosporen worden gevormd die op de grond vallen en andere mieren kunnen infecteren. Bij *O. unilateralis* verloopt de periode van infectie tot de dood van de gastheer in ongeveer 3-6 dagen, en verschijnen de ascocarpen na ongeveer 7 dagen uit het kadaver.<sup>10</sup> Voor het vormen van een ascocarp zijn specifieke lichtcondities nodig.<sup>11</sup> De ascocarpen verschijnen niet wanneer het kadaver wordt verplaatst naar een andere locatie.<sup>12</sup> Voor sporulatie zijn specifieke omstandigheden (licht, temperatuur en luchtvochtigheid) nodig. De *Ophiocordyceps*-schimmels sporuleren beter bij stabiele omstandigheden, wat mogelijk de reden zou kunnen zijn dat de schimmels de geïnfecteerde insecten de hoogte laten opzoeken.<sup>13</sup>

De schimmelsoort *O. humbertii* komt voornamelijk voor in tropische gebieden en is in staat verschillende ‘sociale’ wespsoorten (familie *Vespidae*, Plooiwesp) te infecteren, onder andere uit de genera *Agelaia*, *Apoica*, *Mischocyttarus*, *Polybia* en *Pseudopolybia*.<sup>14,15,16</sup> Gelijkelijk aan *O. unilateralis* dringen de sporen van *O. humbertii* het insect binnen, waar de schimmel het zenuwstelsel aantast en het gedrag van de wesp beïnvloedt.

### 3.2 De schimmelsoort *B. bassiana*

*B. bassiana* is pathogeen voor een breed spectrum aan insecten en spinachtigen.<sup>17</sup> *B. bassiana* groeit vegetatief, zowel filamenteus als in gistvorm (blastosporen) en kan ook conidiosporen vormen.<sup>18</sup> De schimmel infecteert insecten door zich als sporen aan de buitenkant vast te hechten, waarna ze ontkiemen en het insect binnendringen. De schimmel verspreidt zich via het hemolymfe in het insect. *B. bassiana* manipuleert het gedrag van zijn gastheer niet.<sup>19,20</sup> De schimmel produceert mycotoxines, waaronder beauvericine, waardoor het insect sterft.<sup>17</sup> De schimmel groeit verder uit het dode insect en genereert sporen (conidia) aan de buitenkant van het kadaver.<sup>17</sup> De relatief kleine sporen (2-3 µm) worden geproduceerd in poederachtige clusters, en via de lucht verspreid. Hoe snel sporen geproduceerd worden, is afhankelijk van het *B. bassiana* isolaat en de omstandigheden. Sporenvorming kan vanaf de tweede dag na de dood van het insect kan plaatsvinden.<sup>21</sup>

### 3.3 De miersoort *C. floridanus*

*C. floridanus* (‘Florida carpenter ant’) is een miersoort die voornamelijk in Florida voorkomt, met slechts enkele observaties in aangrenzende staten in het zuidoosten van de Verenigde Staten.<sup>22,23,24</sup> De lengte van de mieren varieert van 5,5 tot 10 mm.<sup>25</sup> De mieren vormen nesten door hout uit te graven, en zijn daardoor te vinden in dode boomstronken of rottend hout.<sup>25,26</sup> De mieren en hun nesten worden ook aangetroffen in (houten) gebouwen.<sup>27</sup>

De kolonies zijn groot en bestaan doorgaans uit ongeveer 15.000 werkmieren en één koningin. De werkmieren verzamelen voedsel en produceren alleen steriele eitjes.<sup>22</sup> Wanneer de kolonie ouder is, twee tot vijf jaar afhankelijk van omgevingscondities, ontstaan gevleugelde mieren die seksueel kunnen reproduceren.<sup>22</sup> De gevleugelde mannelijke mieren sterven na de voorplanting, de gevleugelde vrouwelijke mieren beginnen als nieuwe koningin hun eigen kolonie. Voortplanting tussen de gevleugelde mieren gebeurt in Florida voornamelijk in de zomer (juni tot augustus), na een zomerstorm wanneer de luchtvochtigheid zeer hoog is.<sup>22</sup>

## 4. Omschrijving van de voorgenomen werkzaamheden

### 4.1 Modificatie van de schimmelsoorten

De aanvrager is voornemens knock-outs te genereren van de schimmelsoorten *O. humberitii* en *O. unilateralis*, met behulp van gg-*Agrobacterium tumefaciens* en vectoren die CRISPR-Cas modificatie mogelijk maken. Tevens is de aanvrager voornemens om, m.b.v. gg-*A. tumefaciens*, sequenties van *O. unilateralis* en *O. humberitii* tot expressie te brengen in *B. bassiana*. Mogelijk worden er ook genen van *O. unilateralis* in *O. humberitii* tot expressie gebracht. Het betreft sequenties die homologie vertonen met bacteriële enterotoxines, en genen die een veronderstelde rol spelen bij gedragsmanipulatie van de gastheer. Ook worden niet-gekaracteriseerde sequenties van *O. unilateralis* en *O. humberitii* ingebracht.

