

Einfluss verschiedener Virulenzfaktoren und
Lebensmittelkomponenten auf die Enteropathogenität von
Bacillus cereus

von Claudia Franziska Da Riol

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Einfluss verschiedener Virulenzfaktoren und
Lebensmittelkomponenten auf die Enteropathogenität von
Bacillus cereus

von Claudia Franziska Da Riol
aus Landshut

München 2017

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin Märtlbauer

Mitbetreuung durch: Dr. Nadja Jeßberger

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Frank Ebel

Tag der Promotion: 29. Juli 2017

Für meine Familie

und für Tom

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Allgemeines zu <i>B. cereus</i>	2
1.1.	Taxonomie.....	2
1.2.	Nachweisverfahren.....	3
2.	Eigenschaften von <i>B. cereus</i>	3
2.1.	Krankheitsbilder	4
2.2.	Bedeutung.....	5
2.3.	Sporen.....	6
2.4.	Virulenzfaktoren.....	8
2.4.1.	Hämolysin BL	8
2.4.2.	Nicht-hämolytisches Enterotoxin	9
2.4.3.	Zytotoxin K	9
2.4.4.	Weitere bekannte Virulenzfaktoren	10
2.5.	Mögliche weitere Pathogenitätsfaktoren	10
2.5.1.	Motilität	11
2.5.2.	Adhäsion.....	12
2.6.	Gastrointestinale Bedingungen und lebensmittelassoziierte Faktoren	12
III.	MATERIAL UND METHODEN	15
1.	Material	15
1.1.	Chemikalien	15
1.2.	Nährmedien	17
1.2.1.	Flüssige Nährmedien.....	17
1.2.2.	Feste Nährmedien.....	17
1.3.	Lösungen und Puffer	18
1.3.1.	Lösungen zur Sporenerstellung	18
1.3.2.	Lösungen für Enzymimmunoassays.....	20
1.3.3.	Sonstige Lösungen	20
1.4.	Immunreagenzien	21
1.4.1.	Monoklonale Antikörper	21
1.4.2.	Polyklonale Antikörper	21

1.5.	Zelllinie	21
1.6.	Bakterienstämme	21
1.7.	Verbrauchsmaterialien	24
1.8.	Geräte	24
1.9.	Sonstiges.....	25
2.	Methoden.....	26
2.1.	Kultivierung von <i>B. cereus</i> und Gewinnung von zellfreien Kulturüberständen	26
2.2.	Motilitätsassay.....	26
2.3.	Isolierung von <i>B. cereus</i> Sporen	26
2.4.	Zellkultur.....	27
2.4.1.	Kultivierung von eukaryotischen Zellen.....	27
2.4.2.	Adhäsionsassay	27
2.4.2.1.	Bestimmung der koloniebildenden Einheit (KBE)	27
2.4.2.2.	Adhäsion von <i>B. cereus</i> Sporen an CaCo-2-Zellen.....	28
2.4.2.3.	Adhäsion von vegetativen <i>B. cereus</i> an CaCo-2-Zellen	29
2.4.3.	Propidiumiodid-Test (PI)	29
2.4.4.	WST-1-Bioassay	30
2.5.	Überlebensfähigkeit von <i>B. cereus</i> Sporen unter simulierten Magenbedingungen	30
2.5.1.	Überleben von Sporen in reinem Magensaft.....	30
2.5.2.	Einfluss der Lebensmittelmatrix auf das Überleben von Sporen im Magenmilieu.....	31
2.6.	Enzymimmunoassays	32
2.6.1.	Sandwich-Enzymimmunoassay	32
2.6.2.	Indirekter Enzymimmunoassay.....	33
IV.	ERGEBNISSE	34
1.	Motilität von <i>B. cereus</i>	34
1.1.	<i>Swimming</i>	35
1.2.	<i>Swarming</i>	35
2.	Überlebensfähigkeit von <i>B. cereus</i> Sporen unter simulierten Magenbedingungen	42
2.1.	Überleben von Sporen in reinem Magensaft.....	42

2.2.	Einfluss der Lebensmittelmatrix auf das Überleben von Sporen im Magenmilieu.....	45
2.2.1.	Auftreten einer phänotypischen Besonderheit bei WSBC 10035	49
2.2.1.1.	Enzymimmunoassay.....	50
2.2.1.2.	WST-1-Bioassay	51
3.	Adhäsionsfähigkeit von <i>B. cereus</i> an CaCo-2-Zellen	52
3.1.	Adhäsion von <i>B. cereus</i> Sporen an CaCo-2-Zellen.....	52
3.2.	Adhäsion von vegetativen <i>B. cereus</i> an CaCo-2-Zellen	52
4.	Einfluss verschiedener Lebensmittel auf die toxische Aktivität von <i>B. cereus</i> Kulturüberständen	56
4.1.	WST-1-Bioassay mit Lebensmitteln.....	56
4.2.	Propidiumiodid-Test.....	59
4.3.	Auswirkung der Lebensmitteleinzelkomponenten auf die toxische Aktivität der Nhe-Mutante im WST-1-Bioassay	63
4.4.	Auswirkung der Lebensmitteleinzelkomponenten auf das Dreikomponententoxin Hbl.....	64
5.	Erweiterung des Stammsets um genetische Marker	66
6.	Bewertung des Stammsets durch Kombination aller Ergebnisse.....	68
V.	DISKUSSION	72
1.	Motilität von <i>B. cereus</i>	72
2.	Überlebensfähigkeit von <i>B. cereus</i> unter simulierten Magenbedingungen	74
2.1.	Phänotypische Besonderheit des Stammes WSBC 10035 während der simulierten Magenpassage	77
3.	Adhäsionsfähigkeit von <i>B. cereus</i> an CaCo-2-Zellen	79
4.	Einfluss verschiedener Lebensmittel auf die toxische Aktivität von <i>B. cereus</i> Kulturüberständen	82
5.	Risikoorientierte Bewertung des Stammsets	83
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	86
VII.	SUMMARY.....	87

VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	88
IX.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	106
X.	TABELLENVERZEICHNIS	108
XI.	ANHANG	109
XII.	DANKSAGUNG	124

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A. dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
B.	<i>Bacillus</i>
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
C.	<i>Clostridium</i>
CGY	<i>casein-glucose-yeast</i> , Casein-Glucose-Hefe
CytK	<i>Cytotoxin K</i> , Zytotoxin K
E.	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EIA	Enzymimmunoassay
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
Hbl	Hämolysin BL
HlyII	Hämolysin II
InhA	Immuninhibitor A
KBE	koloniebildende Einheiten
L.	<i>Listeria</i>
mAk	monoklonale Antikörper
MHD	Mindesthaltbarkeitsdatum
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MSM	<i>minimal sporulation medium</i>
N- S- Mn	Stickstoff-, Schwefel-, Manganquelle
Nhe	Nicht-hämolytisches Enterotoxin
NprA	neutrale Protease A
OD ₆₀₀	Optische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PI	Propidiumiodid
S.	<i>Staphylococcus</i>
SCV	<i>small colony variant</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
UHT	<i>ultra-high temperature</i> , Ultrahoherhitzung
ÜNK	Übernachtkultur
WST	<i>water-soluble tetrazolium salt</i> , wasserlösliches Tetrazoliumsalz

I. EINLEITUNG

Bacillus (B.) cereus ist ein ubiquitäres, Gram-positives, sporenformendes Bakterium, welches als Ursache für lebensmittelassoziierte Krankheitsbilder gilt. Man unterscheidet dabei zwischen dem emetischem Syndrom (Lebensmittelintoxikation) und der Diarrhö-Form (Lebensmittelinfektion).

Aufgrund der weiten Verbreitung des Bakteriums und seines Sporenbildungsvermögens ist ein Eintrag in die Lebensmittelkette sehr häufig (Kotiranta *et al.*, 2000). Zwischen 2007 und 2014 wurden 413 Krankheitsausbrüche an die *European Food Safety Authority* (EFSA) übermittelt, die im Zusammenhang mit *B. cereus* standen (EFSA, 2016a). Bakterielle Toxine waren 2015 nach Salmonellen die zweithäufigste Ursache lebensmittelassoziiierter Erkrankungen (EFSA, 2016b).

Zu einer Lebensmittelinfektion kommt es, wenn das Bakterium die Magenpassage überdauert und im Dünndarm Toxine bildet. Nach momentanem Wissensstand sind drei Entertoxine die Hauptauslöser für Durchfallerkrankungen (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Fast alle enteropathogenen Stämme tragen eines oder mehrere dieser Toxingene (Guinebretière *et al.*, 2002; Moravek *et al.*, 2006). Der Nachweis dieser Gene gilt aber nicht als aussagekräftig, da keine Korrelation zur Toxinproduktion besteht (Dietrich *et al.*, 2005; Minnaard *et al.*, 2007). Jedoch weiß man, dass zwischen Proteinsekretion und Zytotoxizität ein Zusammenhang besteht und dass sowohl Faktoren, die vom Darm sezerniert werden, als auch die Nährstoffverfügbarkeit einen Einfluss auf das Toxizitätspotential eines Stammes haben (Minnaard *et al.*, 2004; Ouhib-Jacobs *et al.*, 2009; Jessberger *et al.*, 2014).

Bis heute sind weder alle Virulenzfaktoren bekannt, die zu einer *B. cereus* bedingten Lebensmittelinfektion führen, noch ist deren Wirkungsweise im Wirt ausreichend verstanden. Deshalb wurden in dieser Arbeit 20 Stämme, deren Daten zu Toxinproduktion, Toxizität und Genomsequenz bereits vorlagen, hinsichtlich weiterer, putativer Pathogenitätsfaktoren untersucht. Ziel war es, Parameter zu identifizieren, die eine Unterscheidung zwischen potentiell enteropathogenen und apathogenen Stämmen ermöglichen.

Diese Arbeit wurde durch das IGF-Forschungsvorhaben 18677 N der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Allgemeines zu *B. cereus*

1.1. Taxonomie

B. cereus ist ein ubiquitäres, sporenbildendes, Gram-positives, fakultativ anaerobes, bewegliches, stäbchenförmiges Bakterium. Es ist namensgebend für die *B. cereus* Gruppe (*B. cereus sensu lato*), welche momentan neun Spezies umfasst: *B. cereus sensu stricto*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus*, *B. toyonensis* und die neue Spezies *B. wiedmannii* (Guinebretière *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2016).

Obwohl sie sich in ihren pathogenen Eigenschaften unterscheiden, weisen die verschiedenen Spezies eine 99%ige Übereinstimmung in ihrer 16S RNA-Sequenz auf (Kotiranta *et al.*, 2000). *B. cereus*, *B. anthracis* und *B. thuringiensis* beispielsweise unterscheiden sich hauptsächlich anhand von großen Plasmiden, die jedoch den größten Anteil der Virulenzfaktoren tragen (Patino-Navarrete *et al.*, 2016). Diese nahe Verwandtschaft macht die taxonomische Einteilung innerhalb dieser Gruppe komplex.

Durch die Erstellung eines phylogenetischen Stammbaumes mittels *multi-locus sequence typing* (MLST) wurde eine Einteilung in drei grundlegende Clades vorgenommen (Didelot *et al.*, 2009). Clade I beinhaltet *B. anthracis*, die Hälfte der *B. cereus* Stämme und einige *B. thuringiensis* Stämme. Die zweite Hälfte der *B. cereus* Stämme findet sich zusammen mit dem Großteil der *B. thuringiensis* Stämme in Clade II, während *B. mycoides* und *B. weihenstephanensis* Clade III zugeordnet sind. Die Arbeitsgruppe um Guinebretière *et al.* (2008) legte ein Augenmerk auf das Temperaturoptimum der verschiedenen Spezies und teilte die Gruppe durch genetische und phänotypische Analysen in sieben Clades ein. Basierend auf *whole genome sequence typing* wurden nun in einer neuen Studie neun Clades definiert (Kovac *et al.*, 2016). Diese Ergebnisse zeigen, dass das Toxizitätspotential eines Stammes eher in Zusammenhang mit der phylogenetischen Gruppe steht, als mit der Spezies an sich. Sie bestätigen damit Resultate älterer Studien (Guinebretière *et al.*, 2008; Guinebretière *et al.*, 2010) und regen an, die Nomenklatur und taxonomische Stellung der *B. cereus* Gruppe

neu zu diskutieren.

1.2. Nachweisverfahren

Zum Nachweis präsumtiver *B. cereus* werden momentan die beiden Standardmedien Polymyxin-Eigelb-Mannitol-Bromthymol-Blau Agar (PEMBA) und Mannitol-Eigelb-Polymyxin Agar (MYP) verwendet. Über diese selektiven Medien kann lediglich die Anzahl der Bakterien bestimmt werden (Ehling-Schulz *et al.*, 2013). Eine sichere Unterscheidung zwischen *B. cereus* und anderen Spezies der *B. cereus*-Gruppe ist dabei nicht immer möglich. Ebenso führt diese Untersuchungsmethode häufig zu falsch negativen Ergebnissen (Fricker *et al.*, 2007).

Für die Enterotoxine gibt es eine Vielzahl an Nachweismöglichkeiten. Zu den biologischen Ansätzen gehörten früher Tierversuche, wie z. B. der Darmschlingenligationstest (Spira *et al.*, 1972) oder die heute gängigeren *in vitro* Zytotoxizitätsassays (Dietrich *et al.*, 1999; Hardy *et al.*, 2001). Diese Tests haben den Vorteil, biologisch aktive Toxine sicher zu detektieren (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Abhängig von der Antikörperqualität sind die immunologischen Testsysteme sehr spezifisch und sensitiv (Ceuppens *et al.*, 2012a). Jedoch bedeutet der alleinige Nachweis einer Toxinkomponente nicht, dass es sich auch *in vivo* um einen toxischen Stamm handelt (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Zurzeit gibt es drei kommerziell erhältliche Testkits zum Nachweis verschiedener *B. cereus* Enterotoxine: BDE VIATM (3M-Tecra) für die Toxinkomponenten NheA und NheB, BCET-RPLA (Oxoid) für die Hbl-Komponente L2 und Duopath[®] (Merck) für NheB und Hbl L2 (Ceuppens *et al.*, 2012a).

2. Eigenschaften von *B. cereus*

B. cereus kann verschiedene, für den Menschen potentiell gefährliche Erkrankungen hervorrufen. Am häufigsten sind lebensmittelbedingte gastrointestinale Erkrankungen. Durch sein umfangreiches Vorkommen in Böden, Pflanzen und Insekten ist ein Eintrag in zahlreiche Lebensmittel kaum zu vermeiden (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Ein weiterer Faktor ist die Fähigkeit zur Sporenbildung. In dieser Dauerform kann das Bakterium lange Zeit überleben und ist unempfindlich gegenüber Hitze, Trockenheit, Strahlung und vielen Chemikalien (Setlow, 2014a). Zudem können Sporen und vegetative Zellen vor Umwelteinflüssen geschützt werden, wenn es zur Ausbildung eines Biofilms

kommt. V. a. in der Lebensmittelindustrie ist die Biofilmbildung in Leitungen und auf Gegenständen problematisch, da Desinfektionsmaßnahmen häufig nicht greifen (Wijman *et al.*, 2007; Majed *et al.*, 2016).

Eine potentielle Gefahr stellen auch probiotische Nahrungsergänzungsmittel mit *B. cereus* dar. Diese sind häufig falsch gekennzeichnet und beinhalten z. T. pathogene Stämme (Zhu *et al.*, 2016). In Deutschland sind keine probiotischen Produkte mit *B. cereus* zugelassen (BVL - Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2008). *B. cereus* spielt außerdem eine Rolle als Verderberreger. In Milch bewirkt das Bakterium Süßgerinnung mit einhergehender Bitterkeit (Andersson *et al.*, 1995), während es bei Backwaren zum sog. Fadenziehen kommt (Pepe *et al.*, 2003). Auf Grund der Produktveränderung kommt es allerdings i. d. R. nicht zum Verzehr und somit auch nicht zum Krankheitsfall.

2.1. Krankheitsbilder

B. cereus ist verantwortlich für zwei verschiedene Formen von Lebensmittelvergiftungen. Das Toxin Cereulid, ein zyklisches Dodecadepsipeptid, ist die Ursache für die emetische Form (Agata *et al.*, 1995). Das hitzestabile, peptidase- und säureunempfindliche Toxin liegt bei der Aufnahme präformiert im Lebensmittel vor und ruft eine Lebensmittelintoxikation hervor (Shinagawa, 1990; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Eine halbe bis sechs Stunden nach Aufnahme von 10^3 - 10^8 koloniebildenden Einheiten (KBE)/g Lebensmittel kommt es zu Übelkeit und Erbrechen. In der Regel klingen die Symptome nach ca. 24 h ab. Jedoch wurden in Einzelfällen auch schwerwiegendere Symptome sowie Todesfälle beschrieben (Ehling-Schulz *et al.*, 2004). Die leicht mit einer *Staphylococcus (S.) aureus* Intoxikation zu verwechselnden Krankheitsausbrüche sind in der Regel mit stärkehaltigen Lebensmitteln wie Reis und Pasta assoziiert (Shinagawa, 1990).

Wässrige Durchfälle und abdominale Schmerzen sind die Leitsymptome der durch enteropathogene Stämme hervorgerufenen Diarrhö-Form. Erste Symptome treten nach ca. 8-16 h auf. Die Krankheit ist nach 24 h fast immer selbstlimitierend. Auch hier beträgt die infektiöse Dosis 10^5 - 10^8 KBE/g Lebensmittel, aber ebenso wurden niedrigere und höhere Zahlen beschrieben (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Eine Vielzahl an Lebensmitteln wird mit dieser

Form in Verbindung gebracht. Gehäuft finden sich jedoch Milch und Milchprodukte, Puddings und Soßen, Gemüse sowie fleischhaltige Produkte (Granum *et al.*, 1997). Die Diarrhö-Form wird durch den Verzehr eines mit *B. cereus* Sporen und/oder vegetativen Zellen kontaminierten Lebensmittels ausgelöst und gilt als Lebensmittelinfektion. Eine Infektion mit *Clostridium (C.) perfringens* gehört dabei zu den möglichen Differentialdiagnosen (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Die aufgenommenen Sporen gelangen nach überstandener Magenpassage in den Dünndarm. Dort kommt es zur Auskeimung und Vermehrung der Bakterien und schließlich zur Produktion der krankheitsauslösenden Toxine. Vegetativen Zellen wird dabei eine untergeordnete Rolle zugeschrieben, da sie normalerweise durch die Bedingungen im Magen abgetötet werden (Clavel *et al.*, 2004; Wijnands *et al.*, 2006). Zurzeit gelten drei verschiedene Enterotoxine als Hauptauslöser der Diarrhö-Form (siehe 2.4).

Neben den beiden beschriebenen Krankheitsbildern kann *B. cereus* auch lokale und systemische extraintestinale Infektionen verursachen. Dazu gehören beispielsweise Wundinfektionen, Endophthalmitiden, Pneumonien, Septikämie und Infektionen des zentralen Nervensystems. Häufig sind dabei immunsupprimierte Personengruppen betroffen (Bottone, 2010).

2.2. Bedeutung

B. cereus wird in diversen Lebensmitteln häufig nachgewiesen. Te Giffel *et al.* (1997) fanden in 40 % ihrer untersuchten Milchproben *B. cereus*. In einer koreanischen Studie konnten aus 687 Proben (Säuglingsnahrung und *ready-to-eat*-Produkte) 347 Stämme isoliert werden (Hwang *et al.*, 2015). Dem gegenüber steht eine verhältnismäßig geringe Zahl von bestätigten Krankheitsausbrüchen. Vermutlich gibt es hier aber auf Grund der milden Symptomatik eine hohe Dunkelziffer (Ceuppens *et al.*, 2011). In Deutschland zählt *B. cereus* nicht zu den meldepflichtigen Krankheitserregern. Jedoch werden durch das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) Daten zu Lebensmitteln, die an Krankheitsausbrüchen beteiligt waren, erfasst. Im Jahr 2014 wurden insgesamt 48 Ausbrüche gemeldet, zwei davon in Verbindung mit *B. cereus* (BfR, 2015). Die Statistik der EFSA zu lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen von 2015 fasst unter dem Begriff „bakterielle Toxine“ durch *Bacillus*, *Staphylococcus* und *Clostridium* produzierte Toxine zusammen. Diese waren mit 19,5 % an lebensmittelassoziierten Ausbrüchen beteiligt (EFSA, 2016b). Dass *B. cereus* Vergiftungen an Bedeutung

zunehmen, zeigt eine neue Studie aus Frankreich, bei der das Bakterium als zweithäufigste Ursache lebensmittelbedingter Krankheitsausbrüche ermittelt wurde (Glasset *et al.*, 2016).

2.3. Sporen

Auf Grund ihrer ubiquitären Verbreitung und Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen werden häufig *B. cereus* Sporen in kontaminierten Lebensmitteln gefunden (Carlin, 2011). Die geänderten Ansprüche der Verbraucher an prozessierte Lebensmittel (z. B. geringere Hitzeeinwirkung) bergen zudem die Gefahr, dass Sporen in der Herstellung überleben können (Abee *et al.*, 2011).

Die Sporulation der Bakterien findet gewöhnlich im Boden statt. Mehrere Untersuchungen konnten Sporulation verschiedener Bakterien in der Einstreu von Kuhställen, in Milchpulver und im Intestinaltrakt von Mäusen nachweisen (Tam *et al.*, 2006; Magnusson *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2007). Neben Nährstoffgehalt und Zelldichte sind dabei z. B. Temperatur, pH-Wert und Wassergehalt entscheidend Faktoren. Unter Laborbedingungen wurde der Einfluss dieser Faktoren in mehreren Studien getestet, die in der Übersicht von Carlin (2011) zusammengefasst sind. Abhängig von den Bedingungen, die bei der Sporulation herrschen, werden auch Überleben und Auskeimung der Sporen beeinflusst (Planchon *et al.*, 2011).

Eine *B. cereus* Spore besteht aus folgenden Schichten (Abb. 1): Sporenkern, innere Membran, Cortex, äußere Membran und Exosporium (Mantelschicht). Das Exosporium spielt eine Rolle bei der Resistenz gegenüber äußeren Einflüssen, wie z. B. Chemikalien. Darunter folgend befindet sich die äußere Membran, die evtl. eine Permeabilitätsbarriere darstellt, sowie der Cortex, der bei der Auskeimung aufgelöst wird und die Keimzellwand freilegt. Die innere Membran beinhaltet die zur Auskeimung benötigten, wichtigsten Proteine. Die innerste Schicht, der Sporenkern, beinhaltet DNA, Ribosomen und Enzyme (Setlow, 2014b).

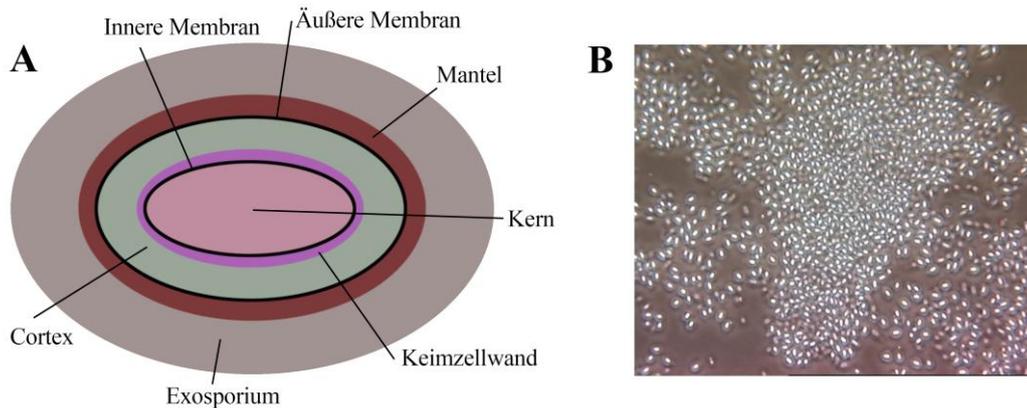


Abbildung 1: A. Schematische Darstellung einer *Bacillus* Spore, modifiziert nach Setlow (2014a). B. Mikroskopische Aufnahme von Sporen des Stammes INRA A3 aus dieser Arbeit.

Unter natürlichen Bedingungen keimen Sporen in Antwort auf bestimmte Stoffe wie Aminosäuren, Zucker oder Purine aus. Auch Hitzeeinwirkung kann den Vorgang hervorrufen. Der Auskeimungsprozess startet dann innerhalb weniger Sekunden und verläuft in aufeinanderfolgenden Stufen (Setlow, 2003). Warum und wie dieser Vorgang genau abläuft ist immer noch nicht vollständig geklärt (Setlow, 2003; Setlow, 2014b). Eine Besonderheit stellen sog. *superdormant*-Sporen dar. Dies ist ein kleiner Anteil von Sporen, der in einem „Über-Ruhezustand“ vorliegt und nur extrem langsam auskeimt. Sie stellen somit ein großes Problem in Lebensmittelbetrieben dar, da sie dann aktiv werden, wenn gängige Mechanismen zur Sporeninaktivierung abgeschlossen sind (Ghosh *et al.*, 2010). Dem Auskeimungsprozess folgt der Auswuchs. Dieser Vorgang überführt die ausgekeimten Sporen in eine wachsende Zelle (Setlow, 2003). Da dies in vielen Schritten stattfindet und dabei jedoch keine morphologischen Veränderungen sichtbar werden, ist eine Unterscheidung nur schwer möglich (Hornstra *et al.*, 2009).

In einigen Lebensmittelbetrieben wird der Auskeimungsprozess bewusst gefördert, da Sporen so anfälliger für Umwelteinflüsse werden und deshalb Abtötungsstrategien effektiver wirken (Abee *et al.*, 2011). Zur Vermeidung mikrobieller Kontaminanten in Lebensmitteln werden verschiedene Maßnahmen ergriffen. Diverse Erhitzungsverfahren sind dabei die gebräuchlichste Methode. Abhängig vom Lebensmittel kommen auch Säuren, Salze und oxidierende Stoffe

zum Einsatz (Wells-Bennik *et al.*, 2016). Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen von Oberflächen und Gegenständen sind oftmals nicht effizient, v. a. wenn sich die Sporen in einem Biofilm entwickeln (Abee *et al.*, 2011).

2.4. Virulenzfaktoren

Proteomstudien von *B. cereus* haben bislang 377 verschiedene Exoproteine identifiziert. Dabei fanden sich sowohl Proteine, die im Bezug zur Toxizität, Motilität und Adhäsion stehen, als auch Proteine für den enzymatischen Abbau (Duport *et al.*, 2016). Einige dieser sekretierten Proteine gelten als potentielle Virulenzfaktoren. Als gesicherte Auslöser der Diarrhö-Form werden momentan drei Zytotoxine angesehen. Zu diesen hitzelabilen Enterotoxinen gehören neben dem Einzelprotein Zytotoxin K (CytK) die aus je drei Komponenten bestehenden Enterotoxine Hämolyysin BL (Hbl) und das nicht-hämolytische Entertoxin (Nhe). Die *nhe*-Gene kommen in nahezu allen enteropathogenen Stämmen vor, während weniger als 50 % aller Stämme Gene für Hbl besitzen (Moravek *et al.*, 2006). Selten findet man Stämme, die ausschließlich Gene für CytK haben. Sie gehören zur Spezies *B. cytotoxicus* (Guinebretière *et al.*, 2013). Guinebretière *et al.* (2002) fanden außerdem heraus, dass die Herkunft der Stämme (Krankheitsausbruch oder Lebensmittelisolat) sich unterschiedlich auf die Genexpression auswirkt. Die Genexpression der Haupttoxine wird durch den pleiotropen Transkriptionsregulator Phospholipase C Regulator (PlcR) aktiviert (Agaisse *et al.*, 1999).

2.4.1. Hämolyysin BL

Hbl besteht aus den drei Proteinen B, L1 und L2 und entfaltet seine gesamte toxische Wirkung, wenn alle drei Komponenten zusammenspielen (Beecher *et al.*, 1995). Auf Schafblutagar bildet es charakteristische, ringförmige Hämolysezonen (Beecher *et al.*, 1997). Neben der hämolytischen Eigenschaft ist das Toxin zytotoxisch, dermonekrotisch und führt zur Steigerung der vaskulären Permeabilität sowie zu Flüssigkeitsansammlung im Darmschlingenligationstest (Beecher *et al.*, 1995).

Die Zelllyse findet auf Grund der Bildung von Poren in der Zellmembran statt. Hierfür müssen die Toxinkomponenten in einer festen Reihenfolge binden. Wenn Hbl B an die Zellmembran gebunden hat, folgt die Bindung von L1 an B, an

welches sich zuletzt L2 anlagert (Sastalla *et al.*, 2013). Im Referenzstamm F837/76, isoliert aus einer postoperativen Wunde, wurde das Toxin zum ersten Mal beschrieben (Turnbull *et al.*, 1979).

2.4.2. Nicht-hämolytisches Enterotoxin

Nhe wurde aus dem heutigen Referenzstamm NVH 0075-95 isoliert, der verantwortlich für einen großen, lebensmittelassozierten Krankheitsausbruch in Norwegen war (Lund *et al.*, 1996). Wie Hbl ist auch Nhe ein Drei-Komponenten-Toxin-Komplex. Die Komponenten NheA, NheB und NheC bilden zusammen eine Pore in der Lipiddoppelschicht, in Folge dessen es zur osmotischen Zelllyse kommt (Fagerlund *et al.*, 2008). Lindbäck *et al.* (2004) fanden zunächst heraus, dass eine maximale zytotoxische Aktivität vorliegt, wenn das Verhältnis von NheA : NheB : NheC 10 : 10 : 1 beträgt. Weitere Untersuchungen zeigten, dass NheB und NheC beide in der Lage sind an die Zellmembran zu binden und daraufhin NheA angelagert wird (Lindbäck *et al.*, 2010). Momentan geht man davon aus, dass NheB und NheC vor der Bindung Komplexe formen. Nach einer Konformationsänderung bindet dann erneut freies NheB an den bestehenden Komplex. Am Schluss lagert sich NheA an die ringförmige Struktur an und formt die transmembranäre Pore (Heilkenbrinker *et al.*, 2013). Zusätzlich zu seiner zytolytischen Eigenschaft bewirkt das Toxin, in Widerspruch zu seinem Namen, eine Hämolyse der Erythrozyten mehrerer Säugetierspezies (Fagerlund *et al.*, 2008).

2.4.3. Zytotoxin K

CytK ist ein Einzelprotein und gehört, wie auch das β -Toxin von *C. perfringens* oder das α -Hämolysin von *S. aureus*, zur Familie der *β -barrel pore-forming toxins* (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Auch CytK bildet transmembranäre Poren in Lipiddoppelschichten aus (Hardy *et al.*, 2001). Isoliert wurde das Toxin aus dem Stamm NVH 391-98, welcher in Frankreich zu einem schweren Krankheitsausbruch mit drei Todesfällen führte (Lund *et al.*, 2000). Nachgewiesen werden konnten dermonekrotische, zytotoxische und hämolytische Eigenschaften (Lund *et al.*, 2000). Eine Analyse von DNA-Sequenzen ergab, dass es neben der ursprünglichen Form einen weiteren Typ, CytK-2, gibt. Dieser weist, im Gegensatz zu CytK-1, deutlich reduzierte Titer in Zytotoxizitätsassays auf. Grund hierfür ist eine verringerte Leitfähigkeit der Poren (Fagerlund *et al.*, 2004).

Bei einer Analyse von 390 Stämmen konnte bei nahezu der Hälfte das *cytK-2*-Gen detektiert werden, wohingegen kein einziger Stamm *cytK-1* aufwies (Castiaux *et al.*, 2015). Auch in anderen Studien war häufiger *cytK-2* als *cytK-1* vertreten (Guinebretière *et al.*, 2006; Fagerlund *et al.*, 2004). Nach Meinung von Castiaux *et al.* (2015) sollte das Zusammenwirken von CytK mit anderen Virulenzfaktoren genauer untersucht werden.

2.4.4. Weitere bekannte Virulenzfaktoren

Neben den bekannten Enterotoxinen gibt es noch weitere Proteine, die zur Pathogenität eines Stammes beitragen können. Clair *et al.* (2010) konnten durch Sekretomanalysen verschiedene PlcR-unabhängige Proteine detektieren, die vermutlich zur Virulenz von *B. cereus* beitragen. Dazu zählen Enterotoxin FM (EntFM), Enterotoxin A (EntA), EntB und EntC, sowie verschiedene Enzyme, Adhäsine und Flagelline. EntFM wurde kurze Zeit später als eine Zellwandpeptidase identifiziert, die an einer Vielzahl von Prozessen, wie z. B. Motilität, Adhäsion und Biofilmbildung beteiligt ist (Tran *et al.*, 2010). Das ebenfalls PlcR-unabhängige Toxin Hämolyisin II (HlyII) zählt wie CytK zu den *β-barrel pore-forming toxins*. Es hat zytotoxische und hämolytische Eigenschaften (Andreeva *et al.*, 2007) und löst bei Makrophagen die Apoptose aus (Tran *et al.*, 2011). Die Metalloproteasen InhA1 (Immuninhibitor A) und NprA (neutrale Protease A) sind in der Lage, verschiedene Membrankomponenten zu spalten (Chung *et al.*, 2006). Zudem können InhA1, InhA2 und InhA3 dem Immunsystem des Wirtes entgegenwirken (Guillemet *et al.*, 2010). Eine Untersuchung zur Häufigkeit und Genexpression der Metalloproteasen InhA1 und NprA sowie Hly II ergab, dass *hlyII* nur in pathogenen Stämmen nachweisbar war und dass auch die Expression von *inhaA1* und *nprA* in pathogenen Isolaten erhöht war (Cadot *et al.*, 2010). Die Sphingomyelinase (SMase) ist ein weiterer Virulenzfaktor. Sie verstärkt den zytotoxischen Effekt von Nhe auf Colonepithelzellen und beeinflusst zudem die Mortalitätsrate im Insektenmodell (Doll *et al.*, 2013). Erst kürzlich wurde die von *B. cereus* sekretierte Kollagenase ColA in die Gruppe der echten Kollagenasen aufgenommen und eine Beteiligung an nicht-gastrointestinalen Infektionen angenommen (Abfalter *et al.*, 2016).

2.5. Mögliche weitere Pathogenitätsfaktoren

Andere, wichtige pathogene Erreger, wie beispielsweise *S. aureus* oder *Listeria*

(*L. monocytogenes*) besitzen extrazelluläre, zytoplasmatische Proteine, die zwei oder mehr Funktionen besitzen und die als *moonlighting* Proteine bezeichnet werden. Diese sitzen an der Zelloberfläche und tragen zur Kolonisation, Adhäsion und Virulenz bei (Henderson *et al.*, 2011). Auch *B. cereus* kann viele dieser Exoproteine produzieren (Clair *et al.*, 2010). Daher stellt sich die Frage, ob die Fähigkeit zur Adhäsion oder Motilität, die durch diverse dieser Proteine bewerkstelligt wird, nicht selbst als potentieller Virulenzfaktor angesehen werden kann.

