

Voorzitter: prof.dr.ir. B.C.J. Zoeteman

Cogem
postbus 578
3720 AN Bilthoven

Aan de Staatssecretaris van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
De heer drs. P.L.B.A. van Geel
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

Uw kenmerk
IG 05-015/01.c01

Uw brief van
24 januari 2006

Kenmerk
CGM/060208-01

Datum
8 februari 2006

Onderwerp
Advies inschaling *Talaromyces Macrosporus*

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van een adviesvraag van Bureau GGO betreffende een wijzigings-verzoek van het Centraalbureau voor Schimmelcultures, instituut van de Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, op de bestaande vergunning IG 05-015/01 deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De bodemschimmel *Talaromyces macrosporus* is in Nederland nog niet eerder genetisch gemodificeerd. De COGEM is daarom verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met deze schimmel. Hiernaast is de COGEM gevraagd of de door de aanvrager voorgestelde inactivatiemethode (20 minuten verhitting bij 120 °C) afdoende is om alle schimmelsporen te inactiveren.

T. macrosporus produceert het mycotoxine duclauxine. Tot op heden zijn er geen mycotoxines bekend die dermate toxisch zijn dat ze binnen een toxiciteitsklasse vallen (<100µg/kg) zoals staat weergegeven in de ggo-regelgeving. Duclauxine wordt in het kader van deze regelgeving daarom niet aangemerkt als toxisch. Op basis van aangebrachte genetische modificaties acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat *T. macrosporus* eigenschappen zal verwerven waardoor een risico voor mens of milieu zal ontstaan. Handelingen met *T. macrosporus* kunnen daarom plaatsvinden in een ML-I ruimte.

T. macrosporus staat bekend om zijn hitte- en drukresistente sporen. De door de aanvrager voorgestelde inactivatiemethode is ruim voldoende om een hoeveelheid van 10^7 sporen te inactiveren. De berekening die de aanvrager hiertoe levert is naar de mening van de COGEM valide.

Met inachtneming van de door BGGO voorgestelde aanvullende voorschriften acht de COGEM de risico's voor mens en milieu van de handelingen met *T. macrosporus* in een ML-I ruimte verwaarloosbaar klein.

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in dark ink, consisting of a large loop followed by a horizontal stroke and a small vertical tick mark.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman

c.c. Dr. ir. B.P. Loos
Dr. I. van der Leij

Inschaling en inactivatie van de bodemschimmel *Talaromyces macrosporus*

COGEM advies CGM/060208-01

Inleiding

De onderhavige adviesvraag betreft een wijzigingsverzoek op de bestaande vergunning IG 05-015/01 van het Centraalbureau voor Schimmelcultures met de titel 'Moleculair genetisch onderzoek aan schimmels en gisten om de biodiversiteit binnen deze groepen beter te begrijpen, alsmede de aan deze diversiteit gerelateerde virulentie en gevoeligheid voor antimycotica'. De wijziging betreft de toevoeging van de bodemschimmel *Talaromyces macrosporus*. De schimmel is in Nederland nog niet eerder als gastheer gebruikt en dient daarom ingeschaald te worden. Hiernaast levert de aanvrager gegevens over de inactivatiemethode van *T. macrosporus*. De COGEM is gevraagd of de door de aanvrager voorgestelde inactivatiemethode als afdoende kan worden beschouwd.

Talaromyces macrosporus

T. macrosporus is een algemeen voorkomende bodemschimmel en staat bekend als bederf-organisme in vruchtensappen. De schimmel behoort tot de klasse van de *Ascomycota*, de orde van de *Eurotiales* en de familie van de *Trichocomaceae*.

