

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Waterstaat  
Mevrouw drs. S. van Veldhoven-van der Meer  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 15 juni 2018  
**KENMERK** CGM/180615-01  
**ONDERWERP** Advies pathogeniteitsclassificatie van de bacterie *Bacillus weihenstephanensis*

Geachte mevrouw Van Veldhoven,

Naar aanleiding van een verzoek van Stichting Wageningen Research om de bacterie *Bacillus weihenstephanensis* te classificeren (IG 18-061\_2.8-000) deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsklasse van *Bacillus weihenstephanensis*. *B. weihenstephanensis* is een anaerobe bacterie die zich bij lage temperaturen kan vermenigvuldigen en in Noord-Europa in de bodem voorkomt. De bacterie wordt ook in gekoelde zuivelproducten aangetroffen.

Van enkele *B. weihenstephanensis* stammen is beschreven dat zij bij lage temperaturen (8 tot 25°C) cereulide kunnen produceren. Dit hitte- en zuurbestendige toxine is af en toe in gekoelde zuivelproducten aanwezig (rauwe ei-producten, melk), en veroorzaakt voedselvergiftiging bij de mens met soms een dodelijke afloop. Sommige *B. weihenstephanensis* stammen zijn pathogeen voor de in de bodem voorkomende rondworm *Caenorhabditis elegans*. De COGEM kan niet uitsluiten dat de bacterie ook pathogeen is voor andere in de bodem voorkomende rondwormen.

Aangezien *B. weihenstephanensis* pathogeen is voor bepaalde rondwormen en in staat is een toxine te produceren dat voor de mens ernstige gevolgen kan hebben, adviseert de COGEM de bacterie in te delen in pathogeniteitsklasse 2.



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 IenW

# Pathogeniteitsclassificatie van de bacterie *Bacillus weihenstephanensis*

## COGEM advies CGM/180615-01

### 1. Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van Stichting Wageningen Research (IG 18-061) is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriesoort *Bacillus weihenstephanensis* en plaatsing van deze bacterie op Bijlage 4 van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen' (Regeling ggo).<sup>1</sup> Deze bijlage bestaat uit lijsten van micro-organismen die pathogeen zijn voor mens, dier of plant.

### 2. Pathogeniteitsclassificatie 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

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. *Bacillus weihenstephanensis*

*B. weihenstephanensis* behoort binnen het geslacht *Bacillus* tot de *Bacillus cereus* groep (*B. cereus* sensu lato), waartoe ook *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides* en *Bacillus thuringiensis* behoren.<sup>2,3,4,5</sup> *B. weihenstephanensis* is voor het eerst in 1998 beschreven.<sup>3</sup> Het is een grampositieve staaftvormige sporevormende anaerobe bacterie die onder meer in Denemarken, Duitsland, Nederland en Zweden in de bodem voorkomt.<sup>6,7,8,9,10</sup> De bacterie is ook aangetroffen in gepasteuriseerde melk, verhitte rauwe melk en rauwe ei-producten.<sup>11,12,13,14</sup> Op basis van zijn genomsequentie en het feit dat hij zich bij 4 tot 7°C (psychrotolerant), maar niet bij 43°C kan vermeerderen, onderscheidt de bacterie zich van de andere soorten binnen de *B. cereus* groep.<sup>3,4,5,14</sup> Recent is een publicatie verschenen met het voorstel om de bacteriën *B. weihenstephanensis* en *B. mycoides* op basis van genomanalyse als dezelfde soort te beschouwen.<sup>5</sup> Op dit moment is het voorstel nog niet doorgevoerd op de internationaal erkende taxonomische lijst met bacterienamen (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature).<sup>2</sup>

Van sommige *B. weihenstephanensis* stammen is beschreven dat zij de groei van de fytopathogene schimmels *Verticillium dahliae* en *Verticillium longisporum* kunnen remmen.<sup>9</sup> Andere stammen zijn pathogeen voor de in de bodem voorkomende nematode *Caenorhabditis elegans*.<sup>15</sup> Van enkele *B. weihenstephanensis* stammen is op nucleotidenniveau aangetoond dat zij over genen beschikken die coderen voor enterotoxines, zoals hemolysine BL, het non-hemolytische enterotoxine, cytotoxine K en cereulide.<sup>8,11,12,13,16</sup>