2.5.1. Motilität

Die Fähigkeit zur gerichteten Fortbewegung stellt für viele Bakterien bei der Besiedelung ihres Wirts einen Vorteil dar. Die häufigsten und am besten untersuchten Formen von Motilität sind *swimming* und *swarming*. Hierfür bildet das Bakterium spezielle, rotierende Organellen, die sog. Flagellen aus (Josenhans *et al.*, 2002). Die Flagelle ist komplex aufgebaut und besteht im Wesentlichen aus Körper, Haken und Filament. Der basale Körper ist in die Zellmembran verankert und gleichzeitig Sekretionsapparat und Motor. Der Haken verbindet den Körper mit dem extrazellulären Filament, welches propellerartig die Bewegung in Gang setzt (Mukherjee *et al.*, 2014). Bewegen sich Bakterien individuell in einer Flüssigkeit, so spricht man von *swimming*. *Swarming* hingegen bezeichnet die Fortbewegung einer gesamten Bakterienpopulation auf einer feuchten Oberfläche. Dabei verändern sich die kurzen, vegetativen Schwimmszellen zu Schwarmzellen. Diese sind länger, besitzen eine größere Anzahl an Flagellen und sind nicht mehr teilungsfähig (Senesi *et al.*, 2010). Auch die Pathogenität kann von der Motilität beeinflusst werden. So weiß man, dass Flagellengene und Virulenzfaktoren z. T. gemeinsam reguliert werden (Ottemann *et al.*, 1997). Ghelardi *et al.* (2007) konnten feststellen, dass *swarming* von *B. cereus* mit einer erhöhten Hbl-Sekretion einhergeht und dass Stämme ohne Flagellen das intrazellulär produzierte Hbl nicht sekretieren können. Außerdem waren die aus klinischen Fällen isolierten Stämme häufiger in der Lage sich fortzubewegen als die Lebensmittelisolate. Daher postulierten die Autoren eine höhere Virulenz für *swarming*-kompetente Zellen. Eine zentrale Rolle in der Regulation von Flagellen spielt FlhF, eine Signalerkennungspartikel-ähnliche GTPase. Gesichert ist, dass FlhF die Anzahl und Anordnung der Flagellen reguliert (Salvetti *et al.*, 2007). Durch proteomische Analysen einer *flhF*-Deletionsmutante konnte nun neben der

Beteiligung am *swarming* auch der Einfluss auf Proteinsekretion und Pathogenität festgestellt werden. Ein Fehlen von FlhF führte bei vielen Proteinen (z. B. Hbl und CytK) zu einer verringerten Sekretion. Im *in vivo* Versuch zeigte sich dies an einer reduzierten Pathogenität (Mazzantini *et al.*, 2016).

2.5.2. Adhäsion

In verschiedenen Studien konnte bislang nachgewiesen werden, dass sowohl *B. cereus* Sporen als auch vegetative Zellen an epitheliale Zellen adhären können (Andersson *et al.*, 1998; Minnaard *et al.*, 2004; Ramarao *et al.*, 2006). Über die Mechanismen oder dafür verantwortlichen Faktoren weiß man bisher nur wenig. Ramarao *et al.* (2006) gehen davon aus, dass adhärenzte Bakterien den Reinigungsmechanismen des Darmes entgehen. Bei ihren Untersuchungen fanden sie heraus, dass Adhäsion stammspezifisch ist und konnten zudem eine Beteiligung des Flagellengens *flhA* nachweisen. Minnaard *et al.* (2004) konnten zeigen, dass eine Verbindung der Bakterien mit Epithelzellen zur Zerstörung der F-Aktinfilamente im Zytoskelett führt. Sie nahmen an, dass durch den Mechanismus der Adhäsion die Virulenz auf verschiedene Weisen verstärkt werden kann, z. B. indem dadurch lokal hohe Toxinkonzentrationen erreicht werden können oder Signalübermittlungen stattfinden. Die Beteiligung an der Signaltransduktion konnte einige Jahre später verifiziert werden. So wird nach der Interaktion zwischen *B. cereus* und epithelialen Zellen eine Phospholipase C abhängige Signalkaskade aktiviert, welche zu signifikanten Veränderungen im Zytoskelett führt. Damit könnte eine Invasion ermöglicht werden (Minnaard *et al.*, 2013).

2.6. Gastrointestinale Bedingungen und lebensmittelassoziierte Faktoren

Die Lebensmittelinfektion wird durch Toxine ausgelöst, die von *B. cereus* im Dünndarm gebildet werden. Auf Grund dieser gegebenen Voraussetzung haben sich zahlreiche Studien mit den verschiedenen Faktoren, die einen Einfluss auf das Überleben von *B. cereus* im Wirt haben könnten, befasst.

Clavel *et al.* (2004) untersuchten das Überleben von Sporen und vegetativen Zellen in einer an die Magenbedingungen angepassten Elektrolytlösung in Verbindung mit Lebensmitteln. Sporen erwiesen sich dabei als säurestabil, während die vegetativen Zellen i. d. R. abgetötet wurden, jedoch in Abhängigkeit

sowohl vom pH-Wert als auch vom mitaufgenommenen Lebensmittel. So widerstanden die Bakterien den sauren Bedingungen am besten unter Zugabe von Milch. Ein pH-Wert über fünf führte sogar zum Wachstum der vegetativen Zellen. Ähnliche Ergebnisse zur Sporenresistenz wurden von Wijnands *et al.* (2006) erzielt. In einem weiteren Versuch dieser Arbeitsgruppe wurde die Inaktivierung vegetativer Zellen unter simulierten Magenbedingungen bestimmt (Wijnands *et al.*, 2009). Sie kamen dabei zum Schluss, dass abhängig von Wachstumsphase, Stamm und Alter des Konsumenten bis zu 26 % der aufgenommenen Zellen die Magenpassage überleben können.

Eine präzise *in vitro* Simulation der Magen-Darm-Passage in fünf dynamischen Phasen wurde von Ceuppens *et al.* (2012b) durchgeführt. Auch hier konnten die Sporen alle Phasen überleben und es kam sogar zur Auskeimung. Darauf folgendes Bakterienwachstum konnte durch den Zusatz natürlicher Begleitflora verhindert werden, was bereits eine frühere Studie ergab (Ceuppens *et al.*, 2012d). Fehlten andere intestinale Bakterien, so wurden bis zu 10^7 KBE erreicht. Allerdings konnte nie die Produktion von Enterotoxinen nachgewiesen werden. Daher kamen die Autoren zum Schluss, dass eine Beteiligung epithelialer Faktoren notwendig ist, um eine Diarrhösymptomatik zu erhalten. Eine Beteiligung des Epithels an der Sporenauskeimung konnte bereits durch Wijnands *et al.* (2007) nachgewiesen werden. Sporen die zwei Stunden mit CaCo-2-Zellen inkubiert wurden, zeigten deutlich gesteigerte Auskeimungsraten im Gegensatz zur Kontrollgruppe.

Auch einzelne Nährstoffgruppen und andere lebensmittelassoziierte Faktoren könnten einen Einfluss auf die Bestimmung von *B. cereus* im Gastrointestinaltrakt haben. So wurde beispielsweise unter den Kohlehydraten Fructose als wichtiger Metabolit unter anaeroben Wachstumsbedingungen identifiziert, der auch Auswirkungen auf die Enterotoxinproduktion zeigte. Während die Produktion von Hbl und Nhe unter Zusatz von Glucose nur sehr niedrig war, konnte z. B. mit Fructose die Produktion von Hbl um das 2,5fache verbessert werden. Jedoch ist bei dieser Untersuchung auch die Wirkung von Aminosäuren zu berücksichtigen, die im Wachstumsmedium enthalten waren (Ouhib-Jacobs *et al.*, 2009). Bei der Untersuchung von im Medium bzw. in Lebensmitteln enthaltenen Fetten auf das anaerobe Wachstum von *B. cereus* bei 15 °C Umgebungstemperatur wurde festgestellt, dass die ungesättigten Fettsäuren in Spinat ausreichen, um ein

verbessertes Wachstum zu erzielen (de Sarrau *et al.*, 2013). Durch die enthaltenen Fette können die Bakterien ihre Membranfluidität an die kalten Temperaturen anpassen und dadurch eine maximale Zelldichte wie unter optimalen Bedingungen erreichen.

Überdies wurden auch komplexe Lebensmittel in Testsysteme integriert. Medrano *et al.* (2009) konnten nachweisen, dass Kefir den zytopathischen Effekt von *B. cereus* auf CaCo-2-Zellen antagonisiert, obwohl die Adhäsion dadurch nicht beeinflusst wird. Eine andere Studie untersuchte antimikrobielle Einflüsse von Blumenkohl, Brokkoli und Sojabohnennebenprodukten und deren phytochemischer Inhaltsstoffe. Das Wachstum verschiedener Gram-negativer und -positiver Bakterien, darunter auch *B. cereus*, wurde unter Zusatz von 5 % Gemüse beurteilt. Bis auf *L. monocytogenes* konnte bei allen getesteten Bakterien eine Reduktion der Bakterienpopulation erreicht werden (Sanz-Puig *et al.*, 2015).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Chemikalien

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) (Sigma-Aldrich, T2885)

Aceton (Sigma-Aldrich, 32201)

Ammoniumsulfat ((NH₄)₂SO₄) (Sigma-Aldrich, 31119)

α-Casein (Sigma-Aldrich, C6780)

α-Lactalbumin (Sigma-Aldrich, L5385)

β-Casein (Sigma-Aldrich, C6905)

β-Lactoglobulin (Sigma-Aldrich, L3908)

Calciumchlorid (CaCl₂) (Merck, 2387)

Calciumnitrat Tetrahydrat (Ca(NO₃)₂ × 4 H₂O) (Roth, X886.1)

Casein-Natriumsalz aus Kuhmilch (Sigma-Aldrich, C8654)

Caseinhydrolysat (Oxoid, LP0041)

Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, 11644807001)

Citronensäure-Monohydrat (Sigma-Aldrich, 33114)

Cobalt(II)-chlorid Hexahydrat (CoCl₂ × 6 H₂O) (Roth, 7095.1)

D-(+)-Glucose-Monohydrat (Sigma-Aldrich, 16301)

D-(+)-Maltose Monohydrat (Roth, 8951.1)

Dikaliumhydrogenphosphat (K₂HPO₄) (Sigma-Aldrich, P3786)

Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) (Sigma-Aldrich, 71640)

Eisensulfat Heptahydrat (FeSO₄) (Sigma-Aldrich, 215422)

Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (Sigma-Aldrich, E1644)

Fetales Kälberserum (FCS) (Biochrom AG, S 0115)

Hefeextrakt (Oxoid, LP0021)

Kaliumchlorid (KCl) (Roth, 6781.1)

Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) (Sigma-Aldrich, 60220)

Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat (CuCl_2) (Roth, 2623.1)

κ -Casein (Sigma-Aldrich, C0406)

Lab-Lemco-Pulver (Oxoid, LP 0029)

Lactoferrin (Sigma-Aldrich, L9507)

Magnesiumchlorid Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$) (Roth, A537.1)

Magnesiumsulfat Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, 63138)

Mangansulfat Monohydrat ($\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, 221287)

Methanol (Sigma-Aldrich, 34860)

Natriumcarbonat (Na_2CO_3) (Sigma-Aldrich, 31432)

Natriumchlorid (NaCl) (Sigma-Aldrich, 31434)

Natriumcitrat-Dihydrat (Merck, 1.06448.0500)

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) (Riedel-de Haën, 31437)

Natriummolybdat Dihydrat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) (Roth, 0274.1)

PBS Dulbecco (*phosphate buffered saline*) (Biochrom AG, L 1825)

Pepsin aus Schweinemagenmukosa (Sigma-Aldrich, P6887)

Pepton (Oxoid, LP 0037)

Propidiumiodid (Sigma-Aldrich, 81845)

RPMI 1640 Medium (Biochrom AG, FG 1215)

Salzsäure (HCl) 5 mol/l (Merck, 1.09911.0001)

Schwefelsäure (H_2SO_4) (Sigma-Aldrich, 30743)

Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich, T3924)

Trypanblau (Sigma-Aldrich, T8154)

Tween 20 (Sigma-Aldrich, P1379)

Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30 % (Sigma-Aldrich, 31642)

Zinkchlorid (ZnCl₂) (Sigma-Aldrich, 96468)

1.2. Nährmedien

1.2.1. Flüssige Nährmedien

Casein-Glucose-Hefeextrakt-Vollmedium (CGY) zur Anzucht von *B. cereus*

Nach (Beecher *et al.*, 1994)

20 g Caseinhydrolysat

6 g Hefeextrakt

2 g Ammoniumsulfat

14 g Dikaliumhydrogenphosphat

6 g Kaliumdihydrogenphosphat

1 g Natriumcitrat

2 g Magnesiumsulfat

Glucoselösung: 20 % Glucosemonohydrat in destilliertem Wasser (A. dest.)
gelöst und sterilfiltriert.

Die abgewogenen Reagenzien wurden mit A. dest. auf 950 ml aufgefüllt und 20 min bei 121 °C autoklaviert. Vor Gebrauch wurden 50 ml einer sterilen 20%igen Glucoselösung zugegeben, um eine Endkonzentration von 1 % zu erhalten.

Flüssigmedium für die Zellkultur

RPMI 1640 Medium wurde mit 10 % FCS supplementiert.

1.2.2. Feste Nährmedien

Columbia-Agar mit Schafblut (Oxoid, PB5039A)

CGY-Agar: zusätzlich zu oben aufgeführten Chemikalien wurden 15 g/l
Agar zugeben

CGY-Weichagar: zugefügt wurde Agar in einer Endkonzentration von 0,25 % bzw. 0,7 %

1.3. Lösungen und Puffer

1.3.1. Lösungen zur Sporenerstellung

Medium zur Sporenisolation (MSM - minimal sporulation medium)

5 ml Spurenelemente (Tab. 1)

5 ml Stickstoff-Schwefel-Mangan-Gemisch (N-, S-, Mn) (Tab. 2)

8 g Nährbrühe (Tab. 4)

Das Gesamtvolumen wurde mit A. dest. auf 1 l aufgefüllt und der pH-Wert auf 7,6 eingestellt. Nach 20-minütigem Autoklavieren bei 121 °C wurde zur abgekühlten Lösung 1 ml Eisensulfat und 10 ml Maltose zugesetzt (Tab. 3).

Tabelle 1: Spurenelemente

	<i>g/mol</i>	<i>finale Konzentration in 1 l MSM</i>		<i>200 x Stock</i>	
		<i>mg/l</i>	<i>μM</i>	<i>g/l</i>	<i>g/50 ml</i>
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	203,3	203,3	1000	40,66	2,03
Ca(NO ₃) ₂ × 4 H ₂ O	236,15	236,15	1000	47,23	2,36
ZnCl ₂	136,3	1,7	12,5	0,34	0,017
CuCl ₂	170,48	0,43	2,5	0,086	0,0043
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	237,93	0,59	2,5	0,118	0,0059
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	241,95	0,6	2,5	0,12	0,006

Jede Lösung wurde einzeln in 50 ml A. dest. hergestellt und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 2: N-, S-, Mn-Quelle

	<i>g/mol</i>	<i>finale Konzentration in 1 l MSM</i>		<i>200 x Stock</i>	
		<i>mg/l</i>	<i>μM</i>	<i>g/l</i>	<i>g/50 ml</i>
(NH ₄) ₂ SO ₄	132,14	660	5	132	6,6
MnSO ₄ × H ₂ O	169,02	11	0,066	2,2	0,11

Eine Lösung aus beiden Chemikalien wurde in 50 ml A. dest. hergestellt und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

Tabelle 3: sonstige Lösungen

		<i>finale Konzentration in 1 l MSM</i>	
	<i>g/mol</i>	<i>M</i>	<i>g/50 ml</i>
FeSO ₄	278,01	0,001	0,0139
Maltose Monohydrat	360,32	1	18,01

Jede Lösung wurde einzeln in 50 ml A. dest. hergestellt, sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

Nährbrühe: 8 g Pulver wurden nach Herstellerangaben (Nutrient Broth, Oxoid, CM0001) selbst hergestellt.

Tabelle 4: Nährbrühe

Lab-Lemco	0,62 g
Hefe	1,23 g
Pepton	3,08 g
Natriumchlorid	3,08 g

Sporenwaschpuffer

Tabelle 5: Sporenwaschpuffer

	<i>g/mol</i>	<i>M</i>	<i>g/100 ml</i>
KH ₂ PO ₄	136,09	1	13,6
K ₂ HPO ₄	174,18	1	17,4

Die Stocklösungen wurden einzeln in A. dest. hergestellt und bei 4 °C gelagert. Vor Gebrauch wurden 2 ml KH₂PO₄ und 8 ml K₂HPO₄ (Tab. 5) mit A. dest. auf 1 l aufgefüllt und 20 min bei 121 °C autoklaviert.

1.3.2. Lösungen für Enzymimmunoassays

Waschlösung: 8,55 g NaCl, 2,5 ml Tween 20, mit A. dest. auf 10 l aufgefüllt

Casein-PBS-Lösung: 3 % bzw. 1 % Casein-Natriumsalz in PBS

Tween 20 in PBS: 0,5 % Tween 20 in PBS

Citratpuffer: 44,13 g Citronensäure-Monohydrat in 800 ml A. dest. gelöst und durch Zugabe von KOH (1 mol/l) auf pH 3,95 eingestellt; 336 µl H₂O₂ zugesetzt

Tetramethylbenzidin-Lösung: 252 mg TMB, 5 ml Aceton, 45 ml Methanol

Chromogen/Substratlösung: 5 % TMB-Lösung in Citratpuffer

Schwefelsäure: 1 mol/l

Bicarbonatpuffer: 1,59 g Na₂CO₃ und 2,93 g NaHCO₃ mit 1 l A. dest. aufgefüllt (pH 9,6)

1.3.3. Sonstige Lösungen

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS): 6,79 g NaCl, 1,47 g Na₂HPO₄ und 0,43 g KH₂PO₄ mit A. dest. auf 1 l aufgefüllt.

Magensaft:

Nach (Clavel *et al.*, 2004)

4,8 g NaCl

1,56 g NaHCO₃

2,2 g KCl

0,22 g CaCl₂

Die Reagenzien wurden mit 1 l A. dest. aufgefüllt und der pH-Wert mit 5 M HCl auf 2 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurde der pH-Wert erneut gemessen und ggf. mit steriler 5 M HCl nachgestellt. Kurz vor Gebrauch wurden 500 U/l Pepsin zugefügt.

1.4. Immunreagenzien

1.4.1. Monoklonale Antikörper

Die in Tabelle 6 aufgeführten monoklonalen Antikörper (mAk) wurden am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch hergestellt (Dietrich *et al.*, 1999; Dietrich *et al.*, 2005; Tausch, 2016).

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete mAk

Toxinkomplex	Komponente	mAk
Nhe	B	2B11 1E11-HRP
	A	1G4 2G11-HRP
Hbl	B	1D12 1B8-HRP
	L2	1A12 1H9-HRP
	L1	1E9

1.4.2. Polyklonale Antikörper

Kaninchen Anti-Maus Immunglobuline-HRP (Dako, P0161)

1.5. Zelllinie

Verwendet wurde die Zelllinie CaCo-2, isoliert aus humanem Colonadenokarzinom (DSMZ-Nr. ACC 169).

1.6. Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme stammten aus einem früheren Forschungsprojekt. Neben diesem 19 Stämme umfassenden Set wurde zusätzlich der probiotische *B. cereus* Stamm IP 5832 untersucht (Tab. 7). Das Stammset wurde bereits hinsichtlich Toxinproduktion, Toxizität und Genomsequenz eingehend charakterisiert. Es beinhaltet sowohl pathogene als auch apathogene Stämme, die entweder aus Lebensmitteln isoliert wurden oder von einem

Krankheitsausbruch stammen. Außerdem wurden nur mesophile *B. cereus sensu stricto* Stämme (Clade I und II) mit einbezogen. Ein weiteres Augenmerk bei der Auswahl des Stammsets lag auf dem Toxingprofil. Das emetische Toxincluster *ces* wurde ausgeschlossen. Die Kombination der Enterotoxingene führte zu einer Einteilung in verschiedene Toxintypen, welche wiederum starke und schwache Toxinproduzenten beinhalteten. Vertreten sind auch die beiden *B. cereus* Referenzstämme für Nhe/Hbl (F837/76) und Nhe (NVH 0075-95). Der probiotische Stamm IP 5832 wurde für diese Arbeit hinzugefügt und die Charakterisierung so weit wie möglich ergänzt. Alle Stämme wurden auf Columbia Agar mit Schafblut kultiviert und 14-tägig passagiert.

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete *B. cereus* Stämme.

B. CEREUS STAMM		GENOTYP	TOXINPROFIL					EIA-Daten (REZIPROK. TITER)		ZYTOTOXIZITÄT (REZIPROK. TITER)
Originalname	Ursprung	Clade (group)	ces	hbl	nhe	cytK2	Typ	NheB	Hb1L2	Vero
I4294-3 (M6)	Eiscreme	I	-	2x	2x	+	A	mittel	gering	mittel
SDA KA96	Rohmilch	I	-	+	+	+	A	hoch	hoch	hoch
INRA A3	Stärke	II	-	+	+	+	A	gering	gering	gering
INRA C3	pasteurisierte Karotten	II	-	+	+	+	A	mittel	hoch	hoch
6/27/S	menschlicher Fäzes	II	-	2x	+	+	A	gering	gering	mittel
F3175/03 (D7)	menschlicher Fäzes	II	-	+	+	+	A	hoch	mittel	hoch
RIVM BC 934	Salat	II	-	2x	+	+	A	gering	gering	gering
F528/94	Reisgericht, Lebensmittelvergiftung	I	-	+	+	-	C	gering	mittel	gering
F837/76	postoperative Infektion	I	-	+	+	-	C	hoch	hoch	hoch
RIVM BC 126	menschlicher Fäzes	I	-	2x	+	-	C	hoch	mittel	hoch
MHI86	Babynahrung	I	-	-	+	+	D	gering	-	0
F4429/71	Vanillepudding	I	-	-	+	+	D	hoch	-	hoch
RIVM BC 964	Kebab	II	-	-	+	+	D	hoch	-	hoch
F3162/04 (D8)	menschlicher Fäzes	I	-	-	+	+	D	gering	-	hoch
MHI226	Milch und Milchprodukte	I	-	(+)	2x	-	F	gering	-	gering
NVH 0075-95	Gemüseintopf, Lebensmittelvergiftung	I	-	-	+	-	F	hoch	-	hoch
WSBC 10035	pasteurisierte Milch	II	-	-	+	-	F	hoch	-	hoch
RIVM BC 90	menschlicher Fäzes	I	-	-	+	-	F	gering	-	0
7/27/S	menschlicher Fäzes	I	-	-	+	-	F	hoch	-	hoch
IP 5832	Probiotikum (Bactisubtil)	?	-	+	+	-	C	gering	gering	gering

1.7. Verbrauchsmaterialien

Cryotubes 1,8 ml (Thermo Fisher, 375418)

Deckgläschen

Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf, 0030 120.086, 0030 120.086)

Mikrotiterplatten, 96 well (Thermo Fisher, 439454)

Mikrotiterplatten, 96 well, schwarz (Thermo Fisher, 165305)

Mikrotiterplatten, 96 well, steril (Thermo Fisher, 167008)

Petrischalen 60 × 15 mm, 94 × 16 mm (greiner bio-one, 628102, 633102)

pH-Indikatorpapier pH 1 - 10 (Merck, 1.09526.)

Pipettenspitzen 0,5 – 20 µl, 2 – 200 µl, 50 – 1000 µl (Brand, 732024, 732028, 732032)

Probenröhrchen 15 ml, 50 ml (greiner bio-one, 188271, 227261)

Sterilfilter Millex-GV Filter Unit 0,22 µm (Merck Millipore, SLGV033RB)

UV-Küvetten (Brand, 759210)

Zellkulturflaschen 25 cm², 80 cm² (Thermo Fisher, 156367, 178905)

Zellkulturplatten, 24 well, steril (Thermo Fisher, 142475)

1.8. Geräte

Begasungsbrutschrank (Heraeus)

Biophotometer (Eppendorf)

Brutschrank (Mettler)

CO₂-Inkubator Heracell 150 (Thermo Fisher)

Flockeneisbereiter (Scotsman)

Heizplatte/Magnetrührer (Velp Scientific)

Inverses Mikroskop (Zeiss)

Mikrotiterplattenlesegerät Sunrise Remote Control Reader (Tecan)

Modulares Funktionsmikroskop Aristoplan (Leitz)

Multifuge 1 S-R (Heraeus)

pH-Meter (InoLab)

Schüttelinkubator (New Brunswick Scientific)

Schüttelwasserbad (GFL)

Sterilwerkbank Herasafe (Heraeus)

Stomacher Lab-Blender 80

Taumelschüttler Polymax 1040 (Heidolph)

Thermomixer comfort (Eppendorf)

Varifuge 3.0R (Heraeus)

Varioklav Dampfsterilisator (H+P Labortechnik GmbH)

Victor³ 1420 multilabel counter (PerkinElmer)

Vortex-2 Genie (Scientific Industries)

Waage (Sartorius)

1.9. Sonstiges

Accu-Jet Pipettierhilfe (Brand)

Erlenmeyerkolben 200 ml, 300 ml, 500 ml, 1000 ml (Schott)

Glaspipetten 1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml

Handzählgerät

Variable Achtkanalpipette 30 – 300 µl (Eppendorf)

Variable Pipetten 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl (Eppendorf)

Variable Zwölfkanalpipette 30 – 300 µl (Eppendorf)

Zählkammer nach Thoma (Brand)

2. Methoden

2.1. Kultivierung von *B. cereus* und Gewinnung von zellfreien Kulturüberständen

20 ml CGY-Medium wurden mit einer Einzelkolonie eines *B. cereus* Stammes von einer Blutplatte beimpft und über Nacht für 17 h bei 32 °C und 125 rpm inkubiert. Zur Gewinnung von zellfreien Kulturüberständen wurde über eine photometrische Messung die optische Dichte der Übernachtskultur (ÜNK) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt (OD_{600}) und CGY-Medium auf eine OD_{600} von 0,2 eingestellt. Nach sechsständiger Inkubation bei 32 °C und 125 rpm wurde die Kultur abzentrifugiert (4500 rpm, 10 min, 4 °C), der Überstand sterilfiltriert und nach Zugabe von 1 mM EDTA-Lösung in Cryotubes portioniert und bei -20 °C gelagert.

2.2. Motilitätsassay

Die Bestimmung der Motilität von *B. cereus* wurde vergleichend für alle 20 Stämme mit jeweils drei Replikaten bei 30 °C sowie 37 °C durchgeführt. Dazu wurde die OD_{600} auf 20 eingestellt. 1 µl dieser Suspension wurde mittig in kleine CGY-Platten (ø 60 mm) mit 0,25 % bzw. 0,7 % Agar injiziert. Nach 5, 10, 24, 32 und 48 h Inkubationszeit erfolgte die Messung und Dokumentation des Motilitätsdurchmessers. Bestimmt wurde dieser an der längsten Stelle. Grund hierfür war die unsymmetrische, z. T. sichelförmige dezentrale Ausbreitung der Bakterien. Berechnet wurde der Mittelwert aus allen Durchgängen.

2.3. Isolierung von *B. cereus* Sporen

Zur Herstellung der *B. cereus* Sporen wurden je Stamm 2 × 100 ml frisches MSM-Medium mit 0,5 % einer *B. cereus* ÜNK inokuliert. Nach dreitägiger Inkubation bei 30 °C und 125 rpm erfolgte eine lichtmikroskopische Kontrolle der Suspension. Zu diesem Zeitpunkt lagen ca. 80 % freie Sporen vor. Anschließend wurde die Kultur bei 4000 rpm und 4 °C für 7 min zentrifugiert und in 40 ml gekühltem Sporenwaschpuffer resuspendiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt und die Suspension ein weiteres Mal mikroskopiert. Die Sporen wurden bei 4 °C gelagert und noch drei Wochen lang einmal wöchentlich gewaschen bis das Präparat eine hohe Sporendichte und -reinheit aufwies. Unmittelbar vor einem Experiment wurde die Sporensuspension erneut einmal mit Waschpuffer gewaschen.

2.4. Zellkultur

2.4.1. Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die Subkultivierung der Zelllinie CaCo-2 erfolgte alle zwei bis drei Tage. Medium und Puffer wurden auf Raumtemperatur angewärmt. Anschließend wurde die Zellkulturflasche aus dem Brutschrank (37 °C, 7 % CO₂-Begasung) genommen und mikroskopiert. Das verbrauchte Medium wurde abgenommen, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und dann mit 5 ml Trypsin-EDTA für 5 min inkubiert. Die Ablösung des Zellrasens wurde makroskopisch geprüft. Nach Zugabe von 10 ml RPMI 1640 Medium wurden die Zellen durch mehrmaliges auf- und abpipettieren resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Röhrchen überführt und für 5 min bei 500 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert und im benötigten Verhältnis (i. d. R. 1:10) in eine neue 80 cm²-Zellkulturflasche mit 30 ml Medium pipettiert.

2.4.2. Adhäsionsassay

Für die Adhäsionversuche wurden 5×10^4 CaCo-2-Zellen in 24-well-Platten ausgesät und 14 Tage ausdifferenziert. Hierfür wurden die Zellen zunächst wie bei der Subkultivierung behandelt. Nach dem Zentrifugieren und Resuspendieren wurde die Anzahl lebender Zellen ermittelt. 50 µl der Zellsuspension wurden mit 50 µl 0,1%iger Trypanblaulösung angefärbt und mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Lebende Zellen erschienen dabei hell, während tote Zellen den Farbstoff durch die durchlässig gewordene Membran aufnahmen und sich dunkelblau anfärbten. Die Berechnung der Zellen/ml erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Anzahl lebender Zellen} \times 50 \text{ (Schichtdicke der Kammer)} \times 2 \text{ (Verdünnung)} \times 1000 \text{ (in 1 ml)}$$

In die 24-well-Platte wurde je 1 ml Medium vorgelegt und die auf eine Zellzahl von 5×10^4 berechneten CaCo-2-Zellen zugegeben. Während der 14 Tage erfolgte alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel.

2.4.2.1. Bestimmung der koloniebildenden Einheit (KBE)

Im Vorversuch wurde die KBE aller Stämme ermittelt. Über die Messung der OD₆₀₀ konnte so später indirekt eine Aussage über die Keimzahl getroffen

werden. Dafür wurde die OD₆₀₀ der ÜNK bestimmt und auf 0,05 eingestellt. Eine Verdünnungsreihe in PBS wurde angelegt und in den Verdünnungsstufen 10⁻³ - 10⁻⁷ auf CGY-Platten ausgebracht. Nach der Bebrütung bei 37 °C über Nacht wurden die makroskopisch sichtbaren Kolonien mit Hilfe eines Handzählgerätes bestimmt und der gewichtete Mittelwert berechnet.

Die Sporenzahlbestimmung wurde ähnlich durchgeführt. Die Sporensuspension wurde bei 4500 rpm und 4 °C für 15 min abzentrifugiert, in 5 ml Sporenwaschpuffer resuspendiert und die OD₆₀₀ auf 0,4 eingestellt. 4 × 200 µl der Suspension wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und nach Erhitzen bzw. in nicht erhitztem Zustand ausplattiert. Die 10-minütige Erhitzung auf 80 °C der einen Hälfte der Sporen gewährleistete zum einen die Ermittlung der reinen Sporenanzahl, da vorhandene vegetative Bakterien somit abgetötet wurden. Zum anderen diente der Vergleich zwischen erhitzter und nicht erhitzter Probe zur Kontrolle der Reinheit der Sporenisolation. Auch hier wurden für die spätere Berechnung KBE und OD₆₀₀ zueinander in Beziehung gesetzt. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die photometrische Bestimmung der Sporen auf Grund ihrer Größe und ihrer Neigung zur Agglomeration z. T. voneinander abweichende Ergebnisse lieferte.

2.4.2.2. Adhäsion von *B. cereus* Sporen an CaCo-2-Zellen

Die Adhäsion von *B. cereus* Sporen an CaCo-2-Zellen wurde vergleichend für alle 20 Stämme durchgeführt. Nach Trypsinbehandlung wurden die Zellen aus zwei wells gelöst und nach Zugabe von Trypanblau gezählt. Die Sporensuspension wurde bei 4500 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert, in 5 ml Waschpuffer resuspendiert und die OD₆₀₀ bestimmt. Anhand dieses Wertes, der Sporenzahlbestimmung aus dem Vorversuch und der Anzahl der Zellen konnte so die benötigte *multiplicity of infection* (MOI) berechnet werden, und damit das Inokulum in 20 ml RPMI Medium fertiggestellt werden. Die MOI drückt das zahlenmäßige Verhältnis zwischen Bakterien und Zielzellen aus. Ein Vorversuch zeigte vergleichbare Ergebnisse für MOI 1 und 10. Um Sporenmaterial zu sparen wurde daher eine MOI von 1 festgelegt. Die Zellen wurden zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml der Bakteriensuspension infiziert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 7 % CO₂ für eine halbe Stunde. Im Anschluss wurde das Inokulum abgenommen. Die Zellen wurden erneut dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen und mit A. dest. lysiert. Pro well wurde die Zelllösung in ein

Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Durch Erhitzung des Röhrchens auf 80 °C für 10 min wurden bereits vorhandene oder frisch ausgekeimte vegetative Bakterien eliminiert. Es wurden Verdünnungsreihen von Inokulum und erhitzter Probe angelegt und auf CGY-Platten ausplattiert. Nach 20-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde die KBE anhand des gewichteten Mittelwerts berechnet und die Anzahl adhärierter Bakterien in Bezug zum Inokulum bestimmt. Der Versuch wurde in Triplikaten durchgeführt.

2.4.2.3. Adhäsion von vegetativen *B. cereus* an CaCo-2-Zellen

Die Anzucht der Bakterienstämme erfolgte in CGY-Medium mit 1 % Glucose bei 32 °C und 125 rpm. Nach 17 h wurde die ÜNK zentrifugiert, einmal in PBS gewaschen und anschließend die OD₆₀₀ bestimmt. Die Zellzahl wurde wie in Punkt 2.4.2.2. beschrieben ermittelt und das Inokulum auf eine MOI von 10 eingestellt. Nach zweimaligem Waschen mit je 1 ml PBS wurden die Zellen mit 1 ml Inokulum infiziert und bei 37 °C für 60 min inkubiert. Nach Absaugen der Bakteriensuspension und drei Waschschrritten wurden die Zellen mit A. dest. lysiert. Eine 1:10-Verdünnungsreihe in PBS wurde auf CGY ausplattiert. Die Berechnung der KBE erfolgte nach Übernachtinkubation bei 37 °C. Auch in diesem Fall wurde die Anzahl adhärierter Bakterien in Bezug zum Inokulum ermittelt. Jede Versuchsreihe wurde zweimal mit je drei Replikaten ausgeführt. Stämme mit stark voneinander abweichenden Ergebnissen wurden ein drittes Mal getestet.

2.4.3. Propidiumiodid-Test (PI)

Ein Propidiumiodid-Test mit CaCo-2-Zellen wurde durchgeführt, um die Wirkung von Enterotoxinen in Verbindung mit Lebensmittelkomponenten zu testen. Auf Grund der Porenbildung durch die *B. cereus* Enterotoxine kann der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid durch die zerstörte Zellmembran in die Zelle einströmen und in die DNA interkalieren. Es entstehen fluoreszierende Komplexe, die im Fluorometer gemessen werden können. Ein Vorversuch ergab, dass Lebensmittel, mit Ausnahme von Milch mit 1, 5 % Fett, zu komplex für diesen Test waren und die Messung störten. Daher wurden Einzelkomponenten aus Rindermilch verwendet (α -, β -, und κ -Casein, α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin und Lactoferrin). In schwarze Mikrotiterplatten mit transparentem Boden wurden 2×10^4 CaCo-2-Zellen in 200 μ l RPMI 1640 Medium pro well ausgesät. Nach

Inkubation über 24 h bei 37 °C und 7 % CO₂-Begasung wurden 100 µl Medium entnommen und 100 µl der Probenverdünnung (RPMI 1640 Medium mit 1:5 Lebensmittelkomponente und 1:20 *B. cereus* Kulturüberstand) hinzugefügt. Diese Mischung wurde für 30 min bei 37 °C auf den Zellen belassen und im Anschluss wieder abgenommen. Die Zellen wurden zweimal mit RPMI Medium gewaschen um eine Interaktion der Lebensmittelkomponenten mit der Fluoreszenzmessung zu verhindern. Zuletzt wurde Medium mit 5 µg/ml PI zugegeben und die Fluoreszenz über 2 h alle 2,5 min im Fluorometer Victor³ 1420 gemessen (Absorption 530 nm, Emission 616 nm, Anregungszeit 1 s). Jeder Ansatz wurde dreimal getestet.

