

Stellungnahme der ZKBS
zur Eignung von asporogenen, thyminabhängigen Mutanten
von *Bacillus subtilis* 168
als Teil biologischer Sicherheitsmaßnahmen
gemäß § 8 Absatz 1 GenTSV

1. Allgemeines

Mit dem Inkrafttreten der Novelle der Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) zum März 2021 ist es erforderlich, dass entsprechend § 7 Abs. 5 GenTSV das Fortbestehen bereits anerkannter biologischer Sicherheitsmaßnahmen (hier: Vektor- und Empfängersysteme) durch die Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit bestätigt wird. Unter § 8 Abs. 1 der novellierten GenTSV wird ausgeführt, nach welchen Voraussetzungen die Verwendung eines Empfängerorganismus als Teil einer biologischen Sicherheitsmaßnahme anerkannt werden kann. Diese sind erfüllt, wenn 1. eine wissenschaftliche Beschreibung und eine taxonomische Einordnung des Empfängerorganismus vorliegen, 2. der Empfängerorganismus für Mensch, Tier und Pflanzen nicht pathogen ist und keine umweltgefährdenden Eigenschaften aufweist, 3. die Vermehrung des Empfängerorganismus nur unter Bedingungen möglich ist, die außerhalb gentechnischer Anlagen selten oder nicht angetroffen werden und 4. der Empfängerorganismus nur einen geringen horizontalen Genaustausch mit anderen Spezies betreibt.

In dieser Stellungnahme wird geprüft und bewertet, ob asporogene, thyminabhängige Mutanten von *Bacillus subtilis* 168 die o. g. Voraussetzungen erfüllen.

Asporogene, thyminabhängige Mutanten von *B. subtilis* 168 wurden bereits in den seit 1978 geltenden „Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch *in-vitro* neukombinierte Nukleinsäuren“ (zuletzt in der 5. überarbeiteten Fassung von 1986) als biologische Sicherheitsmaßnahme (Empfängerorganismus) benannt. Dies wurde im 1. Gentechnikgesetz von 1990 fortgeschrieben. Ursprünglich waren solche Mutantenstämme bereits seit den 70er Jahren in den USA vom *National Institutes of Health* (NIH) als Teil von „*host-vector-systems* (HV)“ zertifiziert worden.

1.1. Wissenschaftliche Beschreibung

Die Spezies *B. subtilis* gehört zur Familie der *Bacillaceae*. Die Familie umfasst mehrheitlich Gram-positive, sporulierende, chemoorganoheterotrophe, aerobe und fakultativ anaerobe stäbchenförmige Bakterienarten [1]. *B. subtilis* kommt weltweit in Böden vor [2].

Bei dem Stamm 168 von *B. subtilis* handelt es sich um ein Tryptophan-auxotrophes Derivat des Stammes *B. subtilis* Marburg. *B. subtilis* Marburg wurde um 1900 in Deutschland aus Heu isoliert und in den 1930er Jahren unter der Bezeichnung Marburg-Stamm in die Stammsammlung der *New York State Agricultural Experiment Station* aufgenommen [3]. Die *B. subtilis*-Stämme ATCC 6051 und NCIB 3610 sind noch heute existierende direkte Nachkommen von *B. subtilis* Marburg [4]. *B. subtilis* 168 wurde im Jahr 1947 durch Strahlenmutagenese erzeugt [5] und wurde seit 1958 aufgrund seiner natürlichen Kompetenz für die Transformation mit freier DNA intensiv in genetischen Studien untersucht [6]. Bis in die 1980er Jahre, bevor sich der Einsatz der Kryokonservierung etablierte, wurden *B. subtilis*-Stämme auf Agarplatten oder in Stichagar-Kultur aufbewahrt oder in ihrer Dauerform als Endosporen in Glycerin für längere Zeiträume bei -20 °C gelagert [7]. Die Genome von *B. subtilis* 168 sowie des parentalen Stammes ATCC 6051 sind vollständig sequenziert [8–10]. Auf Grundlage der Sequenzierungen erfolgte im Jahr 1999 die Einordnung des Stammes *B. subtilis* 168 in die Subspezies *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* [11]. Der Stamm *B. subtilis* 168 wird vielseitig in der Biotechnologie verwendet.

Zusammenfassend handelt es sich bei *B. subtilis* 168 um einen wissenschaftlich sehr gut charakterisierten Modellorganismus mit einer taxonomisch eindeutigen Einordnung.

1.2. Pathogenes Potential von *B. subtilis* 168

Nur selten traten in der Vergangenheit Infektionen mit *B. subtilis* beim Menschen auf, weshalb *B. subtilis* gelegentlich in der Literatur als pathogen benannt wird [12]. In den beschriebenen Fällen handelt es sich um immunkompromittierte Patienten oder Personen mit starkem Drogenmissbrauch. Es sind keine Fälle bekannt, die ein pathogenes Potential von *B. subtilis* für den Menschen im Allgemeinen aufzeigen [12].