Een recente *in vitro* studie met enkele *B. weihenstephanensis* isolaten heeft aangetoond dat, indien de bacteriën bij 37°C gekweekt worden, de supernatanten van het kweekmedium niet toxisch zijn voor humane cellen.<sup>17</sup> Hieruit kan worden afgeleid dat het niet waarschijnlijk is dat de toxinegenen van *B. weihenstephanensis* bij de lichaamstemperatuur van de mens tot expressie komen. Wel zijn sommige *B. weihenstephanensis* stammen in staat om bij lagere temperaturen (8 tot 25°C) cereulide te produceren. Dit is een hitte- en zuurstabiël toxine dat soms voorkomt in gekoelde zuivelproducten en na consumptie binnen 30 minuten tot 6 uur voedselvergiftiging kan veroorzaken.<sup>8,18,19</sup> In de literatuur zijn enkele ziektegevallen van cereulide-intoxicatie met dodelijke afloop beschreven (het 'emetic toxic syndrome').<sup>20,21</sup> Cereulide wordt gecodeerd door het cereulide biosynthese genencluser (*ces*), dat op een mobiele element (transposon, plasmide) is gelegen.<sup>22</sup>

### 4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over *B. weihenstephanensis*. Wel heeft zij een aantal andere bacteriesoorten behorend tot het genus *Bacillus* geclassificeerd en het merendeel ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.<sup>23</sup> Een uitzondering vormen *Bacillus licheniformis* en *B. anthracis*: *B. licheniformis* heeft de COGEM ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1, *B. anthracis* in pathogeniteitsklasse 3.<sup>23</sup>

## 5. Classificaties door andere beoordelende instanties

De Duitse ‘Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin’ (BAuA) die de pathogeniteit voor de mens beoordeelt, heeft *B. weihenstephanensis* ingedeeld in risicogroep 2.<sup>24</sup> Het Zwitserse ‘Federal Office for the Environment’ (FOEN) die de pathogeniteit voor mens, dier en plant beoordeelt, heeft *B. weihenstephanensis* eveneens in risicogroep 2 ingedeeld.<sup>25</sup> De inschaling door deze buitenlandse instanties geldt als referentie en achtergrondinformatie bij de risicobeoordeling die door de COGEM wordt uitgevoerd.

## 6. Overweging en advies

Op dit moment is het de COGEM niet bekend of *B. mycoides* en *B. weihenstephanensis* als één bacteriesoort beschouwd kunnen worden. Zij heeft bij haar overwegingen ten aanzien van de pathogeniteitsclassificatie daarom alleen de eigenschappen van *B. weihenstephanensis* meegenomen.

*B. weihenstephanensis* is pathogeen voor de in de bodem voorkomende nematode *C. elegans*. De COGEM kan niet uitsluiten dat de bacterie ook pathogeen is voor andere in de bodem voorkomende nematoden. Daarnaast is *B. weihenstephanensis* in staat om in gecontamineerde zuivelproducten bij lage temperaturen (8 tot 25°C) cereulide te produceren. Dit toxine veroorzaakt voedselvergiftiging bij de mens met in sommige gevallen een dodelijke afloop. Alles in overweging nemende, adviseert de COGEM de bacterie in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

De COGEM merkt op dat de vergunningverlener in haar inschalingsvoorstel het aanvullende voorschrift heeft opgenomen om bij activiteiten met genetisch gemodificeerde *B. weihenstephanensis* fecaal-orale verspreiding te voorkomen. Er zijn bij de COGEM geen aanwijzingen bekend dat de bacterie zich in de mens kan vermenigvuldigen en zich na consumptie fecaal-oraal zou kunnen verspreiden. Zij ziet daarom geen aanleiding om het voorgestelde aanvullende voorschrift in de vergunning op te nemen.

## Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2015). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <http://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2017-01-01> (bezocht: 23 mei 2018)
2. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). [www.bacterio.net/bacillus.html](http://www.bacterio.net/bacillus.html) (bezocht: 11 juni 2018)
3. Lechner S *et al.* (1998). *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1373-1382
4. Liu Y *et al.* (2015). Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Sci. Rep.* 5: 14082-14093
5. Liu Y *et al.* (2018). Genome analysis-based reclassification of *Bacillus weihenstephanensis* as a later heterotypic synonym of *Bacillus mycoides*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68: 106-112
6. Tegiffel MC *et al.* (1995). Occurrence and characterization of (psychrotrophic) *Bacillus cereus* on farms in the Netherlands. *Neth. Milk Dairy J.* 49: 125-138
7. Hendriksen NB *et al.* (2006). Occurrence and pathogenic potential of *Bacillus cereus* group bacteria in a sandy loam. *Antonie Van Leeuwenhoek* 89: 239-249

8. Thorsen L *et al.* (2006). Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide-producing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5118-5121
9. Hollensteiner J *et al.* (2017). *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus weihenstephanensis* inhibit the growth of phytopathogenic *Verticillium* species. *Front. Microbiol.* 7: 2171-2190
10. Christiansson A *et al.* (1999). *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *J. Dairy Sci.* 82: 305 –314
11. Stenfors LP *et al.* (2002). Pathogenic potential of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 215: 47-51
12. Baron F *et al.* (2007). Isolation and characterization of a psychrotolerant toxin producer, *Bacillus weihenstephanensis*, in liquid egg products. *J. Food Prot.* 12: 2782-2791
13. Techer C *et al.* (2014). Global overview of the risk linked to the *Bacillus cereus* group in the egg product industry: identification of food safety and food spoilage markers. *J. Appl. Microbiol.* 116: 1344-1358
14. Soufiane B & Côté J-C *et al.* (2013). *Bacillus weihenstephanensis* characteristics are present in *Bacillus cereus* and *Bacillus mycoides* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 341: 127-137
15. Rae R *et al.* (2010). A subset of naturally isolated *Bacillus* strains show extreme virulence to the free-living nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Pristionchus pacificus*. *Environ. Microbiol.* 12: 3007-3021
16. Stelder SDK *et al.* (2015). Temperature dependence of the proteome profile of the psychrotolerant pathogenic food spoiler *Bacillus weihenstephanensis* type strain WSBC 10204. *J. Proteome Res.* 14: 2169-2176
17. Miller RA *et al.* (2018). Intraclade variability in toxin production and cytotoxicity of *Bacillus cereus* group type strains and dairy-associated isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 84: doi: 10.1128/AEM.02479-17
18. Guérin A *et al.* (2017). Cereulide production by *Bacillus weihenstephanensis* strains during growth at different pH values and temperatures. *Food Microbiol.* 65: 130-135
19. Ehling-Schulz M *et al.* (2015). Food–bacteria interplay: pathometabolism of emetic *Bacillus cereus*. *Front. Microbiol.* 6: 704-716
20. Dierick K *et al.* (2005). Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *J. Clin. Microbiol.* 43: 4277-4279
21. Mahier H *et al.* (1997). Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *N. Engl. J. Med.* 1997, 336(16):1142–1148
22. Mei X *et al.* (2014). The genetic diversity of cereulide biosynthesis gene cluster indicates a composite transposon *Tnces* in emetic *Bacillus weihenstephanensis*. *BMC Microbiol.* 14: 149-160
23. COGEM (2017). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties groot aantal bacteriën. COGEM advies CGM/170929-03
24. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (2015). Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe. [www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-466.html](http://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-466.html) (bezocht: 8 juni 2018)

25. Federal Office for the Environment (2013). Classification of organisms.  
[www.bafu.admin.ch/bafu/en/home/topics/biotechnology/publications-studies/publications/classification-of-organisms.html](http://www.bafu.admin.ch/bafu/en/home/topics/biotechnology/publications-studies/publications/classification-of-organisms.html) (bezocht: 8 juni 2018)