2.4.4. WST-1-Bioassay

Die Bestimmung der Zytotoxizität von *B. cereus* Kulturüberständen in Zusammenhang mit Lebensmitteln bzw. Lebensmittelkomponenten erfolgte mittels WST-1-Bioassays auf CaCo-2-Zellen. Das Tetrazoliumsalz WST-1 wird von metabolisch aktiven Zellen durch die mitochondriale Atmungskette zu Formazan reduziert. Der damit einhergehende Farbumschlag kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden. Für den Versuch wurden die Lebensmittelkomponenten mit einer Endkonzentration von 0,2 % in Zellkulturmedium gelöst und je 100 µl pro well in eine Mikrotiterplatte mit 96 well vorgelegt. Die Lebensmittel (Milch mit 1,5 und 3,5 % Fett, lactosefreie Milch und Folgemilch) wurden 1:5 vorverdünnt. Wie ein Vortest ergab, behinderten diese Produkte die photometrische Auswertung nicht. Eine serielle Verdünnungsreihe des Toxinüberstandes mit einer Anfangsverdünnung von 1:20 wurde angelegt und 2×10^4 CaCo-2-Zellen in 100 µl Medium pro well zugegeben. Nach 22-stündiger Inkubation bei 37 °C und 7 % CO₂-Begasung wurden 100 µl abgenommen, 10 µl WST-1 zugegeben und die Zellen erneut für ca. 2 h inkubiert. Die reziproken Zytotoxizitätstiter wurden nach der Messung über diejenigen Verdünnungsstufen bestimmt, bei denen die Zellviabilität um 50 % reduziert war.

2.5. Überlebensfähigkeit von *B. cereus* Sporen unter simulierten Magenbedingungen

2.5.1. Überleben von Sporen in reinem Magensaft

Für den Versuch wurde zunächst die Sporensuspension abzentrifugiert, in

Sporenpuffer resuspendiert und das Inokulum auf 10^7 KBE/ml eingestellt. Je 1 ml Inokulum wurde in Erlenmeyer-Kolben mit 50 ml vorgewärmtem Magensaft bei 37 °C und leichtem Schütteln inkubiert. Der pH-Wert wurde mittels Lackmuspapier regelmäßig kontrolliert und lag über die gesamte Versuchsdauer bei 2. Nach einer Stunde erfolgte die Entnahme von 300 µl Probe pro Kolben in Eppendorfgefäße. Diese wurden für 10 min bei 80 °C erhitzt und nach Anlegen einer 1:10-Verdünnungsreihe in PBS auf CGY-Platten ausgebracht. Dieses Vorgehen wurde stündlich für 6 h wiederholt. Um später den prozentualen Anteil der überlebenden Sporen in Bezug zum Inokulum ermitteln zu können, wurde dieses ebenfalls ausplattiert. Die Bebrütung aller Platten erfolgte über Nacht bei 37 °C. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt.

2.5.2. Einfluss der Lebensmittelmatrix auf das Überleben von Sporen im Magenmilieu

Ob verschiedene Lebensmittel einen Einfluss auf die Überlebensrate von *B. cereus* Sporen haben, wurde vergleichend für sechs Stämme untersucht. Neben den beiden Referenzstämmen für Hbl und Nhe (F837/76 und NVH 0075-95) und den jeweiligen schwachen Toxinproduzenten desselben Toxinprofils (F528/94 und MHI226) wurde der Stamm WSBC 10035 und der probiotische Stamm IP 5832 eingesetzt. Für die Lebensmittelmatrix wurden verschiedene Molkereiprodukte unterschiedlicher Fett- und Zuckerstufen ausgesucht. Eingesetzt wurde ultrahocherhitze (UHT) Milch 1,5 % und 3,5 % Fett, UHT Schlagsahne, Mascarpone (mit gültigem und überschrittenem Mindesthaltbarkeitsdatum (MHD)), UHT lactosefreie Milch 1,5 % Fett, Bio Folgemilchpulver und Milchreis Pur (ohne Fruchtzubereitung). Die Produkte wurden vor dem Einsatz im Versuch auf Gesamtkeimzahl (nach DIN 10192 Teil 5) und präsumtive *B. cereus* (nach DIN 10198 Teil 2) in der mikrobiologischen Abteilung des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch untersucht.

In jedem Versuchsdurchgang liefen drei verschiedene Ansätze parallel:

A. Lebensmittelnegativkontrolle: 50 g bzw. ml Lebensmittel wurden mit 50 ml Magensaft in einem 300 ml Erlenmeyer-Kolben gemischt. Dies diente der erneuten Kontrolle der Keimfreiheit des Lebensmittels und wurde daher nur einfach ausgeführt.

B. Negativkontrolle: 50 ml Magensaft wurden in einem 300 ml Erlenmeyerkolben

mit der berechneten Anzahl an Sporen versetzt. Dieser Ansatz erfolgte doppelt.

C. Lebensmittelmatrix: Duplikate von 50 ml Magensaft wurden mit 50 g bzw. ml Lebensmittel in einem 300 ml Erlenmeyerkolben gemischt und mit der berechneten Anzahl an Sporen versetzt. Da nach der Produktzugabe der pH-Wert wieder in den neutralen Bereich stieg, wurde durch Zugabe von steriler Salzsäure der Wert wieder auf 2 gesenkt. Lebensmittel in flüssiger Form konnten direkt zum Magensaft zugegeben werden. Für die Zubereitung der Folgemilch wurden, nach Herstellerangaben, 14,1 g Milchpulver in 90 ml sterilem A. dest. gelöst. Die Mascarponezubereitung wurde ebenfalls direkt zugegeben und durch kräftiges Rühren auf dem Magnetprüher homogenisiert. Der Milchreis wurde für ca. 2 min im Stomacher zerkleinert, der Beutel mit der Magenlösung ausgespült und alles in den Kolben gegeben.

Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte wie unter 2.5.1. beschrieben.

2.6. Enzymimmunoassays

Die Komponenten der Toxinkomplexe Hbl und Nhe wurden mittels Sandwich- und indirektem Enzymimmunoassay (EIA) nachgewiesen.

2.6.1. Sandwich-Enzymimmunoassay

Zum semiquantitativen Nachweis der Komponenten Hbl B und L2 sowie NheB und NheA wurde eine Mikrotiterplatte mit 100 µl/well mAk in PBS beschichtet (5 µg/ml mAk 1D12 gegen Hbl B, 10µg/ml mAk 1A12 gegen Hbl L2, 5 µg/ml mAk 2B11 gegen NheB und 2,5 µg/ml mAk 1G4 gegen NheA). Nach der Inkubation über Nacht in einer feuchten Kammer wurde die Platte ausgeklopft und nach Zugabe von 3 % Casein in PBS (150 µl/well) für 30 min auf dem Taumelschüttler in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Platte wurde dreimal gewaschen, trockengeklopft und eine serielle Verdünnungsreihe (100 µl/well) der Kulturüberstände, verdünnt in 0,5 % Tween 20 in PBS, angelegt. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurden die Proben abgesaugt und die Platte viermal gewaschen und trockengeklopft. Darauf erfolgte die Zugabe von 100 µl/well der Detektionsantikörper in 1%iger Casein/PBS-Lösung (1B8-HRP 1:2000 gegen Hbl B, 1H9-HRP 1:2000 gegen Hbl L2, 1E11-HRP 1:4000 gegen NheB und 2G11-HRP 1:2000 gegen NheA). Nach erneuter einstündiger Inkubation wurde die Platte fünfmal gewaschen, getrocknet und 100 µl/well der Chromogen/Substratlösung zugesetzt. Die Platte wurde 20 min lichtgeschützt

inkubiert und die Farbreaktion durch Zusatz von 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/well) gestoppt. Die Auswertung erfolgte mittels Mikrotiterplatten-Lesegerät (Sunrise Remote Control Reader) bei einer Wellenlänge von 450 nm und mittels Ridasoft Win-Software (R-Biopharm AG). Durch Multiplikation des Extinktionswertes, der 1 am nächsten lag, mit der zugehörigen Verdünnungsstufe wurde der reziproke Titer bestimmt.

2.6.2. Indirekter Enzymimmunoassay

Die Durchführung eines indirekten EIAs wurde zum Nachweis der Hbl-Komponente L1 genutzt. Dabei wurden die zu untersuchenden Proben in Bicarbonatpuffer verdünnt, und zur Plattenbeschichtung eine serielle Verdünnungsreihe angelegt (100 µl/well). Die Blockierung freier Bindungsstellen erfolgte durch Zugabe von 3 % Casein in PBS (200 µl/well). Als Antikörper gegen Hbl L1 wurde 1 µg/ml 1E9 eingesetzt, der durch den zweiten Antikörper (Kaninchen-anti-Maus-HRP 1:2000) detektiert werden konnte. Ansonsten erfolgte die Versuchsdurchführung wie unter 2.6.1. beschrieben.

IV. ERGEBNISSE

Trotz einer Vielzahl von Forschungsarbeiten konnte bislang nicht vollständig geklärt werden, warum der Konsum einiger enteropathogener *B. cereus* Stämme zu Krankheitsausbrüchen in Form von Diarrhö führt und welche Virulenzfaktoren daran beteiligt sind. Bekannt ist bislang, dass die Zytotoxizität *in vitro* mit der Fähigkeit der Stämme, die Enterotoxine Nhe, Hbl oder CytK zu produzieren, korreliert. Daher werden diese Toxine als Hauptvirulenzfaktoren angesehen. Dennoch macht nicht jeder Stamm, der diese Fähigkeit besitzt, krank. Mittlerweile geht man davon aus, dass die Ausbildung einer *B. cereus* Lebensmittelinfektion ein multifaktorieller Prozess ist, bei dem v. a. die Besiedelung des Wirts eine große Rolle spielt. Dies ist das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit. Ziel ist es, eine möglichst genaue Vorhersage über das Pathogenitätspotential eines *B. cereus* Stammes zu ermöglichen.

Ein hinsichtlich Toxinproduktion und *in vitro* Toxizität umfassend charakterisiertes Stammeset (Tab. 7) war Basis für die nachfolgenden Untersuchungen. Zunächst wurden alle Stämme auf ihre Motilität untersucht.

1. Motilität von *B. cereus*

Bei pathogenen Bakterien wie z. B. Salmonellen oder *Campylobacter jejuni* ist die Fortbewegung mit Hilfe von Flagellen als ein Pathogenitätsfaktor beschrieben (Josenhans *et al.*, 2002). Daher wurde die Motilität der 20 *B. cereus* Stämme, vergleichend bei 30 °C und 37 °C, bestimmt (Abb. 4-7). Unter Motilität werden zwei unterschiedliche Bewegungsmuster von Bakterien, *swimming* und *swarming*, zusammengefasst. Unter *swimming* versteht man die Bewegung einzelner Bakterien in Flüssigkeit. Die Gruppenbewegung der Bakterien an feuchten Oberflächen wird als *swarming* bezeichnet (Senesi *et al.*, 2010). 0,25%iger Agar wurde zum Nachweis der Motilität durch *swimming* genutzt, während *swarming* auf 0,7%igem Agar beobachtet wurde. Die Durchmesseränderungen der Bakterienkolonie wurden nach 5, 10, 24, 32 und 48 h protokolliert. Zur vergleichenden Darstellung wurden die Werte nach 24 und 48 h verwendet, da hier deutliche Veränderungen bei allen Ansätzen zu verzeichnen waren.

1.1. *Swimming*

Bei 30 °C hatten sich zwei Stämme (F3175/03 (D7) und RIVM BC 964) bereits nach 24 h an den äußeren Plattenrand (entspricht 53 mm) bewegt. Sehr geringe Zunahmen des Durchmessers zeigten die Stämme RIVM BC 934, F528/94 und F837/76 (≤ 2 mm) (Abb. 2A), was sich auch nach 48 h kaum änderte. Nach 48 h hatten sich die Durchmesser der anderen Stämme weiter vergrößert. Vier weitere Stämme erreichten die maximale Ausbreitung von 53 mm (14294-3 (M6), 6/27/S, MHI226 und RIVM BC 90) (Abb. 2C).

Betrachtet man die Fähigkeit zum *swimming* bei 37 °C fällt auf, dass bereits nach 24 h sechs der Stämme die Platte ganz ausfüllten (Abb. 2B). Weitere 24 h später hatten nur sieben der 20 Stämme den Plattenrand nicht erreicht (Abb. 2D). Vergleicht man diese Zahl mit dem 30 °C-Lauf, so zeigten doppelt so viele der Stämme ein besseres Schwimmverhalten bei höherer Umgebungstemperatur. Einzig Stamm MHI226, der bei 30 °C nach 48 h einen Durchmesser von 53 mm hatte, erreichte den vollen Wert bei höherer Temperatur nicht. Ein schlechtes Schwimmverhalten während der gesamten Versuchsdauer zeigten erneut die Stämme RIVM BC 934 und F837/76 sowie der probiotische Stamm IP 5832. Hervorzuheben ist, dass Stamm F528/94, der bei 30 °C fast kein *swimming* zeigte, nach 48 h mit höherer Bebrütungstemperatur eine maximale Ausdehnung aufwies.

1.2. *Swarming*

Die Ausbreitung über *swarming* war bei allen 20 untersuchten Stämmen sehr gering. Der größte Durchmesser von 18,3 mm wurde bei Stamm INRA A3 nach 48 h und 30 °C gemessen (Abb. 3C). Nach 24 h zeigten alle weiteren Stämme unter beiden Bebrütungstemperaturen eine Motilitätszone von unter 10 mm (Abb. 3A und B). Nach 48 h konnte ein Durchmesser von über 10 mm bei vier (30 °C) bzw. drei Stämmen (37 °C) beobachtet werden (Abb. 3C und D). Ob es sich bei einem gemessenen Wert von 1 mm, wie bei den Stämmen MHI86 und NVH 0075-95 unter 37 °C, überhaupt um Motilität handelt oder sich die Bakterien lediglich vermehren, müsste durch die Identifizierung von Schwarmzellen, z. B. mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen, überprüft werden. Zu betonen ist noch, dass Stamm RIVM BC 934, der nur sehr geringe Fähigkeiten zum *swimming* aufwies, unter beiden Inkubationstemperaturen die zweitgrößte *swarming*-Zone mit 14 mm Durchmesser zeigte. Ein Zusammenhang zwischen den Ergebnissen des Motilitätsassays und der Einteilung der Stämme nach Toxinprofil, Toxizität

oder Ursprung (vgl. Tab. 7) konnte nicht festgestellt werden.

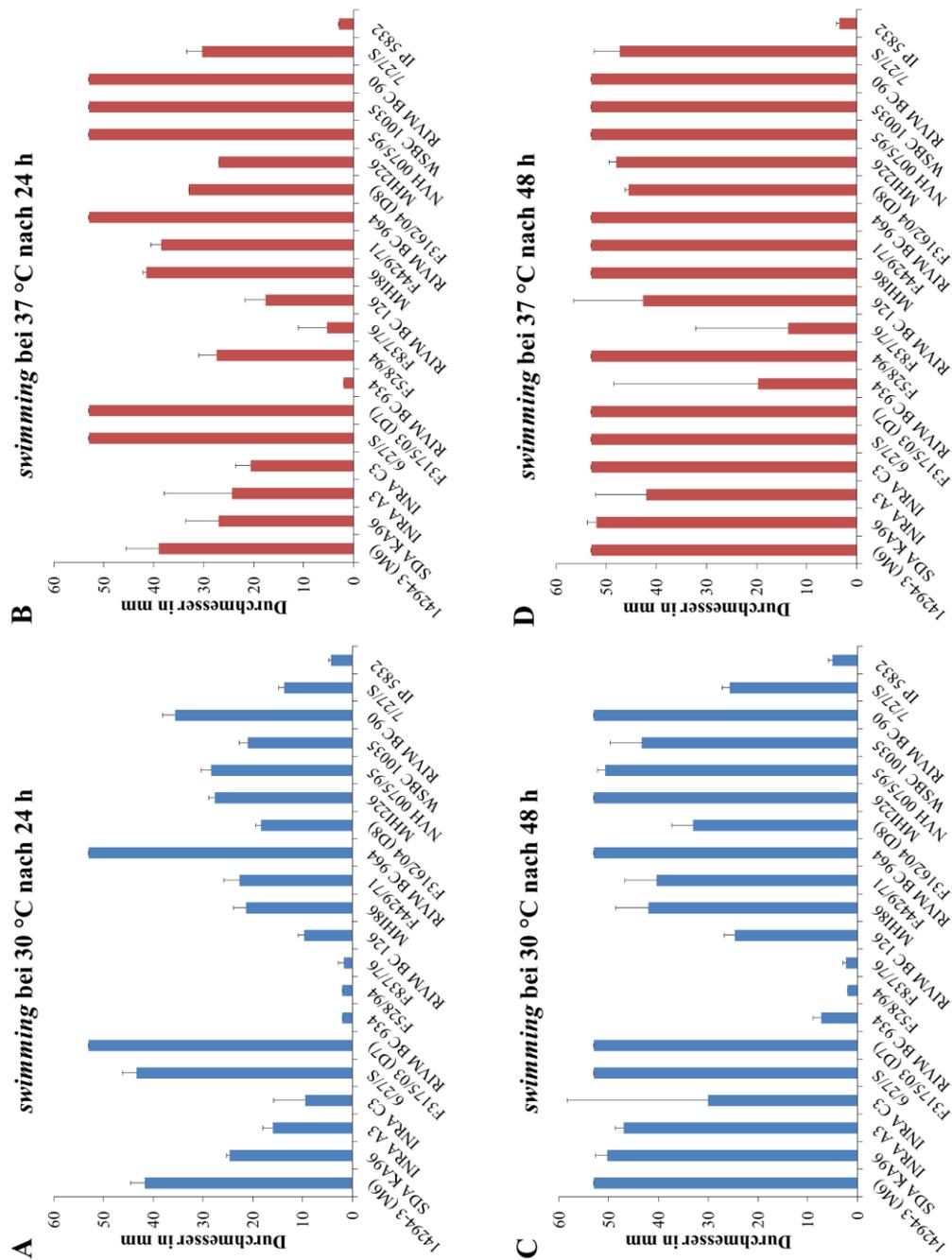


Abbildung 2: Motilität durch *swimming*. Dargestellt ist die Fähigkeit zum *swimming* bei 30 °C nach 24 h (A) und 48 h (C) sowie bei 37 °C nach 24 h (B) und 48 h (D).

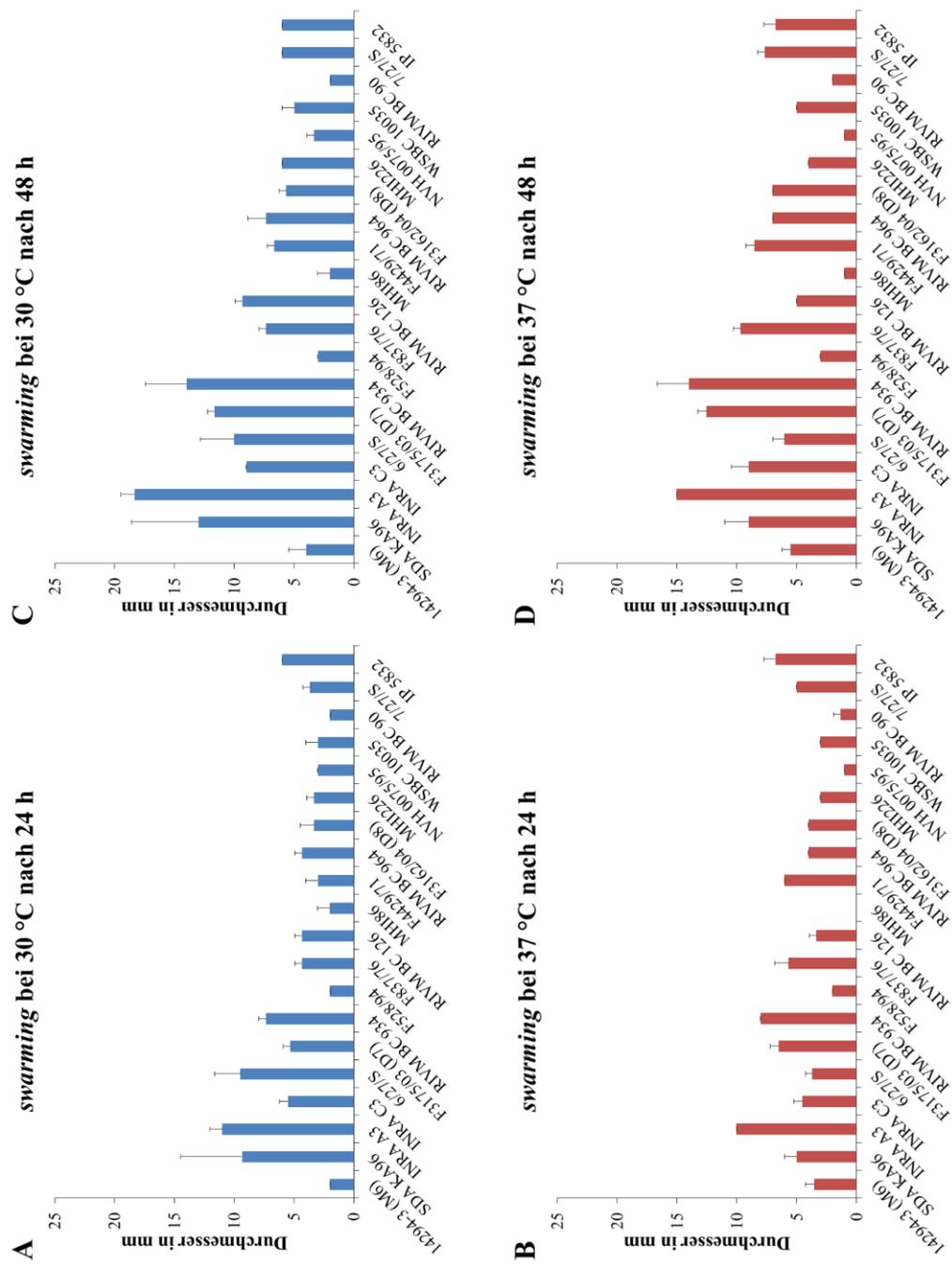


Abbildung 3: Motilität durch swarming. In blau dargestellt ist die Fortbewegung durch *swarming* bei 30 °C nach 24 h (A) und 48 h (C). Rot dargestellt sind die Werte bei 37 °C nach 24 h (B) und 48 h (D).

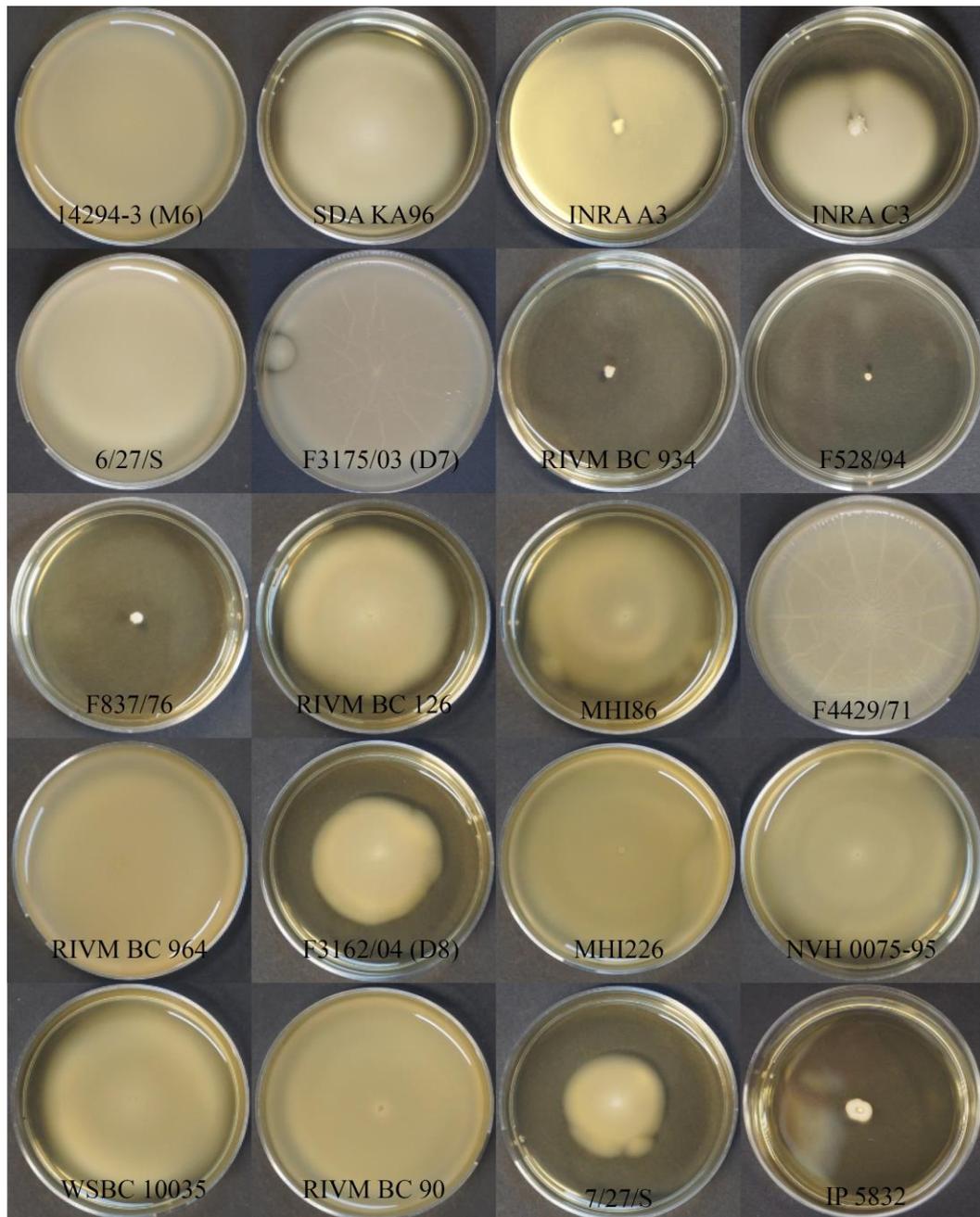


Abbildung 4: *Swimming* bei 30 °C nach 48 h. Abgebildet ist jeweils ein Replikat aller 20 Stämme.

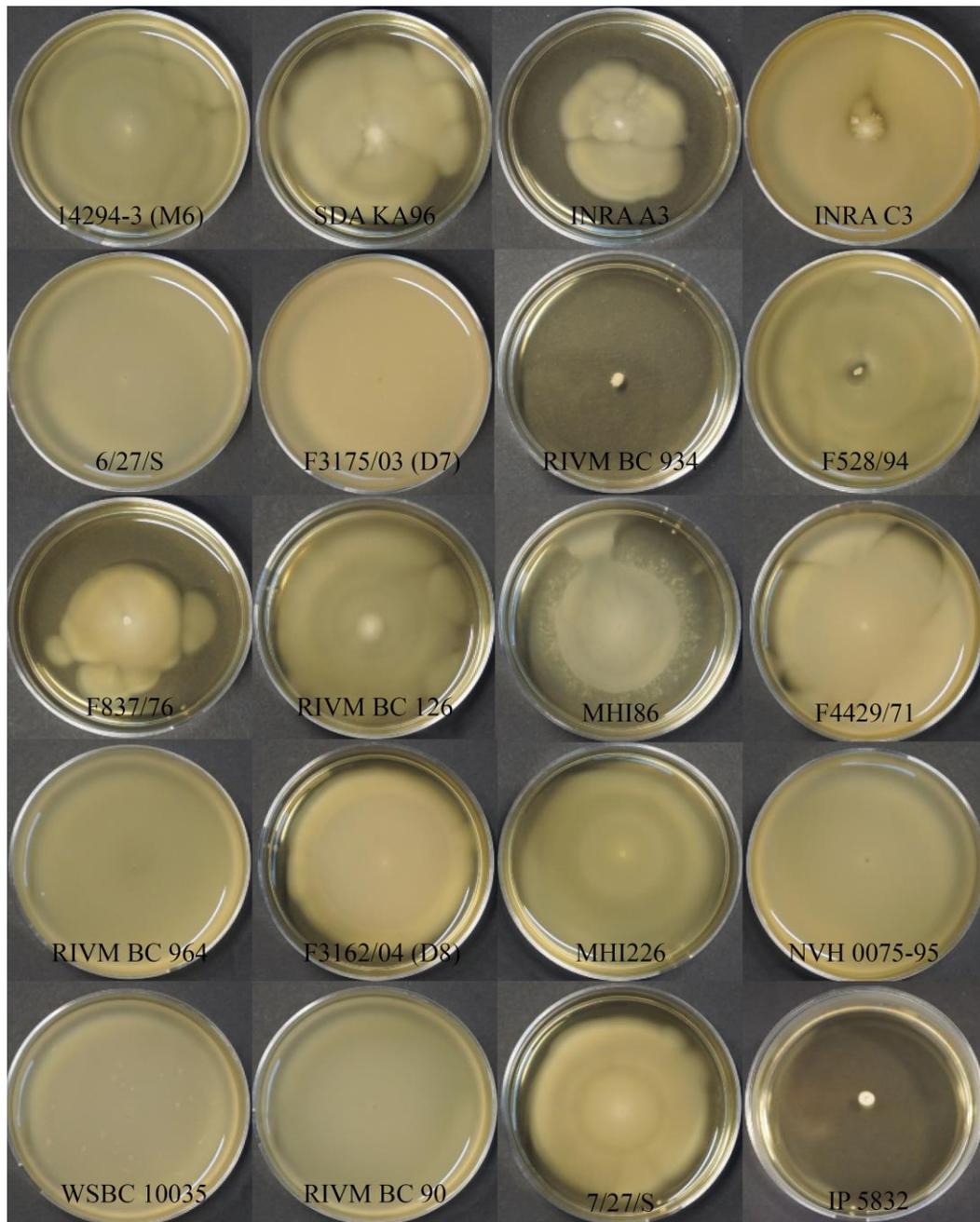


Abbildung 5: *Swimming* bei 37 °C nach 48 h. Abgebildet ist jeweils ein Replikat aller 20 Stämme.

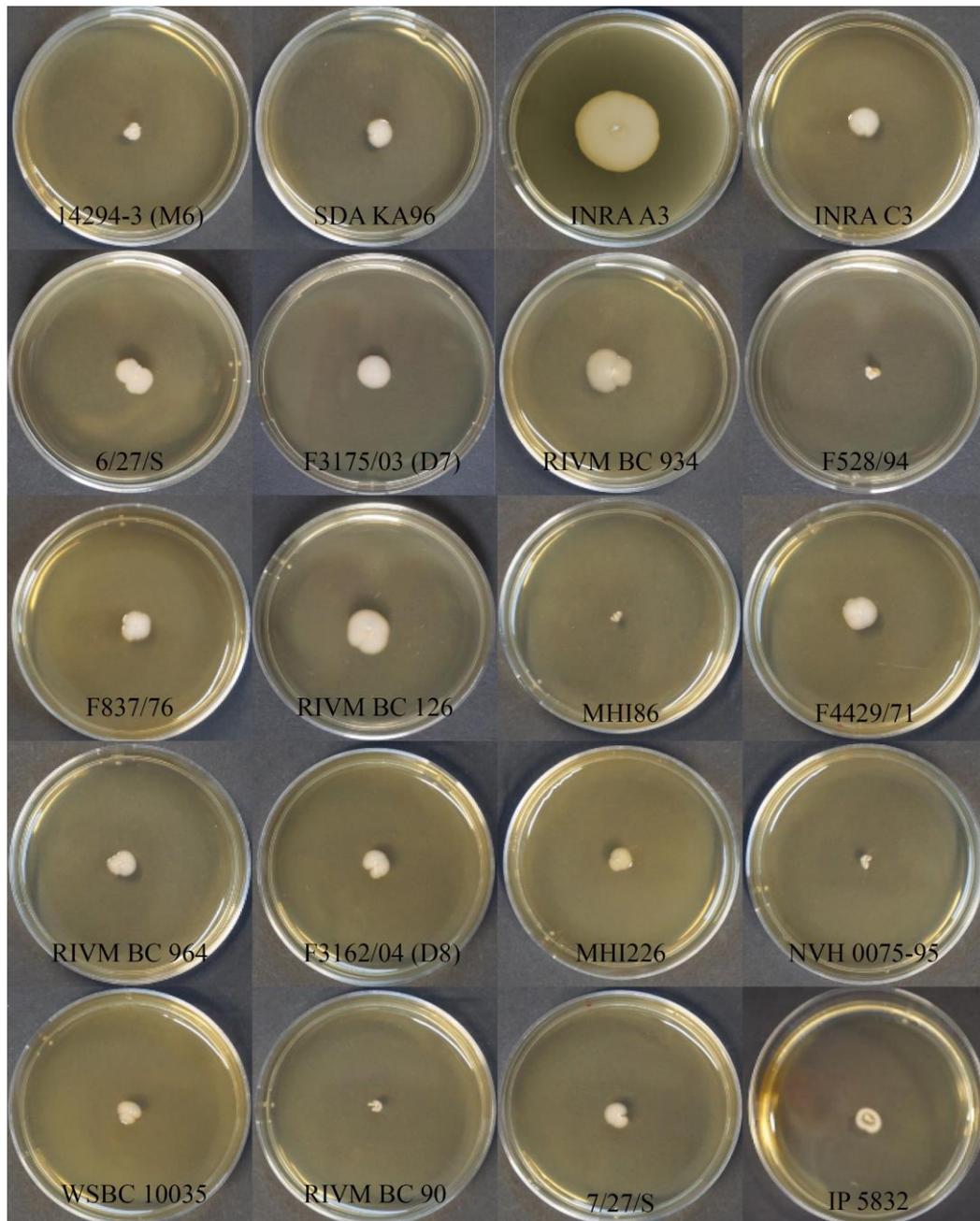


Abbildung 6: *Swarming* bei 30 °C nach 48 h. Abgebildet ist jeweils ein Replikat aller 20 Stämme.

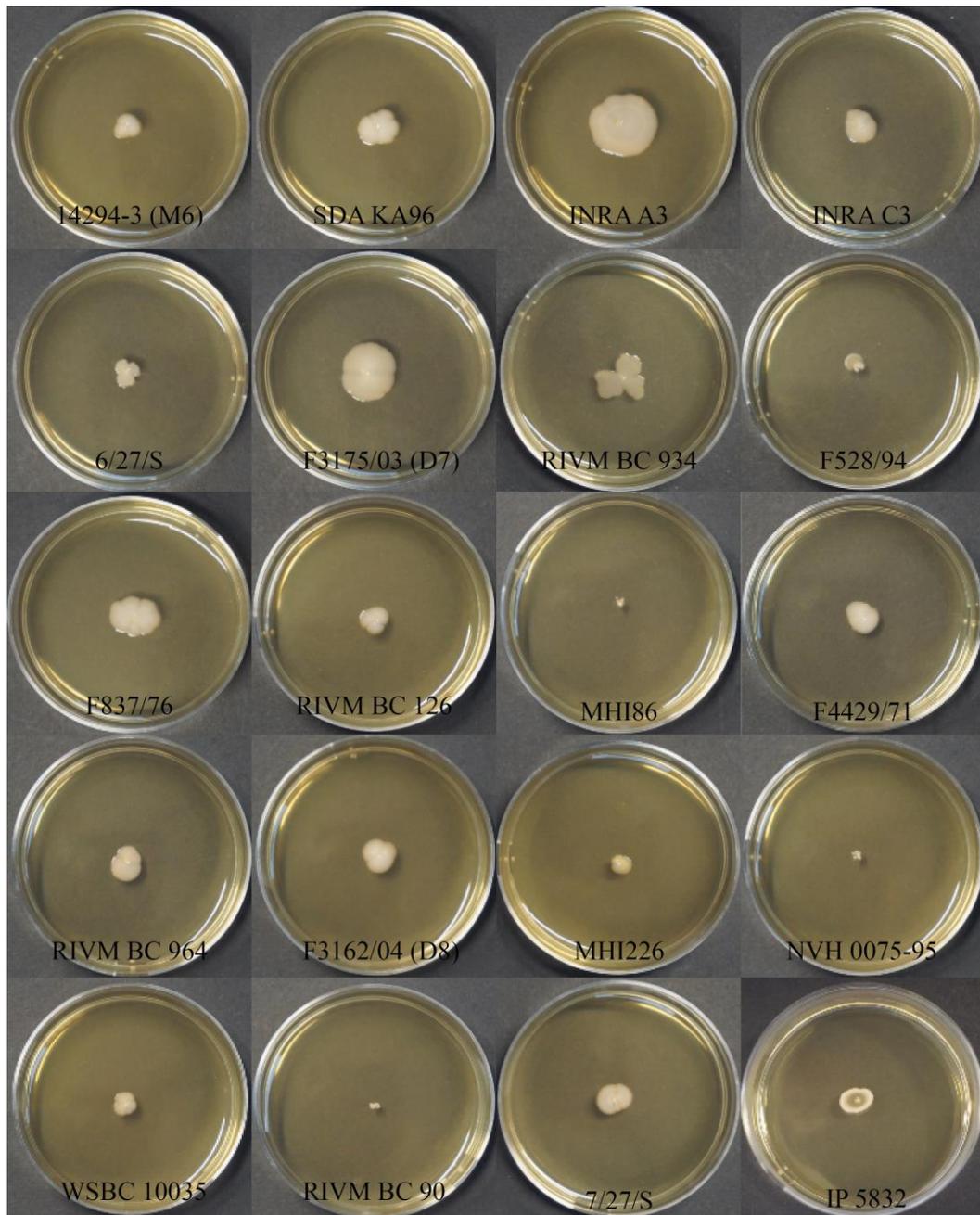


Abbildung 7: Swarming bei 37 °C nach 48 h. Abgebildet ist jeweils ein Replikat aller 20 Stämme.