In *B. subtilis* 168 sind die meisten Virulenzfaktorgene abwesend, die in pathogenen Bakterien der Gattung *Bacillus* vorkommen [13, 14]. Dazu zählen Gene zur Expression von Enterotoxinen, Hämolytinen und anderen Virulenzfaktoren [13, 14]. Das pathogene Potential von *B. subtilis* 168 wurde in Tiermodellen untersucht. Im Mausmodell ist die intraperitoneale Injektion von $2,5 \times 10^6$ koloniebildenden Einheiten (KBE) von *B. subtilis* 168 nicht gesundheitsschädlich [15]. Die Inokulation mit derselben Menge eines pathogenen *B. subtilis*-Stammes führt zu einer Letalität von 70 %. Der pathogene *B. subtilis*-Stamm ist im Gegensatz zu *B. subtilis* 168 in der Lage, intrazellulär in Phagozyten zu replizieren [15]. Die orale Inokulation mit einer Einzeldosis von 1×10^9 KBE von *B. subtilis* 168 führt im Mausmodell zu keinen gesundheitlichen Problemen [14]. Dabei persistieren vegetative Zellen und Endosporen von *B. subtilis* 168 nicht länger als 12 Tage im Darmtrakt [14]. Im Gegensatz zu *Listeria monocytogenes* ist *B. subtilis* 168 kaum in der Lage, an Epithelzellen zu adhären und wirkt nicht zytotoxisch auf menschliche Epithelzellen in Kultur [14]. Es liegen keine Berichte über Infektionen mit *B. subtilis* 168 bei Tier und Mensch vor.

Im Allgemeinen ist *B. subtilis* in der Lage, die Rhizosphäre von Pflanzen zu besiedeln [16, 17]. Dabei ist die Fähigkeit zur Schwarmmotilität eine notwendige Voraussetzung für eine effektive Kolonisierung der Rhizosphäre durch *B. subtilis* [18]. Aufgrund einer Leserasterverschiebung im *swrA*-Gen ist *B. subtilis* 168 hingegen nicht zur Schwarmmotilität befähigt und kann somit Wurzeln nicht effizient besiedeln [4, 19]. Berichte über eine phytopathogene Wirkung der Spezies *B. subtilis* im Allgemeinen und dem Stamm 168 im Speziellen liegen nicht vor.

B. subtilis 168 ist apathogen und ohne Gefährdungspotential für Mensch, Tier und Pflanze.

1.3. Vermehrungsfähigkeit von *B. subtilis* 168 außerhalb von gentechnischen Anlagen

In vielfältigen Studien wurde das Überleben des domestizierten Stammes *B. subtilis* 168 untersucht. Für solche nur durch *in vitro*-Kultur gehaltenen Stämme ist bekannt, dass ihre Überlebensfähigkeit in natürlichen Habitaten oft reduziert ist. Die Zahl vegetativer Zellen von *B. subtilis* 168 nimmt beispielsweise in Süßwasser oder Abwasser innerhalb von zwei Tagen um vier bis sechs Zehnerpotenzen ab [20–22]. In Böden ist die verfügbare Datenlage zum Überleben von *B. subtilis* 168 aufgrund unterschiedlicher Versuchsgestaltungen und -bedingungen (u. a. unterschiedliche Böden, steril bzw. nicht steril, verschiedene Temperaturen, unterschiedliche Supplementierungen) uneinheitlich und begrenzt vergleichbar.

So sank die Bakteriendichte nach Inokulation von steriler Blumenerde mit 2×10^7 KBE *B. subtilis* 168 je g Boden innerhalb von zwei Tagen auf ein Zehntel und blieb anschließend über 80 Tage stabil [23]. In anderen Untersuchungen wuchs die Bakteriendichte nach Inokulation von 2×10^8 KBE *B. subtilis* 168 Auxotrophie-Stämmen je g Boden innerhalb von 24 Stunden auf das Zehnfache an und blieb anschließend bis zum Versuchsende nach acht bzw. fünfzehn Tage stabil [24, 25]. In sterilem Kompostboden wurde eine Verdopplung von *B. subtilis* 168 bei 37 °C in sieben Tagen gezeigt, die über 30 Tage (Versuchsende) stabil blieb [26]. In unsterilem Kompost fiel die Bakterienzahl in sieben Tagen auf ein Hundertstel und blieb anschließend bis Tag 30 (Versuchsende) konstant [26]. In unsterilem Kompost bei 37 °C fiel die Bakterienzahl von 10^7 auf 10^6 in sieben Tagen und blieb bis zum Versuchsende nach 28 Tage konstant [27]. In den Versuchen sank die Koloniebildung durch endogene Bodenbakterien ebenfalls auf ein Zehntel. Ähnlich verlief das Überleben auch in sterilem Kompost. In einer weiteren Studie wurde keine Abnahme der in eine nicht näher charakterisierte Bodenprobe eingebrachten Zellen ($4,6 \times 10^6$ /g Boden) über einen Zeitraum von 15 Tagen beobachtet [28]. In einem ebenfalls nicht näher charakterisierten sterilen Boden sank die KBE um drei Zehnerpotenzen in drei Tagen [29]. In einem sterilen sandigen Lehmboden stieg die Zellzahl auf das Zehnfache in drei Tagen an, im nicht sterilen Boden sank die Zahl um drei Zehnerpotenzen in drei Tagen [20]. In beiden Fällen waren die Koloniebildner in dem Boden am Ende Sporen. In Untersuchungen mit *B. subtilis*-Stämmen, die nicht zur 168er-Linie gehören, sank das Überleben in verschiedenen unsterilen Böden um drei bis vier Zehnerpotenzen in 3 – 20 Tagen [17, 30].