### 4.2 Infectie van de mieren met gg-schimmels en gedragsobservatie

De aanvrager is voornemens om *C. floridanus* mieren te infecteren met de (gg-)schimmels. Voor de experimenten worden uitsluitend werkmieren gebruikt. De mieren worden gehuisvest in afgesloten containers (tupperware bakken) met fluon (polytetrafluorethyleen) of met talkpoeder bewerkte, hoog opstaande randen. De mieren worden in hun containers in incubatoren ondergebracht. Deze incubatoren worden uitsluitend voor dit onderzoek gebruikt.

De mieren worden d.m.v. micro-injectie kunstmatig geïnfecteerd met de gg-schimmels (gistvormige cellen). Voor het toedienen van de micro-injecties worden de mieren verdoofd door de container op ijs te zetten. De verdoofde mieren worden gefixeerd met een pincet, en één voor één geïnjecteerd met de gg-schimmels. Gedurende de injectieprocedure blijft de onderzoeker aanwezig om de mieren te monitoren. Daarna worden de geïnjecteerde mieren in een doorzichtige plastic container met fluon/talk bewerkte opstaande wanden, op kamertemperatuur geplaatst. Vervolgens worden de mieren in hun containers in afgesloten, lichtdichte incubatoren gehouden waarin het licht (12 uur licht en 12 uur donker), de temperatuur (25 tot 28 graden Celsius) en de luchtvochtigheid (70%) worden gereguleerd.

Tijdens de infectie-experimenten blijven de containers en incubatoren in principe gesloten, maar deze worden minstens één keer per dag geopend om overlevingsdata te verzamelen, dode individuen te verwijderen en voedsel te verversen. Om het gedrag van de geïnfecteerde mieren vast te leggen, worden de mieren in gesloten petrischalen geplaatst, in open containers met een fluon- of talkpoeder-barrière, zodat een camera geplaatst boven de bakken het gedrag kan opnemen.

## 5. Voorstel voor inschaling van werkzaamheden en aanvullende maatregelen

De aanvrager verzoekt om de modificatie van de schimmelsoorten *B. bassiana*, *O. humberitii* en *O. unilateralis* plaats te laten vinden op ML-II, met inachtneming van aanvullende voorschriften voor activiteiten met gg-schimmels die sporen produceren. Deze voorschriften gelden voor werkzaamheden met alle drie de schimmelsoorten, *B. bassiana*, *O. humberitii* en *O. unilateralis*, en betreffen:

- De open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd.
- De kweek vindt plaats in sporendichte containers.

Het betreft hierbij enkel het vervaardigen van de gg-schimmels, en niet werkzaamheden in combinatie met *C. floridanus* mieren.

Voor werkzaamheden met gg-*B. bassiana*, gg-*O. humberitii* en gg-*O. unilateralis* in combinatie met *C. floridanus* wordt eveneens ML-II voorgesteld, met inachtneming van aanvullende voorschriften. Hierbij worden alleen voor *B. bassiana* maatregelen opgenomen om sporenverspreiding te voorkomen. De voorgestelde aanvullende maatregelen voor werkzaamheden met *C. floridanus* in combinatie met de gg-schimmels zijn:

