

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

**DATUM** 29 augustus 2023  
**KENMERK** CGM/230829-01  
**ONDERWERP** Advies pathogeniteitsclassificatie van de bacteriesoort *Bacillus paralicheniformis*

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag over de pathogeniteitsclassificatie van de bacteriesoort *Bacillus paralicheniformis* (IG 23-131\_2.13-000), aangevraagd door de Technische Universiteit Delft, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

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

*Bacillus*-bacteriën worden in veel verschillende milieus aangetroffen, waaronder in zoet en zout water en in de bodem. Daarnaast zijn er ook bacillussoorten geïsoleerd uit planten, dieren en mensen.

*B. paralicheniformis* is een bacterie die aangetroffen wordt in gefermenteerde Koreaanse sojagerechten, maar ook in de bodem en rondom plantenwortels. Onderzoek naar *B. paralicheniformis* richt zich vooral op de antagonistische werking van deze bacterie tegen verschillende plantpathogenen, zoals bacteriën, schimmels en rondwormen (aaltjes). Bescherming tegen pathogenen vindt met name plaats door uitscheiding van secundaire metabolieten. Er zijn geen aanwijzingen dat *B. paralicheniformis* pathogeen zou zijn voor mens, dier of plant. Van enkele stammen is beschreven dat zij voor planten groeibevorderende eigenschappen hebben.

Alles in overweging nemende is de COGEM van oordeel dat de bacteriesoort *B. paralicheniformis* ingedeeld dient te worden in pathogeniteitsklasse 1, en opgenomen kan worden 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 bacterie *Bacillus paralicheniformis*

## COGEM advies CGM/230829-01

### 1. Inleiding

In verband met een verzoek van de Technische Universiteit Delft (IG 23-131) is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriesoort *Bacillus paralicheniformis*, voor plaatsing op lijst A1 van Bijlage 2 van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen' (Regeling ggo).<sup>1</sup> Deze bijlage bestaat uit lijsten van micro-organismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant.

### 2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie van een micro-organisme de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden de 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 of een onderliggend ziektebeeld, 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 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* spp.**

Het geslacht *Bacillus* behoort tot de familie van de *Bacillaceae*.<sup>2</sup> Het zijn gramvariabele (meestal grampositieve, maar soms ook gramnegatieve) staafvormige bacteriën die endosporen produceren, 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>

### **4. *Bacillus paralicheniformis***

*Bacillus paralicheniformis* (familie *Bacillaceae*)<sup>5</sup> is een beweeglijke, endosporen producerende, grampositieve en facultatief anaerobe bacterie die geïsoleerd is uit een traditioneel Koreaans gerecht, Cheonggukjang.<sup>6</sup> Dit gerecht bestaat uit gefermenteerde sojabonen, en wordt bereid door gekookte sojabonen 2 tot 3 dagen aan de open lucht bloot te stellen, of door rijststro toe te voegen. Ook in andere gefermenteerde Koreaanse sojagerechten wordt *B. paralicheniformis* aangetroffen.<sup>7</sup> Groei van de bacterie vindt plaats bij temperaturen van 15 - 60 °C (met een optimum van 37 °C) en een pH van 6 - 11 (met een optimum van 7 - 8).<sup>6</sup> Op basis van fylogenetische analyses van het 16S rRNA gen blijkt het Cheonggukjang-isolaat (KJ-16<sup>T</sup>) het meest verwant aan *Bacillus sonorensis* (99,5%) en *Bacillus licheniformis* (99,4%). Verdere analyse van de gepubliceerde genomgegevens van verschillende *B. licheniformis* stammen toonde aan dat KJ-16<sup>T</sup> samen met vier andere stammen in een aparte groep clustert. Op basis van deze genom- en fenotypische analyses is KJ-16<sup>T</sup> in 2015 onderscheiden van *B. sonorensis* en *B. licheniformis* en als nieuwe soort *B. paralicheniformis* (tevens typesoort) in het genus *Bacillus* ondergebracht.<sup>6,8</sup> De soort behoort niet tot de *B. cereus* groep, maar tot de *B. subtilis* groep.<sup>9</sup>