1.3.1 Auswirkung von *spo*-Mutationen

Die Daten weisen darauf hin, dass *B. subtilis* 168 in der Lage ist, in Böden außerhalb von gentechnischen Anlagen zu überleben und sich gegebenenfalls auch zu vermehren. Das dauerhafte Überleben von *B. subtilis* 168 in der Umwelt beruht im Wesentlichen auf der Bildung von Sporen. Der jeweilige Übergang vegetativer Zellen in Sporen wird durch die Lebensbedingungen gesteuert [31]. In den oben genannten Experimenten wurde unter den überlebenden Koloniebildnern auch der Anteil von Sporen bestimmt. Dieser lag nach 7 Tagen in sterilen und unsterilen Kompostböden bei 100 % unter allen Überlebenden und blieb danach konstant [27]. In Experimenten mit sterilem Kompostboden war der Anteil von Sporen ca. 1 % nach 7 Tagen und ca. 100 % nach 28 Tagen [26]. In unsterilem Kompostboden erreichte der Anteil von Sporen ca. 1 % nach 28 Tagen [26]. Bei Untersuchungen mit steriler Blumenerde

lag der Anteil von Sporen zwischen 80 und 90 % nach drei Tagen [25]. In anderen Langzeitstudien mit steriler Blumenerde betrug der Anteil unter den Koloniebildnern 12 – 20 % Sporen nach 45 Tagen [23].

Sporen bergen mit ihrer hohen Überdauerungsfähigkeit und der Möglichkeit zur Translokation in andere Habitate, in welchen ein Auskeimen und vegetatives Wachstum möglich ist, die Gefahr der unerwünschten Ausbreitung gentechnischer Konstrukte. Deshalb hat das amerikanische NIH in seinen Anforderungen an biologische Sicherheitsmaßnahmen (HV1 bzw. HV2) 1978 für *B. subtilis* u. a. die Ausschaltung der Sporenbildung durch Defektmutationen (*spo*) gefordert [32].

Die Endosporen weisen gegenüber chemischen und physikalischen Belastungen eine hohe Widerstandsfähigkeit auf [33]. Die molekularen Abläufe der Endosporenbildung in *B. subtilis* 168 wurden umfassend untersucht [34, 35]. Die Endosporenbildung findet bei *in vitro*-Kultur am Ende der exponentiellen Vermehrung statt und wird z. B. durch Nährstoffmangel und hohe Populationsdichte induziert. Die Bildung der Endosporen ist ein äußerst komplexer Vorgang, an dem nach heutigem Stand mehr als 100 Gene beteiligt sind [36]. Auf Basis morphologischer Veränderungen der Zellen wird die Sporulation in acht Phasen unterteilt. Die Bezeichnung von asporogenen Mutanten richtet sich nach der von der inaktivierenden Mutation betroffenen Phase (*spo0* – *spoVII*). Es gibt eine Vielzahl von asporogenen Mutanten mit Mutationen in unterschiedlichen Genen [37, 38]. Sporulationsmutanten können direkt zurückmutieren (isokonale Reversion bzw. intragenische Suppression), sie können aber auch in ihrer phänotypischen Ausprägung durch Mutationen in anderen Genen supprimiert werden (extragenische Suppressormutationen). Für solche Suppressormutationen gibt es wegen der Komplexität der Sporenbildung zahlreiche Möglichkeiten (z. B. *spo0A* und *spo0F*-Suppressormutationen [39, 40]).

Um eine Sporulation sicher auszuschließen, gibt das NIH eine Reversionshäufigkeit von $\leq 10^{-7}$ für *spo*-Mutanten vor, die als Teil biologischer Sicherheitsmaßnahmen eingesetzt werden sollen. Diese niedrige Reversionshäufigkeit muss jeweils bei der Zertifizierung belegt werden. Als *spo*-Mutationen werden beispielsweise solche im Gen *spo0A* genutzt, dem Hauptregulator der frühen Phase der Sporulation, der über 100 Gene reguliert [41]. Einige wenige Beispiele für beim NIH zertifizierte Stämme sind in der Literatur zu finden. Sie fallen in zwei Kategorien von denen jeweils ein Beispiel (RUB331; ASB298) vorgestellt wird. Der Genotyp von RUB331 ist *B. subtilis* 168 *thyA1*, *thyB1*, *spo-331*. Er wurde zum amerikanischen und europäischen Patent angemeldet (US4302544A, EP0029497A1). Die Rückmutationshäufigkeit der molekular nicht genau beschriebenen *spo-331*-Mutation wird in der Patentschrift auf Basis von *in vitro*-Experimenten (anhand des Wechsels der Koloniemorphologie) mit $\leq 10^{-7}$ angegeben. Ein Überleben in Böden wurde nicht angegeben. Young *et al.* (1980) beschreiben, dass dieser Stamm eine Abnahme der Zellzahl um drei Zehnerpotenzen in 15 Tagen im Boden zeigte [28]. Aus den Daten geht aber auch hervor (Abb. 12, Legende), dass unter den Überlebenden sporulationsfähige Rückmutanten tatsächlich mit einer Häufigkeit von bis zu 10^{-3} auftreten. Diese Rückmutanten beruhen wahrscheinlich auf den oben genannten, relativ häufigen extragenischen Suppressormutationen. Wegen dieser hohen Rückmutabilität zur Sporulationsfähigkeit erfüllt der Stamm RUB331 im Grunde die Anforderungen für eine biologische Sicherheitsmaßnahme nicht.