Ascomyceten kennen zowel een geslachtelijke als een ongeslachtelijke voortplanting. Bij de geslachtelijke voortplanting van ascomyceten wordt een sporenzakje (ascus) gevormd met daarin acht haploïde sporen. De vorming van de ascus wordt vooraf gegaan door de ontwikkeling van speciale hyfen waarin twee celkernen samensmelten. Eén celkern is afkomstig van een zogenaamde (+) schimmel (antheridium) en de andere van een (-) schimmel (ascogonium). Na de versmelting vindt direct meiotische celdeling plaats waardoor acht celkernen gevormd worden. De celkernen groeien uit tot een volwassen ascus met daarin acht ascosporen. De schimmels behorende tot de *Eurotiales* produceren hun asci in cleistothecia. Dit zijn gesloten vruchtlichamen. Voordat de sporen vrijkomen lyseren de wanden van de ascus waardoor de ascosporen in de cleistothecia vrijkomen. Uiteindelijk zal de cleistothecia scheuren en komen de sporen vrij in het milieu (1).

Bij de ongeslachtelijke voortplanting worden conidiosporen gevormd. Deze ontstaan door mitose en daarop volgende celdeling. Conidiosporen worden niet omgeven door een sporenzakje maar worden geproduceerd aan de toppen of de zijkanen van de hyfen.

T. macrosporus staat bekend om zijn hitte- en drukresistente ascosporen. Onderzoek heeft uitgewezen dat kortstondige verhitting of blootstelling aan hoge druk de schimmel wel dood, maar de sporen juist activeert (2,3). Hiernaast is bekend dat

T. macrosporus het mycotoxine (toxische metaboliet) duclauxine produceert dat anti-tumorgene eigenschappen bezit (4,5).

Handelingen met *T. macrosporus*

Tijdens onderzoek naar de ascosporen van *T. macrosporus* is een eiwit geïdentificeerd dat aanwezig is in de celwand van de sporen. De aanvrager verwacht dat dit eiwit bijdraagt aan de grote hitte- en drukresistentie van de sporen. Om dit te onderzoeken heeft de aanvrager het voornemen mutanten te vervaardigen van de stam *T. macrosporus* CBS 130.89, waarin dit eiwit niet meer aanwezig is.

De mutanten worden vervaardigd met behulp van een plasmide waarin het hygromycine B resistentiegen geplaatst is in het open leesraam van het gen van interesse (6). *T. macrosporus* wordt getransformeerd met dit plasmide waardoor middels homologe recombinatie het hygromycine resistentiegen in het gen van interesse op het genoom van *T. macrosporus* wordt geïnserteerd. Naast het hygromycine resistentiegen, dat als selectiemarker wordt gebruikt, worden ook reportergenen ingebracht. De aanvrager geeft aan dat deze reportereiwitten worden gebruikt om de vorming van de sporen te kunnen bestuderen.

In een later stadium zal onderzoek verricht worden naar genen die een rol spelen in het metabolisme van deze sporen. Hierbij zullen naast bovengenoemde mutanten ook RNAi constructen gemaakt worden van zowel cDNA als van genomisch DNA van *T. macrosporus*.

Om de mutanten te bestuderen worden zowel microscopiestudies als fysiologische eiwit- en celwandstudies uitgevoerd. Met de fluorescentiemicroscoop wordt de ontkieming van de ascosporen gevolgd. De sporen worden hiertoe aan een glasplaatje gehecht met behulp van poly-L-lysine. De sporen bevinden zich tijdens de microscoopexperimenten in vloeistof en de aanvrager geeft aan dat het daardoor onwaarschijnlijk is dat de sporen door de lucht verspreid zullen worden. Om verspreiding via de vloeistof te voorkomen zullen de objectglasjes in bakjes met opstaande randen worden vervoerd naar de microscopen.

Om de aanwezigheid van metabolieten, eiwitten en celwandcomponenten te kunnen vaststellen worden de sporen gebroken met glasparsels. Na afloop van de experimenten worden alle vloeistoffen met de hierin nog aanwezige levende sporen geautoclaveerd. Na afloop van de experimenten worden al het glaswerk, alle vloeistoffen met de daarin nog aanwezige levende sporen en de eventueel gebruikte tissues, geautoclaveerd (120°C gedurende 20 minuten).