2. Überlebensfähigkeit von *B. cereus* Sporen unter simulierten Magenbedingungen

Eine entscheidende Voraussetzung für die Ausbildung einer *B. cereus* Lebensmittelinfektion ist das Überleben der Keime in der Magenpassage. Nur Sporen oder evtl. einige vegetative Zellen, die den Magen unbeschadet passieren, können im weiteren Verlauf im Dünndarm zur Toxinproduktion beitragen (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Magenpassage zunächst ohne, später mit verschiedenen Lebensmitteln simuliert. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass vegetative *B. cereus* dem sauren Milieu i. d. R. nicht standhalten (Clavel *et al.*, 2004; Wijnands *et al.*, 2009). In einem eigenen Vorversuch konnte dies bestätigt werden. Aus diesem Grund wurden nur *B. cereus* Sporen eingesetzt.

2.1. Überleben von Sporen in reinem Magensaft

Zuerst wurde die Überlebensrate aller 20 Stämme in reinem Magensaft (NaCl, NaHCO₃, KCl, CaCl₂ und Pepsin mit pH 2) bestimmt. Eine Stunde konnten alle 20 Stämme bei pH 2 überleben. Allerdings zeigten sich hier bereits erste stammspezifische Unterschiede (Abb. 8A). Mit 9,6 % hatte Stamm WSBC 10035 die beste Überlebensrate. Auch die Stämme INRA A3, RIVM BC 964 und 7/27/S konnten mit Werten über 4 % den Bedingungen noch standhalten. RIVM BC 126 hatte nach einer Stunde lediglich noch eine Überlebensrate von 0,02 %. Und auch vier weitere Stämme (RIVM BC 90, F837/76, MHI86 und F3175/03 (D7)) zeigten mit Werten unter 0,1 % eine schlechte Widerstandsfähigkeit gegenüber dem sauren Milieu. Nach 6 h sank die Überlebensrate bei 19 Stämmen auf unter 1 %. Bei den Stämmen RIVM BC 126, MHI86 und MHI226 konnten keine Kolonien mehr nachgewiesen werden. Nur Stamm WSBC 10035 zeigte sich mit 2,75 % deutlich stabiler gegenüber den Magenbedingungen. Interessanterweise waren die beiden Stämme mit der höchsten (WSBC 10035) bzw. niedrigsten (RIVM BC 126) Überlebensrate beide starke Toxinproduzenten mit hohen Zytotoxizitätstiter (vgl. Tab. 7).

Wie in Abbildung 8B sichtbar wird, war im Verlauf des Versuchs bei einigen Stämmen ein erneuter Anstieg der Überlebensrate zu verzeichnen (z. B. bei INRA C3 zwischen 2 und 3 h). Dies ist vermutlich versuchstechnisch zu begründen. Zum einen sind Sporenagglomerate auch durch sorgfältiges Durchmischen vor der

Probenentnahme nicht immer zu trennen. Zum anderen wurde nur eine sehr geringe Probenmenge (300 μ l) abgenommen. Ein Anstieg der Werte auf Grund einer Auskeimung kann durch die Erhitzung der Probe mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

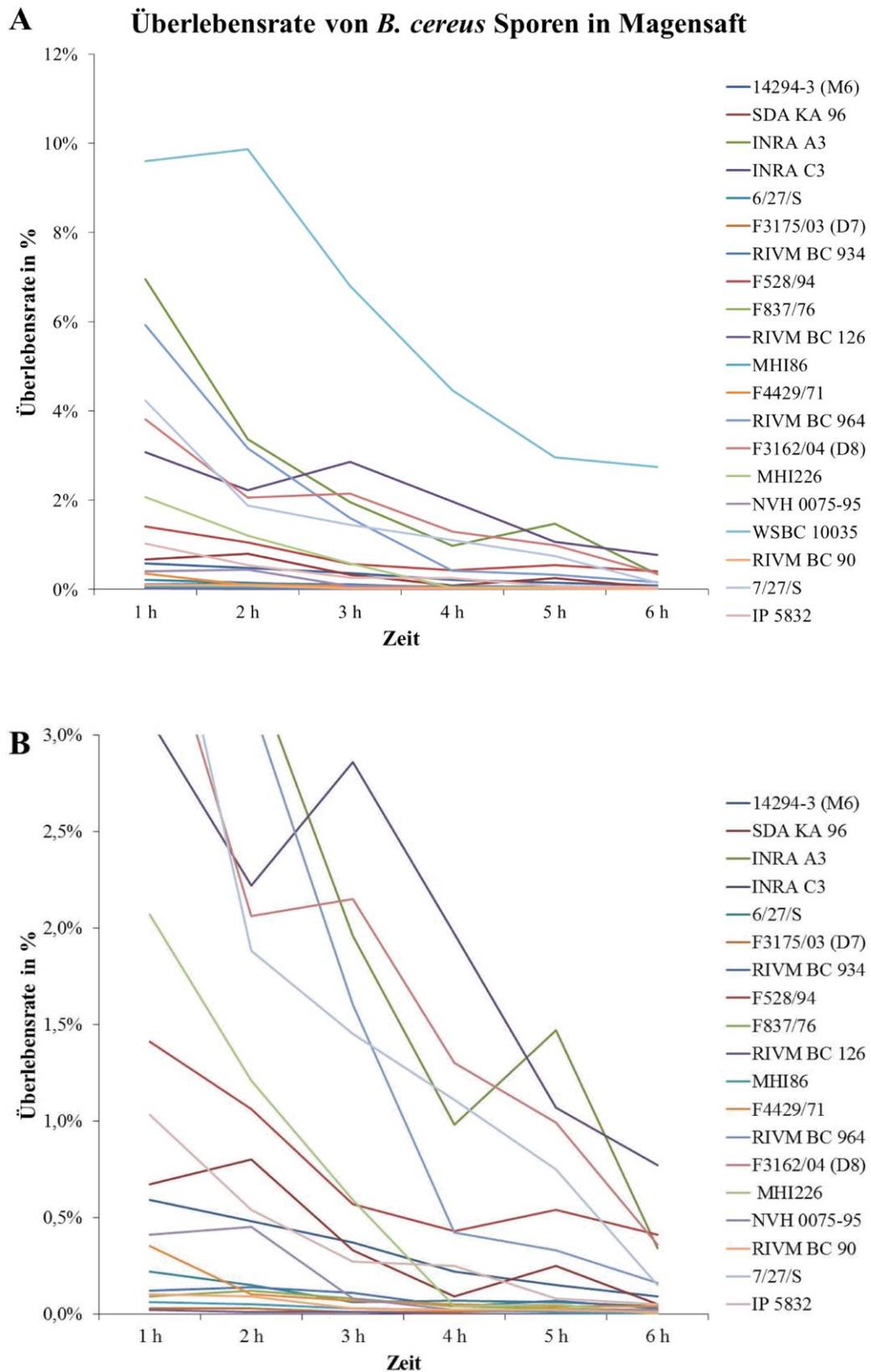


Abbildung 8: Überlebensrate von *B. cereus* Sporen in reinem Magensaft. Berechnet wurde der prozentuale Anteil überlebender Sporen in Bezug zum Inokulum. **A.** Dargestellt sind alle 20 Stämme. Auf die Darstellung des 100 %-Werts wurde auf Grund der besseren Übersicht verzichtet. **B.** Zum besseren Vergleich niedriger Werte wurde die y-Achse verkleinert und Stamm WSBC 10035 entfernt.

2.2. Einfluss der Lebensmittelmatrix auf das Überleben von Sporen im Magenmilieu

Im nächsten Schritt wurde die Auswirkung von Lebensmitteln auf die Überlebensfähigkeit der Sporen in Magensaft getestet. Basierend auf den Ergebnissen von 2.1. wurden repräsentativ folgende sechs Stämme mit hoher, mittlerer und niedriger Überlebensrate ausgewählt: WSBC 10035 (hohe Überlebensrate), der Hbl/Nhe-Referenzstamm F837/76 (mittlere Überlebensrate) mit dem zugehörigen schwach toxischen Stamm F528/94, der Nhe-Referenzstamm NVH 0075-95 (niedrige Überlebensrate) mit dem zugehörigen schwach toxischen Stamm MHI226 sowie der probiotische Stamm IP 5832. Die Lebensmittelmatrix bestand ausschließlich aus Milch und Milchprodukten (siehe III.2.5.2.). Größtenteils wurden UHT-Produkte verwendet. Außerdem wurden die Lebensmittel vor Versuchsbeginn einer mikrobiologischen Untersuchung unterzogen, um Kontaminationen zu vermeiden. Bei keinem der verwendeten Produkte konnte *B. cereus* nachgewiesen werden. Um festzustellen, ob auch das MHD eine Auswirkung auf das Überleben der Sporen hat, wurde ein Lebensmittel vor und nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums getestet. Verwendet wurde Mascarpone, der allgemein als schnell verderbliches Lebensmittel gilt. Mascarpone I war zum Versuchszeitpunkt bereits sechs Tage über dem Verfallsdatum. Mascarpone II hatte das MHD nicht überschritten.

Generell war die Überlebensfähigkeit aller Stämme abhängig von der Verweildauer im Magenmilieu. Auch der Einfluss der eingesetzten Lebensmittel war stammspezifisch unterschiedlich. Über die gesamte Versuchsdauer zeigte erneut, unabhängig vom Lebensmittel, Stamm WSBC 10035 die besten Überlebensraten (Abb. 9E). Auch der probiotische Stamm IP 5832 (Abb. 9F) sowie F837/76 (Abb. 9A) erwiesen sich teilweise noch sehr säurestabil. Am wenigsten von den Lebensmitteln geschützt wurde der Nhe-Referenzstamm NVH 0075-95 (Abb. 9C). Die Überlebensraten glichen dabei denen der Negativkontrolle (reiner Magensaft). Eine ähnlich schlechte Widerstandsfähigkeit gegenüber den Magenbedingungen hatte auch der zugehörige schwache Toxinproduzent MHI226 (Abb. 9D). Vergleicht man die Wirkung der einzelnen Lebensmittel auf die verschiedenen Stämme (Abb. 10), so schützte die Milch mit 1,5 % Fett die Sporen nach einer Stunde im Durchschnitt am besten. Nach 6 h jedoch waren die Überlebensraten in Mascarpone I besser. Während der gesamten

Versuchsdauer hatte Folgemilch den geringsten Einfluss auf das Überleben der Sporen. Auch lactosefreie Milch und Milchreis schützten in den meisten Fällen nur wenig. Hier ähnelten die Werte denen der Negativkontrolle oder lagen z. T. noch darunter. Vergleicht man die Überlebensraten aller sechs Stämme, so war besonders auffallend, dass drei Stämme (F837/76, IP 5832 und WSBC 10035) teilweise Werte über 100 % erreichten. Besonders hervorstechend war dies bei Stamm WSBC 10035. Dieser erreichte Werte bis zu 1000 % und fiel nur bei zwei Lebensmitteln (Folgemilch und lactosefreie Milch) unter die 100 %-Marke.

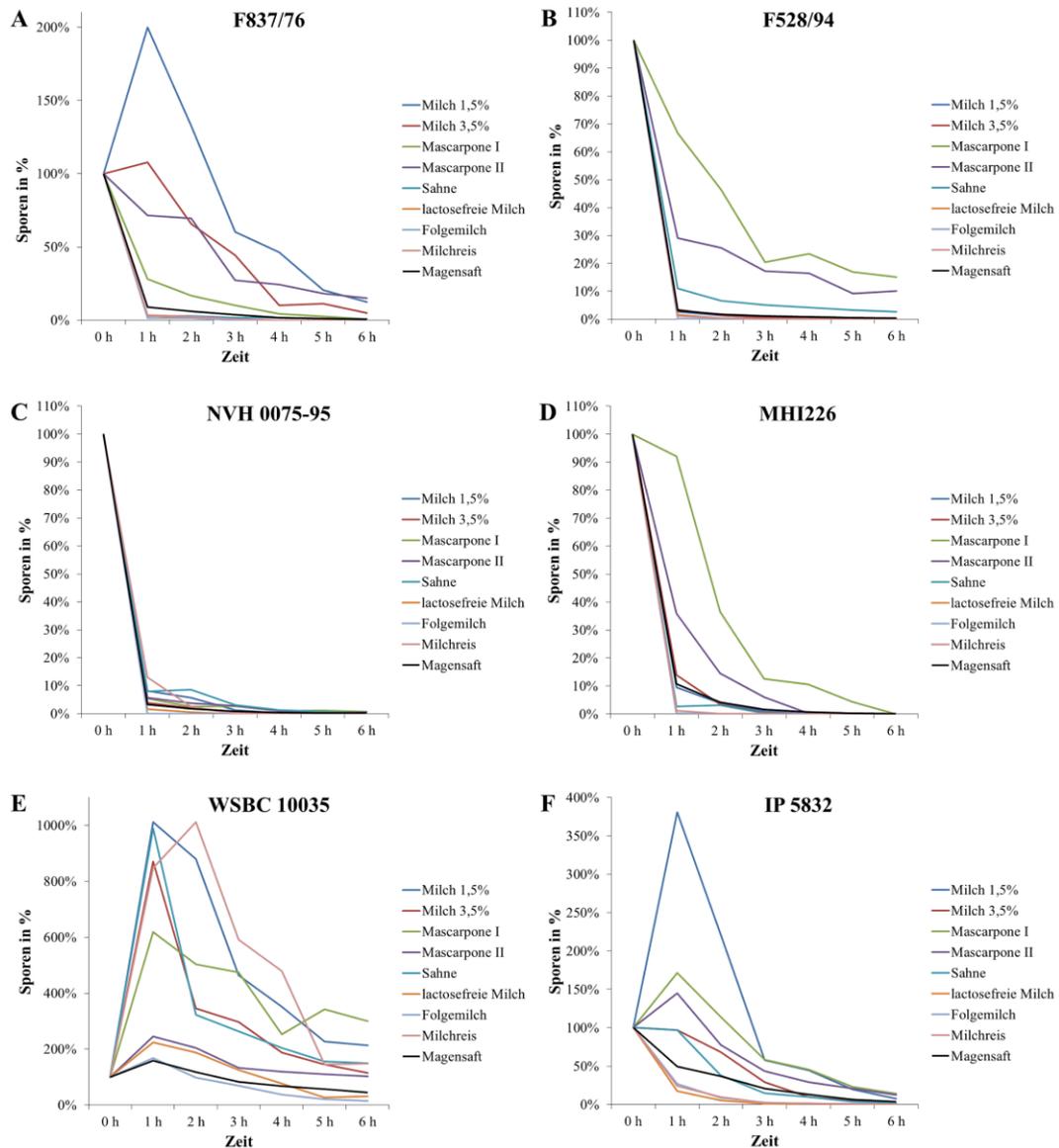


Abbildung 9: Überlebensraten von *B. cereus* Sporen in Magensaft mit Lebensmitteln. Eingesetzt wurden die Stämme F837/76 (A), F528/94 (B), NVH 0075-95 (C), MHI226 (D), WSBC 10035 (E) und IP 5832 (F). Alle Stämme wurden in Magensaft zusammen mit Milch (1,5 und 3,5 % Fett), Mascarpone, Sahne, lactosefreier Milch, Folgemilch und Milchreis getestet. Sporen in reinem Magensaft dienten als Kontrolle (schwarze Linie). Dargestellt ist die prozentuale Anzahl überlebender Sporen in Bezug zum Inokulum.

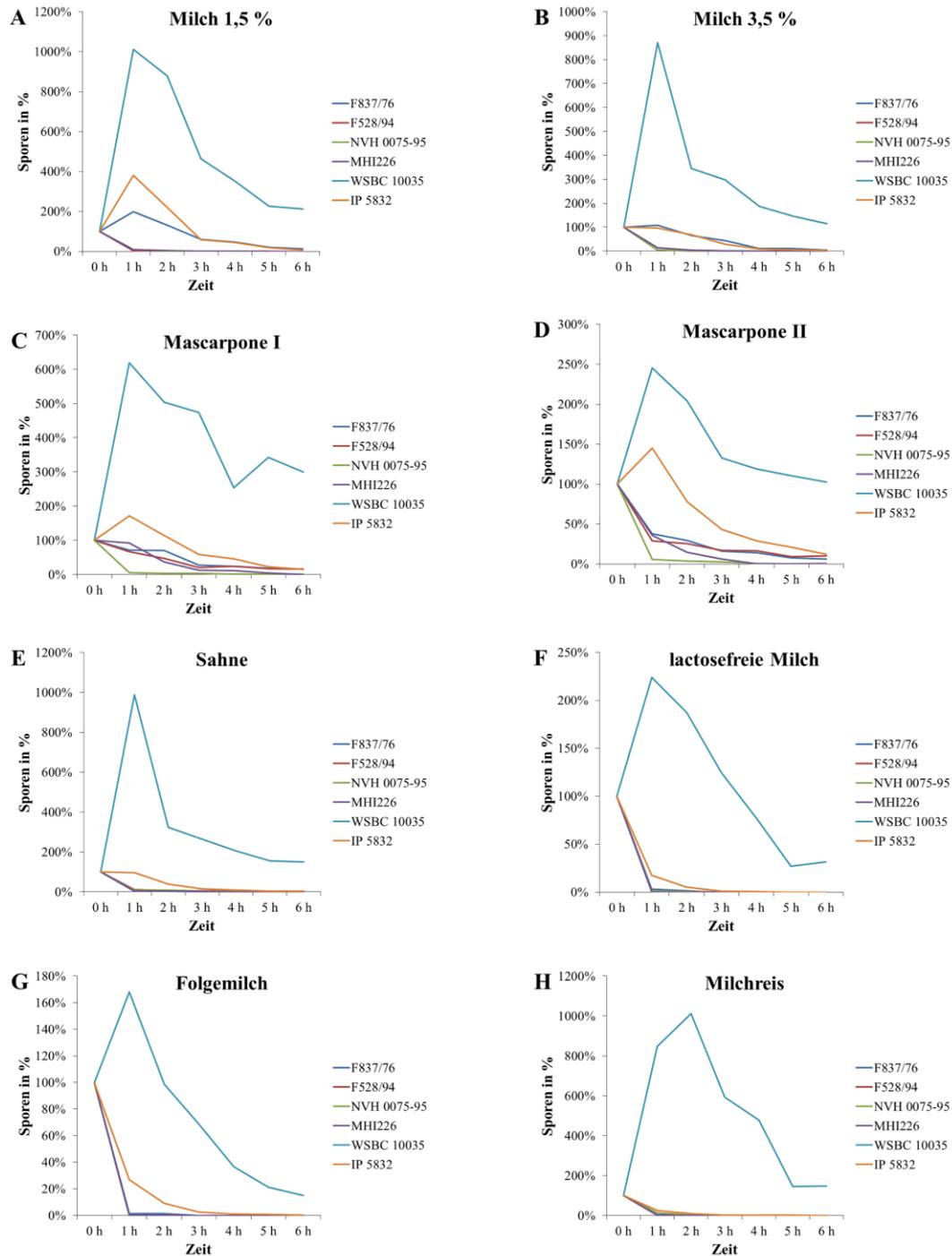


Abbildung 10: Wirkung von Milch 1,5 % Fett (A), Milch 3,5 % Fett (B), Mascarpone I (C), Mascarpone II (D), Sahne (E), lactosefreier Milch (F), Folgemilch (G) und Milchreis (H) auf das Überleben von *B. cereus* Sporen in Magensaft. Dargestellt ist die Überlebensrate der getesteten Stämme in Prozent im Vergleich zum Inokulum.

2.2.1. Auftreten einer phänotypischen Besonderheit bei WSBC 10035

Stamm WSBC 10035 zeichnete sich durch ungewöhnlich hohe Koloniezahlen in Magensaft und Lebensmitteln (bis zu 1000 %) aus (vgl. 2.2.). Außerdem konnte eine weitere Besonderheit beobachtet werden. Nach Ausplattieren der Verdünnungsreihen auf CGY-Agar zeigten sich zwei unterschiedliche Koloniegrößen. Neben der gewohnten Größe fanden sich sehr kleine, punktförmige Kolonien, die sich jedoch makroskopisch im Aussehen nicht unterschieden (Abb. 11). Außerdem glich sich die Koloniegröße nach längerer Bebrütungszeit (48 h) wieder an. Um eine Kontamination der Sporensuspension auszuschließen, wurden große und kleine Kolonien isoliert und in der mikrobiologischen Abteilung des Lehrstuhls untersucht. Es zeigte sich, dass keine Besiedelung mit einem anderen Keim stattgefunden hatte und es sich in beiden Fällen um *B. cereus* handelte. Ein genetischer Abgleich wurde nicht durchgeführt. Um zu klären, ob das Auftreten dieses Phänomens mit den überdurchschnittlich guten Überlebensraten während der simulierten Magenpassage in Zusammenhang stand, wurden CGY-Kulturen von großen und kleinen Kolonien angelegt, zellfreie Überstände gewonnen und Toxinproduktion und Zytotoxizität getestet.

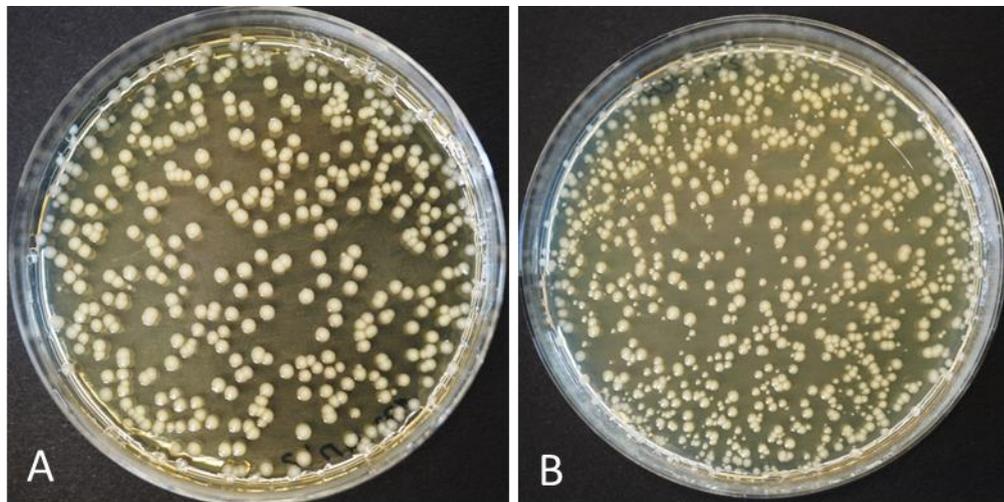


Abbildung 11: WSBC 10035 auf CGY-Agar. A. Gleichmäßige Kolonien nach Bebrütung bei 32 °C über Nacht. B. WSBC 10035 mit unterschiedlich großen Kolonien nach der künstlichen Magenpassage.

2.2.1.1. Enzymimmunoassay

Nach der Herstellung von zellfreien Kulturüberständen wurde zunächst die Toxinproduktion bestimmt. Da Stamm WSBC 10035 Hbl-negativ ist, wurden Sandwich-EIAs für die Toxinkomponenten NheB und NheA durchgeführt. Der reziproke Titer für NheB lag für beide Kolonieformen über 10000, was einer sehr hohen Toxinproduktion entspricht. Die „kleinen Kolonien“ erreichten jedoch einen höheren Wert als die „großen Kolonien“. Ebenso verhielt es sich im EIA für NheA. Auch hier produzierten die „kleinen Kolonien“ mehr Toxin (Abb. 12).

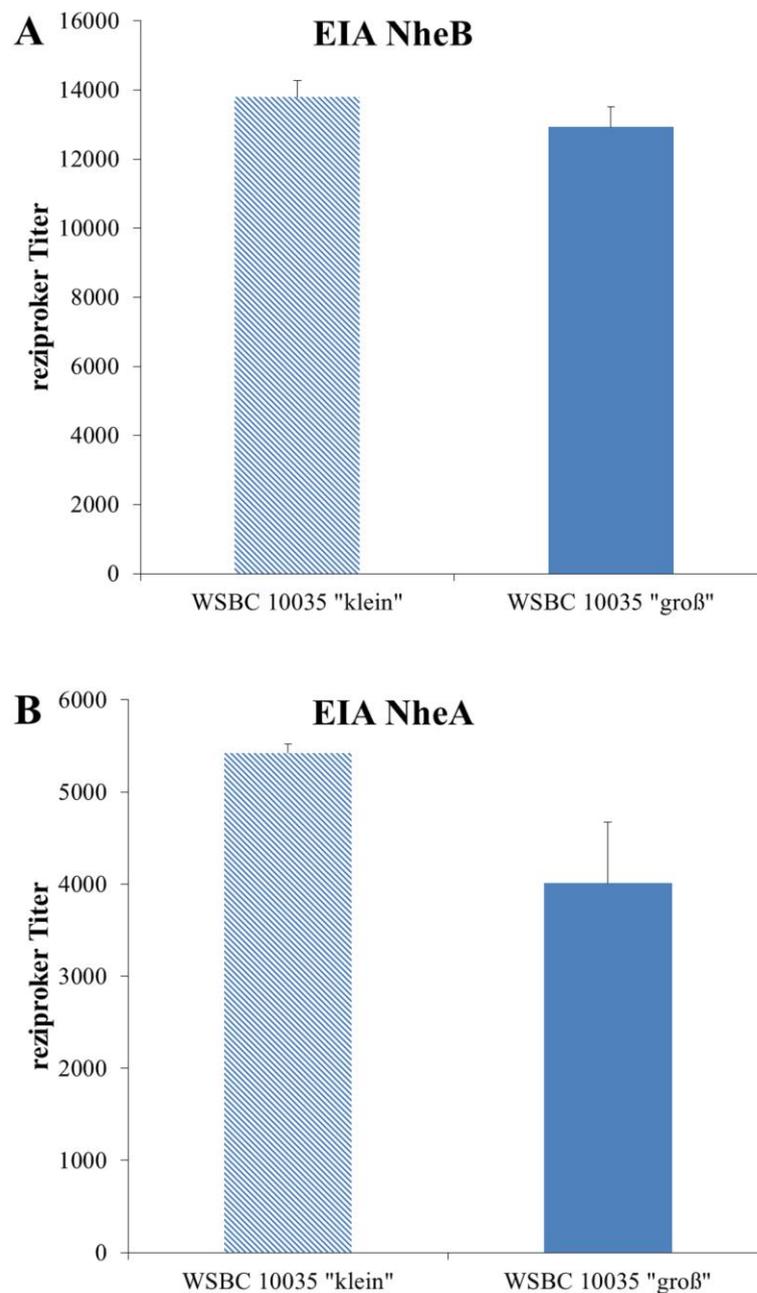


Abbildung 12: Produktion von NheB (A) und NheA (B) beider Kolonievarianten von WSBC 10035.

2.2.1.2. WST-1-Bioassay

Im Weiteren wurde die zytotoxische Aktivität der Kulturüberstände von WSBC 10035 „klein“ und „groß“ auf CaCo-2-Zellen im WST-1-Bioassay ermittelt. Der reziproke Titer der „kleinen Kolonien“ war gegenüber dem der „großen Kolonien“ erhöht (Abb. 13). Im Stammset wurden die reziproken Zytotoxizitätstiter auf Vero-Zellen in gering (unter 400), mittel (400-800) und hoch (über 800) eingeteilt. Dabei ergab sich für Stamm WSBC 10035 eine hohe Zytotoxizität (vgl. Tab. 7). Wendet man diese Einteilung hier an, so waren die „kleinen Kolonien“ stark toxisch. Die „großen Kolonien“ erreichten nur noch eine mittlere Zytotoxizität.

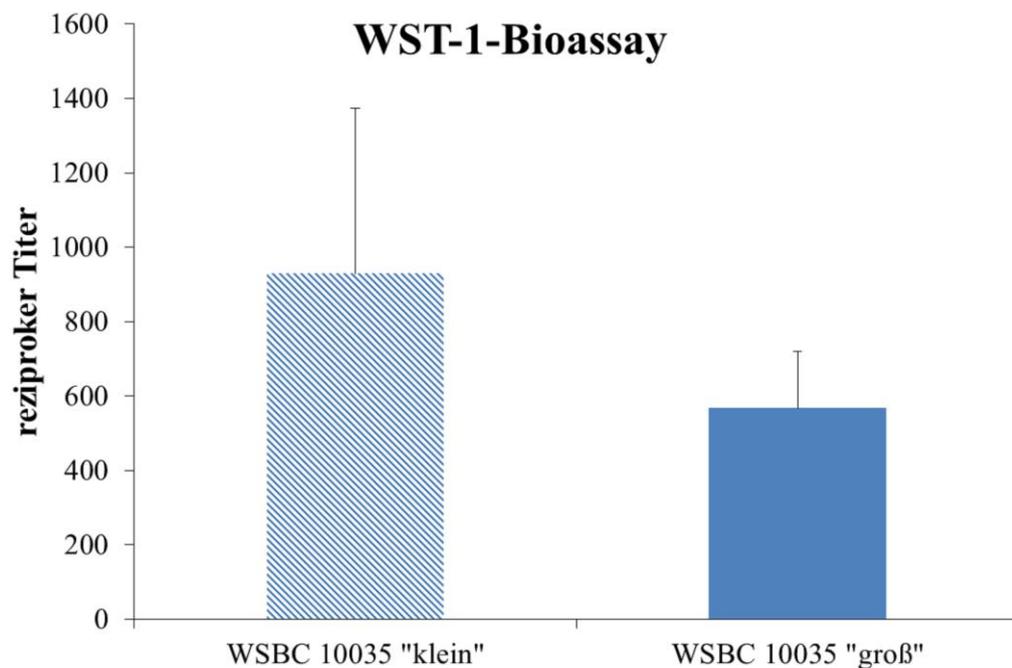


Abbildung 13: Zytotoxizität beider Kolonievarianten von WSBC 10035. Die zytotoxische Wirkung wurde mittels WST-1-Bioassay auf CaCo-2-Zellen ermittelt. Dargestellt sind die reziproken Titer.

3. Adhäsionsfähigkeit von *B. cereus* an CaCo-2-Zellen

Nach Überleben der Magenpassage ist der nächste physiologische Abschnitt, der von den Bakterien erreicht wird, der Dünndarm. Von anderen, diarrhö-assoziierten Erregern (*Escherichia (E.) coli*, *S. aureus*, Salmonellen) weiß man, dass viele Virulenzfaktoren am Darmepithel angreifen (Pizarro-Cerda *et al.*, 2006; Stones *et al.*, 2016). Eine wichtige Rolle spielt dabei die Fähigkeit der Bakterien, sich zunächst an das Epithel anzuheften. Ramarao *et al.* (2006) konnten bereits nachweisen, dass auch *B. cereus* in der Lage ist, an Epithelzellen zu binden. Ob es sich dabei um einen Mechanismus handelt, mit dessen Hilfe man pathogene von apathogenen Stämmen unterscheiden kann, war ein weiterer Gegenstand dieser Studie. Da nicht bekannt ist, ob die Auskeimung der Sporen im Lumen oder an der Zielzelle stattfindet, wurde der Adhäsionsassay mit Sporen und vegetativen Zellen durchgeführt.

3.1. Adhäsion von *B. cereus* Sporen an CaCo-2-Zellen

Zur Bestimmung der Sporenadhäsion wurden ausdifferenzierte CaCo-2-Zellen mit *B. cereus* Sporen (MOI 1) für eine halbe Stunde inkubiert und die erhitzten Proben ausplattiert. Abbildung 14A zeigt den Anteil adhärerter Sporen in Prozent im Vergleich zum Inokulum. Absolute Werte sind im Anhang in Tabelle 11A dargestellt. Wie in Abbildung 14A ersichtlich ist, konnten alle 20 Stämme an CaCo-2-Zellen adhärieren. Die Stämme WSBC 10035 und INRA C3, beides starke Toxinproduzenten isoliert aus pasteurisierten Lebensmitteln, adhärten mit über 2 % am besten. Auch der probiotische Stamm IP 5832 band mit 1,37 % im Vergleich zu den übrigen Stämmen noch gut an die Zielzellen. Die schlechteste Adhäsionsrate zeigte SDA KA96 (0,04 %). Die 16 übrigen Stämme wiesen niedrige Werte zwischen 0,15 und 1,03 % auf. Auch bei diesem Versuch fanden sich neben stammspezifischen Unterschieden keine weiteren Zusammenhänge innerhalb der Einteilung des Stammsets.

3.2. Adhäsion von vegetativen *B. cereus* an CaCo-2-Zellen

Für die Adhäsion von vegetativen *B. cereus* wurde das Inokulum auf eine MOI von 10 eingestellt und die Suspension für eine Stunde auf den CaCo-2-Zellen belassen, bevor die Ausplattierung auf CGY erfolgte. Bei dieser Versuchsanordnung war es erneut allen 20 Stämmen möglich an die CaCo-2-Zellen zu binden (Abb. 14B). Am besten adhärte Stamm F528/94 (6,11 %),

gefolgt von 14294-3 (M6), RIVM BC 964 und INRA C3 (> 3 %). Die Stämme SDA KA96, F4429/71 und RIVM BC 90 adhärten nur wenig (< 1%). Mit 0,34 % adhärte F3162/04 (D8) am schlechtesten an die Zellen. Stark und schwach adhärenente Stämme ließen sich auch hier nicht anhand ihres genetischen Toxinprofils oder ihres Ursprungs (Lebensmittel oder Vergiftungsfall) einteilen.