Der Genotyp des zweiten zertifizierten *B. subtilis* 168-Stammes, ASB298, lautet *thyA*, *thyB*, *spoAΔ677*, *uvr-1*, *dal*, *citDΔ29 (uvrC)*, *str^d* [29]. Alle sieben Mutationen sollen zum verringerten

Überleben in der Umwelt beitragen. Die *dal*-Mutation (D-, L-Alanin-Racemase-Defizienz) behindert die Peptidoglykanbiosynthese bei der Zellwandbildung; die *uvr-1* Mutation macht die Zellen hoch sensibel gegen UV und andere DNA-schädigende Agenzien; die *citD*-Deletion umfasst den *citK*-Lokus, einschließlich zusätzlicher Gene des für die Sporulation erforderlichen Citratzyklus; die *str^d*-Mutation führt zur Abhängigkeit der Vermehrung von Streptomycin (1 mg/ml). Die KBE dieses Stammes sinken in sterilem Boden in zwei Tagen um fünf Zehnerpotenzen, die spontane *spoAΔ677*-Mutante revertiert nachweislich um weniger als 10^{-7} [29]. Der Beitrag der einzelnen Mutationen zur Reduktion des Überlebens des Stammes in der Umwelt wurde nicht bestimmt. Der Stamm erfüllt die NIH-Anforderungen.

Die Verhinderung der Sporenbildung durch eine sehr selten revertierende *spo*-Mutation ist ein grundlegender Beitrag zur Verhinderung der Überdauerung von *B. subtilis* 168 außerhalb gentechnischer Anlagen.

1.3.2 Auswirkung von *thy*-Mutationen

Eine Blockierung der vegetativen Vermehrung der Zellen in der Umwelt kann durch Mutationen zum Wuchsstoffbedarf erfolgen, der in der Umwelt nicht ausreichend erfüllt wird. Im Gegensatz zu den meisten anderen Nährstoffentzügen und -auxotrophien, die nur einen biostatischen Effekt auf Mikroorganismen haben, führt Thyminmangel zum Tod innerhalb einer Generation. Das Phänomen des Thyminmangeltodes wurde bereits in den 50er Jahren [42] entdeckt und wurde in Prokaryoten und Eukaryoten umfassend untersucht [43].

B. subtilis 168 trägt zwei Thymidylat-Synthase-Gene (*thyA*, *thyB*), deren Inaktivierung zu einer Thyminauxotrophie führt [44, 45]. Die Thymin-abhängigen Mutanten von *B. subtilis* 168 sterben bei fehlender Supplementierung mit Thymin innerhalb weniger Stunden [46–49]. Ohne Thyminzusatz kommt es zu DNA-Einzel- und -Doppelstrangbrüchen und dem irreversiblen Verlust von 10 bis 15 % der DNA [43, 46]. Um den Thyminmangeltod in Kultur zu vermeiden, ist eine Thymin- bzw. Thymidinkonzentration von mindestens 5 µg/ml erforderlich [49]. In Böden liegt Thymin frei und in Form von DNA in einer durchschnittlichen Konzentration von ~ 36 µg Thymin / g getrockneten Bodenmaterial vor (Werte aus 15 Böden verschiedener Lokalisation, Tiefe und Beschaffenheit) [50]. Thymin kann ungehindert in *B. subtilis* 168-Zellen diffundieren, wobei die zelluläre Konzentration äquivalent zur Thyminkonzentration im umgebenden Medium ist [51]. Mithilfe der Kompetenz kann DNA von *B. subtilis* aus der Umgebung aufgenommen und die Komponenten im Stoffwechsel verwertet werden [52, 53]. Dass thyminabhängige Bakterien auch ohne Thyminzusatz in Erde vermehrungsfähig sind, wurde bereits für *E. coli* K12-abgeleitete Stämme berichtet [54]. Auch *B. subtilis* 168 *thyA*, *thyB* (RUB830) überlebt uneingeschränkt in Bodenproben über einen Zeitraum von mindestens 15 Tagen [28]. Die Thyminauxotrophie erscheint für die Reduktion des Überlebens von *B. subtilis* 168 in der Umwelt ungeeignet.

1.4. Horizontaler Gentransfer von *B. subtilis* 168 mit anderen Organismen

Horizontaler Gentransfer bei Bakterien kann durch Prozesse wie Transformation, Transduktion, Konjugation und Mobilisierung von genetischem Material stattfinden, deren molekulare Abläufe umfassend untersucht wurden [55].

Der Stamm *B. subtilis* 168 ist in der Lage, DNA aktiv aus der Umgebung aufzunehmen, und weist somit eine natürliche Kompetenz für die Transformation mit freier DNA auf [6]. Die Kompetenz von *B. subtilis* 168 ist am höchsten zum Ende der exponentiellen

Wachstumsphase [56]. Die Aufnahme von DNA erfolgt nach Fragmentierung als Einzelstrang entlang eines Pseudopilus durch die ComEC-Pore [57, 58]. Nach der Aufnahme der DNA kommt es im Zytoplasma zu transienten, nicht kovalenten Heteroduplexkomplexen aus Donor- und Rezipienten-DNA, sodass Einzelstrang-DNA-Abschnitte des Donors durch Rekombinationsprozesse integriert werden können [59, 60]. In zeitlicher Koinzidenz mit der Kompetenzentwicklung setzt *B. subtilis* 168 während des Wachstums in Kulturmedien DNA frei [61, 62]. Alternativ zur natürlichen Transformation kann DNA unter solchen experimentellen Bedingungen in *B. subtilis*-Zellen gelangen, die die Membran der Bakterien für DNA durchlässig machen, z. B. durch die Anwendung physikalischer Methoden (Elektroporation) [63].

