

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

**DATUM** 30 juni 2020  
**KENMERK** CGM/200630-01  
**ONDERWERP** Advies pathogeniteitsclassificatie *Bacillus circulans*

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier getiteld 'Bacillus circulans' (IG 20-126\_2.13-000), ingediend door het Erasmus MC, deelt de COGEM u het volgende mee.


**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacterie *Bacillus circulans*, en de plaatsing van deze stam op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

*B. circulans* is een Gram-variabele sporenvormer die zowel onder aerobe als anaerobe condities kan groeien. Zijn optimale groeitemperatuur bevindt zich tussen de 30° en 37°C. De bacterie komt voornamelijk voor in de bodem, en wordt al langere tijd gebruikt voor biotechnologische toepassingen.

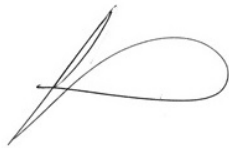
In de wetenschappelijke literatuur zijn enkele gevallen gerapporteerd waarbij *B. circulans* geïsoleerd is uit bloed of weefsel afkomstig van patiënten met een onderliggend ziektebeeld. Daarnaast is de bacterie geïsoleerd uit gezonde planten, en wordt in enkele publicaties antagonistische activiteit tegen larven van insecten en nematoden beschreven. Het mechanisme achter deze antagonistische activiteit is echter niet duidelijk. Ook is identificatie van de bacteriesoort in oudere publicaties mogelijk niet altijd correct geweest. In de genomsequentie van *B. circulans* zijn geen aanwijzingen gevonden voor aanwezigheid van klassieke virulentiefactoren voor mens of dier.

Gezien het bovenstaande adviseert de COGEM om *B. circulans* in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en 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.

Hoogachtend,



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

# Pathogeniteitsclassificatie van de bacterie *Bacillus circulans*

## COGEM advies CGM/200630-01

### 1. Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van het Erasmus MC is de COGEM gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsklasse van *Bacillus circulans* (IG 20-126) en over de plaatsing van deze bacterie op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.<sup>1</sup> 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 micro-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. 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

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. Opportunisten

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.

### 4. *Bacillus* spp.

Het geslacht *Bacillus* behoort tot de familie van de Bacillaceae.<sup>2</sup> Het zijn Gram-variabele (meestal Gram-positief, maar soms ook Gram-negatief) staafvormige bacteriën die endosporen kunnen vormen, en onder aerobe en facultatief anaerobe condities kunnen groeien.<sup>3,4</sup> *Bacillus* spp. worden in veel verschillende milieus aangetroffen, waaronder in zoet water, zout water en in de bodem. Daarnaast zijn er ook bacillussoorten geïsoleerd uit planten of dieren, waaronder de mens. Sommige soorten tolereren hoge temperaturen, extreme zoutgehalten, of een hoge zuurgraad.<sup>3</sup>

Enkele bekende soorten binnen het geslacht betreffen de pathogene bacteriën *Bacillus anthracis*, de veroorzaker van de ziekte miltvuur (anthrax), *Bacillus cereus*, een veroorzaker van voedselvergiftiging, en *Bacillus thuringiensis*, bekend door productie van Bt-toxines die giftig zijn voor bepaalde insecten. Deze drie bacillussoorten behoren tot de zogenaamde *B. cereus* groep.<sup>4</sup>

### 5. *Bacillus circulans*

*B. circulans* behoort tot het geslacht *Bacillus* en is voor het eerst beschreven in 1890.<sup>5,6</sup> De bacterie dankt zijn naam aan het feit dat het binnenste deel van een bacteriekolonie op voedingsbodems onder een kleine vergroting beweeglijke cirkelvormige patronen laat zien.<sup>7</sup> Deze beweeglijke eigenschap is ook op voedingsbodems zichtbaar in de vorm van microkolonies, die zich als een 'waas' rondom de kolonie bevinden.<sup>8</sup> *B. circulans* behoort niet tot de *B. cereus* groep.<sup>3,9</sup>

*B. circulans* is een Gram-variabele sporenvormer die zowel onder aerobe als anaerobe condities kan groeien. Zijn optimale groeitemperatuur bevindt zich tussen de 30° en 37°C.<sup>10</sup> De bacterie komt voornamelijk voor in de bodem (in de rhizosfeer rondom plantenwortels),<sup>7,11</sup> maar is ook als endofyt aangetroffen in de plant *Costus igneus*.<sup>12</sup> Ook is de bacterie aangetroffen in een slijm laag aanwezig op een kokosnoot.<sup>13</sup> Sinds 1997 kennen verschillende door *B. circulans* geproduceerde bestanddelen (enzymen, exopolysacchariden) industriële en biotechnologische toepassingen.<sup>13,14,15,16</sup>