- geïnfecteerde mieren worden gehouden in afgesloten plastic containers met hoog opstaande wanden gecoat met fluon of talkpoeder;
- geïnfecteerde mieren worden tijdens gedragsobservaties in afgesloten petrischalen gehouden die geplaatst zijn in open plastic containers met hoog opstaande wanden gecoat met fluon of talkpoeder;
- de incubatoren worden niet gelijktijdig gebruikt voor andere experimenten;
- dode geïnfecteerde mieren worden uiterlijk binnen 24 uur uit het experiment verwijderd;
- in de ruimte waar de mieren gehouden worden, wordt vliegtape aangebracht op de grond voor de deur en rondom de deurkozijnen. Alle spleten en kieren worden afgeplakt met tochtstrips of dichtgekit;
- tijdens de injectieprocedure van de mieren met gistvormige cellen zal er te allen tijde een onderzoeker aanwezig zijn om de mieren te monitoren;
- onderzoekers dragen witte labjassen zonder zakken en dragen handschoenen;
- alleen onderzoekers die direct betrokken zijn bij het onderzoek, hebben toegang tot de ruimte waar de mieren worden gehouden en geobserveerd;
- mieren worden alleen geïnfecteerd met gistvormige cellen;
- werkzaamheden met *B. bassiana* worden uitgevoerd in sporendichte containers en open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet van klasse II;
- na de experimenten worden mieren afgedood met een gevalideerde methode.

De aanvrager heeft aangegeven dat alle ventilatieopeningen in de ruimtes voorzien zullen worden van insectengaas. Er vinden in de ruimte geen andere onderzoeken, met al dan niet gg-micro-organismen, plaats.

## 6. Overweging

### 6.1 Pathogeniteit van de gg-schimmels

De drie schimmelsoorten *O. unilateralis*, *O. humberitii* en *B. bassiana* zijn pathogeen voor insecten. De schimmels *O. unilateralis* en *O. humberitii* zijn pathogeen voor respectievelijk (neo)tropische mieren en wespen.<sup>7,8,14,15,16</sup> *B. bassiana* is daarentegen pathogeen voor een breed spectrum aan insecten en spinachtigen.<sup>17</sup> De aanvrager is voornemens om genen uit te schakelen in *O. unilateralis* en *O. humberitii*, en om sequenties uit deze soorten in *B. bassiana* in te brengen. Mogelijk worden ook sequenties van *O. unilateralis* ingebracht in *O. humberitii*. Het gaat hierbij o.a. om sequenties die homologie vertonen met bacteriële enterotoxines en genen die een veronderstelde rol spelen bij gedragsmanipulatie van de gastheer. Ook worden niet-gekaracteriseerde sequenties van *O. unilateralis* en/of *O. humberitii*

ingebracht. De COGEM acht het niet aannemelijk dat door deze modificaties pathogenen kunnen ontstaan die voldoen aan de criteria van een klasse 3 pathogeen.

### **6.2 Sporulatie van de (gg-)schimmels**

Zowel Beauvaria- als Ophiocordyceps-schimmels produceren sporen die zich door de lucht kunnen verspreiden. Hoe snel Beauvaria-schimmels sporen vormen, is isolaat- en nutriënt-afhankelijk, maar sporulatie kan vanaf dag twee na de dood van de gastheer plaatsvinden.<sup>21</sup> Bij Ophiocordyceps-geïnfecteerde mieren zijn ascosporen na 7 dagen waarneembaar.<sup>10</sup> De vorming van ascosporen bij *Ophiocordyceps* vereist specifieke temperatuur-, luchtvochtigheid en lichtcondities.<sup>13,12,28</sup>

Zoals eerder genoemd worden bij het vervaardigen van gg-*O. unilateralis*, gg-*O. humberitii* en gg-*B. bassiana* maatregelen voorgesteld om verspreiding van sporen te voorkomen. Bij de werkzaamheden met de gg-schimmels in combinatie met *C. floridanus* zijn alleen voor werkzaamheden met *B. bassiana* maatregelen voorgesteld om sporenverspreiding te voorkomen. De COGEM kan niet uitsluiten dat de genetische modificaties, zoals hierboven beschreven, kunnen leiden tot (een betere) sporulatie van *O. unilateralis* en/of *O. humberitii* onder laboratoriumomstandigheden. Derhalve is de COGEM van oordeel dat ook bij werkzaamheden met gg-*O. unilateralis* en gg-*O. humberitii* in combinatie met *C. floridanus*, aanvullende maatregelen getroffen moeten worden om verspreiding van sporen te voorkomen.

### **6.3 Werkzaamheden met de (gg-)schimmels in combinatie met mieren**

#### **6.3.1 Eigenschappen van *C. floridanus***

*C. floridanus* komt voor in Florida en omliggende staten. De COGEM verwacht dat, gezien het verschil in habitat, *C. floridanus* zich niet of zeer moeilijk kan vestigen in de Nederlandse natuur. Zij kan niet uitsluiten dat de miersoort zich kan vestigen in gebouwen. De mieren kunnen zich goed oriënteren, en hebben gespierde kaken waardoor ze door diverse materialen kunnen vreten. De COGEM merkt op dat ook wanneer een geïnfecteerde mier buiten de containers terechtkomt en daar buiten niet kan overleven, het niet is uit te sluiten dat er na verloop van tijd sporulatie van de (gg-)schimmels optreedt. Bovendien zouden de sporen van (gg-)*B. bassiana* overgedragen kunnen worden naar andere insecten, en zich van daaruit verder kunnen verspreiden.