Ein anderer Prozess des horizontalen Gentransfers ist die Übertragung von Plasmiden mittels Konjugation. Die bakterielle Konjugation ist ein Vorgang, in dem es zum physikalischen Kontakt zwischen Donor- und Rezipientenzellen und anschließend zum Transfer eines DNA-Einzelstranges kommt. Der Stamm *B. subtilis* 168 enthält keine Plasmide, so dass ein Gentransfer mithilfe der Konjugation einschließlich der Mobilisierung ausgeschlossen ist [9].

Zum horizontalen Gentransfer bei Bakterien tragen generell transduzierende Phagen mit breitem Wirtsbereich bei. Solche Phagen können gelegentlich ausschließlich DNA bakteriellen Ursprungs (chromosomale- oder Plasmid-DNA) in infektiöse Phagenpartikel verpacken und Wirte aus mehreren Bakterienfamilien infizieren. Nach Prophagen-induzierenden Behandlungen können die zwei Prophagen PBSX und SP β aus dem Chromosom von *B. subtilis* 168 ausgeschnitten werden [9]. SP β ist ein temperenter Phage, der nur spezifische bakterielle DNA-Abschnitte benachbart zum Integrationsort übertragen kann (spezielle Transduktion) [64]. PBSX ist ein defekter Phage, dessen Partikel ausschließlich chromosomale DNA beinhalten. PBSX kann an suszeptible Zellen adsorbieren, aber es kommt nicht zur DNA-Injektion in die Zelle. Die Zellen werden dabei abgetötet (Bacteriocinwirkung) [65]. Es sind bislang keine generell transduzierenden Phagen mit weitem Wirtsbereich bekannt, die *B. subtilis* 168 infizieren können. Häufig werden in gentechnischen Arbeiten mit *B. subtilis* 168 die generell transduzierenden Phagen PBS1 und SP-10 eingesetzt, die jedoch nur einige *B. subtilis*-Stämme infizieren können und somit keinen breiten Wirtsbereich besitzen [66–68].

2. Empfehlung

Nach § 8 Abs. 1 GenTSV werden asporogene (*spo*) Mutanten als Teil einer biologischen Sicherheitsmaßnahme anerkannt, wenn nachweislich die vorliegende *spo*-Mutation mit einer Häufigkeit von $\leq 10^{-7}$ zurückmutiert und mindestens eine weitere, die vegetative Vermehrung der Zellen unter natürlichen Umweltbedingungen behindernde, Mutation vorliegt. Thyminmangelmutationen sind nicht geeignet für eine Verhinderung des Umweltüberlebens. Die Eignung des jeweiligen Stammes wird als Einzelfallentscheidung von der ZKBS geprüft.

3. Begründung

Folgende Erfordernisse nach § 8 Abs. 1 GenTSV sind für *Bacillus subtilis* 168 *spo*, *thyA*, *thyB* Stämme erfüllt: Sie sind wissenschaftlich sehr gut beschrieben und apathogen für Mensch, Tier und Pflanze, Horizontaler Gentransfer von diesen Stämmen auf andere Bakterien ist nicht zu erwarten. Allerdings ist ein Überleben der Stämme außerhalb gentechnischer Anlagen nicht

auszuschließen, da die Thyminabhängigkeit in Böden ausgeglichen werden kann und die vegetative Vermehrung dort nicht durch Thyminmangel begrenzt wird. Die Wirksamkeit der Vermehrungsbegrenzung in der Umwelt durch andere Mutationen (z. B. *dal* oder *str^d*) muss im Einzelfall durch Laborexperimente nachgewiesen werden. Der Stamm ASB298 erfüllt alle Voraussetzungen für die Anerkennung als Teil einer biologischen Sicherheitsmaßnahme. Dieser Stamm wird von der *American Type Culture Collection* angeboten.

Informationen dazu, welche asporogenen *B. subtilis* 168-Mutanten entsprechend der in dieser Stellungnahme festgelegten Kriterien als Empfängerstämme für biologische Sicherheitsmaßnahmen geeignet sind, werden in der [Datenbank der Empfängerstämme für biologische Sicherheitsmaßnahmen](#) gesammelt und zur Verfügung gestellt, die von der ZKBS-Geschäftsstelle geführt wird.