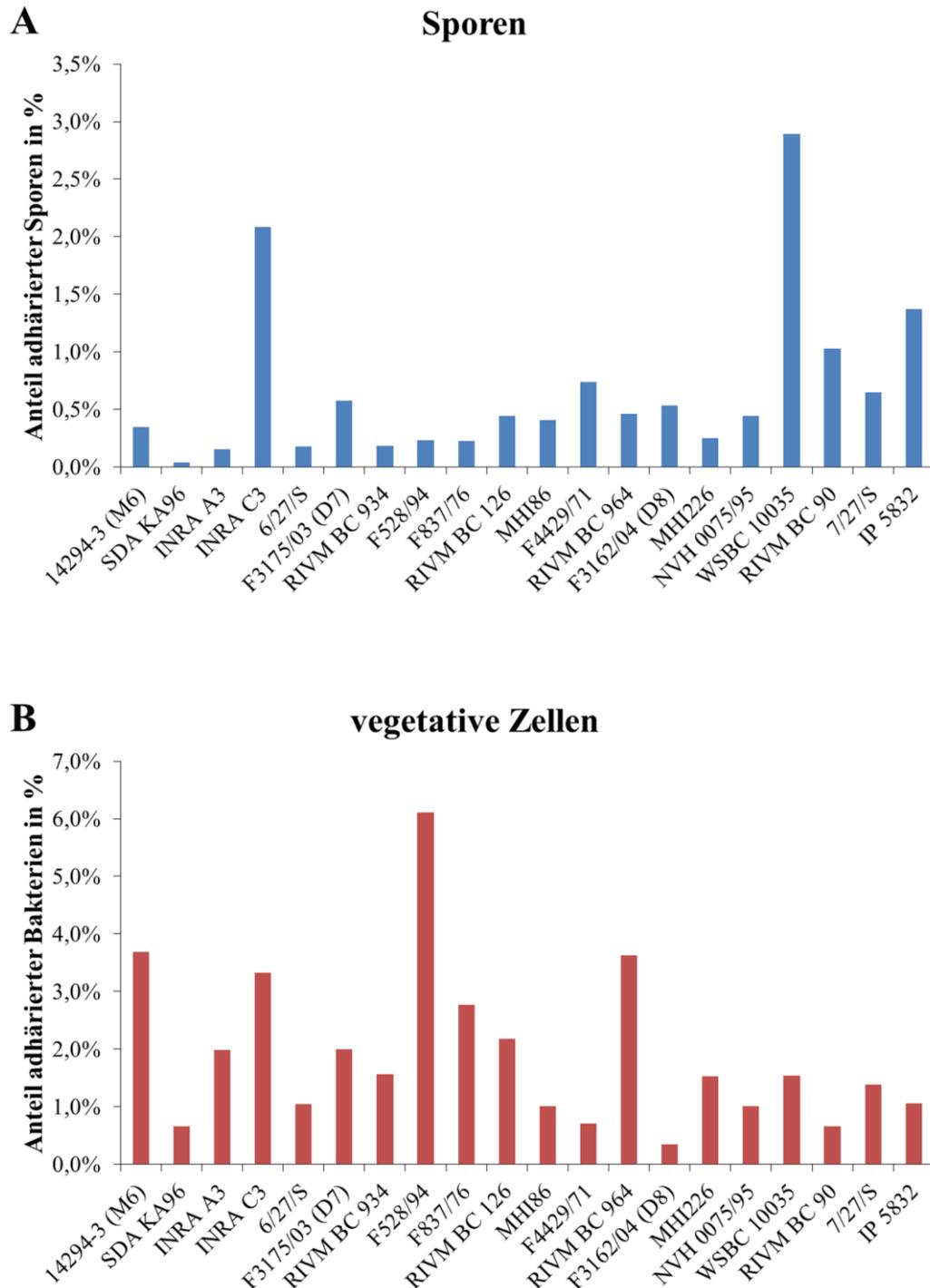


Abbildung 14: Adhäsionsfähigkeit von *B. cereus* an CaCo-2-Zellen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil adhärterter Sporen (A) bzw. vegetativer Zellen (B) im Vergleich zum Inokulum.

Vergleichend kann festgestellt werden, dass alle 20 Stämme, als Sporen oder in vegetativer Form, an CaCo-2-Zellen adhäreren können. Mit Ausnahme der Stämme F4429/71, F3162/04 (D8), WSBC 10035, RIVM BC 90 und IP 5832 banden Sporen im Durchschnitt schlechter an die Zellen als die vegetative Form (Abb. 15A). Hierbei ist allerdings die unterschiedlich eingesetzte MOI zu beachten. Auffallend ist auch, dass die in vegetativer Form am besten adhärerten Stämme als Sporen nur Werte von unter 0,5 % erreichten. Lediglich INRA C3 zeigte hier ähnliche Adhäsionsraten. Ein Muster nach der vorgenommenen Einteilung bezüglich Toxinprofil, Toxizität und Ursprung der Stämme war nicht erkennbar.

Bildet man den Mittelwert aus je allen stark und schwach toxischen Stämmen bzw. aus den aus Lebensmitteln oder Krankheitsfällen isolierten Stämmen, führte dies bei den vegetativen Zellen zu einem ähnlichen Wert (zwischen 1,9 und 1,99 %) (Abb. 15B). Die aus dem Sporenversuch gebildeten Mittelwerte jedoch sind für die stark toxischen Stämme höher (0,85 %) als für die schwach toxischen (0,37 %) (Abb. 15B). Auch bei der Herkunft fanden sich hier unterschiedliche Werte. Ein Mittelwert von 0,75 % ergab sich bei den aus Lebensmitteln isolierten Stämmen, während die Adhäsionsrate bei den aus Vergiftungsfällen isolierten Stämmen nur bei 0,48 % lag (Abb. 15B).

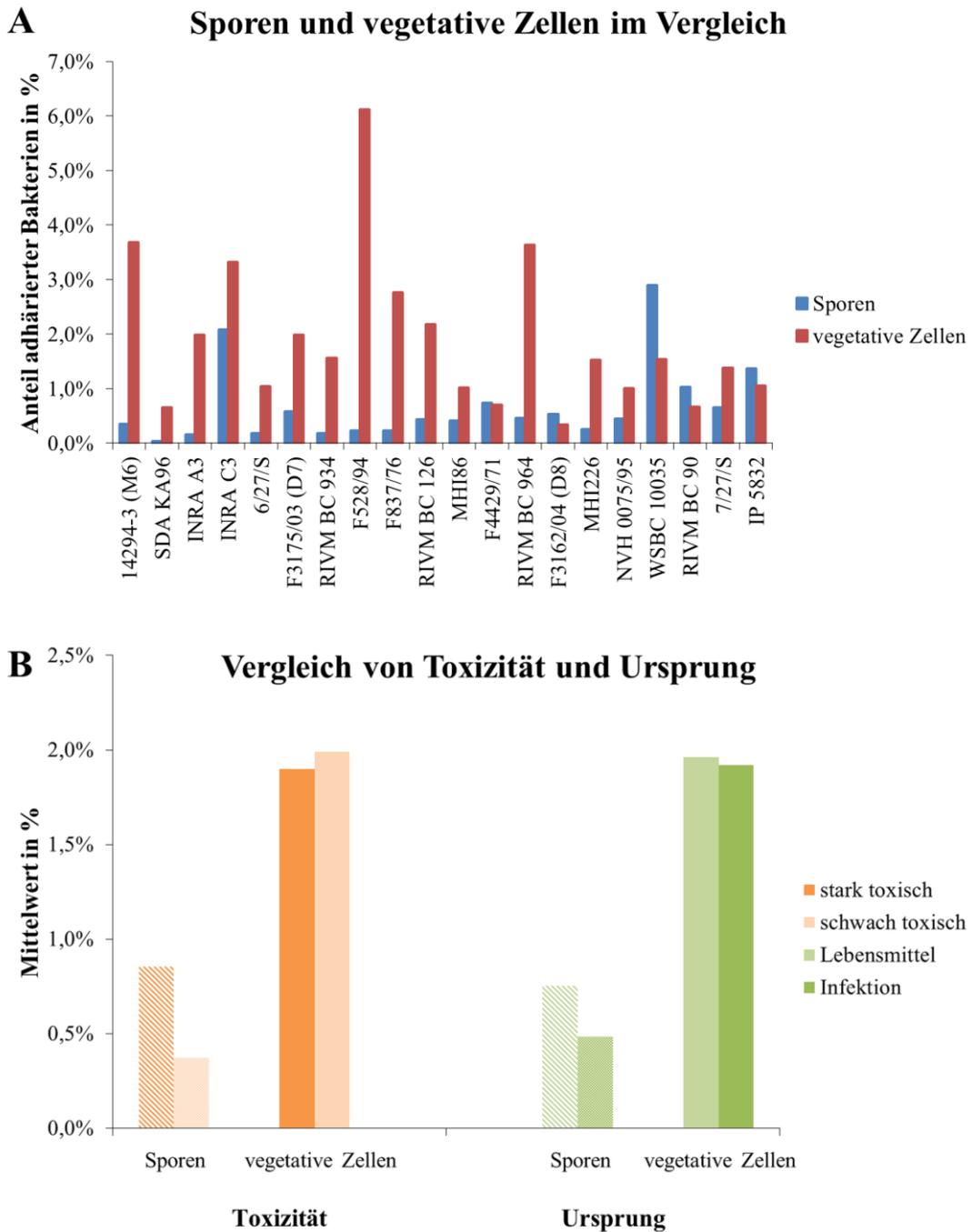


Abbildung 15: Unterschiede in der Adhäsionsfähigkeit. **A.** Adhäsion vegetativer Zellen und Sporen im Vergleich. Dargestellt ist der Anteil adhärrierter Bakterien in %. Das Adhäsionsvermögen vegetativer Zellen wurde mit MOI 10 untersucht, Sporen wurden mit MOI 1 getestet. **B.** Direkter Vergleich von Toxizität und Ursprung zwischen Sporen und vegetativen Zellen. Berechnet wurde der Mittelwert aus dem prozentualen Anteil adhärrierter Bakterien aller stark und schwach toxischen Stämme (orange) bzw. aller aus Lebensmitteln und Vergiftungsfällen isolierten Stämme (grün). Die Ergebnisse der Adhäsion mit Sporen sind schraffiert dargestellt.

4. Einfluss verschiedener Lebensmittel auf die toxische Aktivität von *B. cereus* Kulturüberständen

Um zu testen, ob sich Lebensmittel, die bereits das Überleben von *B. cereus* Sporen in der Magenpassage beeinflussten, auch auf die zytotoxische Aktivität der Entertoxine auswirken, wurden zwei verschiedene Tests mit CaCo-2-Zellen eingesetzt. Die hochtoxischen Referenzstämme NVH 0075-95 (reiner Nhe-Produzent) und F837/76 (Nhe- und Hbl-Produzent) wurden verwendet. Zusätzlich erfolgte die Testung einer Mutante, die Nhe nicht sekretiert. Diese, im Rahmen dieser Arbeit verwendete Nhe-Mutante, wurde von Frau Dr. Kristina Schauer zur Verfügung gestellt (Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, unveröffentlichte Daten). Beim PI-Test findet eine sofortige Auswertung nach zeitnaher Zugabe von Kulturüberstand und PI statt. Die toxinbedingte Porenformung in der Zellmembran ermöglicht einen Einstrom von PI. Der fluoreszierende Farbstoff formt dabei Komplexe mit der Zell-DNA, welche photometrisch gemessen werden können. Im Gegensatz zum PI-Test werden im WST-1-Bioassay lebende Zellen nachgewiesen. Nach 22-stündiger Inkubation wird die Stoffwechselaktivität bestimmt, um damit die Toxinkonzentration zu ermitteln, bei der die Zellviabilität um 50 % reduziert ist. Der Einsatz von Lebensmitteln war auf Grund der Empfindlichkeit beider Testsysteme limitiert. In Vorversuchen wurden deshalb verschiedene Produkte geprüft und ggf. auf Lebensmitteleinzelkomponenten zurückgegriffen.

4.1. WST-1-Bioassay mit Lebensmitteln

Der zytotoxische Effekt von Kulturüberständen der Stämme NVH 0075-95 und F837/76 sowie der Nhe-Mutante auf CaCo-2-Zellen wurde im WST-1-Bioassay getestet. Als Lebensmittelmatrix wurde Milch (1,5 % und 3,5 % Fett), lactosefreie Milch und Folgemilch verwendet. Die übrigen, in der Magenpassage verwendeten Lebensmittel konnten hier nicht eingesetzt werden, da sie die Messung behinderten. In jedem Ansatz wurde der reine Kulturüberstand als Positivkontrolle mitgeführt. Durch den Zusatz der Lebensmittel konnte bei allen getesteten Überständen eine Verringerung des reziproken Titers im Vergleich zur Kontrolle erzielt werden. Am deutlichsten war dieser Effekt bei Stamm F837/76 zu beobachten, während er bei NVH 0075-95 am schwächsten war (Abb. 16B und A). Folgemilch schwächte die toxische Wirkung am stärksten ab. Der reziproke

Titer der Nhe-Mutante wurde dabei über die Hälfte reduziert (Abb. 16C). F837/76 war zusammen mit Folgemilch bei einem reziproken Titer von 7,3 überhaupt nicht mehr toxisch für die CaCo-2-Zellen. Die geringste Auswirkung auf die Zytotoxizität von F837/76 und der Nhe-Mutante hatte lactosefreie Milch. Stamm NVH 0075-95 wurde am wenigsten von Milch mit 3,5 % Fett beeinflusst.

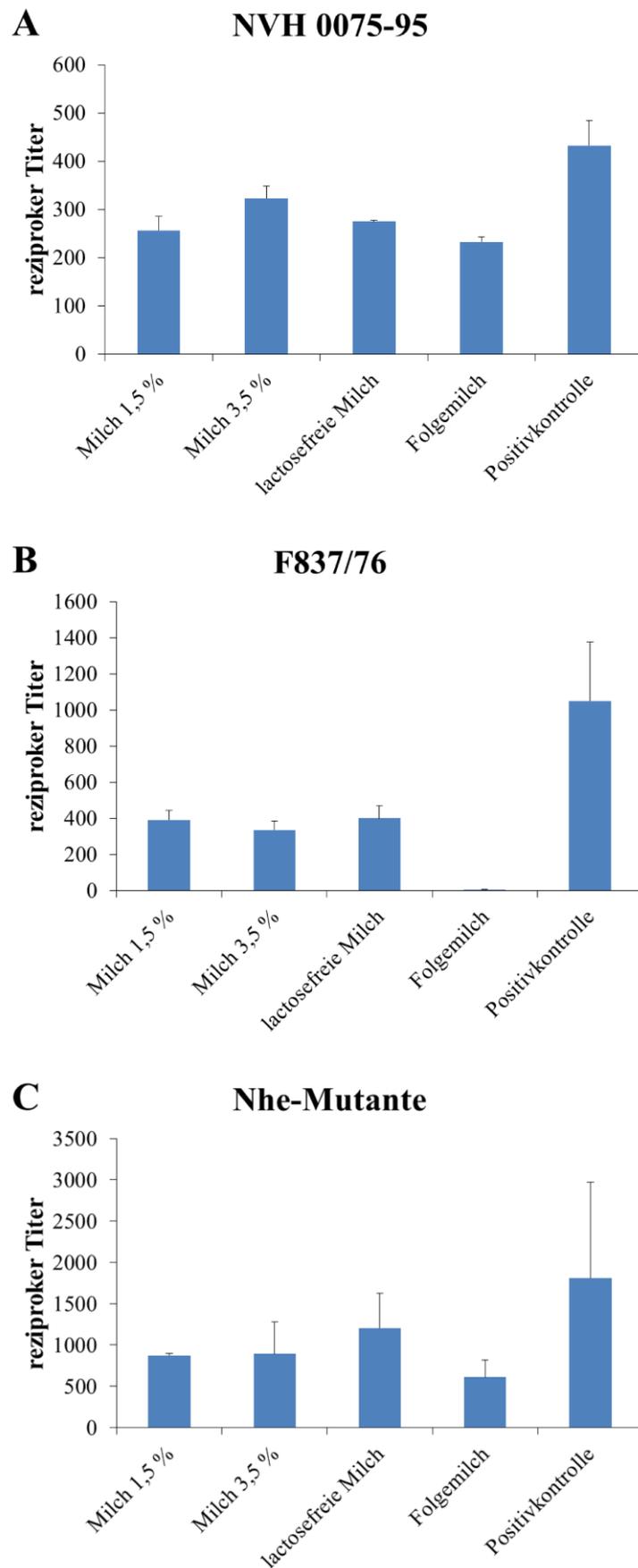


Abbildung 16: WST-1-Bioassay mit Lebensmitteln. Die zytotoxische Wirkung von NVH 0075-95 (A), F837/76 (B) und einer Nhe-Mutante (C) auf CaCo-2-Zellen wurde unter dem Einfluss von Milchprodukten getestet. Der Kulturüberstand wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Dargestellt sind die reziproken Titer.

4.2. Propidiumiodid-Test

Wie unter III.2.4.3. beschrieben, wurde zusätzlich ein modifizierter PI-Test durchgeführt. Die meisten Lebensmittel konnten hier nicht mehr getestet werden, da sie die fluoreszenz-basierte Auswertung des Tests behinderten. Jeder Stamm wurde zusammen mit Milch (1,5 % Fett) und den einzelnen Casein- und Molkenproteinfraktionen, sowie mit Lactoferrin getestet. Zur Kontrolle wurden Kulturüberstände und Lebensmittelkomponenten jeweils einzeln mitgeführt. Alle sieben getesteten Komponenten allein hatten keinen Einfluss auf die Messung oder die Zellen an sich, da kein Einstrom von PI gemessen werden konnte (roter Graph entlang der x-Achse) (Abb. 17-19). Vergleicht man die reinen Kulturüberstände untereinander (blauer Graph), so erreichten alle ähnliche Werte. Jedoch zeigte Stamm NVH 0075-95 eine geringfügig stärkere Fluoreszenz (Abb. 17-19).

Betrachtet man Stamm NVH 0075-95 in Abhängigkeit zu den Komponenten, fielen kaum Unterschiede auf (Abb. 17). Lediglich der Zusatz von β -Lactoglobulin ermöglichte eine steilere Fluoreszenzkurve als die Positivkontrolle, während die Einstromkurve mit dem Milchzusatz unter die des reinen Toxins fiel (Abb. 17F und A). Besonders deutlich war auch ein starker PI-Einstrom unter Zugabe von β -Lactoglobulin bei Stamm F837/76 zu beobachten (Abb. 18F). Die Fluoreszenzintensität wurde hier gegenüber der Toxinkontrolle mehr als verdoppelt. Auch der Zusatz von α -Lactalbumin, Lactoferrin, κ -Casein und Milch verstärkte den PI-Einstrom in die Zellen (Abb. 18E, G, D und A). Eine leicht schützende Wirkung gegen das Toxin konnte bei α - und β -Casein beobachtet werden (Abb. 18B und C). Der stärkste Einfluss der Lebensmittelkomponenten wurde bei der Nhe-Mutante sichtbar. Bis auf β -Lactoglobulin führten alle Einzelbestandteile sowie die Milch zu einem geringeren Einstrom von PI verglichen zur deutlichen Steigung der Toxinkontrolle (Abb. 19). Die Fluoreszenzintensität nahm unter dem Zusatz von Lactoferrin sogar um das Fünffache ab (Abb. 19G). Im Gegensatz zu den anderen beiden Stämmen war die Einstromgeschwindigkeit der Positivkontrolle und der Probe mit β -Lactoglobulin gleich (Abb. 19F).

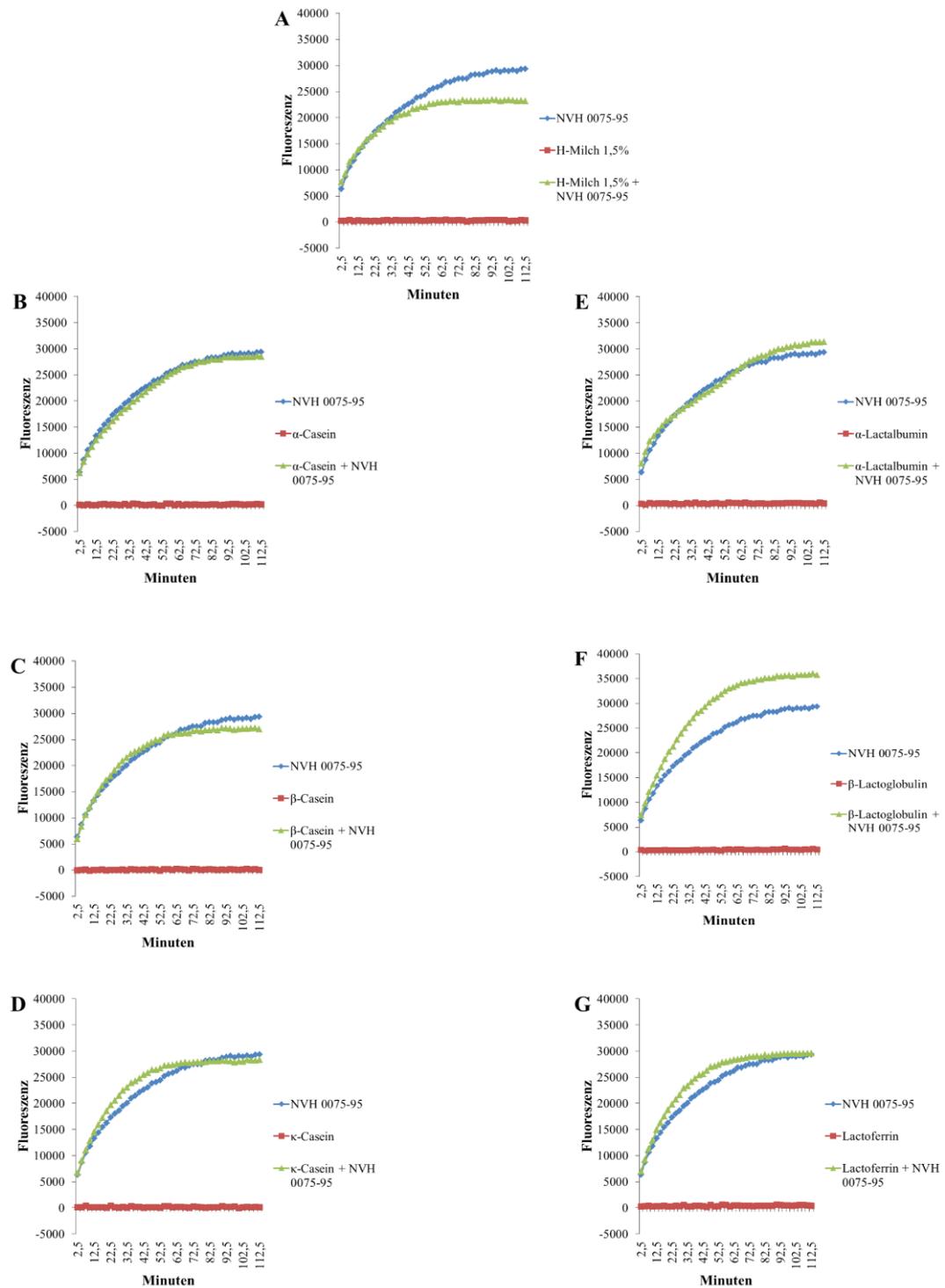


Abbildung 17: PI-Test auf CaCo-2-Zellen mit Kulturüberstand von NVH 0075-95. Der zytotoxische Effekt des Stammes wurde zusammen mit Milch (A) und den Lebensmitteleinzelkomponenten α -, β - und κ -Casein (B-D), α -Lactalbumin (E), β -Lactoglobulin (F) und Lactoferrin (G) getestet. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zeit. Als Positivkontrolle diente der reine Kulturüberstand (blaue Linie). Die Lebensmittelkomponente allein wurde als Negativkontrolle mitgeführt (rote Linie).

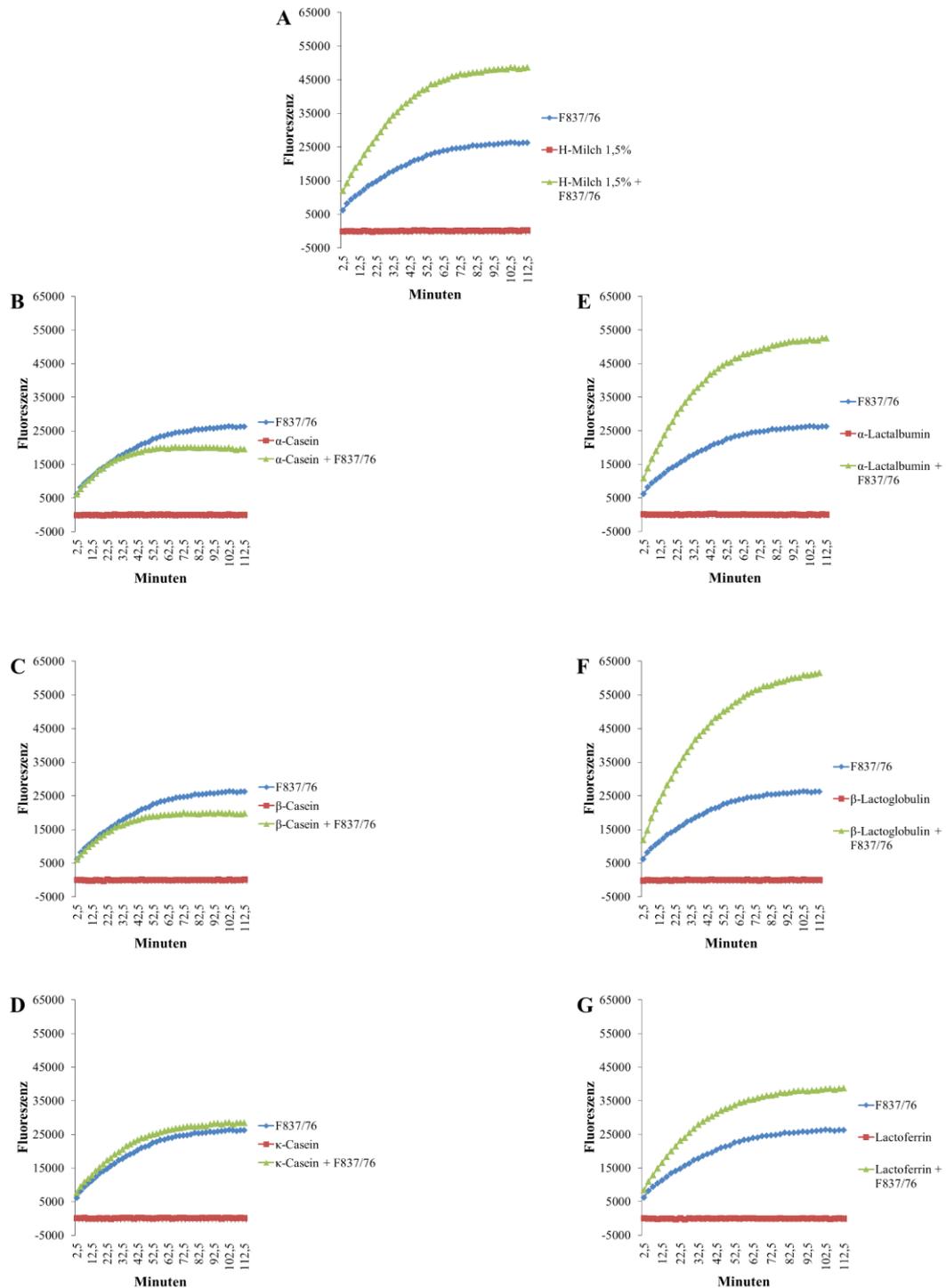


Abbildung 18: PI-Test auf CaCo-2-Zellen mit Kulturüberstand von F837/76. Der zytotoxische Effekt des Stammes wurde zusammen mit Milch (A) und den Lebensmitteleinzelkomponenten α -, β - und κ -Casein (B-D), α -Lactalbumin (E), β -Lactoglobulin (F) und Lactoferrin (G) getestet. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zeit. Als Positivkontrolle diente der reine Kulturüberstand (blaue Linie). Die Lebensmittelkomponente allein wurde als Negativkontrolle mitgeführt (rote Linie).

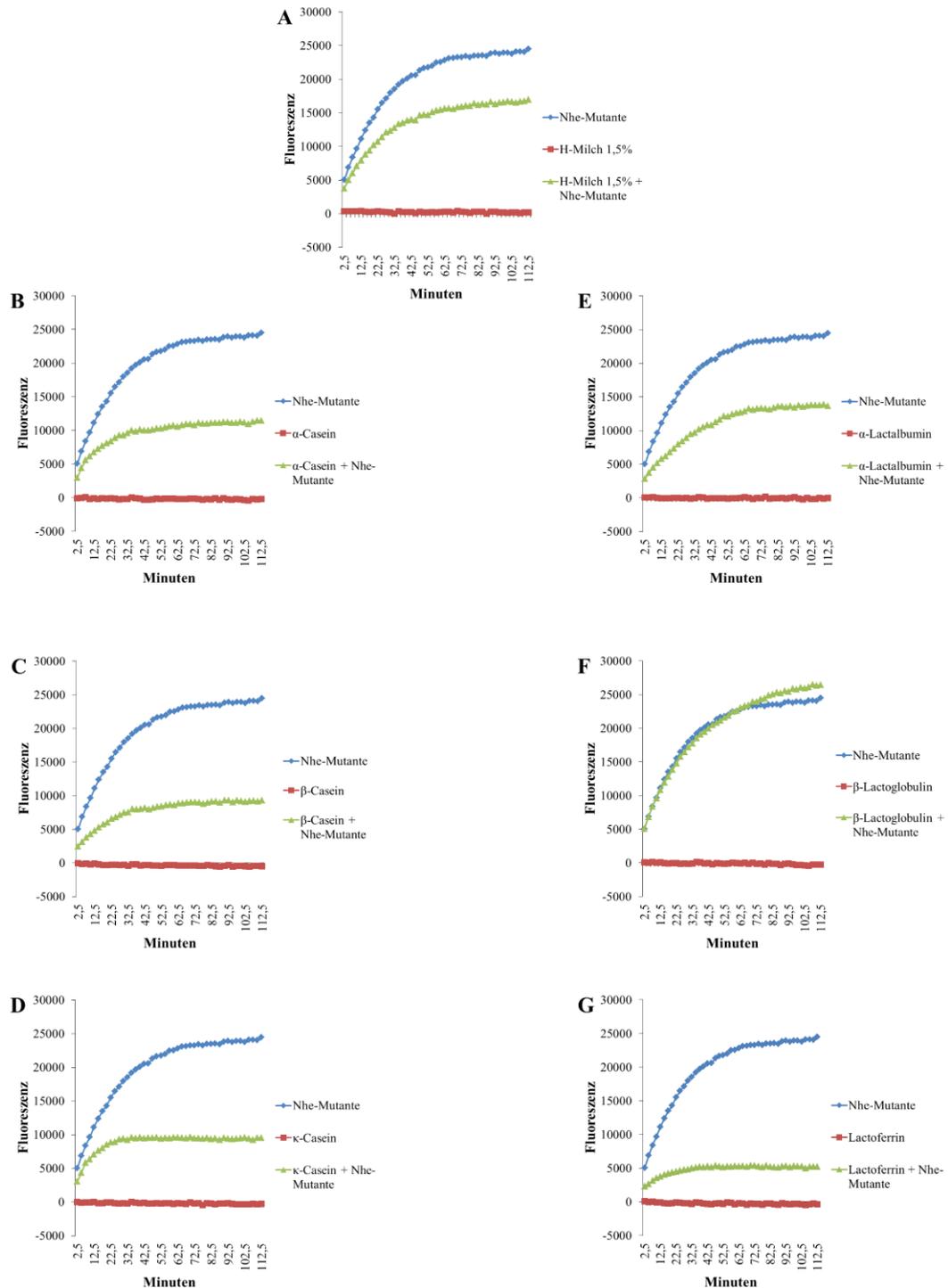


Abbildung 19: PI-Test auf CaCo-2-Zellen mit Kulturüberstand der Nhe-Mutante. Der zytotoxische Effekt des Stammes wurde zusammen mit Milch (A) und den Lebensmitteleinzelkomponenten α -, β - und κ -Casein (B-D), α -Lactalbumin (E), β -Lactoglobulin (F) und Lactoferrin (G) getestet. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zeit. Als Positivkontrolle diente der reine Kulturüberstand (blaue Linie). Die Lebensmittelkomponente allein wurde als Negativkontrolle mitgeführt (rote Linie).

4.3. Auswirkung der Lebensmitteleinzelkomponenten auf die toxische Aktivität der Nhe-Mutante im WST-1-Bioassay

Da die einzelnen Milchbestandteile den PI-Einstrom in CaCo-2-Zellen durch die Nhe-Mutante (nur Hbl) am stärksten behinderten, wurde diese Kombination im WST-1-Bioassay wiederholt (Abb. 20). Besonders hervorstechend war dabei, dass unter Zusatz von Lactoferrin der reziproke Titer um ein Fünffaches verringert werden konnte. Dies entspricht dem Ergebnis des PI-Tests.

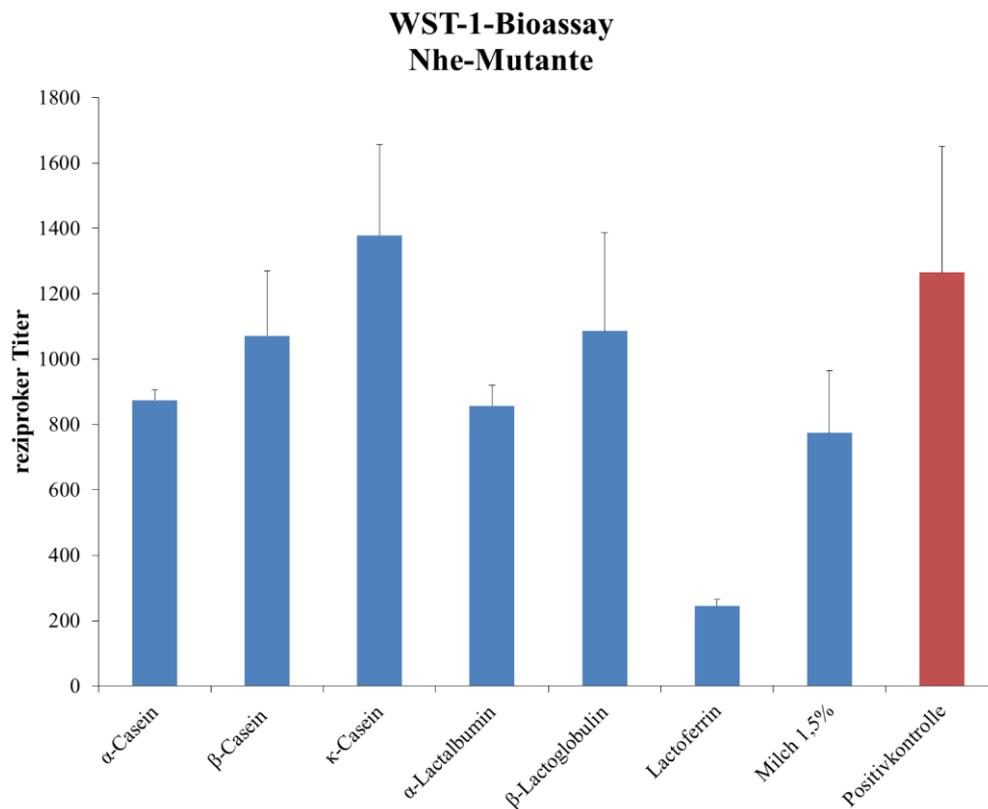


Abbildung 20: Einfluss von Lebensmitteleinzelkomponenten auf die Zytotoxizität der Nhe-Mutante. Der reziproke Zytotoxizitätstiter wurde mittels WST-1-Bioassay auf CaCo-2-Zellen bestimmt. Reiner Kulturüberstand diente zur Kontrolle.

4.4. Auswirkung der Lebensmitteleinzelkomponenten auf das Dreikomponententoxin Hbl

Ob die Lebensmittelkomponenten eine direkte Auswirkung auf die Toxine haben können, wurde, auf Grund der Resultate aus 4.2. und 4.3., für die Nhe-Mutante ermittelt. Die Titerbestimmung erfolgte für alle drei Komponenten des Hbl-Komplexes mittels EIAs. Analog zum Einsatz der Milchkomponenten im WST-1-Bioassay wurden sie in diese Assays integriert. Kulturüberstand und Lebensmittelkomponenten wurden zusammen bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert und erst dann als serielle Verdünnungsreihen auf die Mikrotiterplatten aufgetragen.

Die reziproken Titer der Komponenten L2 und B erreichten unter Zusatz von β -Lactoglobulin ein Maximum (Abb. 21A und B). Eine Steigerung der Hbl L2-Titer konnte zudem mit α -Lactalbumin und Lactoferrin nachgewiesen werden (Abb. 21A). Einen reduzierten Nachweis von L2 und B bewirkte κ -Casein. Beachtlich ist das Ergebnis des indirekten EIAs der Komponente L1 (Abb. 21C). Nur die Positivkontrolle und der mit α -Lactalbumin inkubierte Überstand führten zum Nachweis der Toxinkomponente. Unter Zusatz der übrigen Lebensmittelkomponenten konnte kein Hbl L1 mehr nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Lebensmittelkomponenten an L1 binden und somit eine Erkennung durch den L1-spezifischen mAk verhindern. Ebenso könnten sie durch diese Bindung die zytotoxische Aktivität von Hbl beeinflussen.