#### **6.3.2 Maatregelen om verspreiding van *C. floridanus* te voorkomen**

Er zijn door de aanvrager verschillende maatregelen voorgesteld om verspreiding van geïnfecteerde *C. floridanus* mieren te voorkomen. Zo zal er vliegentape worden aangebracht op de grond voor de deur en rondom deurkozijnen. Alle spleten en kieren worden afgeplakt met tochtstrips of dichtgekit. Ook zal de aanvrager alle ventilatieopeningen in de ruimtes voorzien van insectengaas. De COGEM merkt op dat aan de doeltreffendheid van vliegentape beperkingen kleven, omdat de tape door het opvangen van vuil na verloop van tijd niet meer zal plakken waardoor het geen effectieve barrière meer vormt. Derhalve dient bij het gebruik van vliegentape, de tape regelmatig te worden gecontroleerd op effectiviteit en tijdig te worden vervangen. De COGEM merkt tevens op dat naast het afdichten van spleten en kieren ook stopcontacten afgeplakt of van standaard stopcontactbeveiliging voorzien dienen

te worden. Tot slot merkt zij op dat het insectengaas gevalideerd dient te worden voor de inperking van Camponotus-mieren. Deze mieren hebben sterke kaken en kunnen zich mogelijk naar buiten vreten.

De aanvrager zal de levende geïnfecteerde mieren in afgesloten containers, met fluon of talkpoeder bewerkte oppervlaktes, in een afgesloten incubator houden. Voor gedragsobservaties worden de geïnfecteerde mieren in afgesloten petrischalen geplaatst, in een open container met fluon/talkpoeder barrière en daarboven een camera. De COGEM merkt op dat het van belang is dat de met fluon behandelde oppervlakte niet beslagen is met condens, en er geen vervuiling op de behandelde oppervlakte aanwezig is, aangezien mieren dan mogelijk wel over deze oppervlakte kunnen klimmen.

Gezien het bovenstaande, is de COGEM van oordeel dat een combinatie van meerdere barrières noodzakelijk is om ontsnapping van geïnfecteerde mieren te voorkomen. Zij acht de combinatie van een compleet afgesloten en met fluon-behandelde container in een afgesloten incubator, zoals voorgesteld door de aanvrager, voldoende om ontsnapping van geïnfecteerde mieren te voorkomen. Eveneens zou voor het uitvoeren van gedragsobservaties de combinatie van een open fluon-behandelde container en gesloten petrischalen voldoende zijn, mits deze zich in een afgesloten incubator bevindt en de petrischalen afgeplakt worden met parafilm of luchtdoorlatende tape. Open handelingen met geïnfecteerde mieren, zoals het overplaatsen in petrischalen, dienen plaats te vinden in een veiligheidskabinet van klasse II. Hierbij kan ontsnapping beperkt worden door de mieren op ijs te verdoven alvorens ze over te plaatsen. Het verwijderen van dode geïnfecteerde individuen dient eveneens plaats te vinden in een klasse II veiligheidskabinet, aangezien de vorming van sporen door de gg-schimmels niet kan worden uitgesloten.

In de aanvraag wordt het aantal mieren waarmee tegelijkertijd wordt gewerkt, niet genoemd. De COGEM is van oordeel dat met een beperkt aantal mieren tegelijk gewerkt dient te worden, dusdanig dat een eventuele ontsnapping opgemerkt wordt. De mieren dienen tevens voor en na de uitgevoerde werkzaamheden geteld te worden, zodat een eventuele ontsnapping tijdig gedetecteerd kan worden en een ontsnapte mier gedood of teruggevonden kan worden. Ook zouden vallen, geschikt voor *C. floridanus* mieren, in de werkruimte en de incubatoren moeten worden geplaatst.

## **7. Advies**

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat het vervaardigen van de gg-schimmels plaats kan vinden op ML-II met aanvullende maatregelen om verspreiding van de gg-schimmels via sporen te voorkomen (namelijk open handelingen in een klasse II veiligheidskabinet en kweek in sporendichte containers).