Enmaal is er in een publicatie van 1986 melding gemaakt van de aanwezigheid van *B. circulans* in *in vitro* gekweekt callus van een gezonde dadel palm. De bacteriestam was aan de hand van biochemische

en fysiologische testen geïdentificeerd. Injectie van de geïsoleerde *B. circulans* in gezond weefsel zorgde in 9 van de 10 gevallen voor rot in het geïnoculeerde dadelpalmweefsel.<sup>17</sup>

In 1998 is in de wetenschappelijke literatuur melding gemaakt van een entomopathogene *B. circulans*. De bacterie was geïsoleerd uit een levende larve van de muggensoort *Culex quinquefasciatus*.<sup>18</sup> Een latere publicatie (2002) rapporteert dat *in vitro* blootstelling van muggenlarven aan sporen van *B. circulans* (van twee niet nader beschreven stammen), afhankelijk van de muggensoort in meer of mindere mate dodelijk was.<sup>19</sup> Volgens de onderzoekers was de LC<sub>50</sub> (lethale concentratie 50%) van *B. circulans* sporen voor *Ae. Aegypti* larven vergelijkbaar met die van een variant van *B. thuringiensis*. Blootstelling aan supernatant van het kweekmedium van *B. circulans* had geen effect op letaliteit, waaruit de onderzoekers concluderen dat deze soort geen chitinase of exotoxines produceert (zoals *B. thuringiensis*), of dat deze minder krachtig zijn.<sup>19</sup>

In ander onderzoek naar de *in vitro* en *in vivo* antagonistische eigenschap van *B. circulans*, werd de bacterie toegevoegd aan feces van schapen met gastro-intestinale nematoden (*Haemonchus contortus*) of als orale suspensie aan geïnfecteerde schapen toegediend, en werd een afname van de hoeveelheid parasitaire wormen waargenomen.<sup>20,21</sup> Het mechanisme achter de antagonistische activiteit in deze studies is echter onduidelijk.

In de wetenschappelijke literatuur zijn een aantal gevallen gerapporteerd waarbij *B. circulans* is geïsoleerd uit bloed of weefsel van patiënten. Dit betrof in alle gevallen patiënten met een verzwakte weerstand of een onderliggend ziektebeeld, of situaties waarbij door operatieve handelingen of katheterisatie de buitenste barrière (huid) was doorbroken.<sup>22,23,24,25,26</sup> Ook is *B. circulans* geïdentificeerd in een retrospectief onderzoek in 1988 naar de aanwezigheid van bacillussoorten in bloed van patiënten met bacteriëmie die opgenomen zijn geweest in het ziekenhuis.<sup>27</sup> *B. circulans* werd echter niet klinisch relevant geacht.

## 6. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over *B. circulans*. Wel heeft zij meerdere andere soorten binnen het geslacht *Bacillus* geclassificeerd.<sup>28</sup> Het merendeel van de *Bacillus* soorten is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2, met uitzondering van *Bacillus licheniformis* die is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1, en *Bacillus anthracis* die is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.

## 7. Classificaties van andere organisaties

In de Duitse ‘Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen’ (DSMZ) is *B. circulans* ingedeeld in risicogroep 1.<sup>29</sup> De ‘Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin’ (BAUA) heeft de bacteriesoort als apathogeen ingedeeld in risicogroep 1, met de opmerking dat de soort opportunistisch pathogeen is.<sup>30</sup> De ‘Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit’ (ZKBS), die de pathogeniteit voor mens, dier en plant beoordeelt, heeft *B. circulans* ingedeeld in risicogroep 1.<sup>31</sup> Het Zwitserse ‘Federal Office for the Environment’ (FOEN),<sup>32</sup> die de pathogeniteit voor mens, dier en plant beoordeelt, heeft *B. circulans* ingedeeld in risicogroep 2, met de opmerking dat de soort pathogeen is in individuele gevallen, voornamelijk bij immuungecompromitteerde individuen, en met de kanttekening dat

identificatie van de soort onbetrouwbaar kan zijn. Daarnaast wordt opgemerkt dat deze soort mogelijk plantpathogeen is, maar dat op basis van de huidige kennis hier geen definitieve uitspraak over gedaan kan worden. De inschaling door buitenlandse instanties geldt als referentie en achtergrondinformatie bij de risicobeoordeling die door de COGEM wordt uitgevoerd.

## 8. Overwegingen

Wetenschappelijk gezien is de pathogeniteit van een micro-organisme 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 bacteriën weinig literatuur over apathogeniteit voorhanden.