Literatur

1. **Logan NA, Vos P de** (2009). Family *Bacillaceae*. p. 20. In Vos P de, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H, Whitman WB (eds), *BERGEY'S MANUAL® OF Systematic Bacteriology*. Volume Three The Firmicutes, vol. 3. Springer, Dordrecht Heidelberg London New York.
2. **Logan NA, Vos P de** (2015). *Bacillus*. pp. 1–163. In Whitman WB (ed), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley, Hoboken, New Jersey.
3. **Conn HJ** (1930). The identity of *Bacillus subtilis*. *J Infect Dis* **1930**(Vol. 46):341–50.
4. **Zeigler DR, Prágai Z, Rodriguez S, Chevreux B, Muffler A, Albert T, Bai R, Wyss M, Perkins JB** (2008). The origins of 168, W23, and other *Bacillus subtilis* legacy strains. *J Bacteriol* **190**(21):6983–95. doi:10.1128/JB.00722-08.
5. **Burkholder PR, Giles NH, JR** (1947). Induced biochemical mutations in *Bacillus subtilis*. *Am J Bot* **34**(6):345–8.
6. **Spizizen J** (1958). Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **44**(10):1072–8. doi:10.1073/pnas.44.10.1072.
7. **Young FE, Wilson GA** (1974). *Bacillus subtilis*. pp. 69–114. In King RC (ed), *Bacteria, Bacteriophages, and Fungi: Volume 1*. Springer US, Boston, MA.
8. **Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessières P, Bolotin A, Borchert S, Borriss R, Boursier L, Brans A, Braun M, Brignell SC, Bron S, Brouillet S, Bruschi CV, Caldwell B, Capuano V, Carter NM, Choi S-K, Codani J-J, Connerton IF, Cummings NJ, Daniel RA, Denizot F, Devine KM, Düsterhöft A, Ehrlich SD, Emmerson PT, Entian KD, Errington J, Fabret C, Ferrari E, Foulger D, Fritz C, Fujita M, Fujita Y, Fuma S, Galizzi A, Galleron N, Ghim S-Y, Glaser P, Goffeau A, Golightly EJ, Grandi G, Guiseppi G, Guy BJ, Haga K, Haiech J, Harwood CR, Hénaut A, Hilbert H, Holsappel S, Hosono S, Hullo M-F, Itaya M, Jones L, Joris B, Karamata D, Kasahara Y, Klaerr-Blanchard M, Klein C, Kobayashi Y, Koetter P, Koningstein G, Krogh S, Kumano M, Kurita K, Lapidus A, Lardinois S, Lauber J, Lazarevic V, Lee S-M, Levine A, Liu H, Masuda S, Mauël C, Médigue C, Medina N, Mellado RP, Mizuno M, Moestl D, Nakai S, Noback M, Noone D, O'Reilly M, Ogawa K, Ogiwara A, Oudega B, Park S-H, Parro V, Pohl TM, Portetelle D, Porwollik S, Prescott AM, Presecan E, Pujic P, Purnelle B, Rapoport G, Rey M, Reynolds S, Rieger M, Rivolta C, Rocha E, Roche B, Rose M, Sadaie Y, Sato T, Scanlan E, Schleich S, Schroeter R, Scoffone F, Sekiguchi J, Sekowska A, Seror SJ, Serror P, Shin B-S, Soldo B, Sorokin A, Tacconi E, Takagi T, Takahashi H, Takemaru K, Takeuchi M, Tamakoshi A, Tanaka T, Terpstra P, Tognoni A, Tosato V, Uchiyama S, Vandenbol M, Vannier F, Vassarotti A, Viari A, Wambutt R, Wedler E, Wedler H, Weitzenegger T, Winters P, Wipat A, Yamamoto H, Yamane K, Yasumoto K, Yata K, Yoshida K, Yoshikawa H-F, Zumstein E, Yoshikawa H, Danchin A** (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**(6657):249–56. doi:10.1038/36786.