Inactivatiemethode

Zoals hierboven vermeld, staan de sporen van *T. macrosporus* bekend om hun hitte- en drukresistente eigenschappen. Hitteresistentie wordt uitgedrukt in de zogenaamde D-waarde. Deze waarde drukt de tijd uit die nodig is om bij een bepaalde temperatuur 90% van de sporen te doden. De aanvrager geeft aan dat de D₈₅ van *T. macrosporus*

maximaal 100 minuten bedraagt (2). Dit betekent dat het 100 minuten duurt om bij een temperatuur van 85 °C, 90% van de sporen te doden. De D-waarde kan als volgt berekend worden:

$$D_{\text{temperatuur}} = \frac{T}{(\log_{N_0} - \log_N)}$$

Hierbij is T = duur van de verhitting, N₀ = aantal sporen aan het begin van de behandeling, N = aantal sporen dat de behandeling overleeft.

Naast de D-waarde wordt bij berekeningen aan hitte-resistentie ook gebruik gemaakt van de z-waarde. Dit getal geeft de verandering aan in temperatuur die nodig is om een tienvoudige vermindering van tijd te realiseren om een bepaald aantal sporen te kunnen afdoden. De aanvrager gebruikt in zijn berekening een z-waarde van 10. Dit houdt in dat bij een toename van 10 °C in temperatuur een tienvoudige vermindering van de tijd om de hitte te overleven bereikt wordt. De z-waarde kan als volgt berekend worden:

$$z = \frac{(T_2 - T_1)}{(\log D_1 - \log D_2)}$$

Hierbij zijn T₁ en T₂ de temperaturen en zijn D₁ en D₂ de D-waarden behorend bij T₁ en T₂.

Met behulp van deze formules kan berekend worden of de verhitting van de sporen bij 120 °C, gedurende 20 minuten een adequate methode is.

Inschalingsvoorstel van Bureau GGO

Op basis van de niet-pathogene en niet-toxische eigenschappen van *T. macrosporus* stelt Bureau GGO voor de handelingen met *T. macrosporus* in te schalen op ML-I niveau. Als aanvullende voorschriften worden gesteld dat de schimmelcultures alleen gehanteerd mogen worden in een veiligheidskabinet van klasse-II. Omdat handelingen met een microscoop niet kunnen plaatsvinden in een veiligheidskabinet dienen de sporen, wanneer bestudeerd onder een microscoop, in een vloeistof gehouden te worden. Dit teneinde verspreiding van de sporen te voorkomen.

Overwegingen en advies

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van *T. macrosporus* als gastheerorganisme. Hiernaast is de COGEM verzocht te beoordelen of de door de aanvrager gebruikte inactivatiemethode volstaat om de sporen van *T. macrosporus* te doden en of met de voorgestelde aanvullende voorschriften, de veiligheid voor mens en milieu gewaarborgd is.

Inschaling

In onderhavige aanvraag wordt *T. macrosporus* als gastheer gebruikt voor het vervaardigen van mutanten om de functie van eiwitten betrokken bij de sporenvorming te kunnen bestuderen. In het verleden heeft de COGEM een lijst opgesteld van organismen die als veilig kunnen worden beschouwd (klasse 1). Hiernaast zijn lijsten opgesteld van organismen die als pathogeen worden aangemerkt (klasse 2 t/m 4). *T. macrosporus* staat niet op deze lijsten vermeld. De COGEM is daarom verzocht advies uit te brengen over de te hanteren inschaling.