*B. circulans* is een facultatief anaerobe bacterie die voornamelijk voorkomt in de bodem. De beschikbare literatuur over mogelijke pathogeniteit van *B. circulans* is beperkt en veelal gedateerd. De COGEM merkt op dat identificatie van *B. circulans* in oudere publicaties veelal gebaseerd is op morfologie of biochemische testen, terwijl tegenwoordig identificatie op basis van 16S rDNA als gouden standaard gebruikt wordt.<sup>3</sup> Zij kan daarom niet uitsluiten dat (klinische) isolaten, die in het verleden geïdentificeerd zijn als *B. circulans*, met behulp van de huidig geldende standaard identificatiemethodes anders gedetermineerd zouden worden.<sup>3</sup>

*B. circulans* kent al meer dan 20 jaar industriële en biotechnologische toepassingen, maar associatie met ziekte is zelden beschreven. De bacterie is geïsoleerd uit verschillende patiënten met een ziektegeschiedenis en uit gezonde planten. In één oudere publicatie kon onder weefselkweekcondities rot veroorzaakt worden in dadelpalmweefsel na inoculatie met *B. circulans*. Mede gezien de sterke artificiële proefopzet, acht de COGEM dit niet ecologisch relevant. Ook zijn er enkele meldingen in de literatuur dat *B. circulans* antagonistische activiteit vertoont tegen larven van insecten of nematoden, maar het achterliggende mechanisme (bijvoorbeeld door consumptie van sporen, competitie om voedingsbronnen, of productie van andere secundaire metabolieten) is niet duidelijk.

In onderzoek naar de productie van toxines van verschillende bacillussoorten die niet tot de *B. cereus* groep behoren, is *B. circulans* niet geïdentificeerd. Wel werd door de onderzoekers opgemerkt dat *B. circulans* mogelijk de *hbl* en *nhe* genen bevat om enterotoxines te produceren, maar dat hier onzekerheid over is omdat de identificatie van deze soort verbetering behoeft.<sup>33</sup> In de *B. circulans* stam WL-12 zijn verschillende chitinase-genen geïdentificeerd.<sup>34</sup> De afbraakproducten van chitine worden door de bacterie als energiebron gebruikt. In een studie naar mogelijke pathogeniteit van *B. circulans* bij muggenlarven kon echter geen effect van kweekmedium (waarin eventueel geproduceerd chitinase aanwezig zou kunnen zijn) op de mortaliteit van de larven aangetoond worden.

Van de *B. circulans* stam RIT379 is recent het volledige genoom bepaald, waarbij 4.950 eiwitten zijn geannoteerd.<sup>12,35</sup> Er blijken geen klassieke virulentiefactoren voor mens of dier in het genoom van *B. circulans* aanwezig zijn.

## 9. Conclusie en advies

*B. circulans* komt voor in de bodem en wordt al meer dan 20 jaar op diverse manieren industrieel toegepast zonder dat daarbij melding is gemaakt van schadelijke effecten. De bacterie kan infecties

veroorzaken bij patiënten met een onderliggend ziektebeeld, of wanneer de buitenste barrière wordt doorbroken (zoals bij operaties).

Oudere publicaties vermelden dat de bacterie mogelijk pathogeen is voor insectenlarven en nematoden, maar een direct oorzakelijk verband is daarbij niet aangetoond. Daarnaast merkt de COGEM op dat de identificatie van *B. circulans* niet altijd is uitgevoerd volgens de huidig geldende gestandaardiseerde determinatietechnieken. Zij kan daarom niet uitsluiten dat de gegevens in deze oudere literatuur berusten op een onjuiste identificatie van het oorzakelijke agens.

Al het bovenstaande in overweging nemende, en mede gezien zijn lange historie van veilig gebruik (criterium b), adviseert de COGEM *B. circulans* in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Tevens is zij van oordeel dat *B. circulans* in aanmerking komt voor plaatsing op lijst A1 van Bijlage 2 van de Regeling ggo.