9. **Barbe V, Cruveiller S, Kunst F, Lenoble P, Meurice G, Sekowska A, Vallenet D, Wang T, Moszer I, Médigue C, Danchin A** (2009). From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology (Reading)* **155**(Pt 6):1758–75. doi:10.1099/mic.0.027839-0.
10. **Kabisch J, Thürmer A, Hübel T, Popper L, Daniel R, Schweder T** (2013). Characterization and optimization of *Bacillus subtilis* ATCC 6051 as an expression host. *J Biotechnol* **163**(2):97–104. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.06.034.
11. **Nakamura LK, Roberts MS, Cohan FM** (1999). Note: Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: A proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **49**(3):1211–5. doi:10.1099/00207713-49-3-1211.
12. **Boer Sietske A de, Diderichsen B** (1991). On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* **36**(1):1–4. doi:10.1007/BF00164689.
13. **Sorokulova IB, Pinchuk IV, Denayrolles M, Osipova IG, Huang JM, Cutting SM, Urdaci MC** (2008). The Safety of Two *Bacillus* Probiotic Strains for Human Use. *Dig Dis Sci* **53**(4):954–63. doi:10.1007/s10620-007-9959-1.
14. **Hong HA, Huang J-M, Khaneja R, Hiep LV, Urdaci MC, Cutting SM** (2008). The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *J Appl Microbiol* **105**(2):510–20. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03773.x.
15. **Gu H-J, Sun Q-L, Luo J-C, Zhang J, Sun L** (2019). A first study of the virulence potential of a *Bacillus subtilis* isolate from deep-sea hydrothermal vent. *Front Cell Infect Microbiol* **9**:183.
16. **Siala A, Gray TRG** (1974). Growth of *Bacillus subtilis* and Spore Germination in Soil Observed by a Fluorescent-antibody Technique. *Microbiology (Reading)* **81**(1):191–8. doi:10.1099/00221287-81-1-191.
17. **van Elsas JD, Dijkstra AF, Govaert JM, van Veen JA** (1986). Survival of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* introduced into two soils of different texture in field microplots. *FEMS Microbiol Ecol* **2**(3):151–60. doi:10.1111/j.1574-6968.1986.tb01724.x.
18. **Gao S, Wu H, Yu X, Qian L, Gao X** (2016). Swarming motility plays the major role in migration during tomato root colonization by *Bacillus subtilis* SWR01. *Biol Control* **98**:11–7.
19. **Patrick JE, Kearns DB** (2009). Laboratory Strains of *Bacillus subtilis* Do Not Exhibit Swarming Motility. *J Bacteriol* **191**(22):7129–33. doi:10.1128/JB.00905-09.
20. **Liang LN, Sinclair JL, Mallory LM, Alexander M** (1982). Fate in Model Ecosystems of Microbial Species of Potential Use in Genetic Engineering. *Appl Environ Microbiol* **44**(3):708–14. doi:10.1128/aem.44.3.708-714.1982.
21. **Gurijala KR, Alexander M** (1990). Explanation for the decline of bacteria introduced into lake water. *Microb Ecol* **20**(1):231–44. doi:10.1007/BF02543879.
22. **Sinclair JL, Alexander M** (1984). Role of resistance to starvation in bacterial survival in sewage and lake water. *Appl Environ Microbiol* **48**(2):410–5. doi:10.1128/aem.48.2.410-415.1984.
23. **Pantastico-Caldas M, Duncan KE, Istock CA, Bell JA** (1992). Population Dynamics of Bacteriophage and *Bacillus Subtilis* in Soil. *Ecology* **73**(5):1888–902. doi:10.2307/1940040.
24. **Graham JB, Istock CA** (1978). Genetic exchange in *Bacillus subtilis* in soil. *Mol Gen Genet* **166**(3):287–90. doi:10.1007/BF00267620.
25. **Graham J, Istock C** (1981). Parasexuality and Microevolution in Experimental Populations of *Bacillus subtilis*. *Evolution* **35**(5):954–63. doi:10.2307/2407866.
26. **McDonald IR, Riley PW, Sharp RJ, McCarthy AJ** (1998). Survival of Plasmid-Containing *Bacillus subtilis* Released into Mushroom Compost. *Microb Ecol* **36**(1):51–9. doi:10.1007/s002489900092.
27. **Amner W, McCarthy AJ, Edwards C** (1991). Survival of a plasmid-bearing strain of *Bacillus subtilis* introduced into compost. *Microbiology (Reading)* **137**(8):1931–7. doi:10.1099/00221287-137-8-1931.
28. **Young FE** (1980). Impact of Cloning in *Bacillus subtilis* on Fundamental and Industrial Microbiology: The Eighth Griffith Memorial Lecture. *Microbiology (Reading)* **119**(1):1–15. doi:10.1099/00221287-119-1-1.
29. **Burke WF Jr., Le HT** (1980). Characterization of a *Bacillus subtilis* Strain. *Recombinant DNA Technical Bulletin* **3**(4):175–94.
30. **Tokuda Y, Ano T, Shoda M** (1995). Survival of *Bacillus subtilis* NB22 and its transformant in soil. *Appl Soil Ecol* **2**(2):85–94. doi:10.1016/0929-1393(94)00042-6.