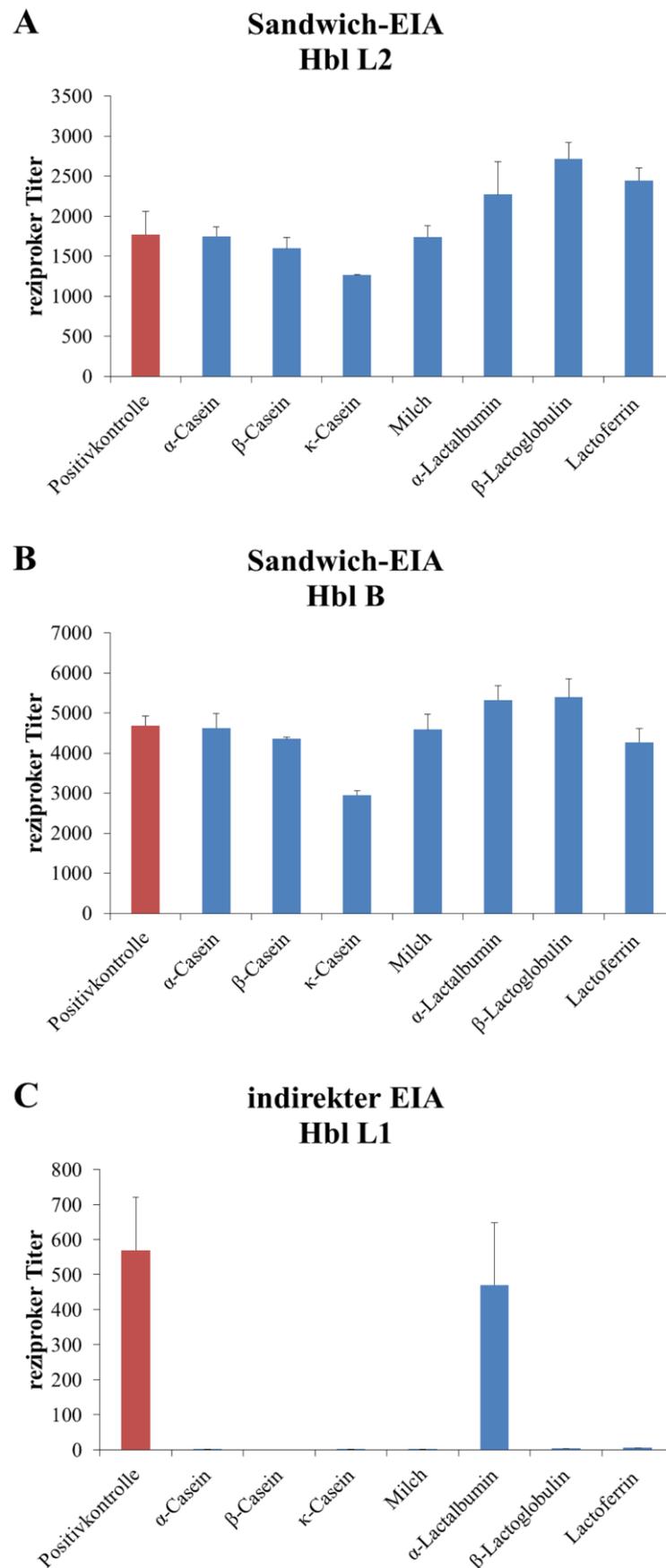


Abbildung 21: Toxinproduktion der Nhe-Mutante in Abhängigkeit von Lebensmitteleinzelkomponenten. Dargestellt sind die reziproken Toxintiter. Für die Hbl-Komponenten L2 und B wurden Sandwich-EIAs durchgeführt (A und B), Hbl L1 (C) wurde im indirekten EIA ermittelt.

5. Erweiterung des Stammsets um genetische Marker

Da im bestehenden Stammsset bisher nur genetische Informationen über die wichtigsten Toxine enthalten waren, wurde es hinsichtlich weiterer Virulenz- und Adhäsionsfaktoren ergänzt (Tab. 8). Mit Hilfe des Programms MAUVE wurden Gesamtgenomalignments der 20 Stämme mit dem annotierten Referenzstamm F837/76 erstellt (Böhm *et al.*, 2016). Die Sequenz des gesuchten Gens wurde aus dem entsprechenden Contig ermittelt. Die Sequenzen von putativen Adhäsionsfaktoren (Sanchez *et al.*, 2009) sowie von ausgewählten Flagellengenen - für *flaA* (Flagellin) sowie für *flhA* und *flhF* wurde bereits eine Beteiligung an Adhäsion bzw. Motilität beschrieben (Ghelardi *et al.*, 2002; Ramarao *et al.*, 2006; Salvetti *et al.*, 2007) - wurden mittels clustal Ω verglichen und phylogenetische Stammbäume wurden erstellt. Es zeigte sich allerdings keine Korrelation mit stark oder schwach adhärenenten bzw. stark oder schwach motilen Stämmen (siehe Anhang).

6. Bewertung des Stammsets durch Kombination aller Ergebnisse

Momentan stehen keine Möglichkeiten zur Verfügung, um sicher zwischen enteropathogenen und apathogenen Stämmen zu unterscheiden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb verschiedene Faktoren untersucht, die die Virulenz von *B. cereus* näher bestimmen könnten. Diese Ergebnisse wurden mit den bestehenden Informationen des Stammsets kombiniert (Tab. 9). Ziel war es, mit Hilfe dieser Aufstellung eine Bewertung der Stämme hinsichtlich ihrer potentiellen Pathogenität zu ermöglichen.

Bereits im Stammset enthalten waren die Angaben zu Toxinproduktion und Zytotoxizität (Mohr, 2014; Jessberger *et al.*, 2015). In die Auswertung wurde die Toxinproduktion von NheB unter Laborbedingungen (6 h CGY) und unter simulierten Darmbedingungen (2 h RPMI) aufgenommen. Die zytotoxische Wirkung auf CaCo-2-Zellen wurde mittels WST-1-Bioassay ermittelt. Verwendet wurden dabei ebenfalls Überstände, die unter optimalen (6 h CGY) und unter darmähnlichen Bedingungen (6 h RPMI) gewonnen wurden. Die unterschiedlichen Zeitpunkte der simulierten Darmbedingungen führen darauf zurück, dass bei der Toxinproduktion in erster Linie der rasche Einstieg in die Produktion von Bedeutung ist und weniger die Gesamtkonzentration. Hinzu kam die Motilität bei 30 °C und 37 °C. Hier wurden die gemessenen Werte nach 24 h miteinbezogen. Auch die Adhäsionsfähigkeit wurde zur Auswertung berücksichtigt. Die Überlebensfähigkeit von Sporen unter simulierten Magenbedingungen war der letzte Parameter, der mitberechnet wurde. In diesem Fall eigneten sich die Werte nach einer Stunde am besten, weil Unterschiede zu diesem Zeitpunkt am deutlichsten ausfielen.

Da diese Kriterien ursprünglich unterschiedliche Einheiten (Titer, mm, Prozent, usw.) besitzen, mussten sie für die Analyse angeglichen werden. Daher wurde der beste bzw. stärkste Stamm jedes einzelnen Tests mit 100 % gleichgesetzt und die Werte der übrigen Stämme angepasst. Die Prozentpunkte jedes einzelnen Stammes wurden summiert und die Stämme daraufhin erneut eingeteilt (Tab. 10). Stämme mit einer Gesamtsumme von über 500 Prozentpunkten wurden als potentiell hochpathogen und bis zu 300 Prozentpunkte als potentiell pathogen definiert. Stämme unter 300 Prozentpunkten wurden für nicht, bzw. geringfügig

pathogen befunden.

Nach dieser Einteilung hätte Stamm INRA C3 die höchste Pathogenität im Set. Dieser besitzt zwar hohe Toxinproduktion und Zytotoxizität, steht jedoch nicht im Zusammenhang mit einem Krankheitsausbruch. Stamm 14294-3 (M6) war der einzige Stamm in dieser Gruppe, dem nach der bisherigen Einteilung nur eine mittlere Toxizität zugesprochen wurde. Die beiden Referenzstämme F837/76 und NVH 0075-95, beide für den Menschen nachgewiesen pathogen, wären nach dieser Einschätzung potentiell pathogen. Unter den geringfügig pathogenen Stämmen fanden sich tatsächlich nur solche, die auch im bisherigen Stammset als schwach toxisch eingestuft waren. Ebenfalls dort eingeordnet war der probiotische Stamm IP 5832, der von allen Stämmen die wenigsten Prozentpunkte erreichte.

Tabelle 9: Bewertung des Stammsets. Die aufgeführten Ergebnisse wurden in Prozentpunkte umgewandelt und die Gesamtsumme für jeden Stamm berechnet.

Stamm	Herkunft	Überleben der Magenpassage nach 1 h	Motility nach 24 h bei 30°C		Motility nach 24 h bei 37 °C	Adhäsion an CaCo-2		Toxinproduktion (NheB)		Toxizität		Summe der % aus den 11 Tests	
			swimming	swarming		Sporen	vegetative	6 h CGY	2 h RPMI	6 h CGY	6 h RPMI		
<i>I4294-3 (M6)</i>	Eiscreme	6,1	78,6	18,2	73,6	35,0	12,0	60,3	42,2	100,0	50,1	32,1	508,3
<i>SDA K496</i>	Rohmilch	7	46,5	84,8	50,9	50,0	1,3	10,7	71,9	67,4	100,0	46,5	537,2
<i>INRA A3</i>	Stärke	72,5	30,2	100,0	45,9	100,0	5,2	32,5	11,4	25,8	19,6	19,3	462,5
<i>INRA C3</i>	pasteurisierte Karotte	32,1	17,9	50,0	39,0	45,0	72,0	54,3	50,0	97,9	24,8	100,0	583,0
<i>6/27/S</i>	menschlicher Fäzes	2,3	81,8	86,4	100,0	36,7	6,1	17,0	11,2	4,2	54,1	32,4	432,1
<i>F3175/03 (D7)</i>	menschlicher Fäzes	0,3	100,0	48,5	100,0	65,0	19,9	32,6	29,1	43,4	49,0	25,6	513,4
<i>RIVM BC934</i>	Salat	1,25	3,8	66,7	3,8	80,0	6,3	25,5	19,0	13,2	44,6	22,0	286,0
<i>F528/94</i>	Reisgericht,												
	Lebensmittelvergiftung	14,7	3,8	18,2	51,9	20,0	8,0	100,0	11,0	26,1	38,9	19,0	311,5
<i>F837/76</i>	postoperative Infektion	0,9	3,1	39,4	10,1	56,7	7,9	45,2	100,0	23,7	68,5	30,0	385,5
<i>RIVM BC 126</i>	menschlicher Fäzes	0,2	18,2	39,4	33,3	33,3	15,3	35,6	40,2	4,2	75,7	34,1	329,6
<i>MHI86</i>	Babynahrung	0,6	40,3	18,2	78,3	0,0	14,1	16,5	0,2	1,6	2,9	5,5	178,2
<i>F4429/71</i>	Vanillepudding	3,6	42,8	27,3	72,6	60,0	25,6	11,5	28,6	70,5	22,8	21,3	386,6
<i>RIVM BC964</i>	Kebab	61,7	100,0	39,4	100,0	40,0	15,9	59,4	50,2	14,7	53,1	42,6	577,0
<i>F3162/04 (D8)</i>	menschlicher Fäzes	39,7	34,6	30,3	62,3	40,0	18,5	5,6	19,5	7,6	42,7	20,3	320,9
<i>MHI226</i>	Milchprodukt	21,6	52,2	30,3	50,9	30,0	8,7	25,0	3,0	7,4	31,4	10,8	271,3
<i>NVH0075-95</i>	Gemüseintopf,												
	Lebensmittelvergiftung	4,3	53,5	27,3	100,0	10,0	15,3	16,4	99,7	33,9	65,9	27,7	454,1
<i>WSBC 10035</i>	pasteurisierte Milch	100	39,6	27,3	100,0	30,0	100,0	25,2	81,3	10,8	41,0	25,3	580,5
<i>RIVM BC 90</i>	menschlicher Fäzes	1	67,3	18,2	100,0	13,3	35,6	10,8	3,4	0,3	2,7	1,9	254,5
<i>7/27/S</i>	menschlicher Fäzes	44,1	25,8	33,3	57,2	50,0	22,5	22,6	50,7	15,8	45,1	12,5	379,7
<i>IP 5832</i>	Probiotikum (Bactisubtil)	10,7	8,1	11,3	5,7	12,8	47,40	17,30	1,9	13,3	9,6	29,4	167,5

Tabelle 10: Neue Einteilung der Stämme bezüglich ihrer potentiellen Pathogenität. Über 500 Prozentpunkte wurden als potentiell hochpathogen, über 300 als pathogen und unter 300 als geringfügig pathogen definiert.

Stamm	Summe	
<i>INRA C3</i>	583,0	potentiell hochpathogen
<i>WSBC 10035</i>	580,5	
<i>RIVM BC964</i>	577,0	
<i>SDA KA96</i>	537,2	
<i>F3175/03 (D7)</i>	513,4	
<i>14294-3 (M6)</i>	508,3	
<i>INRA A3</i>	462,5	potentiell pathogen
<i>NVH0075-95</i>	454,1	
<i>6/27/S</i>	432,1	
<i>F4429/71</i>	386,6	
<i>F837/76</i>	385,5	
<i>7/27/S</i>	379,7	
<i>RIVM BC 126</i>	329,6	
<i>F3162/04 (D8)</i>	320,9	
<i>F528/94</i>	311,5	
<i>RIVM BC934</i>	286,0	
<i>MHI226</i>	271,3	potentiell geringfügig pathogen
<i>RIVM BC 90</i>	254,5	
<i>MHI86</i>	178,2	
<i>IP 5832</i>	167,5	

V. DISKUSSION

Zur möglichen Abgrenzung zwischen enteropathogenen und apathogenen *B. cereus* Stämmen steht bislang der Nachweis der Toxinproduktion sowie der zytotoxischen Wirkung *in vitro* zur Verfügung. Allerdings kann mit Hilfe der bislang etablierten Verfahren keine Aussage über das tatsächliche Toxinbildungsvermögen im Darm gemacht werden. Neben den momentan als Hauptvirulenzfaktoren angesehenen Enterotoxinen Hbl, Nhe und CytK werden viele weitere Faktoren mit der Pathogenese der Diarrhö-Form in Verbindung gebracht. Einige dieser möglichen Faktoren, wie beispielsweise Motilität und Adhäsion gelten bei anderen Bakteriengattungen als gesicherte Virulenzfaktoren. Auch bei *B. cereus* hat man die Vermutung, dass das Darmmilieu und andere wirtspezifische Faktoren eine entscheidende Rolle bei der Krankheitsentstehung spielen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein umfassend charakterisiertes Set mit 20 Stämmen (vgl. Tab. 7) auf Motilität und Adhäsion getestet. Außerdem wurde der Einfluss von Lebensmitteln und Lebensmitteleinzelkomponenten auf die Resistenz der Bakterien im Magen-Darm-Trakt als auch auf das Toxizitätspotential untersucht. Das so erlangte Wissen soll zum besseren Verständnis der Pathogenese von *B. cereus* beitragen und eine Risikobewertung der Stämme ermöglichen.

1. Motilität von *B. cereus*

Die Fähigkeit zur gerichteten Fortbewegung ist für pathogene Erreger in vielerlei Hinsicht vorteilhaft. Sie erlaubt eine gezielte Annäherung an passende Umweltbedingungen, eine erfolgreiche Kolonisation, sowie die Weiterverbreitung nach einer erfolgreichen Wachstumsphase (Chaban *et al.*, 2015). So finden flagellierte Bakterien, wie *E. coli*, *Helicobacter pylori* oder *Vibrio cholerae*, während ihrer aktiven Suche nach einem geeigneten Infektionsort diesen durch Chemotaxis (Chaban *et al.*, 2015). *Campylobacter jejuni* reagiert auf Mucin und Glycoproteine, die chemischen Hauptbestandteile der mukusgefüllten Krypten im Dünndarm (Chaban *et al.*, 2015). Für *L. monocytogenes* wurde gezeigt, dass bewegliche Bakterien Darm und Leber schneller und besser kolonisieren können als nichtmotile (O'Neil *et al.*, 2006). Die Rolle der Motilität bei der Pathogenese *in vivo* konnte indirekt auch für *B. cereus* bewiesen werden. Im künstlich

infizierten Kaninchenauge kam es durch nichtmotile Stämme von *B. thuringiensis* (v. a. insektizide Wirkung) zu einer verzögerten und nicht vollständig ausgebreiteten Infektion im Gegensatz zu motilen Stämmen, die nach 18 h zu vollständiger Blindheit führten (Callegan *et al.*, 2005).

Um die Motilität der *B. cereus* Stämme zu testen, wurden in dieser Arbeit *swimming* und *swarming* vergleichend bei 30 °C und 37 °C untersucht. Während beim *swarming* keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Temperaturen festgestellt wurden, wies *swimming* neben stammspezifischen auch temperaturabhängige Unterschiede auf (größere Durchmesser bei 37 °C) (vgl. Abb. 2 und 3). Im Gegensatz dazu bildet *L. monocytogenes* bei 37 °C weniger Flagellen aus, als unter normalen Umwelttemperaturen (22-30 °C) (Kamp *et al.*, 2011). Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür wäre, dass pathogene Erreger darauf angewiesen sind, ihre Flagellengene abzuschalten oder nur noch reduziert zu exprimieren, wenn sie an der richtigen Stellen im Wirt sind (Chaban *et al.*, 2015).

Zusätzlich wurde das Stammset auf die Präsenz von Flagellengen gen gescreent. In den Genomen aller Stämme konnten Flagellengene identifiziert werden (vgl. Tab. 8), was die allgemein hohe Fähigkeit zum *swimming* begründen könnte. Von besonderem Interesse sind die Gene *flaA*, *flhA* und *flhF*. Diese Gene kodieren für Proteine, die am Aufbau des Flagellenapparates beteiligt sind und somit direkt die Fähigkeit zur Motilität beeinflussen (Albertini *et al.*, 1991; Ghelardi *et al.*, 2002; Salvetti *et al.*, 2007). Für FlaA, FlhA und FlhF wurden phylogenetische Stammbäume basierend auf DNA-Sequenzhomologien erstellt (siehe Anhang Abb. 22-25). Betrachtet man die phylogenetischen Bäume, so besteht allerdings kein verwandtschaftlicher Zusammenhang mit der Fähigkeit zu *swimming* und *swarming*. Warum keiner der 20 Stämme bei der Untersuchung auf *swarming* hohe Durchmesserzahlen erreichte, bleibt zu klären. Um festzustellen, ob es sich bei Durchmessern unter 20 mm tatsächlich um *swarming*-Zonen oder lediglich um bakterielles Wachstum handelt, sollte hierzu zusätzlich eine Identifizierung von Schwarmzellen mittels Elektronenmikroskopie erfolgen. Eine weitere Erklärung wäre die Tatsache, dass *swarming* nicht nur abhängig von der Viskosität des Mediums ist, sondern v. a. von der Art und Anzahl der enthaltenen Nährstoffe (Senesi *et al.*, 2010).

Über die Motilität und ihre Zusammenhänge bei *B. cereus* ist auf genetischer

Ebene noch nicht so viel bekannt wie beispielsweise bei Gram-negativen Bakterien, jedoch gibt es bereits einige Erkenntnisse (Senesi *et al.*, 2010). So gilt es als gesichert, dass FlhF allgemein zur Pathogenität beiträgt und nicht nur zum *swarming* gebraucht wird (Salveti *et al.*, 2007; Mazzantini *et al.*, 2016). Salveti *et al.* (2011) konnten zeigen, dass die Fähigkeit zum *swarming* sich auf die Expression von 118 Genen auswirkt. Und obwohl die Expression von Toxingenen im Allgemeinen herabreguliert wurde, konnte eine erhöhte Hbl-Sekretion festgestellt werden (Ghelardi *et al.*, 2007; Salveti *et al.*, 2011). Eine bessere Beweglichkeit wurde für Stämme aus klinisch assoziierte Fällen in der Studie von Ghelardi *et al.* (2007) festgestellt. Dies deckt sich nicht mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit, bei denen Lebensmittelisolate und klinische Isolate in beiden Gruppen zu finden waren. Interessant ist auch, dass durch das Vorhandensein von Flagellen eine Auswirkung auf das Immunsystem des Wirts ausgelöst wird (Duan *et al.*, 2013). Eine wirtsabhängige Immunreaktion könnte auch die unterschiedlichen Schweregrade einer *B. cereus* Infektion erklären. Aufgrund bisheriger Forschungsergebnisse ist eine Beteiligung der Motilität an der Pathogenese von *B. cereus* sehr wahrscheinlich. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit aber zeigen, kann dadurch alleine noch keine Abgrenzung zwischen krankheitsauslösenden und harmlosen Stämmen erfolgen. Vielmehr müssen dabei noch wirtsabhängige Faktoren in die Untersuchung miteinbezogen werden.

2. Überlebensfähigkeit von *B. cereus* unter simulierten Magenbedingungen

Am Anfang einer *B. cereus* Lebensmittelinfektion steht das Überleben der Bakterien in der Magenpassage. Da vegetative Bakterien im niedrigen pH-Bereich des Magens i. d. R. abgetötet werden (Clavel *et al.*, 2004; Ceuppens *et al.*, 2012c), konzentriert sich diese Arbeit auf das Überleben der Sporen im Magen. Dabei wurde neben reinem Magensaft auch die Wirkung von Lebensmitteln getestet.

Im Versuch wurde der pH-Wert dauerhaft auf 2 belassen. Diesen konnten alle 20 Stämme eine Stunde überdauern (vgl. Abb. 8). Nach 6 h zeigten die Überlebensraten stammspezifische Unterschiede, die sich jedoch nicht nach Genprofil oder Toxizität einteilen ließen. Auch der Ursprung der Stämme korrelierte nicht mit den Ergebnissen. Dies wäre zu vermuten gewesen, da im Gegensatz zu den Lebensmittelisolaten, Stämme, die bereits aus einem

Vergiftungsfall isoliert wurden, die Magenbedingungen offensichtlich schon einmal ausreichend gut überstanden hatten. Die Überlebensraten der Stämme erscheinen auf den ersten Blick relativ gering. So erreichte Stamm WSBC 10035 mit 2,75 % die höchste Rate. Betrachtet man allerdings die absoluten Werte (siehe Anhang Tab. 12), erreichte dieser Stamm nach sechs Stunden immer noch über 10^6 KBE und liegt damit im Bereich der infektiösen Dosis.

Die Miteinbeziehung von Lebensmitteln in den Versuch stützt sich auf verschiedene Studien, die einen Einfluss von Lebensmitteln auf *B. cereus* nachgewiesen hatten. So wurde bereits gezeigt, dass Milch die Sporen vor einem Säureabbau schützt (Clavel *et al.*, 2004), die Toxinproduktion von der Nährstoffverfügbarkeit abhängt (Ouhib-Jacobs *et al.*, 2009) und der zytopathische Effekt von *B. cereus* Kulturüberständen durch Kefir aufgehoben wird (Medrano *et al.*, 2009).

Auch in dieser Arbeit konnte die protektive Wirkung der Lebensmittel bei den meisten der eingesetzten Stämme nachgewiesen werden. Jedoch waren es hier neben den stammspezifischen Unterschieden auch die Lebensmittel, die verschiedene Ergebnisse lieferten. Da für diesen Versuch nur sechs der 20 Stämme eingesetzt wurden, kann hier keine Aussage zur Einteilung nach dem Stammset gemacht werden.

Interessant ist sicherlich, dass der hochtoxische Referenzstamm NVH 0075-95, bekannt als Auslöser eines großen Vergiftungsfalles in Norwegen (Lund *et al.*, 1996), generell schlecht in Magensaft überlebte und durch die hier getesteten Milchprodukte kaum geschützt wurde. Nach sechs Stunden waren meist keine Sporen mehr nachweisbar. Auffallend ist dabei auch, dass dieser Stamm nach einer Stunde die beste Überlebensrate in Milchreis aufwies, obwohl dieses Produkt bei den meisten Stämmen nur einen geringen Einfluss auf die Überlebensrate zeigte. Daher stellt sich die Frage, ob für Stamm NVH 0075-95 andere Nahrungskomponenten wichtiger sind, oder ob weniger die Lebensmittel als wirtsabhängige Faktoren eine Rolle für das Überleben dieses Stammes im Magen spielen.

Clavel *et al.* (2004), die einen ähnlichen Versuch mit drei verschiedenen Lebensmittelmatrices (Milch, Erbsen- und Hühnersuppe) und nur einem Stamm durchgeführt hatten, kamen zu dem Ergebnis, dass Sporen nicht um mehr als 1,5

log Stufen reduziert wurden. Auch bei Ceuppens *et al.* (2012b) blieb die Sporenanzahl über die Versuchszeit stabil. In der vorliegenden Arbeit reduzierte sich die Sporenanzahl mit der Zeit zum Teil deutlich. Um den Grund für diesen Unterschied zu finden, müssten noch weitere Studien durchgeführt werden, da sich auch in der Literatur keine weiteren Anhaltspunkte finden.

Allerdings kann man vermuten, dass die meisten Stämme unter natürlichen Bedingungen deutlich höhere Überlebensraten zeigen würden und damit das Risiko eines Krankheitsausbruches gegeben wäre. Der pH-Wert wurde im Verlauf dieser Versuchs stabil auf 2 gehalten, was für die Sporen eine extreme Situation darstellt. Im menschlichen Magen würde es aber auf Grund der Lebensmittelzugabe initial zu einem Anstieg des pH-Wertes kommen, der sich dann allmählich wieder senken würde. Abhängig von Menge und Art der Mahlzeit können dann Werte von über 5 erreicht werden, was sogar von vegetativen Bakterien noch toleriert werden kann (Dressman *et al.*, 1990; Clavel *et al.*, 2004).

Auch der Einfluss des MHD auf die Überlebensfähigkeit der Sporen wurde untersucht. Laut § 7 (1) der Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung (LMKV) ist das MHD als jenes Datum definiert, „...bis zu dem dieses Lebensmittel unter angemessenen Aufbewahrungsbedingungen seine spezifischen Eigenschaften behält.“. Dies bedeutet, dass Zusammensetzung, Genusswert, oder Brauchbarkeit nicht verändert sind (BVL, 2017). Obwohl die mikrobiologische Untersuchung des abgelaufenen Mascarpone ohne Befund blieb, sowie optisch und olfaktorisch keine Auffälligkeiten festgestellt werden konnten, zeigte sich doch nach 6 h eine vergleichsweise bessere Überlebensrate als in den anderen, nicht abgelaufenen Lebensmitteln (vgl. Abb. 10). Es stellt sich daher die Frage, ob im Produkt bereits Prozesse im Gang waren, die hier nicht detektiert werden konnten aber einen Einfluss auf die Zusammensetzung und somit auf die Überlebensfähigkeit der Sporen hatten. Allerdings sei auch angemerkt, dass Mascarpone II (MHD nicht überschritten) die Sporen gut vor den Magenbedingungen schützte. Deshalb könnte man annehmen, dass das sehr fetthaltige Produkt über die längere Zeit gesehen einen Vorteil gegenüber weniger reichhaltigen Produkten zeigte. So könnten die in der Milch enthaltenen Proteine und Lipide die Bakterien in einem Komplex einschließen und somit einen schützenden Effekt auf die Sporen haben (Berthold-Pluta *et al.*, 2015).

Außergewöhnlich war zudem das Verhalten von drei Stämmen (F837/76, WSBC

10035 und IP 5832) während der Magenpassage unter Lebensmittelzusatz. Sie zeigten z. T. Überlebensraten von über 100 %, Stamm WSBC 10035 zeigte sogar Werte, die an die 1000 %-Marke reichten. Bereits ohne die Lebensmittel konnte bei einigen Stämmen beobachtet werden, dass die Überlebensraten im Laufe der Versuchsdauer wieder anstiegen. Jedoch waren die Unterschiede in diesen Fällen nicht sehr groß und v. a. wurde der initial bestimmte Wert nie überschritten. Die wahrscheinlichste Erklärung für diese geringen Unterschiede liegt in der Versuchsdurchführung, da nur eine sehr geringe Probemenge (300 µl) entnommen wurde und zudem die Sporen zur Bildung von Agglomeraten neigten, die auch durch gründliches Mischen vermutlich nicht immer getrennt werden konnten.

Ein Erklärungsansatz für die extremen Werte wäre eine Auskeimung. Die Sporen waren bei Versuchsbeginn bereits mehrere Monate gelagert, aber mikroskopisch unverändert. Durch das wiederholte Zentrifugieren könnte jedoch eine mechanische Schädigung der Sporen stattgefunden haben. Zusammen mit den Induktoren im Milieu (Zucker, Aminosäuren, Nucleoside, Salze) hätte dies zu einer Aktivierung der Sporen und einer rasch folgenden Auskeimung beitragen können (Jones *et al.*, 2005; Wells-Bennik *et al.*, 2016). Auch moderate Wärme soll zur Auskeimung beitragen (Wells-Bennik *et al.*, 2016). Ob 37 °C dazu ausreichend sind, ist allerdings fraglich, da Hitzeaktivierung erst ab 65 °C stattfindet (Ghosh *et al.*, 2010).

Angaben zu Sporenaktivierung, -inaktivierung und -auskeimung sowie mögliche Einflussfaktoren weichen in der Literatur voneinander ab und sind zudem speziesspezifisch (Clavel *et al.*, 2004; Fricker *et al.*, 2011; Setlow, 2014b). So lässt sich letztendlich nicht feststellen, welche dieser möglichen Ursachen zu einer Erhöhung der Überlebensrate über die ursprünglich eingesetzte Anzahl geführt hat. Weiterführend müssten die Sporen dazu auf Auskeimung und Säureadaptation untersucht werden und zusätzlich die Auswirkung der Lebensmittel (Zucker, Fett, Salz) miteinbezogen werden.

2.1. Phänotypische Besonderheit des Stammes WSBC 10035 während der simulierten Magenpassage

Zu beachten ist darüber hinaus die phänotypische Auffälligkeit, die der Stamm WSBC 10035 im Verlauf dieses Versuches zeigte. Dieser Stamm, der schon durch die sehr hohen Überlebensraten auffiel, zeigte nach der Magenpassage (mit und

ohne Lebensmittel) Kolonien mit zwei unterschiedlichen Größen (Abb. 11). Die kleinen Kolonien zeigten sowohl eine erhöhte Nhe-Produktion als auch eine verstärkte toxische Wirkung im WST-1-Bioassay.

Einige Bakterienarten (u. a. Staphylokokken, Salmonellen, *E. coli*) besitzen die Fähigkeit, sog. *small colony variants* (SCVs) auszubilden. Gekennzeichnet sind diese durch morphologische Unterschiede und langsames Wachstum (Proctor *et al.*, 2006). Da auch die hier isolierten Kolonien dieser Definition entsprechen, liegt die Vermutung nahe, dass es sich dabei um eine SCV handelt. SCVs wurden bereits vor über 100 Jahren zum ersten Mal bei Staphylokokken beschrieben. Die Forschung konzentriert sich überwiegend auf diese Gattung, da hier ein Zusammenhang zwischen dieser Form und persistierenden, wiederkehrenden Infektionen verschiedener Gewebe und Organe erkannt wurde (Kahl *et al.*, 2016). Auch bei der Gattung *Bacillus* (*B. licheniformis*) wurde das Auftreten einer SCV beschrieben, die zur Bakteriämie nach der Implantation eines Herzschrittmachers führte (Kahl *et al.*, 2016). Frenzel *et al.* (2015) konnten erstmals bei einem emetischen *B. cereus* Stamm eine SCV nachweisen, die sich in Gegenwart eines Aminoglycosid-Antibiotikums entwickelte.

Bisherige Studien fanden heraus, dass diese Subpopulationen einen fehlerhaften Elektronentransport aufweisen oder die Thymidin-Biosynthese unzureichend ist. Verschiedenste Genmutationen können diese Ausfälle ebenso hervorrufen, wie auch eine Langzeittherapie mit Antibiotika (Proctor *et al.*, 2006; Kahl *et al.*, 2016). Allerdings nimmt man an, dass es noch weitere Möglichkeiten gibt, die zu einem veränderten Metabolismus dieser Kolonievarianten führen (Kahl *et al.*, 2016). So können auch Nährstoffmangel und chemische Stressoren die Ausbildung von SCVs bewirken (Bui *et al.*, 2015).

Aus welchem Grund nur einer der 20 Stämme diese Besonderheit trotz gleicher Bedingungen zeigte, ist nicht klar. Die lange Lagerungszeit der Sporen oder die Säureeinwirkung während des Versuchs könnten ebenso eine Mutation in Stamm WSBC 10035 hervorgerufen haben, wie die Hitzeeinwirkung vor dem Ausplattieren. Eine künstlich durch Mutation erzeugte SCV von *E. coli* zeigte sich sehr widerstandsfähig gegenüber Säure, Hitze und osmotischem Stress (Santos *et al.*, 2016). So könnte auch Stamm WSBC 10035 durch die Kolonievariation eine höhere Resistenz gegenüber den äußeren Einflüssen, denen er ausgesetzt war, erreicht haben. Bei *S. aureus* wird vermutet, dass die SCVs ein besseres

Überleben im Wirt gewährleisten (Proctor *et al.*, 2006).

SCVs bei *B. cereus* wurden, wie bereits oben erwähnt, erst einmal beschrieben. Die SCV von Stamm WSBC 10035 stellt daher eine Besonderheit dar, da sie spontan und vermutlich aufgrund äußerer Einflüsse entstand und zudem aus einem Sporenpräparat hervorging. Ein eingehenderes Studium der SCV bietet möglicherweise eine weitere Herangehensweise an die Erforschung der Virulenzmechanismen von enteropathogenen *B. cereus*. Aus diesem Grund sollte die SCV biochemisch und genetisch genauer untersucht werden, sowie eine Bestimmung der Motilitäts- und Adhäsionsrate erfolgen.

3. Adhäsionsfähigkeit von *B. cereus* an CaCo-2-Zellen

Aufgrund bisheriger Untersuchungen wird vermutet, dass Sporen an die Mukusschicht des Darmepithels adhären und es dann zu Auskeimung, Auswuchs und folgend zur Enterotoxinproduktion kommt (Ceuppens *et al.*, 2013). Im Allgemeinen geht man davon aus, dass vegetative Zellen dabei eine untergeordnete Rolle spielen, da die Magenpassage i. d. R. nicht überlebt wird. Eine mögliche Überlebensrate von bis zu 26 % (Wijnands *et al.*, 2009) und die Tatsache, dass die Sporen spätestens in Epithelnähe auskeimen müssen, ließ es für sinnvoll erscheinen, dass im Rahmen dieser Arbeit nicht nur die Adhäsionsfähigkeit von Sporen an Darmepithelzellen, sondern auch die der vegetativen Zellen überprüft wurde.