Omdat *B. paralicheniformis* op basis van 16S rRNA niet te onderscheiden is van *B. licheniformis* zijn verschillende (multilocus) genetische markers voorgesteld waarmee dit onderscheid wel gemaakt kan worden.<sup>7,10</sup> Hiermee zijn verscheidene isolaten als *B. paralicheniformis* geïdentificeerd, die voorheen als *B. licheniformis* bekend stonden.

In de wetenschappelijke literatuur zijn veel verschillende *B. paralicheniformis* isolaten beschreven, waaronder de zouttolerante stammen TXO7B-1SG6, F47 en GSFE7 geïsoleerd uit grondmonsters rondom zoutmeren in Mexico<sup>11</sup> en Algerije,<sup>12</sup> en van durumtarwewortels geteeld op een zoutveld in de buurt van de Dode Zee,<sup>13</sup> de stam TB197 geïsoleerd uit een bodemmonster in het Noordwestelijke deel van de Sonorawoestijn in Mexico,<sup>14,15</sup> en de stammen TRQ65, RP01 en MDJK30 geïsoleerd uit de rhizosfeer van respectievelijk durumtarwe (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) in Mexico,<sup>16</sup> Paksoiplanten (*Brassica chinensis*),<sup>17</sup> en pioenrozen in China.<sup>9</sup> Ook zijn enkele *B. paralicheniformis* stammen geïsoleerd uit mager melkpoeder in Ierland.<sup>18</sup>

Van de *B. paralicheniformis* isolaten is beschreven dat deze verscheidene genclusters bevatten voor de productie van secundaire metabolieten, zoals lipopeptiden, sideroforen en antibiotica, die een antagonistische werking hebben tegen plantpathogene (micro)organismen (zoals bacteriën, schimmels en nematoden).<sup>6,9,12,14,16,19</sup> Blootstelling van verschillende nematoden (*Caenorhabditis elegans*, *Meloidogyne enterolobii*, *Meloidogyne incognita* en *Radopholus similis*) aan deze secundaire metabolieten of endosporen van *B. paralicheniformis* remt de groei en ontwikkeling van deze nematoden.<sup>14,15</sup> Naast *in vitro* studies bleek ook uit kas- en veldexperimenten dat de schade aan plantenwortels die veroorzaakt wordt door de nematoden, afneemt bij blootstelling aan endosporen of secundaire metabolieten.<sup>15</sup> Ook blijkt uit experimenten dat *B. paralicheniformis* TRQ65 de groei van de plantpathogene schimmel *Bipolaris sorokiniana* kan remmen,<sup>16</sup> en is van *B. paralicheniformis* MDJK30 beschreven dat deze antagonistische activiteit vertoont tegen *Fusarium solani* en *B. subtilis*.<sup>9</sup> Tevens is van enkele stammen beschreven dat zij plantengroei kunnen stimuleren.<sup>9,16,17</sup> Van de *B. paralicheniformis* stammen TRQ65 en GSFE7 is beschreven dat deze genen bevatten die gerelateerd zijn aan de biosynthese van auxine, een groeibevorderend planthormoon.<sup>13,16</sup> Inoculatie van tarweplanten met TRQ65 onder experimentele condities stimuleerde de groei van de planten. Ook voor de *B. paralicheniformis* stam RP01 zijn onder experimentele condities groeibevorderende eigenschappen bij katoenplanten waargenomen.<sup>17</sup>

## 5. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over *B. paralicheniformis*. Wel heeft zij meerdere andere soorten binnen het geslacht *Bacillus* geïsoleerd. Het merendeel van de *Bacillus* soorten is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2,<sup>20</sup> met uitzondering van *B. licheniformis*<sup>21</sup> en *Bacillus circulans*<sup>22</sup> die zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1, en *B. anthracis* die is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.<sup>20</sup>