31. **Nicholson WL** (2002). Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cell Mol Life Sci* **59**(3):410–6. doi:10.1007/s00018-002-8433-7.
32. **National Institutes of Health** (2019). NIH Guidelines for Research Involving Recombinant or Synthetic Nucleic Acid Molecules (NIH Guidelines) https://osp.od.nih.gov/wp-content/uploads/NIH_Guidelines.pdf
33. **Setlow P** (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol* **101**(3):514–25. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x.
34. **Setlow P, Johnson EA** (2020). Spores and their significance. pp. 23–63. *In* Doyle MP, Diez-Gonzalez F, Hill C (eds), *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, 5th ed., vol. 1. John Wiley & Sons, Washington, DC.
35. **Piggot PJ, Hilbert DW** (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol* **7**(6):579–86. doi:10.1016/j.mib.2004.10.001.
36. **Meeske AJ, Rodrigues CDA, Brady J, Lim HC, Bernhardt TG, Rudner DZ** (2016). High-Throughput Genetic Screens Identify a Large and Diverse Collection of New Sporulation Genes in *Bacillus subtilis*. *PLoS Biology* **14**(1):e1002341. doi:10.1371/journal.pbio.1002341.
37. **The Bacillus Genetic Stock Center** (2022). *Bacillus* Genetic Stock Center <https://bgsc.org/>
38. **Pedreira T, Eifmann C, Stülke J** (2022). The current state of SubtiWiki, the database for the model organism *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* **50**(D1):D875–D882. doi:10.1093/nar/gkab943.
39. **Grossman AD, Lewis T, Levin N, Vivo R de** (1992). Suppressors of a spo0A missense mutation and their effects on sporulation in *Bacillus subtilis*. *Biochimie* **74**(7):679–88. doi:10.1016/0300-9084(92)90140-A.
40. **Kawamura F, Saito H** (1983). Isolation and mapping of a new suppressor mutation of an early sporulation gene spo0F mutation in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* **192**(3):330–4. doi:10.1007/BF00392171.
41. **Donato V** (2018). Spo0A, as the Master Regulator of Multicellularity in *B. subtilis*. *Microbiol Infect Dis* **2**. doi:10.33425/2639-9458.1018.
42. **Cohen SS, Barner HD** (1954). Studies on unbalanced growth in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **40**(10):885–93. doi:10.1073/pnas.40.10.885.
43. **Ahmad SI, Kirk SH, Eisenstark A** (1998). Thymine metabolism and thymineless death in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Microbiol* **52**(1):591–625. doi:10.1146/annurev.micro.52.1.591.
44. **Pritikin WB, Romig WR** (1966). Death of *Bacillus subtilis* Auxotrophs Due to Deprivation of Thymine, Tryptophan, or Uracil. *J Bacteriol* **92**(2):291–6. doi:10.1128/jb.92.2.291-296.1966.
45. **Wilson MC, Farmer JL, Rothman F** (1966). Thymidylate Synthesis and Aminopterin Resistance in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **92**(1):186–96. doi:10.1128/jb.92.1.186-196.1966.
46. **Reiter H, Ramareddy G** (1970). Loss of DNA behind the growing point of thymine-starved *Bacillus subtilis* 168. *J Mol Biol* **50**(2):533–48. doi:10.1016/0022-2836(70)90210-X.
47. **Hosseini S, Curilovs A, Cutting SM, Elliot MA** (2018). Biological Containment of Genetically Modified *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **84**(3):e02334-17. doi:10.1128/AEM.02334-17.
48. **Rolfe R** (1967). On the mechanism of thymineless death in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **57**(1):114–21. doi:10.1073/pnas.57.1.114.
49. **Farmer JL, Rothman F** (1965). Transformable thymine-requiring mutant of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **89**(1):262–3.
50. **Cortez J, Schnitzer M** (1979). Nucleic acid bases in soils and their association with organic and inorganic soil components. *Can J Soil Sci* **59**(3):277–86.
51. **Rinehart KV, Copeland JC** (1973). Evidence that thymine is not a normal metabolite in wild-type *Bacillus subtilis*. *Biochim Biophys Acta* **294**(1):1–7. doi:10.1016/0005-2787(73)90308-0.
52. **Redfield RJ** (1993). Genes for Breakfast: The Have-Your-Cake and-Eat-It-Too of Bacterial Transformation. *J Hered* **84**(5):400–4. doi:10.1093/oxfordjournals.jhered.a111361.
53. **Finkel SE, Kolter R** (2001). DNA as a nutrient: novel role for bacterial competence gene homologs. *J Bacteriol* **183**(21):6288–93. doi:10.1128/JB.183.21.6288-6293.2001.
54. **Wright O, Delmans M, Stan G-B, Ellis T** (2015). GeneGuard: A Modular Plasmid System Designed for Biosafety. *ACS Synth Biol* **4**(3):307–16. doi:10.1021/sb500234s.
55. **Dreiseikelmann B** (1994). Translocation of DNA across bacterial membranes. *Microbiol Rev* **58**(3):293–316. doi:10.1128/mr.58.3.293-316.1994.
56. **Anagnostopoulos C, Spizizen J** (1961). Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **81**(5):741–6.

57. **Chen I, Provvedi R, Dubnau D** (2006). A macromolecular complex formed by a pilin-like protein in competent *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **281**(31):21720–7.
58. **Dubnau D** (1999). DNA uptake in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **53**:217–44. doi:10.1146/annurev.micro.53.1.217.
59. **Dubnau D, Cirigliano C** (1972). Fate of transforming deoxyribonucleic acid after uptake by competent *Bacillus subtilis*: size and distribution of the integrated donor segments. *J Bacteriol* **111**(2):488–94. doi:10.1128/jb.111.2.488-494.1972.
60. **Dubnau D, Cirigliano C** (1972). Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*. IV. The endwise attachment and uptake of transforming DNA. *J Mol Biol* **64**(1):31–46. doi:10.1016/0022-2836(72)90319-1.
61. **Crabb WD, Streips UN, Doyle RJ** (1977). Selective enrichment for genetic markers in DNA released by competent cultures of *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* **155**(2):179–83. doi:10.1007/BF00393157.
62. **Sinha RP, Iyer VN** (1971). Competence for genetic transformation and the release of DNA from *Bacillus subtilis*. *Biochim Biophys Acta* **232**(1):61–71. doi:10.1016/0005-2787(71)90491-6.
63. **Stephenson M, Jarrett P** (1991). Transformation of *Bacillus subtilis* by electroporation. *Biotechnol Tech* **5**(1):9–12. doi:10.1007/BF00152746.
64. **Zahler SA** (1988). Temperate Bacteriophages of *Bacillus subtilis*. pp. 559–92. In Richard Calendar (ed), *The bacteriophages*, 1st ed.. Plenum Press, New York.
65. **Wood HE, Dawson MT, Devine KM, McConnell DJ** (1990). Characterization of PBSX, a defective prophage of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **172**(5):2667–74. doi:10.1128/jb.172.5.2667-2674.1990.
66. **Hemphill HE, Whiteley HR** (1975). Bacteriophages of *Bacillus subtilis*. *Bacteriol Rev* **39**(3):257–315.
67. **Takahashi I** (1963). Transducing Phages for *Bacillus subtilis*. *Microbiology (Reading)* **31**(2):211–7. doi:10.1099/00221287-31-2-211.
68. **Thorne CB** (1962). Transduction in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **83**(1):106–11. doi:10.1128/jb.83.1.106-111.1962.