## Referenties

1. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072> (bezoekt: 17 juni 2020)
2. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). <https://lpsn.dsmz.de/family?page=B> (bezoekt: 23 juni 2020)
3. Maughan H & Van der Auwera (2011). Bacillus taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infect. Genet. Evol.* 11: 789-797
4. Ehling-Schulz M *et al.* (2019). The Bacillus cereus Group: Bacillus species with pathogenic potential. *Microbiol Spectr* 7: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018.
5. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). <https://lpsn.dsmz.de/genus/bacillus> (bezoekt: 23 juni 2020)
6. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). <https://lpsn.dsmz.de/species/bacillus-circulans> (bezoekt: 23 juni 2020)
7. Nakamura LK & Swezey J (1983). Taxonomy of *Bacillus circulans* Jordan 1890: Base composition and reassociation of deoxyribonucleic acid. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33: 46-52
8. Logan NA & Rodriguez-Diaz M (2006). *Bacillus* spp. and related genera. In: Principles and Practice of Clinical Bacteriology, 2nd Edition, Eds. Gillespie SH & Hawkey PM. John Wiley & sons, Ltd, England
9. Liu Y *et al.* (2015). Genomic insights into the taxonomic status of the Bacillus cereus group. *Sci. Rep.* 5:14082
10. BacDive. *Bacillus circulans* Jordan 1890. <https://bacdive.dsmz.de/strain/642> (bezoekt: 17 juni 2020)
11. Meena VS *et al.* (2014). Does a rhizospheric microorganism enhance K<sup>+</sup> availability in agricultural soils? *Microbiol. Res.* 169: 337-347
12. Polter SJ *et al.* (2015). Isolation, identification, whole-genome sequencing, and annotation of four Bacillus species, *B. anthracis* RIT375, *B. circulans* RIT379, *B. altitudinis* RIT380, and *B. megaterium* RIT381, from internal stem tissue of the insulin plant *Costus igneus*. *Genome Announc.* 3: e00847-15
13. Vidhyalakshmi R *et al.* (2016). *Bacillus circulans* exopolysaccharide: Production, characterization and bioactivities. *Int. J. Biol. Macromol.* 87: 405-414

14. Mu W *et al.* (2013). Current studies on physiological functions and biological production of lactosucrose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 7073–7080
15. Suyotha W *et al.* (2016). a-1,3-Glucanase: present situation and prospect of research. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32:30
16. Matsuda S *et al.* (1997). Purification and properties of mutanase from *Bacillus circulans*. *J. Ferment. Bioeng.* 83: 593–595
17. Leary JV *et al.* (1986). Isolation of pathogenic *Bacillus circulans* from callus cultures and healthy offshoots of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 1173-1176
18. Darriet E 1998. La lutte contre les moustiques nuisants et vecteurs de maladies. Paris: Coédition Karthala-Orstom, collection économie et développement.
19. Darriet F & Hougard JM (2002). An isolate of *Bacillus circulans* toxic to mosquito larvae. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 18:65-67
20. Sinott MC *et al.* (2012). *Bacillus* spp. toxicity against *Haemonchus contortus* larvae in sheep fecal cultures. *Exp. Parasitol.* 132: 103-108
21. Sinott MC *et al.* (2014). Larvicidal activity of *Bacillus circulans* against the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus* in sheep. *J. Helminthol.* 90: 68-73
22. Alebouyeh M *et al.* (2011). Fatal sepsis by *Bacillus circulans* in an immunocompromised patient. *Iran. J. Microbiol.* 3: 156-158
23. Castagnola E *et al.* (1997). Broviac catheter-related bacteraemias due to unusual pathogens in children with cancer: Case reports with literature review. *J. Infect.* 34: 215-218
24. Logan NA *et al.* (1985). Isolation of *Bacillus circulans* from a wound infection. *J. Clin. Pathol.* 38: 838-839
25. Krause A *et al.* (1999). Prosthetic heart valve endocarditis caused by *Bacillus circulans*. *J. Infect.* 39: 160-162
26. Tandon A *et al.* (2001). *Bacillus circulans* endophthalmitis. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 29: 92-93
27. Weber DJ *et al.* (1988). *In vitro* susceptibility of *Bacillus* spp. to selected antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 642-645
28. COGEM (2018). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal apathogene en pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/181112-03
29. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH' (DSMZ). *Bacillus circulans* <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-11> (bezocht: 17 juni 2020)
30. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA). TRBA 466 „Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen“ [https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/pdf/TRBA-466.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=8](https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/pdf/TRBA-466.pdf?__blob=publicationFile&v=8) (bezocht: 17 juni 2020)
31. Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit. [https://zag.bvl.bund.de/organismen/index.jsf;jsessionid=5ppL6fw1I5Y1wusyir\\_kLKq7N-Gb31C2jYdrPN6M.subs208?dswid=1959&dsrid=772](https://zag.bvl.bund.de/organismen/index.jsf;jsessionid=5ppL6fw1I5Y1wusyir_kLKq7N-Gb31C2jYdrPN6M.subs208?dswid=1959&dsrid=772) (bezocht: 23 juni 2020)
32. Federal Office for the Environment (FOEN). Classification of Organisms. <https://www.bafu.admin.ch/bafu/en/home/topics/biotechnology/publications-studies/publications/classification-of-organisms.html> (bezocht: 17 juni 2020)



33. From C *et al.* (2005). Toxin-producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1178-1183
34. Wanatabe T *et al.* (1992). Structure of the gene encoding chitinase D of *Bacillus circulans* WL-12 and possible homology of the enzyme to other prokaryotic chitinases and class III plant chitinases. *J. Bacteriol.* 174: 408-414
35. NCBI Sequence Set Browser. LDPH00000000.1 *Bacillus circulans*.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/LDPH01?display=proteins&page=1> (bezocht: 23 juni 2020)