

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

**DATUM** 15 februari 2024  
**KENMERK** CGM/240215-02  
**ONDERWERP** Advies pathogeniteitsclassificatie *Bacillus thuringiensis* 407 Cry-

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier getiteld 'Bacillus thuringiensis 407 Cry' (IG 23-200\_2.13-000), ingediend door de Universiteit Leiden, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriestam *Bacillus thuringiensis* 407 Cry-. Bacteriën behorend tot het genus *Bacillus* komen wereldwijd in uiteenlopende omgevingen voor. De soort *B. thuringiensis* is voor het eerst aangetroffen in zijde-wormen en is een bekend insectenpathogeen, en ingedeeld als dierpathogeen in pathogeniteitsklasse 2. De pathogeniteit van *B. thuringiensis* wordt voornamelijk veroorzaakt door zogenaamde crystal (cry)-eiwitten die schadelijk zijn voor insecten. De bacterie en Cry-eiwitpreparaten worden daarom veel toegepast bij de bestrijding van plaaginsecten.

De bacteriestam *B. thuringiensis* 407 is geïsoleerd uit vlinderachtigen. Door deze stam langdurig te kweken bij hogere temperaturen is het plasmide waarop de cry-genen gelegen zijn, verloren gegaan, waardoor deze stam geen cry-eiwitten kan produceren. Met de verkregen stam *B. thuringiensis* 407 Cry- wordt al enkele jaren onderzoek gedaan. Er zijn geen aanwijzingen dat *B. thuringiensis* 407 Cry- pathogeen is voor insecten onder natuurlijke omstandigheden. Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de bacteriestam *B. thuringiensis* 407 Cry- 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 bacteriestam**

### ***Bacillus thuringiensis* 407 Cry- COGEM advies CGM/240215-02**

#### **1. Inleiding**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriestam *Bacillus thuringiensis* 407 Cry-, en plaatsing van deze stam op bijlage 2, lijst A1 van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen' (Regeling ggo).<sup>1</sup> Bijlage 2, bestaat uit een lijst van micro-organismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant. Opname op Bijlage 2, lijst A1 betekent dat onder ML-I laboratorium-condities met het betreffende micro-organisme ggo's vervaardigd mogen worden indien hierbij vectoren worden gebruikt die wél, of inserties die níet, op de A-lijsten staan (lijst A2 veilige vectoren en lijst A3 inserties). Het verzoek is afkomstig van de Universiteit Leiden (IG 23-200). De soort *Bacillus thuringiensis* is opgenomen in de Regeling ggo in pathogeniteitsklasse 2. De aanvrager stelt dat de stam 407 Cry- geen genetisch materiaal bevat dat verantwoordelijk is voor de virulentie en verzoekt de stam *B. thuringiensis* 407 Cry- in te delen in klasse 1.

#### **2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)**

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in oenschouw 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.

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. De soort *Bacillus thuringiensis***

Het genus *Bacillus* behoort tot de familie van de *Bacillaceae*.<sup>2</sup> Het zijn grampositieve staafvormige bacteriën die endosporen produceren, en onder aerobe en facultatief anaerobe condities kunnen groeien.<sup>3,4</sup> Het genus *Bacillus* bestaat uit een zeer diverse groep bacteriën, waaronder dier- en humaanpathogenen, die wereldwijd in zeer verschillende omgevingen voorkomen.<sup>5</sup> De soort *B. thuringiensis* is een grampositieve, anaerobe bacteriesoort.<sup>5</sup> De bacteriën zijn staafvormig (1.0 – 1.2 x 3 – 5 µm) en groeien bij temperaturen tussen 10 en 48 °C, met een optimum tussen 28 en 35 °C.<sup>6</sup>

*B. thuringiensis* is voor het eerst aangetroffen in zijdedwormen in Japan in 1901. Hierna is de bacterie gevonden in 1911 in Duitsland in de larven van de grauwe meelmot, *Ephestia kuehniella*, en is de soort beschreven.<sup>7</sup> *B. thuringiensis* is vooral bekend als pathogeen voor insecten en nematoden. De pathogeniteit wordt vooral veroorzaakt door de productie van Cry-eiwitten (δ-endotoxines). *B. thuringiensis* stammen kunnen verschillende Cry-eiwitten produceren die schadelijk zijn voor specifieke organismen: insecten (orde Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Dictyoptera, Orthoptera en Mallophaga), nematoden (orde Strongylida en Tylenchida), protozoa (Diplomonadida) en mijten.<sup>5</sup>