Generell konnten alle 20 Stämme in beiden Versuchsdurchführungen an CaCo-2-Zellen binden. In beiden Gruppen konnte allerdings kein Hinweis darauf gefunden werden, dass die Adhäsionsfähigkeit mit den Einteilungskriterien des Stammsatzes korreliert. Vergleicht man die Adhäsionsraten von Sporen und vegetativen Zellen, so adhären, bis auf einige Ausnahmen, die vegetativen Zellen besser (Sporen erreichten Werte zwischen 0,04 und 2,89 %, die Adhäsionsrate der vegetativen Zellen lag zwischen 0,34 und 6,11 %). Wijnands *et al.* (2007) ermittelten für Sporen eine Adhäsionsrate von ca. 1 %, was die Resultate dieser Arbeit in etwa widerspiegelt. Ein Vergleich der Ergebnisse mit anderen Studien gestaltet sich schwierig, da sich die angewandten Methoden meist erheblich unterscheiden. Erstaunlich ist, dass in der Studie von Andersson *et al.* (1998) die vegetativen Zellen nicht in der Lage waren zu adhären, was u. a. auf die fehlenden hydrophoben Eigenschaften zurückgeführt wurde, die den Sporen eine verbesserte

Adhäsionsfähigkeit verschafften. Auch Sanchez *et al.* (2009) stellten eine bessere Adhäsionsfähigkeit bei Sporen fest. Eine weitere Studie, die die Adhäsion von vegetativen Zellen überprüfte, wies hingegen bei zwei Stämmen Raten von 1,8 und 40 % auf CaCo-2-Zellen nach (Ramarao *et al.*, 2006). Minnaard *et al.* (2004) zeigten erstmals, dass ein kleiner Anteil der adhärenierten Bakterien sogar in der Lage ist, in die Zellen einzudringen. Die Fähigkeit zur Invasion ist v. a. bei Salmonellen und Listerien bekannt. So zeigen Salmonellen beispielsweise deutlich höhere Adhäsionsraten, damit eine adäquate Anzahl an Bakterien überhaupt in die Zielzelle eindringen kann (Gagnon *et al.*, 2013). Daher ist fraglich, ob *B. cereus* tatsächlich invasive Eigenschaften besitzt, auch weil sich die Pathogenitätsmechanismen dieser Bakterienarten grundlegend unterscheiden.

Betrachtet man die Adhäsionsraten der vegetativen Zellen in dieser Arbeit, so fällt auf, dass Stamm F528/94 einen Wert von über 6 % erreichte. Dieser Stamm wurde zwar aus einem Lebensmittel isoliert, welches aber in Zusammenhang mit einer Lebensmittelvergiftung gebracht werden konnte. Bemerkenswerterweise ergaben sich für diesen Stamm aber nur sehr geringe Zytotoxizitätstiter und auch die Produktion von Nhe und Hbl wurde nur als gering bzw. mittel eingestuft. Daher stellt sich die Frage, ob nicht auch *in vivo* eine außergewöhnlich hohe Adhäsion zum Krankheitsausbruch hätte beitragen können. Die Sporen desselben Stammes adhärenierten im Vergleich dazu eher schlecht. Dies könnte bedeuten, dass die Adhäsion vegetativer Zellen bislang unterschätzt wird. Der Referenzstamm NVH 0075-95, der ebenfalls aus einem Vergiftungsfall stammt, zeigte in beiden Fällen mittlere Adhäsionsraten, gehört allerdings auch einem anderen Toxingenprofil an. Die Entstehung einer Infektion könnte daher durch ein Zusammenspiel von Adhäsion und Toxinprofil begünstigt werden. Im Vergleich zu den Adhäsionsraten der vegetativen Zellen zeigte Stamm WSBC 10035 eine deutlich bessere Adhäsion der Sporen. Im Hinblick auf die bereits oben erwähnten Besonderheiten dieses Stammes kann man vermuten, dass diese Sporen besondere Eigenschaften aufweisen, die noch zu untersuchen sind.

Vergleicht man die erstellten Mittelwerte von Ursprung bzw. Toxizität, ist besonders interessant, dass bei vegetativen Zellen fast keinerlei Unterschiede zwischen den Gruppen festzustellen waren, während Sporen der toxischen Stämme besser adhärenierten als die der schwach toxischen (vgl. Abb. 15B). Unerwartet war die schlechtere Adhäsionsfähigkeit der Sporen, die von

Krankheitsfällen isolierten Stämmen gewonnen wurden. Wie bereits oben erwähnt widersprechen diese Ergebnisse der gängigen Meinung, dass v. a. die Sporenadhäsion ein wichtiger Bestandteil der Pathogenese sein könnte. Jedoch fehlen für *B. cereus in vivo* Studien, die diese Hypothese untermauern. Bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse muss zusätzlich beachtet werden, dass die eingesetzte MOI in den beiden Versuchen nicht gleich war. Obwohl ein Vorversuch ähnliche Ergebnisse für beide MOIs ergab, kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine höhere MOI im Sporenversuch nicht doch auch zu einer höheren Adhäsionsrate geführt hätte. Im Wirt würde die Adhäsion auch nicht direkt an der Epithelschicht stattfinden, sondern zunächst die Mukusschicht des Darms betreffen. Hierzu gibt es bereits einige Studien, die dies *in vitro* bestätigen konnten (Sanchez *et al.*, 2009; Laparra *et al.*, 2009; Tsilia *et al.*, 2016). Zudem muss auch bedacht werden, dass das Vorhandensein anderer Bakterien (z. B. natürliche Darmflora, Probiotika) die Adhäsion beeinflussen kann (Zhang *et al.*, 2016).

Bei einigen Bakteriengattungen sind Flagellen direkt an der Adhäsion beteiligt (Chaban 2015). Sanchez *et al.* (2009) bestimmten die Oberflächenproteine eines sehr gut adhärierenden *B. cereus* Stammes. Das Stammset wurde auf einige dieser putativen Adhäsionsfaktoren untersucht und es stellte sich heraus, dass alle 20 Stämme diese Gene besitzen. Allerdings konnte auch hier keine Korrelation zwischen der Gensequenz und den Adhäsionsraten festgestellt werden (siehe Anhang Abb. 26 und 27).

Laparra *et al.* (2009) konnten zeigen, dass probiotische Keime besser adhäreren können als pathogene. Stamm IP 5832 zeigte in diesem Versuch weder sehr gute noch sehr schlechte Adhäsionsraten. Interessant ist dies deshalb, weil IP 5832 früher Bestandteil probiotischer Präparate war (*Bactisubtil*TM für den Humangebrauch, *Paciflor*TM als Futtermittelzusatz) (Duc *et al.*, 2004). Mittlerweile sind beide Präparate nicht mehr zugelassen, da die Produktion von Nhe und Hbl nachgewiesen werden konnte und zudem bei Mäusen eine letale Dosis von 10^9 KBE ermittelt wurde, was ungefähr der empfohlenen therapeutischen Dosis entsprach (Kniehl *et al.*, 2003; Duc *et al.*, 2004; Sorokulova, 2008). Die gute Überlebensfähigkeit während der Magenpassage würde für die probiotischen Eigenschaften dieses Stammes sprechen, die relativ geringe Adhäsionsfähigkeit stellt allerdings die früher angenommene, positive

Wirkung im Darm in Frage. Sowohl Zytotoxizität als auch NheB Toxinproduktion waren für diesen Stamm sehr gering. Dies zusammen mit der geringen Adhäsion könnte erklären, warum es nicht häufiger zu größeren Krankheitsausbrüchen kam, während das Präparat auf dem Markt war.

4. Einfluss verschiedener Lebensmittel auf die toxische Aktivität von *B. cereus* Kulturüberständen

Bislang sind nur wenige Studien bekannt, die sich mit der Wirkung eines Lebensmittels auf die Zytotoxizität von *B. cereus* befassen haben (Medrano *et al.*, 2008; Medrano *et al.*, 2009). Aus diesem Grund wurde die toxische Aktivität der beiden Referenzstämme und einer Nhe-Mutante im Zusammenhang mit verschiedenen Lebensmitteln bzw. Einzelkomponenten getestet. Durch den Zusatz der ausgewählten Lebensmittel konnte bei allen getesteten Stämmen die zytotoxische Aktivität reduziert werden. Der deutlichste Effekt im WST-1-Bioassay konnte bei Stamm F837/76 erreicht werden, gefolgt von der Nhe-Mutante. Die Titer des reinen Nhe-Produzenten NVH 0075-95 wurden durch die Lebensmittelzugabe nur wenig beeinflusst. Dies lässt den Schluss zu, dass die Lebensmittel sich anscheinend stärker auf den Hbl-Toxinkomplex auswirken. Die wahrscheinlichste Erklärung dafür ist der unterschiedliche Wirkmechanismus der Enterotoxine, der bereits in verschiedenen Zellkulturassays nachgewiesen werden konnte (Jessberger *et al.*, 2014). Was die Lebensmittel betrifft, so konnte Folgemilch die toxische Wirkung z. T. beträchtlich reduzieren. Welche Zutat in der verwendeten Säuglingsnahrung dazu führte, wurde nicht untersucht. Jedoch konnte in weiteren Tests festgestellt werden, dass bei den Einzelkomponenten der Zusatz von Lactoferrin den zytopathischen Effekt der Nhe-Mutante deutlich verringern konnte. Interessant wäre nun, in welcher Menge diese Komponente in der Folgemilch vorliegt, um einen möglichen Zusammenhang herzustellen. Der Einsatz der Einzelkomponenten im PI-Test deckte sich allerdings nicht völlig mit den Ergebnissen des WST-1-Bioassays, vielmehr traten stammspezifische Unterschiede auf. Dies ist jedoch nicht überraschend, da sich die beiden Tests unterschiedlicher Wirkmechanismen bedienen. Nachfolgend wurden EIAs durchgeführt, um die Auswirkungen der Lebensmitteleinzelkomponenten auf den Hbl-Komplex zu charakterisieren. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass v. a. Hbl L1 mit den Lebensmitteln reagierte und nicht mehr detektiert werden konnte.

Die Ursache für die Verminderung der toxischen Aktivität liegt also vermutlich an der Bindung der einzelnen Lebensmittelkomponenten an die Toxinkomponenten, was deren volle Funktionsfähigkeit einschränkt.

Die Tatsache, dass *B. cereus* zwar häufig in Milchprodukten zu finden ist, es aber selten zu damit verbundenen Krankheitsfällen kommt, könnte somit erklärt werden. Welche Bestandteile und Schritte dabei genau betroffen sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr bearbeitet werden, wäre aber ein interessanter neuer Forschungsansatz. So könnten neben den hier getesteten Milchkomponenten auch Milchzucker und -fette sowie andere Lebensmittel miteinbezogen werden.

5. Risikoorientierte Bewertung des Stammsets

Die vollständige Vermeidung einer Kontamination von Lebensmitteln mit *B. cereus* ist nicht möglich, deshalb gibt es zumindest für Säuglingsnahrung einen EU-weiten Grenzwert (EFSA, 2016a). Mit Hilfe von Grenzwerten kann immerhin die Gefahr eines Krankheitsausbruchs reduziert werden. Jedoch werden zugleich auch Lebensmittel, die mit einem apathogenen Stamm kontaminiert sind, vernichtet, obwohl sie zum Verzehr geeignet wären. Zwar können für *B. cereus* sowohl Toxingene detektiert als auch Toxinproduktion und Toxizität ermittelt werden, allerdings kann nach momentanem Forschungsstand nicht beurteilt werden, ob ein Stamm deshalb krankheitsauslösend ist oder nicht. Da die momentane Routinediagnostik Raum für Fehlinterpretationen lässt (z. B. der Nachweis präsumtiver *B. cereus* auf chromogenen Medien) und zudem wirtsabhängige Faktoren nicht in die Gefahrenanalyse miteinbezogen werden, ist die Etablierung eines ganzheitlichen, risiko-orientierten Bewertungsschemas von Nöten. Deshalb war ein Ziel, auf Grundlage bereits bestehender Erkenntnisse und den Ergebnissen dieser Arbeit ein Schema zu entwickeln, welches die Unterscheidung zwischen enteropathogenen und apathogenen *B. cereus* ermöglicht. So wurden die bestehenden Informationen mit den Daten zu Motilität, Überlebensfähigkeit der Sporen unter simulierten Magenbedingungen, Adhäsion, Toxinproduktion und Zytotoxizität ergänzt und die Stämme neu in potentiell hochpathogen, pathogen und geringfügig pathogen eingeteilt (vgl. Tab. 9 und 10). Die Gruppe der geringfügig pathogenen Stämme beinhaltete auch nur Stämme, die in der vorigen Einteilung, basierend auf Toxinproduktion unter Laborbedingungen und Zytotoxizitätstests auf Vero-Zellen (vgl. Tab. 7), als

gering toxisch bezeichnet wurden. Ähnlich verhielt es sich für die Gruppe der hochpathogenen Stämme. Besonders interessant ist aber die dazwischenliegende Gruppe der potentiell pathogenen Stämme. Hier finden sich neben nachgewiesenen Krankheitsauslösern (die beiden Referenzstämme F837/76 und NVH 0075-95) auch einige Stämme, die früher nur als gering toxisch eingestuft waren. Darunter befindet sich z. B. Stamm F528/94, der, obwohl nur ein geringer Toxinproduzent mit geringer Zytotoxizität, aus einem Vergiftungsfall isoliert worden war. Durch das Hinzufügen weiterer, putativer Virulenzmerkmale in die Liste wird er nun als pathogen eingestuft.

Die neue Einteilung ermöglicht somit präzisere Aussagen und möglicherweise sogar die Abgrenzung zwischen pathogenen und apathogenen Stämmen, da es die relevantesten Kriterien von der Aufnahme des Bakteriums bis hin zur Toxizität miteinschließt. Zur Verifizierung müsste das Bewertungsschema jedoch mit einer noch größeren Anzahl an Stämmen getestet werden. Trotzdem bleibt die Beurteilung der Stämme immer unsicher, da die *in vivo* Situation nach wie vor nicht bekannt ist. Zusätzlich gilt zu beachten, dass die Abgrenzung zwischen den einzelnen Gruppen letztendlich noch Spielraum bietet.

Eine eindeutige Unterscheidung zwischen pathogenen und apathogenen Stämmen auf Grund von Motilität, Adhäsion, Biofilmbildung, Zytotoxizität, Antibiotikaresistenz und der Virulenz im Insektenmodell wurde von Kamar *et al.* (2013) postuliert, was nach den Ergebnissen dieser Arbeit nicht eindeutig möglich ist. Darüber hinaus lässt diese Studie einige Fragen offen, was Methodik und Auswertung betrifft. Zudem ist ein Vergleich der Ergebnisse unmöglich, da im Rahmen dieser Arbeit die Einteilung nach einzelnen Stämmen erfolgte, während Kamar *et al.* (2013) nur Mittelwerte der klinischen und lebensmittelassoziierten Stämme bildete. So wird Stamm INRA A3 in der oben genannten Studie als nicht pathogen eingeordnet, während das vorliegende Bewertungsschema ihm eine potentiell pathogene Wirkung zuspricht.

Ein sehr schwer zu kalkulierender Faktor bei der Risikobewertung bleibt vorerst der Wirt selbst, der durch eine Vielzahl von Mechanismen an der Pathogenität beteiligt ist. Die Miteinbeziehung von lebensmittelabhängigen Faktoren könnte das Schema zusätzlich präzisieren, aber auch aufwändiger machen. Für den Einsatz in der Routinediagnostik ist das Bewertungsschema momentan noch zu umfangreich und auch nicht für den Schnellnachweis geeignet, da viele der

Methoden sehr arbeits- und zeitaufwändig sind. Bis eindeutige Marker gefunden werden, die pathogene und apathogene Stämme voneinander abgrenzen, kann dieses umfassende Bewertungsschema jedoch ein sinnvolles Instrument zur Abschätzung der Enteropathogenität von *B. cereus* darstellen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Enteropathogene *B. cereus* Stämme sind in der Lage, im Darm Toxine zu produzieren und lösen damit Lebensmittelinfektionen in Form von Diarrhö aus. Jedoch führt nicht jeder Stamm zu einem Krankheitsausbruch, so dass man bislang dahinter ein multifaktorielles Geschehen vermutet, was wiederum die Abgrenzung zwischen pathogenen und apathogenen Stämmen erschwert. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit 20 Stämme auf verschiedene putative Virulenzmechanismen untersucht und aus diesen Erkenntnissen ein Bewertungsschema erstellt, um damit die potentielle Gefährdung, die von einem *B. cereus* Stamm ausgeht, abschätzen zu können. Zudem wurde der Einfluss von Lebensmitteln auf das Infektionsgeschehen analysiert.

Motilität durch *swimming* und *swarming* zeigte stammspezifische Unterschiede, die v. a. beim *swimming* auch temperaturabhängig waren, aber keine Übereinstimmung mit Toxinprofil, Toxizität oder Ursprung zeigten. Auch die Adhäsionsfähigkeit der Stämme konnte nicht in Zusammenhang mit den bestehenden Einteilungskriterien gebracht werden. Allerdings adhärten vegetative Zellen stärker an CaCo-2-Zellen als *B. cereus* Sporen. Die simulierte Magenpassage bei einem pH-Wert von 2 konnten die Sporen aller Stämme eine Stunde überleben. Nachfolgend zeigten sich stammspezifische Unterschiede, die allerdings erneut nicht dem Toxinprofil oder der Toxizität zugeordnet werden konnten. Die Zugabe von Lebensmitteln, v. a. fetthaltigerer Milchprodukte, führte bei manchen Stämmen zu einer erhöhten Widerstandsfähigkeit gegenüber den Magenbedingungen, während andere nicht geschützt wurden. Zudem zeigten Zytotoxizitätstests mit CaCo-2-Zellen, dass in den meisten Fällen durch die Zugabe von Lebensmitteln eine Reduktion der toxischen Wirkung erzielt werden konnte. Einzelne Lebensmittelkomponenten binden vermutlich an die Toxinkomponenten und verhindern somit deren volle Funktionsfähigkeit.

Mit Hilfe dieser Arbeit wurden wichtige Aspekte einer *B. cereus* Infektion - vom Überleben der mitverzehrten Sporen in der Magenpassage bis hin zur Toxinproduktion im Darm – zusammengefasst. Auf der Basis dieser Daten wurde ein vorläufiges Bewertungsschema erstellt.

VII. SUMMARY

Enteropathogenic *B. cereus* strains are able to produce toxins in the human intestine and thereby cause foodborne infections which lead to diarrhea. It is assumed that due to a multifactorial process not every strain triggers an outbreak, which makes it difficult to distinguish between pathogenic and non-pathogenic strains. Therefore, 20 strains were tested for various putative virulence mechanisms in order to estimate the potential threat of a *B. cereus* strain. In addition, the effects of the food matrix on the course of infection were analyzed.

Swimming motility showed strain-specific and temperature-dependent differences, whereas differences in *swarming* motility were only strain-specific. Both did not correlate with toxin profile, toxicity or origin. Moreover between adhesion ability and the existing classification no match was found. However, vegetative cells adhered better to CaCo-2 cells than *B. cereus* spores. Spores of all strains survived the simulated gastric passage at a pH of 2 for one hour. In the course of the experiment strain-specific differences were found, which again could not be attributed to toxin profile or toxicity. The addition of food, especially fatty dairy products, led to increased resistance towards gastric conditions in some strains, while others were not protected. Moreover, cytotoxicity tests with CaCo-2 cells showed that in most cases the addition of food reduced the toxic effect. Single food components probably bind to the toxin components and thus prevent their full functionality.

With this study, important aspects of a *B. cereus* infection were summarized so that the entire course of an infection - from the survival of the spores during the gastric passage to the toxin production in the intestine - can now be assessed more thoroughly.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

ABEE, T., GROOT, M. N., TEMPELAARS, M., ZWIETERING, M., MOEZELAAR, R. & VAN DER VOORT, M. 2011. Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: diversity and role of germinant receptors. *Food Microbiol.*, 28, 199-208.

ABFALTER, C. M., SCHONAUER, E., PONNURAJ, K., HUEMER, M., GADERMAIER, G., REGL, C., BRIZA, P., FERREIRA, F., HUBER, C. G., BRANDSTETTER, H., POSSELT, G. & WESSLER, S. 2016. Cloning, purification and characterization of the collagenase ColA expressed by *Bacillus cereus* ATCC 14579. *PLoS One*, 11, e0162433.

AGAISSE, H., GOMINET, M., ØKSTAD, O. A., KOLSTØ, A. B. & LERECLUS, D. 1999. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.*, 32, 1043-1053.

AGATA, N., OHTA, M., MORI, M. & ISOBE, M. 1995. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 129, 17-20.

ALBERTINI, A. M., CARAMORI, T., CRABB, W. D., SCOFFONE, F. & GALIZZI, A. 1991. The *flaA* locus of *Bacillus subtilis* is part of a large operon coding for flagellar structures, motility functions, and an ATPase-like polypeptide. *J. Bacteriol.*, 173, 3573-3579.

ANDERSSON, A., RÖNNER, U. & GRANUM, P. E. 1995. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*. *Int. J. Food Microbiol.*, 28, 145-155.

ANDERSSON, A., GRANUM, P. E. & RÖNNER, U. 1998. The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. *Int. J. Food Microbiol.*, 39, 93-99.

ANDREEVA, Z. I., NESTERENKO, V. F., FOMKINA, M. G., TERNOVSKY, V. I., SUZINA, N. E., BAKULINA, A. Y., SOLONIN, A. S. & SINEVA, E. V. 2007. The properties of *Bacillus cereus* hemolysin II pores depend on environmental conditions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1768, 253-263.

BEECHER, D. J. & WONG, A. C. L. 1994. Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.*, 62, 980-986.

BEECHER, D. J., SCHOENI, J. L. & WONG, A. C. L. 1995. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.*, 63, 4423-4428.

BEECHER, D. J. & WONG, A. C. L. 1997. Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *J. Biol. Chem.*, 272, 233-239.

BERTHOLD-PLUTA, A., PLUTA, A. & GARBOWSKA, M. 2015. The effect of selected factors on the survival of *Bacillus cereus* in the human gastrointestinal tract. *Microb. Pathog.*, 82, 7-14.

BFR 2015. An Krankheitsausbrüchen beteiligte Lebensmittel in Deutschland im Jahr 2014. *Information Nr. 039/2015*. <http://www.bfr.bund.de/cm/343/an-krankheitsausbruechen-beteiligte-lebensmittel-in-deutschland-im-jahr-2014.pdf> [Zugriff am: 09.03.2017].

BÖHM, M. E., KREY, V. M., JESSBERGER, N., FRENZEL, E. & SCHERER, S. 2016. Comparative bioinformatics and experimental analysis of the intergenic regulatory regions of *Bacillus cereus hbl* and *nhe* enterotoxin operons and the impact of CodY on virulence heterogeneity. *Front. Microbiol.*, 7, 768.

BOTTONE, E. J. 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, 23, 382-98.

BUI, L. M., HOFFMANN, P., TURNIDGE, J. D., ZILM, P. S. & KIDD, S. P. 2015. Prolonged growth of a clinical *Staphylococcus aureus* strain selects for a stable small-colony-variant cell type. *Infect. Immun.*, 83, 470-481.

BVL 2008. Auszug aus der deutschen Liste: Probiotika. *Auszug aus der deutschen Liste nach Art. 13 Abs. 2 der Verordnung (EG) Nr. 1924/2006.* http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/healthclaims/PrProbiotik%20Empf.%20II.html?nn=1406586 [Zugriff am: 09.03.2017].

BVL 2017. Mindesthaltbarkeitsdatum (MHD).

<http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/GlossarEntry/M/Mindesthaltbarkeitsdatum.html?nn=1401078> [Zugriff am: 09.03.2017].

CADOT, C., TRAN, S. L., VIGNAUD, M. L., DE BUYSER, M. L., KOLSTØ, A. B., BRISABOIS, A., NGUYEN-THÈ, C., LERECLUS, D., GUINEBRETIERE, M. H. & RAMARAO, N. 2010. InhA1, NprA, and HlyII as candidates for markers to differentiate pathogenic from nonpathogenic *Bacillus cereus* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 48, 1358-1365.

CALLEGAN, M. C., KANE, S. T., COCHRAN, D. C., NOVOSAD, B., GILMORE, M. S., GOMINET, M. & LERECLUS, D. 2005. *Bacillus* Endophthalmitis: roles of bacterial toxins and motility during infection. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 46, 3233–3238.

CARLIN, F. 2011. Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiol.*, 28, 177-182.

CASTIAUX, V., LIU, X., DELBRASSINNE, L. & MAHILLON, J. 2015. Is Cytotoxin K from *Bacillus cereus* a bona fide enterotoxin? *Int. J. Food Microbiol.*, 211, 79-85.

CEUPPENS, S., RAJKOVIC, A., HEYNDRICKX, M., TSILIA, V., VAN DE WIELE, T., BOON, N. & UYTTENDAELE, M. 2011. Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications. *Crit. Rev. Microbiol.*, 37, 188-213.

CEUPPENS, S., RAJKOVIC, A., HAMELINK, S., VAN DE WIELE, T., BOON, N. & UYTTENDAELE, M. 2012a. Enterotoxin production by *Bacillus cereus* under gastrointestinal conditions and their immunological detection by commercially available kits. *Foodborne Pathog. Dis.*, 9, 1130-1136.

CEUPPENS, S., UYTTENDAELE, M., DRIESKENS, K., HEYNDRICKX, M., RAJKOVIC, A., BOON, N. & VAN DE WIELE, T. 2012b. Survival and germination of *Bacillus cereus* spores without outgrowth or enterotoxin production during in vitro simulation of gastrointestinal transit. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78, 7698-7705.

CEUPPENS, S., UYTTENDAELE, M., HAMELINK, S., BOON, N. & VAN DE WIELE, T. 2012c. Inactivation of *Bacillus cereus* vegetative cells by gastric acid and bile during in vitro gastrointestinal transit. *Gut Pathog.*, 4, 11.

CEUPPENS, S., VAN DE WIELE, T., RAJKOVIC, A., FERRER-CABACERAN, T., HEYNDRICKX, M., BOON, N. & UYTTENDAELE, M. 2012d. Impact of intestinal microbiota and gastrointestinal conditions on the *in vitro* survival and growth of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.*, 155, 241-246.

CEUPPENS, S., BOON, N. & UYTTENDAELE, M. 2013. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 84, 433-450.

CHABAN, B., HUGHES, H. V. & BEEBY, M. 2015. The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 46, 91-103.

CHUNG, M. C., POPOVA, T. G., MILLIS, B. A., MUKHERJEE, D. V., ZHOU, W., LIOTTA, L. A., PETRICOIN, E. F., CHANDHOKE, V., BAILEY, C. & POPOV, S. G. 2006. Secreted neutral metalloproteases of *Bacillus anthracis* as candidate pathogenic factors. *J. Biol. Chem.*, 281, 31408-31418.

CLAIR, G., ROUSSI, S., ARMENGAND, J. & DUPORT, C. 2010. Expanding the known repertoire of virulence factors produced by *Bacillus cereus* through early secretome profiling in three redox conditions. *Mol. Cell Prot.*, 9, 1486-1498.

CLAVEL, T., CARLIN, F., LAIRON, D., NGUYEN-THÈ, C. & SCHMITT, P. 2004. Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *J. Appl. Microbiol.*, 97, 214-219.

DE SARRAU, B., CLAVEL, T., ZWICKEL, N., DESPRES, J., DUPONT, S., BENEY, L., TOURDOT-MARECHAL, R. & NGUYEN-THÈ, C. 2013. Unsaturated fatty acids from food and in the growth medium improve growth of *Bacillus cereus* under cold and anaerobic conditions. *Food Microbiol.*, 36, 113-122.

DIDELOT, X., BARKER, M., FALUSH, D. & PRIEST, F. G. 2009. Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. *Syst. Appl. Microbiol.*, 32, 81-90.

DIETRICH, R., FELLA, C., STRICH, S. & MÄRTLBAUER, E. 1999. Production and characterization of monoclonal antibodies against the hemolysin BL enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 4470-4474.

DIETRICH, R., MORAVEK, M., BÜRCK, C., GRANUM, P. E. & MÄRTLBAUER, E. 2005. Production and characterization of antibodies against each of the three subunits of the *Bacillus cereus* nonhemolytic enterotoxin complex. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 8214-8220.

DOLL, V. M., EHLING-SCHULZ, M. & VOGELMANN, R. 2013. Concerted action of sphingomyelinase and non-hemolytic enterotoxin in pathogenic *Bacillus cereus*. *PLoS One*, 8, e61404.

DRESSMAN, J. B., BERARDI, R. R., DERMENTZOGLOU, L. C., RUSSELL, T. L., SCHMALTZ, S. P., BARNETT, J. L. & JARVENPAA, K. M. 1990. Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women. *Pharmaceutical Research*, 7, 756-761.

DUAN, Q., ZHOU, M., ZHU, L. & ZHU, G. 2013. Flagella and bacterial pathogenicity. *J. Basic Microbiol.*, 53, 1-8.

DUC, L. H., HONG, H. A., BARBOSA, T. M., HENRIQUES, A. O. & CUTTING, S. M. 2004. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 2161-2171.

DUPORT, C., JOBIN, M. & SCHMITT, P. 2016. Adaptation in *Bacillus cereus*: From stress to disease. *Front. Microbiol.*, 7, 1550.

EFSA 2016a. 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*, 14, 93.

EFSA 2016b. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14, 231.

EHLING-SCHULZ, M., FRICKER, M. & SCHERER, S. 2004. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Mol. Nutr. Food Res.*, 48, 479-487.

EHLING-SCHULZ, M. & MESSELHÄUSSER, U. 2013. *Bacillus* "next generation" diagnostics: moving from detection toward subtyping and risk-related strain profiling. *Front. Microbiol.*, 4, 32.

FAGERLUND, A., WEEN, O., LUND, T., HARDY, S. P. & GRANUM, P. E. 2004. Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology*, 150, 2689-2697.

FAGERLUND, A., LINDBÄCK, T., STORSET, A. K., GRANUM, P. E. & HARDY, S. P. 2008. *Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia. *Microbiology*, 154, 693-704.

FRENZEL, E., KRANZLER, M., STARK, T. D., HOFMANN, T. & EHLING-SCHULZ, M. 2015. The endospore-forming pathogen *Bacillus cereus* exploits a small colony variant-based diversification strategy in response to aminoglycoside exposure. *mBio*, 6, e01172-15.

FRICKER, M., REISSBRODT, R. & EHLING-SCHULZ, M. 2007. Evaluation of standard and new chromogenic selective plating media for isolation and identification of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.*, 121, 27-34.

FRICKER, M., ÅGREN, J., SEGERMAN, B., KNUTSSON, R. & EHLING-SCHULZ, M. 2011. Evaluation of *Bacillus* strains as model systems for the work on *Bacillus anthracis* spores. *Int. J. Food Microbiol.*, 145, S129-S136.

GAGNON, M., ZIHLER BERNER, A., CHERVET, N., CHASSARD, C. & LACROIX, C. 2013. Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate *Salmonella* adhesion and invasion. *J. Microbiol. Methods*, 94, 274-279.

GHELARDI, E., CELANDRONI, F., SALVETTI, S., BEECHER, D. J., GOMINET, M., LERECLUS, D., WONG, A. C. L. & SENESI, S. 2002. Requirement of *flhA* for swarming differentiation, flagellin export, and secretion of virulence-associated proteins in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.*, 184, 6424-6433.

GHELARDI, E., CELANDRONI, F., SALVETTI, S., CERAGIOLI, M., BEECHER, D. J., SENESI, S. & WONG, A. C. L. 2007. Swarming behavior of and hemolysin BL secretion by *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 4089-4093.

GHOSH, S. & SETLOW, P. 2010. The preparation, germination properties and stability of superdormant spores of *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.*, 108, 582-590.

GLASSET, B., HERBIN, S., GUILLIER, L., CADEL-SIX, S., VIGNAUD, M., GROUT, J., PAIRAUD, S., MICHEL, V., HENNEKINNE, J., RAMARAO, N. & BRISABOIS, A. 2016. *Bacillus cereus*-induced food-borne outbreaks in France, 2007 to 2014: epidemiology and genetic characterisation. *Euro Surveill.*, 21.

GRANUM, P. E. & LUND, T. 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett.*, 157, 223-228.

GUILLEMET, E., CADOT, C., TRAN, S. L., GUINEBRETIERE, M. H., LERECLUS, D. & RAMARAO, N. 2010. The InhA metalloproteases of *Bacillus cereus* contribute concomitantly to virulence. *J. Bacteriol.*, 192, 286-294.

GUINEBRETIERE, M. H., BROUSSOLLE, V. & NGUYEN-THÈ, C. 2002. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 3053-3056.

GUINEBRETIERE, M. H., FAGERLUND, A., GRANUM, P. E. & NGUYEN-THÈ, C. 2006. Rapid discrimination of *cytK-1* and *cytK-2* genes in *Bacillus cereus* strains by a novel duplex PCR system. *FEMS Microbiol. Lett.*, 259, 74-80.

GUINEBRETIERE, M. H., THOMPSON, F. L., SOROKIN, A., NORMAND, P., DAWYNDT, P., EHLING-SCHULZ, M., SVENSSON, B., SANCHIS, V., NGUYEN-THÈ, C., HEYNDRICKX, M. & DE VOS, P. 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environ. Microbiol.*, 10, 851-865.

GUINEBRETIERE, M. H., VELGE, P., COUVERT, O., CARLIN, F., DEBUYSER, M. L. & NGUYEN-THÈ, C. 2010. Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation. *J. Clin. Microbiol.*, 48, 3388-3391.

GUINEBRETIERE, M. H., AUGER, S., GALLERON, N., CONTZEN, M., DE SARRAU, B., DE BUYSER, M. L., LAMBERET, G., FAGERLUND, A., GRANUM, P. E., LERECLUS, D., DE VOS, P., NGUYEN-THÈ, C. & SOROKIN, A. 2013. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63, 31-40.

HARDY, S. P., LUND, T. & GRANUM, P. E. 2001. CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. *FEMS Microbiol. Lett.*, 197, 47-51.

HEILKENBRINKER, U., DIETRICH, R., DIDIER, A., ZHU, K., LINDBÄCK, T., GRANUM, P. E. & MÄRTLBAUER, E. 2013. Complex formation between NheB and NheC is necessary to induce cytotoxic activity by the three-component *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *PLoS One*, 8, e63104.

HENDERSON, B. & MARTIN, A. 2011. Bacterial virulence in the moonlight: multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. *Infect. Immun.*, 79, 3476-3491.

HORNSTRA, L. M., TER BEEK, A., SMELT, J. P., KALLEMEIJN, W. W. & BRUL, S. 2009. On the origin of heterogeneity in (preservation) resistance of *Bacillus* spores: input for a 'systems' analysis approach of bacterial spore outgrowth. *Int. J. Food Microbiol.*, 134, 9-15.

HWANG, J. Y. & PARK, J. H. 2015. Characteristics of enterotoxin distribution, hemolysis, lecithinase, and starch hydrolysis of *Bacillus cereus* isolated from infant formulas and ready-to-eat foods. *J. Dairy Sci.*, 98, 1652-1660.

JESSBERGER, N., DIETRICH, R., BOCK, S., DIDIER, A. & MÄRTLBAUER, E. 2014. *Bacillus cereus* enterotoxins act as major virulence factors and exhibit distinct cytotoxicity to different human cell lines. *Toxicon*, 77, 49-57.

JESSBERGER, N., KREY, V. M., RADEMACHER, C., BÖHM, M. E., MOHR, A. K., EHLING-SCHULZ, M., SCHERER, S. & MÄRTLBAUER, E. 2015. From genome to toxicity: a combinatory approach highlights the complexity of enterotoxin production in *Bacillus cereus*. *Front. Microbiol.*, 6, 560.

JONES, C. A., PADULA, N. L. & SETLOW, P. 2005. Effect of mechanical abrasion on the viability, disruption and germination of spores of *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Microbiol.*, 99, 1484-1494.

JOSENHANS, C. & SUERBAUM, S. 2002. The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.*, 291, 605-614.

KAHL, B. C., BECKER, K. & LÖFFLER, B. 2016. Clinical significance and pathogenesis of staphylococcal small colony variants in persistent infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 29, 401-427.

KAMAR, R., GOHAR, M., JEHANNO, I., REJASSE, A., KALLASSY, M., LERECLUS, D., SANCHIS, V. & RAMARAO, N. 2013. Pathogenic potential of *Bacillus cereus* strains as revealed by phenotypic analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 51, 320-323.

KAMP, H. D. & HIGGINS, D. E. 2011. A protein thermometer controls temperature-dependent transcription of flagellar motility genes in *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog.*, 7, e1002153.

KNIEHL, E., BECKER, A. & FORSTER, D. H. 2003. Pseudo-outbreak of toxigenic *Bacillus cereus* isolated from stools of three patients with diarrhoea after oral administration of a probiotic medication. *J. Hosp. Infect.*, 55, 33-38.