Uit literatuurgegevens blijkt dat *T. macrosporus* het mycotoxine duclauxine produceert (4). Van duclauxine zijn bij de COGEM geen LD₅₀ of LD₁₀₀ waarden bekend. In een eerder uitgebracht advies gaat de COGEM in op de inschaling van toxineproducerende organismen (7). Waar enkele eiwittoxines bekend staan als zeer giftig (LD₅₀ < 100 ng/kg) zijn tot op heden geen mycotoxines bekend die dermate toxisch zijn dat ze binnen een toxiciteitsklasse vallen (< 100 µg/kg). De COGEM is daarom van mening dat het waarschijnlijk is dat duclauxine een LD₅₀ waarde heeft die lager is dan 100 µg/kg. Hiernaast staat *T. macrosporus* bekend als bederf-organisme in vruchtensappen. Het is zeer aannemelijk dat indien duclauxine sterk toxisch zou zijn, hier publicaties over verschenen zijn. Bij de COGEM zijn deze publicaties niet bekend.

Sommige mycotoxines bezitten carginogene eigenschappen. Stoffen die (potentieel) carcinogeen zijn staan weergegeven in een lijst die is opgesteld door de International Agency of Research in Cancer (IARC). In deze lijst staat duclauxine niet vermeld (8). Er zijn eveneens geen wetenschappelijke gegevens gepubliceerd waaruit blijkt dat duclauxine carcinogene eigenschappen bezit.

De COGEM heeft geen redenen om aan te nemen dat duclauxine carcinogeen is. Hiernaast valt duclauxine buiten de toxiciteitsklassen en wordt daarmee in het kader van de huidige ggo-regelgeving niet aangemerkt als toxisch. De COGEM is dan ook van mening dat *T. macrosporus* aangemerkt kan worden als een klasse 1 organisme.

Op basis van de ingebrachte genen (reportergenen en het hygromycine B resistentiegen) en de inactivatie van het gen van interesse acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat de genetisch gemodificeerde *T. macrosporus* eigenschappen zal verwerven waardoor een risico voor mens of milieu zal ontstaan. *T. macrosporus* is een algemeen voorkomende bodemschimmel waarbij onder

natuurlijke omstandigheden ook genen kunnen worden uitgeschakeld. Hiernaast wordt niet verwacht dat de ingebrachte genen de plant een verhoogde fitness geven.

Handelingen met *T. macrosporus* kunnen gezien het bovenstaande naar de mening van de COGEM plaatsvinden in een ML-I ruimte.

Inactivatiemethode

Een inactivatiemethode kan als afdoende worden beschouwd wanneer met de voorgestelde methode alle sporen geïnactiveerd worden.

De aanvrager geeft aan dat de maximaal gemeten D_{85} voor *T. macrosporus* gelijk is aan 100 minuten (2). Hiernaast worden gegevens overlegd dat bij 95°C na een verhitting van 15 minuten, 10 sporen overleven van een oorspronkelijke suspensie van 10^7 sporen. Bij een verhoging van de temperatuur van 10 °C is dus een sterke reductie van het aantal overlevende sporen te constateren. Dit is in analogie met andere microorganismen.

D_{95} kan met bovenstaande waarden berekend worden en is gelijk aan $15/(\log 10^7 - \log 10) = 2,5$ minuten. Wanneer alle sporen geïnactiveerd worden is een verhittingstijd van $2,5 * (\log 10^7 - \log 1) = 17,5$ minuten benodigd.

De z-waarde kan ook berekend worden en bedraagt: $(95-85)/(\log 100 - \log 2,5) = 6,2$ °C. Dit houdt in dat een verhoging van de temperatuur met 6,2 °C resulteert in een tienvoudige reductie van de verhittingstijd. De uitkomsten van de D-waarde en de z-waarde worden echter mede bepaald door de gebruikte oplossing waarin de sporen zich bevinden. Hiernaast speelt de leeftijd van de sporen een rol (2). De aanvrager gaat in zijn berekening uit van een z-waarde van 10 °C en houdt hiermee een ruime veiligheidsmarge aan.