De Cry-eiwitten worden in eerste instantie geproduceerd als parasporale kristallen.<sup>8</sup> Wanneer deze kristallen in contact komen met maagvloeistoffen van insecten, worden de toxische Cry-eiwitten geactiveerd.<sup>8</sup> De voornaamste, maar niet de enige, theorie over de toxiciteit is dat de Cry-eiwitten poriën vormen in de darmwandcellen van het insect.<sup>8</sup> Deze poriën laten selectief kationen door, wat een osmotische onbalans veroorzaakt en waardoor de cellen afsterven.<sup>8</sup> Hierdoor kan *B. thuringiensis* het lichaam binnentreden en koloniseren, waardoor het insect komt te overlijden.<sup>8</sup> De Cry-eiwitten zijn uitgebreid onderzocht waarbij geen toxiciteit voor mensen is aangetoond.<sup>9</sup> De Cry-eiwitten zijn essentieel voor de pathogeniteit van *B. thuringiensis*, maar de bacterie kan nog verschillende andere toxines aanmaken, waaronder: thuringiensin, Vegetative Insecticidal Proteins (VIPs), secreted insecticidal proteins (Sips), zwittermicin A, en enterotoxines.<sup>10,11,12</sup> Deze toxines zijn belangrijke voor de mate van virulentie van *B. thuringiensis* en maken opportunistische infecties mogelijk.

De bacteriesoort *B. thuringiensis* is nauw verwant aan *Bacillus cereus*, en het staat ter discussie of *B. cereus* niet als een ondersoort van *B. thuringiensis* geïdentificeerd moet worden.<sup>13</sup> *B. cereus* is een bron voor voedselvergiftigingen.<sup>14</sup> Bij *B. thuringiensis* zijn alleen opportunistische infecties van mensen waargenomen.<sup>15,16</sup> *B. cereus* maakt geen Cry-eiwitten aan, maar wel een aantal toxines die ook door *B. thuringiensis* worden geproduceerd. Omdat bij identificatie van infecties het onderscheid tussen deze twee soorten niet standaard wordt vastgesteld, kan niet uitgesloten worden dat *B. thuringiensis* en *B. cereus* in wetenschappelijke publicaties onjuist geïdentificeerd zijn.<sup>14,16,17,18</sup>

#### **4. De stam *Bacillus thuringiensis* 407 Cry-**

In 1989 is de 407 Cry- variant van *B. thuringiensis* beschreven.<sup>19</sup> De stam *B. thuringiensis* 407 is pathogeen voor vlinderachtigen (lepidoptera). Bij het kweken van deze stam bij 42°C is het plasmide met de *cry* genen verloren gegaan. Deze stam is *B. thuringiensis* 407 Cry- genoemd, en in 2013 is de genomesequentie gepubliceerd.<sup>20</sup> Op basis van PCR-analyse is aangetoond dat er geen Cry-genen meer aanwezig zijn in het genoom van deze stam.<sup>12</sup> De stam wordt gemakkelijk getransformeerd en wordt gebruikt voor genetisch onderzoek naar virulentie en pathogeniteit van *B. thuringiensis*.<sup>20,21</sup>

In een wetenschappelijke publicatie waarin onderzocht werd hoe *B. thuringiensis* het best getransformeerd kan worden, is beschreven dat eiwitextracten van *B. thuringiensis* 407 Cry- geen toxiciteit vertonen voor de larven van *Plutella xylostella* (koolmot) en *Spodoptera littoralis* (katoenuil).<sup>19,22</sup> Wanneer *B. thuringiensis* 407 Cry- oraal toegediend wordt aan *Galleria mellonella* (Grote wasmot) of *Bombyx mori* (zijdevlinder) larven, treedt geen sterfte op van de larven, maar de combinatie van *B. thuringiensis* 407 met Cry-eiwitten leidt wel tot sterfte.<sup>23,24,25</sup> Ook directe injectie van *B. thuringiensis* 407 Cry- in rupsen leidt tot mortaliteit.<sup>23,24</sup>

#### **5. Eerder COGEM advies**

De soort *B. thuringiensis* is door de COGEM ingedeeld als dierpathogeen en in pathogeniteitsklasse 2.<sup>26,27</sup>

#### **6. Overweging**

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 (of bacteriestammen) weinig literatuur over apathogeniteit voorhanden.

De bacteriestam *B. thuringiensis* 407 Cry- is een stam die verkregen is na langdurige kweek van *B. thuringiensis* bij hoge temperaturen. Er zijn bij de COGEM geen publicaties bekend die *B. thuringiensis* 407 Cry- in verband brengen met pathogeniteit voor mens of plant. Ook bij dieren (insecten) zijn er geen aanwijzingen voor pathogeniteit onder natuurlijke omstandigheden. De bacteriestam *B. thuringiensis* 407 Cry- wordt al jaren gebruikt voor onderzoek naar de pathogeniteit en virulentie van *B. thuringiensis*.<sup>20,21</sup> Uit onderzoek blijkt dat er geen *cry* genen in *B. thuringiensis* 407 Cry- aanwezig zijn.<sup>12,20</sup> Zonder deze Cry-eiwitten lijkt de stam niet schadelijk te zijn voor insecten via natuurlijke blootstelling.<sup>19,23,24,25</sup>