De COGEM is tevens van oordeel dat de voorgenomen werkzaamheden met gg-*B. bassiana*, gg-*O. humberitii* en gg-*O. unilateralis* in combinatie met *C. floridanus* uitgevoerd kunnen worden op ML-II, mits de voorgestelde aanvullende voorschriften en de door de COGEM-geadviseerde aanvullingen hierop, in acht worden genomen. Deze betreffen:



- geïnfecteerde mieren worden gehouden in afgesloten plastic containers met hoog opstaande wanden gecoat met fluon of talkpoeder, in een afgesloten incubator;
- geïnfecteerde mieren worden tijdens gedragsobservaties in afgesloten petrischalen gehouden die geplaatst zijn in open plastic containers met hoog opstaande wanden gecoat met fluon of talkpoeder, waarbij de opstelling zich in een afgesloten incubator bevindt en de petrischalen afgeplakt worden met parafilm of luchtdoorlatende tape;
- open handelingen met geïnfecteerde mieren, zoals het overplaatsen in petrischalen of het verwijderen van dode individuen, dienen plaats te vinden in een veiligheidskabinet klasse II;
- de incubatoren worden niet gelijktijdig gebruikt voor andere experimenten;
- dode geïnfecteerde mieren worden uiterlijk binnen 24 uur uit het experiment verwijderd;
- alle spleten en kieren worden afgeplakt met tochtstrips of dichtgekit. Stopcontacten worden afgeplakt of voorzien van stopcontactbeveiliging;
- tijdens de injectieprocedure van de mieren met gistachtige cellen zal er te allen tijde een onderzoeker aanwezig zijn om de mieren te monitoren;
- onderzoekers dragen witte labjassen zonder zakken en dragen handschoenen, waarbij de mouwen in de handschoenen gedragen worden of nauwsluitende manchetten hebben;
- alleen onderzoekers die direct betrokken zijn bij het onderzoek hebben toegang tot de ruimte waar de mieren worden gehouden en geobserveerd;
- mieren worden alleen geïnfecteerd met gistachtige cellen;
- werkzaamheden met *gg-B. bassiana*, *gg-O. unilateralis* en *gg-O. humberitii*, worden uitgevoerd in sporendichte containers en open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet van klasse II;
- na afloop van de experimenten worden de mieren direct afgedood met een gevalideerde methode;
- alle ventilatieopeningen in de ruimtes worden voorzien van gevalideerd insectengaas;
- er vinden in de ruimte geen andere onderzoeken, met al dan niet gg-micro-organismen, plaats;
- in de werkruimte en de incubatoren worden voor *C. floridanus* geschikte vallen geplaatst;
- er wordt met een dusdanig klein aantal mieren gewerkt dat een eventuele ontsnapping kan worden opgemerkt;
- voorafgaand en na afloop van een open handeling worden de mieren geteld;
- in het geval van een ontsnapping worden adequate maatregelen genomen om de ontsnapte mier terug te vinden of te doden.

De COGEM acht het risico voor mens en milieu verwaarloosbaar klein wanneer de werkzaamheden op het hierboven genoemde inperkingsniveau en met inachtneming van de vermelde aanvullende voorschriften worden uitgevoerd.

### **8. Additionele opmerking**

De COGEM heeft in haar eerdere advies betreffende werkzaamheden met gg-geleedpotigen als één van de werkvoorschriften gesteld dat de medewerkers kennis dienen te hebben van de geleedpotige en zijn getraind.<sup>4</sup> De COGEM adviseert de vergunningaanvrager om bij de werkzaamheden de werknemers te trainen in het hanteren van de mieren teneinde het risico op ontsnapping te minimaliseren.