Bij 105 °C zal de suspensie nog 105 seconden verhit moeten worden om alle sporen af te doden. Bij 115 °C zal dit 10,5 seconden bedragen. Verhitting bij 120 °C over een periode van 20 minuten bij een beginconcentratie van 10^7 sporen zal dus ruim voldoende zijn om alle sporen te inactiveren.

Aanvullende voorschriften

De vergunningverlener hanteert standaard een aanvullend voorschrift indien schimmels niet biologisch zijn ingeperkt of geen IAB status bezitten. Hierin staat vermeld dat de handelingen met de schimmelcultures plaats dienen te vinden in een veiligheidskabinet van klasse II. Als vector wordt in de aanvraag gebruik gemaakt van pAN7 (9). De pAN7 vector staat niet vermeld op de lijst van veilig te hanteren vectoren (bijlage 1 Regeling genetisch gemodificeerde organismen). De genetisch gemodificeerde (gg) schimmel heeft daardoor geen IAB status.

Omdat onderzoek met de microscoop, die gesitueerd is in de ML-I ruimte, niet kan plaatsvinden in een veiligheidskabinet, heeft BGGO voorgesteld een extra aanvullend voorstel op te nemen waarin vermeld staat dat de ascosporen tijdens de handelingen met de fluorescentiemicroscoop op objectglasjes in vloeistof worden gehouden.

Hiernaast geeft de aanvrager aan dat vervoer van de objectglaasjes van het veiligheidskabinet naar de microscoop zal geschieden in bakjes met opstaande randen zodat verspreiding van de sporen wordt voorkomen. Na afloop van de experimenten zullen de objectglaasjes worden geautoclaveerd.

Om onderzoek te verrichten naar de aanwezigheid van metaboliëten, eiwitten en celwandcomponenten is de aanvrager voornemens de sporen te breken met glasparsels. Hierbij dient opgemerkt te worden dat bij deze werkzaamheden grote aerosolvorming kan optreden. Bij het breken van de glasparsels dient aerosolvorming derhalve zoveel mogelijk voorkomen te worden.

De COGEM is van mening dat deze aanvullende voorschriften de verspreiding van de ascosporen voorkomen en dat de veiligheid voor mens en milieu gewaarborgd is.

Conclusie

Concluderend kan de COGEM instemmen met de door BGGO voorgestelde inschaling en aanvullende voorschriften. Hiernaast is de COGEM van mening dat de door de aanvrager voorgestelde inactivatiemethode volstaat om de hitteresistente ascosporen af te doden.

Referenties

1. Carlile M.J. en Watkinson S.C. (1994). The fungi. Academic Press, Londen
2. Dijksterhuis J. en Teunissen PGM. (2004). Dormant ascospores of *Talaromyces macrosporus* are activated to germinate after treatment with ultra high pressure. Journal of applied microbiology 96: 162-169
3. Dijksterhuis J. et al. (2002). Trehalose degradation and glucose efflux precede cell ejection during germination of heat-resistant ascospores of *Talaromyces macrosporus*. Archives of microbiology 178: 1-7
4. Frisvad J.C. et al. (1990). Chemotaxonomy of the genus *Talaromyces*. Antonie van Leeuwenhoek 57: 179-189
5. Bryant F.O. et al. (1993). Properties and cost effective method for production of the antitumor agent decauxin from sporulating *Penicillium herquei*. Journal of pharmaceutical science 82: 1214-1217
6. Murray E.R. et al. (1997). Isolation of the glucose oxidase gene from *Talaromyces flavus* and characterization of its role in the biocontrol of *Verticillium dahliae*. Current genetics 32: 367-375
7. COGEM (2005). "Classificatie van toxine producerende genen". COGEM advies CGM/050628-01
8. International Agency of Research in Cancer. Lists of IARC evaluations. <http://www-cie.iarc.fr/monoeval/grlist.html> (2 februari 2006).
9. Punt P.J. et al. (1987). Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli* 56: 117-124