## 7. Advies

Alles in overweging nemende is de COGEM van oordeel dat de bacteriestam *Bacillus thuringiensis* 407 Cry- een apathogene bacteriestam is. De COGEM adviseert om *B. thuringiensis* 407 Cry- 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/BWBR0035072/2024-01-01>
2. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). *Bacillus* <https://lpsn.dsmz.de/genus/bacillus> (bezocht: 13 februari 2024)
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, doi: 10.1016/j.meegid.2011.02.001.
4. Ehling-Schulz M *et al.* (2019). The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential. *Microbiol. Spectr.* 7, doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018
5. Vilas-Bôas GT *et al.* (2007). Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Can. J. Microbiol.* 53:673-687. doi:10.1139/W07-029.
6. De Vos *et al.* (2011). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York, NY: Springer.
7. Ibrahim MA *et al.* (2010). *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. *Bioeng Bugs*.1: 31-50. doi:10.4161/bbug.1.1.10519.
8. Juan LuiJurat-Fuentes JL *et al.* (2021). Mechanisms of Resistance to Insecticidal Proteins from *Bacillus thuringiensis*, *Annu. Rev. Entomol.*, 66: 121-140, doi: 10.1146/annurev-ento-052620-073348
9. Rubio-Infante N & Moreno-Fierros L (2016). An overview of the safety and biological effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in mammals. *J. Appl. Toxicol.*, 36: 630–648. doi: 10.1002/jat.3252.
10. Liu X *et al.* (2014) Thuringiensin: a thermostable secondary metabolite from *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against a wide range of insects. *Toxins* 25;6:2229-38. doi:10.3390/toxins6082229
11. Xiao-Yan L *et al.* (2010) Genome-wide screening reveals the genetic determinants of an antibiotic insecticide in *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 285: 39191-39200, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.148387>.
12. Schwenk V *et al.* (2020) Enteropathogenic Potential of *Bacillus thuringiensis* Isolates from Soil, Animals, Food and Biopesticides. *Foods*, 9:1484, doi: /10.3390/foods9101484
13. Baek I *et al.* (2019) Comparative Genomic and Phylogenomic Analyses Clarify Relationships Within and Between *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*: Proposal for the Recognition of Two *Bacillus thuringiensis* Genomovars. *Front. Microbiol.* 10:1978. doi:10.3389/fmicb.2019.01978
14. Dietrich R *et al.* (2021). The Food Poisoning Toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins*. 13:98. <https://doi.org/10.3390/toxins13020098>
15. National Pesticide Information Center (NPIC) *Bacillus thuringiensis* <http://npic.orst.edu/factsheets/btgen.html> bezocht op 12-02-2024 (bezocht: 12 februari 2024)

16. Celandroni *et al.* (2014). *Bacillus thuringiensis* membrane-damaging toxins acting on mammalian cells, FEMS Microbiol. Lett., 3;2, 95–103, <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12615>
17. EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards) (2016). Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. EFSA Journal 2016; 14(7):4524, 93 pp. doi:10.2903/j.efsa.2016.4524
18. Johler S *et al.* (2018). Enterotoxin Production of *Bacillus thuringiensis* Isolates From Biopesticides, Foods, and Outbreaks. Front. Microbiol. 9:1915. doi: 10.3389/fmicb.2018.01915
19. Lereclus D *et al.* (1989). Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiol Lett. 15;51:211-7. doi:10.1016/0378-1097(89)90511-9
20. Sheppard AE *et al.* (2013). Complete Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* Strain 407 Cry-. Genome Announc, 1:e00158-12. doi:10.1128/genomeA.00158-12.
21. Espinasse S *et al.* (2004). An extracytoplasmic-function sigma factor is involved in a pathway controlling beta-exotoxin I production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* strain 407-1. J. Bacteriol. 186:3108-16, doi:10.1128/JB.186.10.3108-3116.2004
22. Espinasse *et al.* (2002) An ABC transporter from *Bacillus thuringiensis* is essential for beta-exotoxin I production, *J Bacteriol*, 184:5848-54, doi: 10.1128/JB.184.21.5848-5854.2002.
23. Fedhila *et al.* (2002). The InhA2 Metalloprotease of *Bacillus thuringiensis* Strain 407 Is Required for Pathogenicity in Insects Infected via the Oral Route, J. Bacteriol. Res. 184:12, doi: 10.1128/JB.184.12.3296-3304.2002
24. Salamiou *et al.* (2000) The *plcR* regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. Microbiol. Res. 146:11, doi: 10.1099/00221287-146-11-2825
25. Smith V *et al.* (2020). MogR Is a Ubiquitous Transcriptional Repressor Affecting Motility, Biofilm Formation and Virulence in *Bacillus thuringiensis*. Front. Microbiol. 11:610650. doi: 10.3389/fmicb.2020.610650
26. COGEM (2011). Classificatie pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-03
27. COGEM (2023). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van apathogene en pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/231011-01