## Referenties

1. COGEM (2022). Pathogeniteitsclassificatie van het schimmelsoortcomplex *Ophiocordyceps unilateralis* sensu lato. COGEM advies CGM/220713-02
2. COGEM (2022). Pathogeniteitsclassificatie van de schimmelsoort *Ophiocordyceps humberitii*. COGEM advies CGM/220713-03
3. COGEM (2014). Classificatie en inschaling werkzaamheden van insectenpathogene schimmelsoorten *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii* en *B. pseudobassiana*. COGEM advies CGM/141215-02
4. COGEM (2013). Inperkingsmaatregelen voor werkzaamheden met gg-geleedpotigen onder 'ingeperkt gebruik'. COGEM advies CGM/130416-01
5. Ban S *et al.* (2019). Three new species of *Ophiocordyceps* and overview of anamorph types in the genus and the family Ophiocordyceptaceae. *Mycol. Progress* 14: 1017
6. Pontoppidan MJ *et al.* (2009). Graveyards on the move: the spatio-temporal distribution of dead *Ophiocordyceps*-infected ants. *PloS One* 4: e4835
7. Evans HC *et al.* (2018). Epitypification and re-description of the zombie-ant fungus, *Ophiocordyceps unilateralis* (Ophiocordycipitaceae). *FUSE* 1: 13-22
8. Hughes DP *et al.* (2011). Behavioral mechanisms and morphological symptoms of zombie ants dying from fungal infection. *BMC Ecol.* 11: 13
9. Hughes DP *et al.* (2011). Behavioral mechanisms and morphological symptoms of zombie ants dying from fungal infection. *BMC Ecol.* 11: 13
10. Mongkolsamrit S *et al.* (2012). Life cycle, host range and temporal variation of *Ophiocordyceps unilateralis*/*Hirsutella formicarum* on Formicine ants. *J. Invertebr. Pathol.* 111: 217-224
11. Andriolli FS *et al.* (2019). Do zombie ant fungi turn their hosts into light seekers? *Behavioral Ecology*, 30: 609e616
12. Loreto RG *et al.* (2014). Long-term disease dynamics for a specialized parasite of ant societies: a field study. *PloS one*, 9: e103516.
13. Andersen SB *et al.* (2009). The life of a dead ant: the expression of an adaptive extended phenotype. *The American Naturalist*, 174: 424-433.
14. Sobczak JF *et al.* (2019). Manipulation of wasp (Hymenoptera: Vespidae) behavior by the entomopathogenic fungus *Ophiocordyceps humberitii* in the Atlantic forest in Ceará, Brazil. *Entomol. News* 129: 98-103
15. Somavilla A *et al.* (2019). Infection and behavior manipulation of social wasps (Vespidae: Polistinae) by *Ophiocordyceps humberitii* in Neotropical forests: new records of wasp-zombification by a fungus. *Stud. Neotrop. Fauna* 55: 23-28
16. Somavilla A *et al.* (2019). Behavior manipulation of Crabronidae and Pompilidae (Hymenoptera) by the entomopathogenic fungus *Ophiocordyceps humberitii* (Ascomycota: Hypocreales) in an Amazonian rainforest, Brazil. *Rev. Bras. Zoociências* 20: 1-7
17. Zimmerman G (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology* 17: 553-596
18. Holder DJ & Keyhani, NO (2005). Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5260–5266

19. de Bekker & Das (2022) Hijacking time: How *Ophiocordyceps* fungi could be using ant host clocks to manipulate behavior. *Parasite Immunology* 44: e12909
20. Trinh *et al.*, 2021: Getting lost: the fungal hijacking of ant foraging behaviour in space and time. *Animal Behaviour* 18: 165-184
21. Sun J *et al.* (2002). Sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Coptotermes formosanus* and in vitro. *Invertebr Pathol.* 81: 78–85
22. Endler A. (2006). Regulation and reproductive division of labor in the ant *Camponotus floridanus*: Behavioral mechanisms and pheromonal effects. PhD Dissertatie, Julius Maximilians Universität Würzburg
23. AntWeb. Species: *Camponotus (Myrmothrix) floridanus*  
<https://www.antweb.org/description.do?rank=species&genus=camponotus&species=floridanus&project=worldants>  
 (bezocht op 4 november 2022)
24. AntWiki: The Ants --- Online. *Camponotus floridanus* [https://antwiki.org/wiki/Camponotus\\_floridanus](https://antwiki.org/wiki/Camponotus_floridanus) (bezocht op 4 november 2022)
25. Vail K *et al.* (1994). Structure-invading ants of Florida. University of Florida
26. Rossi N & Feldhaar H (2020). Carpenter ants. In: Starr, C. (eds) *Encyclopedia of Social Insects*. Springer, Cham. ISBN 978-3-319-90306-4
27. Florida carpenter ant. Featured Creatures, Entomology news University of Florida  
[https://entnemdept.ufl.edu/creatures/urban/ants/fl\\_carpenter\\_ants.htm](https://entnemdept.ufl.edu/creatures/urban/ants/fl_carpenter_ants.htm) (bezocht op 17 november 2022)
28. Andriolli FS *et al.* (2019). Do zombie ant fungi turn their hosts into light seekers? *Behavioral Ecology* 30: 609e616