## 6. Pathogeniteitsclassificaties andere beoordelende instanties

Het Duitse ‘Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin’ (BAUA) die pathogeniteit voor de mens beoordeelt, heeft in de ‘Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe’ (TRBA) 466 (‘Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen’ de soort *B. paralicheniformis* ingedeeld in risicogroep 1.<sup>23</sup> In de database van de ‘American Type Culture Collection’ (ATCC) is *B. paralicheniformis* ingedeeld in risicogroep 1.<sup>24</sup> De Canadese ‘Public Health Agency’ heeft de soort *B. paralicheniformis* in risicogroep 1 ingedeeld voor mens en dier.<sup>25</sup> In 2023 heeft de ‘European Food Safety Authority’ (EFSA) een wetenschappelijke opinie uitgebracht over de veiligheid en werkzaamheid

van een voedingsmiddelenadditief voor biggen, kalveren en andere herkauwers (BioPlus® 2B), waar *B. paralicheniformis* (DSM 5749) en *B. subtilis* (DSM 5750) als actieve ingrediënten in aanwezig zijn.<sup>26</sup> In deze opinie worden beide bacteriestammen veilig beschouwd voor de doeldieren, consumenten en het milieu. De inschaling en beoordeling door deze buitenlandse instanties geldt als referentie en achtergrondinformatie bij de risicobeoordeling die door de COGEM wordt uitgevoerd.

## 7. Overweging en advies

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. paralicheniformis* is een bacterie die aangetroffen wordt in gefermenteerde Koreaanse sojagerechten, maar ook in de grond en rhizosfeer aanwezig kan zijn. De COGEM merkt op dat *B. paralicheniformis* in het verleden door identificatie op basis van 16S rRNA soms verkeerd geïdentificeerd is als *B. licheniformis*. De soort *B. licheniformis* is eerder door de COGEM in pathogeniteitsklasse 1 ingedeeld.<sup>21</sup>

Er zijn geen publicaties bekend die *B. paralicheniformis* in verband brengen met pathogeniteit voor mens of dier. Een voedingsmiddelenadditief dat in de veterinaire praktijk als probiotica verkocht wordt, en waar *B. paralicheniformis* onderdeel van uitmaakt, is door de EFSA als veilig beschouwd voor gebruik in de EU.<sup>26</sup> Veel onderzoek naar *B. paralicheniformis* richt zich op antagonistische werking van deze bacterie tegen verschillende plantpathogenen, met name door uitscheiding van secundaire metabolieten. Er is geen eenduidig bewijs dat de soort nematodepathogeen is.

Voor zover bij de COGEM bekend, zijn er ook geen aanwijzingen dat *B. paralicheniformis* plantpathogeen is. *B. paralicheniformis* staat ook niet vermeld in de databases van de American Phytopathological Society<sup>27</sup> en de 'European and Mediterranean Plant Protection Organization' (EPPO).<sup>28</sup> Van een aantal stammen is beschreven dat zij voor planten groeibevorderende eigenschappen hebben.

Alles in overweging nemende is de COGEM van oordeel dat de bacteriesoort *B. paralicheniformis* een apathogene bacteriestam is. De COGEM adviseert om *B. paralicheniformis* in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en op te nemen in Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

## Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2015). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2023-04-01>
2. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). Bacillus <https://lpsn.dsmz.de/genus/bacillus> (bezoekt: 15 augustus 2023)
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). *Bacillus paralicheniformis*. <https://lpsn.dsmz.de/species/bacillus-paralicheniformis> (bezocht: 15 augustus 2023)
6. Dunlap CA et al. (2015). *Bacillus paralicheniformis* sp. nov., isolated from fermented soybean paste. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 65: 3487-3492
7. Jeong DW et al. (2018). Urease characteristics and phylogenetic status of *Bacillus paralicheniformis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1992- 1998
8. Oren A & Garrity GM (2016). Notification that new names of prokaryotes, new combinations and new taxonomic opinions have appeared in volume 65, part 10, of the IJSEM. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 66: 4-6
9. Du Y et al. (2019). Comparative genomic analysis of *Bacillus paralicheniformis* MDJK30 with its closely related species reveals an evolutionary relationship between *B. paralicheniformis* and *B. licheniformis*. *BMC Genomics* 20: 283
10. Olajide AM et al. (2021). Markers to rapidly distinguish *Bacillus paralicheniformis* from the very close relative *Bacillus licheniformis*. *Front. Microbiol.* 11: 596828
11. Can-Ubando LC et al. (2022). *Bacillus paralicheniformis* isolated from a hypersaline sediment of Lake Texcoco, draft genome sequence of strain TXO7B-1SG6. *Microbiol. Resour. Announc.* 11: e0033822
12. Daas MS et al. (2018). Draft genome sequence of *Bacillus paralicheniformis* F47, isolated from an Algerian salty lake. *Genome Announc.* 6: e00190-18
13. Albdaiwi R et al. (2022). Draft genome sequence of *Bacillus paralicheniformis* strain GSFE7, a halotolerant plant growth-promoting bacterial endophyte isolated from cultivated saline areas of the Dead Sea region. *Microbiol. Resour. Announc.* 11: e00425-22
14. Chavarría-Quicaño E et al. (2023). Nematicidal lipopeptides from *Bacillus paralicheniformis* and *Bacillus subtilis*: A comparative study. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 107: 1537-1549
15. Chavarría-Quicaño E et al. (2023). Native *Bacillus paralicheniformis* isolate as a potential agent for phytopathogenic nematodes control. *Front. Microbiol.* 14: 1213306
16. Valenzuela-Ruiz V et al. (2019). Draft genome sequence of *Bacillus paralicheniformis* TRQ65, a biological control agent and plant growth-promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico. *Biotech* 9: 436
17. Xu J et al. (2023). *Bacillus paralicheniformis* RP01 enhances the expression of growth-related genes in cotton and promotes plant growth by altering microbiota inside and outside the root. *Int. J. Mol. Sci* 24: 7227
18. Lourenco A et al. (2023). Draft genome sequences of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus paralicheniformis* strains isolated from Irish skim milk powder. *Microbiol Resour. Announc.* 12: e00137-23
19. Harwood CR et al. (2018). Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. *FEMS Microbiol. Rev.* 42: 721-738
20. COGEM (2021). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van apathogene en pathogene bacteriën (2021). COGEM advies CGM/211025-01

21. COGEM (2007). Classificatie van enkele micro-organismen van bijlage 1 van de Regeling ggo. COGEM advies CGM/070917-02
22. COGEM (2020). Pathogeniteitsclassificatie van de bacterie *Bacillus circulans*. COGEM advies CGM/200630-01
23. Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA) 466 “Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen” (2015). [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: 16 augustus 2023)
24. American Type Culture Collection (ATCC). <https://www.atcc.org/> (bezocht: 22 augustus 2023)
25. Public Health Agency of Canada. <https://health.canada.ca/en/epathogen> (bezocht: 16 augustus 2023)
26. European Food and Safety Authority (EFSA, 2023). Safety and efficacy of a feed additive consisting of *Bacillus paralicheniformis* DSM 5749 and *Bacillus subtilis* DSM 5750 (BioPlus@2B) for piglets, calves for fattening and other growing ruminants (Chr. Hansen A/S). EFSA Journal 21: 7859
27. American Phytopathological Society (APS). <https://www.apsnet.org/Pages/default.aspx> (bezocht: 21 augustus 2023)
28. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). EPPO Global Database <https://gd.eppo.int/> (bezocht: 21 augustus 2023)