KOTIRANTA, A., LOUNATMAA, K. & HAAPASALO, M. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect.*, 2, 189-198.

KOVAC, J., MILLER, R. A., CARROLL, L. M., KENT, D. J., JIAN, J., BENO, S. M. & WIEDMANN, M. 2016. Production of hemolysin BL by *Bacillus cereus* group isolates of dairy origin is associated with whole-genome phylogenetic clade. *BMC Genomics*, 17, 581.

LAPARRA, J. M. & SANZ, Y. 2009. Comparison of *in vitro* models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Lett. Appl. Microbiol.*, 49, 695-701.

LMKV 1981. § 7 Mindesthaltbarkeitsdatum (1) *Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 15. Dezember 1999 (BGBl. IS. 2464), die zuletzt durch Artikel 2 der Verordnung vom 25. Februar 2014 (BGBl. I S. 218) geändert worden ist.* <http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/lmkv/gesamt.pdf> [Zugriff am: 09.03.2017]

LINDBÄCK, T., FAGERLUND, A., RODLAND, M. S. & GRANUM, P. E. 2004. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology*, 150, 3959-3967.

LINDBÄCK, T., HARDY, S. P., DIETRICH, R., SODRING, M., DIDIER, A., MORAVEK, M., FAGERLUND, A., BOCK, S., NIELSEN, C., CASTEEL, M., GRANUM, P. E. & MÄRTLBAUER, E. 2010. Cytotoxicity of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin requires specific binding order of its three exoprotein components. *Infect. Immun.*, 78, 3813-3821.

LUND, T. & GRANUM, P. E. 1996. Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak *FEMS Microbiol. Lett.*, 141, 151-156.

LUND, T., DE BUYSER, M. L. & GRANUM, P. E. 2000. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol. Microbiol.*, 38, 254-261.

MAGNUSSON, M., SVENSSON, B., KOLSTRUP, C. & CHRISTIANSSON, A. 2007. *Bacillus cereus* in Free-Stall Bedding. *J. Dairy Sci.*, 90, 5473-5482.

MAJED, R., FAILLE, C., KALLASSY, M. & GOHAR, M. 2016. *Bacillus cereus* Biofilms-Same, Only Different. *Front. Microbiol.*, 7, 1054.

MAZZANTINI, D., CELANDRONI, F., SALVETTI, S., GUEYE, S. A., LUPETTI, A., SENESI, S. & GHELARDI, E. 2016. FlhF Is Required for Swarming Motility and Full Pathogenicity of *Bacillus cereus*. *Front. Microbiol.*, 7, 1644.

MEDRANO, M., PEREZ, P. F. & ABRAHAM, A. G. 2008. Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. *Int. J. Food Microbiol.*, 122, 1-7.

MEDRANO, M., HAMET, M. F., ABRAHAM, A. G. & PEREZ, P. F. 2009. Kefiran protects Caco-2 cells from cytopathic effects induced by *Bacillus cereus* infection. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 96, 505-513.

MILLER, R. A., BENO, S. M., KENT, D. J., CARROLL, L. M., MARTIN, N. H., BOOR, K. J. & KOVAC, J. 2016. *Bacillus wiedmannii* sp. nov. is a new psychrotolerant and cytotoxic group species isolated from dairy foods and environments in the USA. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66, 4744-4753.

MINNAARD, J., LIEVIN-LE MOAL, V., COCONNIER, M., SERVIN, A. & PEREZ, P. 2004. Disassembly of F-Actin cytoskeleton after interaction of *Bacillus cereus* with fully differentiated human intestinal Caco-2 cells. *Infect. Immun.*, 72, 3106-3112.

MINNAARD, J., DELFEDERICO, L., VASSEUR, V., HOLLMANN, A., ROLNY, I., SEMORILE, L. & PEREZ, P. F. 2007. Virulence of *Bacillus cereus*: a multivariate analysis. *Int. J. Food Microbiol.*, 116, 197-206.

MINNAARD, J., ROLNY, I. S. & PEREZ, P. F. 2013. Interaction between *Bacillus cereus* and cultured human enterocytes: Effect of calcium, cell differentiation, and bacterial extracellular factors. *J. Food Prot.*, 820-826.

MOHR, A. K. 2015. Enterotoxinproduktion von *Bacillus cereus* unter simulierten intestinalen Bedingungen. *Dissertation, LMU München: Tierärztliche Fakultät*

MORAVEK, M., DIETRICH, R., BUERK, C., BROUSSOLLE, V., GUINEBRETIERE, M. H., GRANUM, P. E., NGUYEN-THÈ, C. & MÄRTLBAUER, E. 2006. Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses. *FEMS Microbiol. Lett.*, 257, 293-298.

MUKHERJEE, S. & KEARNS, D. B. 2014. The structure and regulation of flagella in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.*, 48, 319-340.

O'NEIL, H. S. & MARQUIS, H. 2006. *Listeria monocytogenes* flagella are used for motility, not as adhesins, to increase host cell invasion. *Infect. Immun.*, 74, 6675-6681.

OTTEMANN, K. M. & MILLER, J. F. 1997. Roles for motility in bacterial-host interactions. *Mol. Microbiol.*, 24, 1109-1117.

OUHIB-JACOBS, O., LINDLEY, N. D., SCHMITT, P. & CLAVEL, T. 2009. Fructose and glucose mediates enterotoxin production and anaerobic metabolism of *Bacillus cereus* ATCC14579(T). *J. Appl. Microbiol.*, 107, 821-829.

PATINO-NAVARRETE, R. & SANCHIS, V. 2016. Evolutionary processes and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of *Bacillus cereus* group bacteria. *Res. Microbiol.*, 1-10.

PEPE, O., BLAIOTTA, G., MOSCHETTI, G., GRECO, T. & VILLANI, F. 2003. Rope-producing strains of *Bacillus spp.* from wheat bread and strategy for their control by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 2321-2329.

PIZARRO-CERDA, J. & COSSART, P. 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*, 124, 715-727.

PLANCHON, S., DARGAIGNARATZ, C., LEVY, C., GINIES, C., BROUSSOLLE, V. & CARLIN, F. 2011. Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10 °C and 30 °C display variations in their properties. *Food Microbiol.*, 28, 291-297.

PROCTOR, R. A., VON EIFF, C., KAHL, B. C., BECKER, K., MCNAMARA, P., HERRMANN, M. & PETERS, G. 2006. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat. Rev. Microbiol.*, 4, 295-305.

RAMARAO, N. & LERECLUS, D. 2006. Adhesion and cytotoxicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* to epithelial cells are FlhA and PlcR dependent, respectively. *Microbes Infect.*, 8, 1483-1491.

SALVETTI, S., GHELARDI, E., CELANDRONI, F., CERAGIOLI, M., GIANNESI, F. & SENESI, S. 2007. FlhF, a signal recognition particle-like GTPase, is involved in the regulation of flagellar arrangement, motility behaviour and protein secretion in *Bacillus cereus*. *Microbiology*, 153, 2541-2552.

SALVETTI, S., FAEGRI, K., GHELARDI, E., KOLSTØ, A. B. & SENESI, S. 2011. Global gene expression profile for swarming *Bacillus cereus* bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77, 5149-5156.

SANCHEZ, B., ARIAS, S., CHAIGNEPAIN, S., DENAYROLLES, M., SCHMITTER, J. M., BRESSOLLIER, P. & URDACI, M. C. 2009. Identification of surface proteins involved in the adhesion of a probiotic *Bacillus cereus* strain to mucin and fibronectin. *Microbiology*, 155, 1708-1716.

SANTOS, V. & HIRSHFIELD, I. 2016. The physiological and molecular characterization of a small colony variant of *Escherichia coli* and its phenotypic rescue. *PLoS One*, 11, e0157578.

SANZ-PUIG, M., PINA-PEREZ, M. C., CRIADO, M. N., RODRIGO, D. & MARTINEZ-LOPEZ, A. 2015. Antimicrobial potential of cauliflower, broccoli, and okara byproducts against foodborne bacteria. *Foodborne Pathog. Dis.*, 12, 39-46.

SASTALLA, I., FATTAH, R., COPPAGE, N., NANDY, P., CROWN, D., POMERANTSEV, A. P. & LEPPLA, S. H. 2013. The *Bacillus cereus* Hbl and Nhe tripartite enterotoxin components assemble sequentially on the surface of target cells and are not interchangeable. *PLoS One*, 8, e76955.

SCOTT, S. A., BROOKS, J. D., RAKONJAC, J., WALKER, K. M. & FLINT, S. H. 2007. The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. *Int. J. Dairy Technol.*, 60, 109-117.

SENESE, S., SALVETTI, S., CELANDRONI, F. & GHELARDI, E. 2010. Features of *Bacillus cereus* swarm cells. *Res. Microbiol.*, 161, 743-749.

SETLOW, P. 2003. Spore germination. *Curr. Opin. Microbiol.*, 6, 550-556.

SETLOW, P. 2014a. Spore resistance properties. *Microbiol. Spectrum*, 2.

SETLOW, P. 2014b. The Germination of Spores of *Bacillus* Species: what we know and don't know. *J. Bacteriol.*, 196, 1297-1305.

SHINAGAWA, K. 1990. Analytical methods for *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. *Int. J. Food Microbiol.*, 10, 125-142.

SOROKULOVA, I. 2008. Preclinical testing in the development of probiotics: a regulatory perspective with *Bacillus* strains as an example. *Clin. Infect. Dis.*, 46 Suppl 2, S92-95.

SPIRA, W. M. & GOEPFERT, J. M. 1972. *Bacillus cereus*-induced fluid accumulation in rabbit ileal loops. *Appl. Microbiol.*, 24, 341-348.

STENFORS ARNESEN, L. P., FAGERLUND, A. & GRANUM, P. E. 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32, 579-606.

STONES, D. H. & KRACHLER, A. M. 2016. Against the tide: the role of bacterial adhesion in host colonization. *Biochem. Soc. Trans.*, 44, 1571-1580.

TAM, N. K., UYEN, N. Q., HONG, H. A., DUC LE, H., HOA, T. T., SERRA, C. R., HENRIQUES, A. O. & CUTTING, S. M. 2006. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *J. Bacteriol.*, 188, 2692-2700.

TAUSCH, F. F. 2016. Nachweis der Einzelkomponenten B, L1 und L2 des *Bacillus cereus* Enterotoxin-Komplexes Hämolysin BL: Entwicklung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern. *Dissertation, LMU München: Tierärztliche Fakultät*

TE GIFFEL, M. C., BEUMER, R. R., GRANUM, P. E. & ROMBOUITS, F. M. 1997. Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* from pasteurised milk in household refrigerators in the Netherlands. *Int. J. Food Microbiol.*, 34, 307-318.

TRAN, S. L., GUILLEMET, E., GOHAR, M., LERECLUS, D. & RAMARAO, N. 2010. CwpFM (EntFM) is a *Bacillus cereus* potential cell wall peptidase implicated in adhesion, biofilm formation, and virulence. *J. Bacteriol.*, 192, 2638-2642.

TRAN, S. L., GUILLEMET, E., NGO-CAMUS, M., CLYBOUW, C., PUHAR, A., MORIS, A., GOHAR, M., LERECLUS, D. & RAMARAO, N. 2011. Haemolysin II is a *Bacillus cereus* virulence factor that induces apoptosis of macrophages. *Cell Microbiol.*, 13, 92-108.

TSILIA, V., KERCKHOF, F. M., RAJKOVIC, A., HEYNDRICKX, M. & VAN DE WIELE, T. 2016. *Bacillus cereus* NVH 0500/00 can adhere to mucin, but cannot produce enterotoxins during gastrointestinal simulation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82, 289–296.

TURNBULL, P. C. B., JORGENSEN, K., KRAMER, J. M. & GILBERT, R. J. 1979. Severe clinical conditions associated with *Bacillus cereus* and the apparent involvement of exotoxins. *J. Clin. Pathol.*, 32, 289-293.

WELLS-BENNIK, M. H., EIJLANDER, R. T., DEN BESTEN, H. M., BERENDSEN, E. M., WARDA, A. K., KRAWCZYK, A. O., NIEROP GROOT, M. N., XIAO, Y., ZWIETERING, M. H., KUIPERS, O. P. & ABEE, T. 2016. Bacterial spores in food: survival, emergence, and outgrowth. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 7, 457-482.

WIJMAN, J. G., DE LEEUW, P. P., MOEZELAAR, R., ZWIETERING, M. H. & ABEE, T. 2007. Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 1481-1488.

WIJNANDS, L. M., DUFRENNE, J. B., ZWIETERING, M. H. & VAN LEUSDEN, F. M. 2006. Spores from mesophilic *Bacillus cereus* strains germinate better and grow faster in simulated gastro-intestinal conditions than spores from psychrotrophic strains. *Int. J. Food Microbiol.*, 112, 120-128.

WIJNANDS, L. M., DUFRENNE, J. B., VAN LEUSDEN, F. M. & ABEE, T. 2007. Germination of *Bacillus cereus* spores is induced by germinants from differentiated Caco-2 Cells, a human cell line mimicking the epithelial cells of the small intestine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 5052-5054.

WIJNANDS, L. M., PIELAAT, A., DUFRENNE, J. B., ZWIETERING, M. H. & VAN LEUSDEN, F. M. 2009. Modelling the number of viable vegetative cells of *Bacillus cereus* passing through the stomach. *J. Appl. Microbiol.*, 106, 258-67.

ZHANG, Z., TAO, X., SHAH, N. P. & WEI, H. 2016. Antagonistics against pathogenic *Bacillus cereus* in milk fermentation by *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 and its anti-adhesion effect on Caco-2 cells against pathogens. *J. Dairy Sci.*, 99, 2666-2674.

ZHU, K., HÖLZEL, C. S., CUI, Y., MAYER, R., WANG, Y., DIETRICH, R., DIDIER, A., BASSITTA, R., MÄRTLBAUER, E. & DING, S. 2016. Probiotic *Bacillus cereus* strains, a potential risk for public health in China. *Front. Microbiol.*, 7, 718.

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: A. Schematische Darstellung einer <i>Bacillus</i> Spore, modifiziert nach Setlow (2014a). B. Mikroskopische Aufnahme von Sporen des Stammes INRA A3 aus dieser Arbeit.....	7
Abbildung 2: Motilität durch <i>swimming</i>	36
Abbildung 3: Motilität durch <i>swarming</i>	37
Abbildung 4: <i>Swimming</i> bei 30 °C nach 48 h.....	38
Abbildung 5: <i>Swimming</i> bei 37 °C nach 48 h.....	39
Abbildung 6: <i>Swarming</i> bei 30 °C nach 48 h.....	40
Abbildung 7: <i>Swarming</i> bei 37 °C nach 48 h.....	41
Abbildung 8: Überlebensrate von <i>B. cereus</i> Sporen in reinem Magensaft.....	44
Abbildung 9: Überlebensraten von <i>B. cereus</i> Sporen in Magensaft mit Lebensmitteln.....	47
Abbildung 10: Wirkung von Milch 1,5 % Fett (A), Milch 3,5 % Fett (B), Mascarpone I (C), Mascarpone II (D), Sahne (E), lactosefreier Milch (F), Folgemilch (G) und Milchreis (H) auf das Überleben von <i>B. cereus</i> Sporen in Magensaft.....	48
Abbildung 11: WSBC 10035 auf CGY-Agar.....	49
Abbildung 12: Produktion von NheB (A) und NheA (B) beider Kolonievarianten von WSBC 10035.....	50
Abbildung 13: Zytotoxizität beider Kolonievarianten von WSBC 10035.....	51
Abbildung 14: Adhäsionsfähigkeit von <i>B. cereus</i> an CaCo-2-Zellen.....	53
Abbildung 15: Unterschiede in der Adhäsionsfähigkeit.....	55
Abbildung 16: WST-1-Bioassay mit Lebensmitteln.....	58
Abbildung 17: PI-Test auf CaCo-2-Zellen mit Kulturüberstand von NVH 0075-95.....	60
Abbildung 18: PI-Test auf CaCo-2-Zellen mit Kulturüberstand von F837/76....	61
Abbildung 19: PI-Test auf CaCo-2-Zellen mit Kulturüberstand der Nhe-Mutante.....	62

Abbildung 20: Einfluss von Lebensmitteleinzelkomponenten auf die Zytotoxizität der Nhe-Mutante.....	63
Abbildung 21: Toxinproduktion der Nhe-Mutante in Abhängigkeit von Lebensmitteleinzelkomponenten..	65
Abbildung 22: Phylogenetische Stammbäume für FlaA, FlhA und FlhF. Einteilung nach <i>swimming</i> bei 30 °C nach 24 h.....	116
Abbildung 23: Phylogenetische Stammbäume für FlaA, FlhA und FlhF. Einteilung nach <i>swimming</i> bei 37 °C nach 24 h.....	117
Abbildung 24: Phylogenetische Stammbäume für FlaA, FlhA und FlhF. Einteilung nach <i>swarming</i> bei 30 °C nach 24 h.....	118
Abbildung 25: Phylogenetische Stammbäume für FlaA, FlhA und FlhF. Einteilung nach <i>swarming</i> bei 37 °C nach 24 h.....	119
Abbildung 26: Phylogentische Stammbäume für FlaA, FlhA und FlhF (A) sowie für <i>s-layer protein</i> , <i>zinc metalloproteinase</i> und <i>cell-enevelope-bound metalloprotease</i> (Sanchez <i>et al.</i> , 2009) (B).....	120
Abbildung 27: Phylogentische Stammbäume für FlaA, FlhA und FlhF (A) sowie für <i>s-layer protein</i> , <i>zinc metalloproteinase</i> und <i>cell-enevelope-bound metalloprotease</i> (Sanchez <i>et al.</i> , 2009) (B). Einteilung nach Adhäsion von vegetativen Zellen an CaCo-2-Zellen.	122

X. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Spurenelemente	18
Tabelle 2: N-, S-, Mn-Quelle	18
Tabelle 3: sonstige Lösungen	19
Tabelle 4: Nährbrühe.....	19
Tabelle 5: Sporenwaschpuffer.....	19
Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete mAk	21
Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete <i>B. cereus</i> Stämme.	23
Tabelle 8: Erweitertes Stammset.....	67
Tabelle 9: Bewertung des Stammsets.....	70
Tabelle 10: Neue Einteilung der Stämme bezüglich ihrer potentiellen Pathogenität.....	71
Tabelle 11: Adhäsion – Mittelwert (MW) und Standardabweichung (STAB) aller Replikate in absoluten Zahlen.....	109
Tabelle 12: Magenpassage ohne Lebensmittel.....	110
Tabelle 13: Magenpassage mit Lebensmitteln.	111

XI. ANHANG

Tabelle 11: Adhäsion – Mittelwert (MW) und Standardabweichung (STAB) aller Replikate in absoluten Zahlen A. Adhäsion von Sporen an CaCo-2-Zellen. B. Adhäsion von vegetativen Zellen an CaCo-2-Zellen.

absolute Werte Adhäsion Sporen

A Stamm	MW*	STAB*	MW	STAB
	Inokulum	Inokulum	Infektion	Infektion
<i>14294-3 (M6)</i>	4,2E+06	1,5E+05	1,5E+04	3,9E+03
<i>SDA KA96</i>	1,0E+07	7,2E+05	3,7E+03	2,5E+03
<i>INRA A3</i>	8,0E+06	2,0E+06	1,2E+04	2,4E+03
<i>INRA C3</i>	2,7E+06	2,0E+05	5,5E+04	3,9E+04
<i>6/27/S</i>	3,0E+06	3,3E+05	5,2E+03	1,1E+03
<i>F3175/03 (D7)</i>	7,9E+06	5,1E+05	4,5E+04	6,0E+03
<i>RIVM BC 934</i>	6,2E+06	1,7E+06	1,1E+04	5,7E+03
<i>F528/94</i>	4,3E+06	5,5E+05	1,0E+04	8,3E+03
<i>F837/76</i>	6,1E+06	2,1E+06	1,4E+04	7,7E+03
<i>RIVM BC 126</i>	2,5E+06	2,4E+05	1,1E+04	2,9E+03
<i>MHI86</i>	6,3E+06	2,9E+05	2,6E+04	5,1E+03
<i>F4429/71</i>	1,4E+07	3,9E+06	1,0E+05	5,1E+04
<i>RIVM BC 964</i>	1,8E+06	7,7E+04	8,1E+03	5,9E+03
<i>F3162/04 (D8)</i>	2,2E+07	3,2E+06	1,2E+05	4,3E+04
<i>MHI226</i>	3,7E+06	3,2E+05	9,3E+03	1,9E+03
<i>NVH 0075/95</i>	4,9E+06	2,2E+05	2,2E+04	6,2E+03
<i>WSBC 10035</i>	7,9E+06	2,0E+06	2,3E+05	2,5E+04
<i>RIVM BC 90</i>	1,6E+07	3,0E+06	1,6E+05	6,4E+03
<i>7/27/S</i>	1,1E+07	1,5E+06	6,9E+04	1,2E+04
<i>IP 5832</i>	2,97E+06	2,97E+05	4,07E+04	8,51E+03

absolute Werte Adhäsion vegetative Zellen

B Stamm	MW*	STAB*	MW	STAB
	Inokulum	Inokulum	Infektion	Infektion
<i>14294-3 (M6)</i>	1,28E+06	5,25E+05	4,73E+04	3,59E+04
<i>SDA KA96</i>	6,32E+06	3,19E+06	4,14E+04	1,82E+04
<i>INRA A3</i>	2,13E+06	8,85E+05	4,23E+04	2,05E+04
<i>INRA C3</i>	3,27E+06	1,25E+06	1,09E+05	5,08E+04
<i>6/27/S</i>	1,30E+07	9,51E+06	1,35E+05	8,29E+04
<i>F3175/03 (D7)</i>	2,03E+06	1,48E+05	4,05E+04	1,45E+04
<i>RIVM BC 934</i>	1,28E+06	3,23E+05	1,99E+04	1,29E+04
<i>F528/94</i>	1,76E+06	3,81E+05	1,08E+05	6,64E+04
<i>F837/76</i>	5,75E+05	2,08E+05	1,59E+04	4,40E+03
<i>RIVM BC 126</i>	1,37E+05	1,47E+04	2,98E+03	4,68E+02
<i>MHI86</i>	2,15E+06	8,30E+05	2,17E+04	1,15E+04
<i>F4429/71</i>	3,50E+06	3,77E+05	2,45E+04	1,18E+04
<i>RIVM BC 964</i>	2,02E+05	5,92E+04	7,33E+03	5,80E+03
<i>F3162/04 (D8)</i>	4,87E+06	3,82E+06	1,65E+04	7,43E+03
<i>MHI226</i>	3,66E+06	1,58E+06	5,60E+04	2,84E+04
<i>NVH 0075/95</i>	3,17E+06	1,26E+06	3,18E+04	1,12E+04
<i>WSBC 10035</i>	6,89E+05	8,89E+04	1,06E+04	4,63E+03
<i>RIVM BC 90</i>	4,67E+06	3,34E+06	3,08E+04	8,50E+03
<i>7/27/S</i>	3,82E+06	1,69E+06	5,29E+04	2,40E+04
<i>IP 5832</i>	3,10E+06	8,74E+05	6,79E+04	1,76E+04

Tabelle 12: Magenpassage ohne Lebensmittel. A. Mittelwerte aller Replikate in absoluten Zahlen. **B.** zugehörige Standardabweichungen in absoluten Zahlen.

Mittelwert

A	Stamm	Inokulum	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
	<i>I4294-3 (M6)</i>	1,24E+07	7,27E+04	5,91E+04	4,55E+04	2,73E+04	1,82E+04	1,14E+04
	<i>SDA KA 96</i>	1,08E+08	7,23E+05	8,64E+05	3,59E+05	1,00E+05	2,68E+05	5,23E+04
	<i>INRA A3</i>	1,25E+07	8,73E+05	4,23E+05	2,45E+05	1,23E+05	1,84E+05	4,32E+04
	<i>INRA C3</i>	1,74E+07	5,36E+05	3,86E+05	4,98E+05	3,43E+05	1,86E+05	1,34E+05
	<i>6/27/S</i>	1,29E+08	2,86E+05	1,93E+05	8,18E+04	8,64E+04	8,18E+04	5,00E+04
	<i>F3175/03 (D7)</i>	9,82E+08	2,70E+05	3,30E+05	1,36E+05	6,59E+04	1,50E+05	5,91E+04
	<i>RIVM BC 934</i>	8,05E+07	9,32E+04	1,09E+05	8,64E+04	3,18E+04	5,91E+04	2,05E+04
	<i>F528/94</i>	1,84E+07	2,59E+05	1,95E+05	1,05E+05	7,95E+04	1,00E+05	7,50E+04
	<i>F837/76</i>	7,70E+08	7,02E+05	9,61E+05	6,20E+05	2,89E+05	2,64E+05	1,91E+05
	<i>RIVM BC 126</i>	4,99E+08	1,20E+05	6,14E+04	4,09E+04	2,27E+04	1,14E+04	9,09E+03
	<i>MHI86</i>	4,12E+08	2,27E+05	2,02E+05	1,07E+05	6,36E+04	5,00E+04	1,82E+04
	<i>F4429/71</i>	1,99E+08	6,95E+05	1,95E+05	1,41E+05	1,02E+05	8,86E+04	8,41E+04
	<i>RIVM BC 964</i>	6,95E+06	4,11E+05	2,20E+05	1,11E+05	2,95E+04	2,27E+04	1,14E+04
	<i>F3162/04 (D8)</i>	1,01E+07	3,86E+05	2,09E+05	2,18E+05	1,32E+05	1,00E+05	3,64E+04
	<i>MHI226</i>	2,32E+07	4,80E+05	2,80E+05	1,36E+05	9,09E+03	1,14E+04	2,27E+03
	<i>NVH 0075-95</i>	1,10E+07	4,55E+04	5,00E+04	9,09E+03	2,27E+03	2,27E+03	2,27E+03
	<i>WSBC 10035</i>	1,52E+08	1,46E+07	1,50E+07	1,03E+07	6,77E+06	4,50E+06	4,18E+06
	<i>RIVM BC 90</i>	3,45E+08	3,32E+05	3,02E+05	1,09E+05	8,18E+04	6,14E+04	4,09E+04
	<i>7/27/S</i>	1,84E+07	7,77E+05	3,45E+05	2,66E+05	2,05E+05	1,39E+05	2,73E+04
	<i>IP 5832</i>	6,82E+08	7,00E+06	3,66E+06	1,87E+06	1,71E+06	5,39E+05	3,25E+05

Standardabweichung

B	Stamm	Inokulum	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
	<i>I4294-3 (M6)</i>	1,48E+06	4,50E+04	7,07E+04	6,43E+03	2,57E+04	6,43E+03	3,21E+03
	<i>SDA KA 96</i>	3,11E+07	3,21E+05	4,89E+05	1,16E+05	1,93E+04	1,80E+05	9,64E+03
	<i>INRA A3</i>	1,29E+05	5,08E+05	1,99E+05	7,07E+04	1,93E+04	8,04E+04	3,54E+04
	<i>INRA C3</i>	5,72E+06	4,69E+05	2,76E+05	2,86E+05	1,57E+05	0,00E+00	7,39E+04
	<i>6/27/S</i>	1,75E+08	1,61E+05	1,06E+05	2,57E+04	5,14E+04	1,93E+04	6,43E+03
	<i>F3175/03 (D7)</i>	1,61E+08	2,09E+05	2,86E+05	3,86E+04	2,89E+04	1,29E+05	1,29E+04
	<i>RIVM BC 934</i>	3,54E+06	9,64E+03	1,16E+05	1,29E+04	1,93E+04	0,00E+00	3,21E+03
	<i>F528/94</i>	5,34E+06	9,00E+04	9,64E+04	5,14E+04	2,89E+04	1,29E+04	1,61E+04
	<i>F837/76</i>	0,00E+00	3,89E+05	2,86E+05	2,09E+05	1,70E+05	9,00E+04	6,43E+04
	<i>RIVM BC 126</i>	2,56E+08	7,39E+04	9,64E+03	4,50E+04	6,43E+03	9,64E+03	1,29E+04
	<i>MHI86</i>	5,87E+07	2,51E+05	8,68E+04	4,82E+04	1,93E+04	1,29E+04	6,43E+03
	<i>F4429/71</i>	8,13E+07	3,15E+05	1,22E+05	7,07E+04	3,21E+03	5,46E+04	4,82E+04
	<i>RIVM BC 964</i>	4,82E+06	1,77E+05	9,96E+04	8,04E+04	9,64E+03	2,57E+04	3,21E+03
	<i>F3162/04 (D8)</i>	8,36E+05	3,02E+05	8,36E+04	9,64E+04	1,03E+05	7,71E+04	4,50E+04
	<i>MHI226</i>	6,43E+05	9,96E+04	1,25E+05	2,57E+04	6,43E+03	3,21E+03	3,21E+03
	<i>NVH 0075-95</i>	5,14E+05	3,86E+04	1,29E+04	6,43E+03	3,21E+03	3,21E+03	3,21E+03
	<i>WSBC 10035</i>	1,17E+08	8,23E+06	4,50E+06	2,60E+06	2,12E+06	1,41E+06	1,61E+06
	<i>RIVM BC 90</i>	1,41E+07	6,43E+03	6,75E+04	9,00E+04	5,79E+04	9,64E+03	1,93E+04
	<i>7/27/S</i>	0,00E+00	4,95E+05	1,29E+05	8,04E+04	7,71E+04	2,89E+04	1,93E+04
	<i>IP 5832</i>	3,06E+08	3,15E+06	6,11E+05	3,76E+05	6,07E+05	1,19E+05	4,18E+04

Tabelle 13: Magenpassage mit Lebensmitteln. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte (MW) aus allen Replikaten sowie die zugehörigen Standardabweichungen (STAB) für Milch 1,5 % (A), Milch 3,5 % (B), Mascarpone I (C), Mascarpone II (D), Sahne (E), lactosefreie Milch (F), Folgemilch (G) und Milchreis (H).

A

MW						
Milch 1,5 %	<i>F837/76</i>	<i>F528/94</i>	<i>NVH 0075-95</i>	<i>MHI226</i>	<i>WSBC 10035</i>	<i>IP 5832</i>
0 h	1,66E+06	7,91E+06	1,68E+06	2,79E+06	4,55E+06	3,10E+06
1 h	3,32E+06	2,09E+05	1,36E+05	2,64E+05	4,60E+07	1,18E+07
2 h	2,20E+06	1,05E+05	9,55E+04	1,09E+05	4,00E+07	6,86E+06
3 h	1,00E+06	5,00E+04	2,27E+04	2,73E+04	2,11E+07	1,80E+06
4 h	7,68E+05	2,27E+04	4,55E+03	4,55E+03	1,60E+07	1,39E+06
5 h	3,41E+05	3,18E+04	0,00E+00	0,00E+00	1,03E+07	6,17E+05
6 h	2,05E+05	4,55E+03	0,00E+00	0,00E+00	9,68E+06	2,34E+05

STAB						
Milch 1,5 %	<i>F837/76</i>	<i>F528/94</i>	<i>NVH 0075-95</i>	<i>MHI226</i>	<i>WSBC 10035</i>	<i>IP 5832</i>
0 h	7,01E+04	0,00E+00	1,91E+05	3,25E+05	2,57E+05	5,73E+04
1 h	3,54E+05	1,03E+05	0,00E+00	1,80E+05	1,41E+06	6,43E+05
2 h	4,18E+05	3,21E+04	6,43E+03	9,00E+04	2,83E+06	4,50E+05
3 h	3,34E+05	1,93E+04	6,43E+03	3,86E+04	6,43E+05	9,56E+04
4 h	4,18E+05	6,43E+03	6,43E+03	6,43E+03	1,03E+06	1,53E+05
5 h	1,22E+05	6,43E+03	0,00E+00	0,00E+00	3,21E+05	1,59E+05
6 h	8,36E+04	6,43E+03	0,00E+00	0,00E+00	1,86E+06	2,55E+04

B

MW						
Milch 3,5 %	<i>F837/76</i>	<i>F528/94</i>	<i>NVH 0075-95</i>	<i>MHI226</i>	<i>WSBC 10035</i>	<i>IP 5832</i>
0 h	1,80E+06	9,95E+06	3,79E+06	3,18E+06	9,82E+06	3,41E+06
1 h	1,94E+06	3,45E+05	1,45E+05	4,41E+05	8,55E+07	3,30E+06
2 h	1,18E+06	1,45E+05	7,73E+04	1,09E+05	3,40E+07	2,32E+06
3 h	7,95E+05	5,00E+04	2,73E+04	1,36E+04	2,92E+07	9,82E+05
4 h	1,82E+05	3,64E+04	1,36E+04	0,00E+00	1,84E+07	3,33E+05
5 h	2,00E+05	5,00E+04	0,00E+00	0,00E+00	1,43E+07	1,76E+05
6 h	8,64E+04	2,27E+04	0,00E+00	0,00E+00	1,13E+07	6,31E+04

STAB						
Milch 3,5 %	<i>F837/76</i>	<i>F528/94</i>	<i>NVH 0075-95</i>	<i>MHI226</i>	<i>WSBC 10035</i>	<i>IP 5832</i>
0 h	1,59E+05	1,48E+06	1,21E+05	0,00E+00	9,00E+05	7,39E+05
1 h	2,57E+05	3,60E+05	7,71E+04	1,74E+05	2,05E+07	5,22E+05
2 h	1,54E+05	1,80E+05	1,93E+04	1,29E+04	1,10E+07	5,10E+05
3 h	3,21E+04	7,07E+04	1,29E+04	1,93E+04	3,54E+06	3,19E+05
4 h	2,57E+04	3,86E+04	6,43E+03	0,00E+00	4,69E+06	1,91E+05
5 h	1,29E+04	7,07E+04	0,00E+00	0,00E+00	3,66E+06	4,46E+04
6 h	1,93E+04	3,21E+04	0,00E+00	0,00E+00	7,71E+05	1,27E+04

C

MW Mascarpone I	<i>F837/76</i>	<i>F528/94</i>	<i>NVH 0075-95</i>	<i>MHI226</i>	<i>WSBC 10035</i>	<i>IP 5832</i>
0 h	7,91E+06	6,36E+06	5,00E+06	2,41E+06	1,52E+07	5,09E+06
1 h	5,65E+06	4,25E+06	2,73E+05	2,22E+06	9,40E+07	8,73E+06
2 h	5,50E+06	2,95E+06	1,27E+05	8,82E+05	7,65E+07	5,82E+06
3 h	2,15E+06	1,30E+06	1,36E+05	3,05E+05	7,20E+07	2,23E+06
4 h	1,91E+06	1,49E+06	5,00E+04	2,55E+05	3,85E+07	2,36E+06
5 h	1,44E+06	1,08E+06	5,45E+04	1,05E+05	5,20E+07	8,64E+05
6 h	1,20E+06	9,64E+05	3,64E+04	0,00E+00	4,55E+07	5,45E+05

STAB Mascarpone I	<i>F837/76</i>	<i>F528/94</i>	<i>NVH 0075-95</i>	<i>MHI226</i>	<i>WSBC 10035</i>	<i>IP 5832</i>
0 h	5,14E+05	1,54E+06	0,00E+00	1,27E+04	1,29E+06	9,00E+05
1 h	2,12E+05	1,34E+06	5,14E+04	2,64E+05	0,00E+00	1,16E+06
2 h	9,90E+05	6,36E+05	1,29E+04	1,67E+05	3,54E+06	7,71E+05
3 h	2,70E+05	3,41E+05	2,57E+04	1,61E+05	1,41E+07	1,72E+05
4 h	5,14E+04	9,00E+04	6,43E+03	0,00E+00	1,34E+07	5,73E+04
5 h	2,51E+05	1,35E+05	1,29E+04	6,43E+03	5,66E+06	5,73E+04
6 h	2,12E+05	5,14E+04	0,00E+00	0,00E+00	4,95E+06	1,27E+05

D

MW Mascarpone II	<i>F837/76</i>	<i>F528/94</i>	<i>NVH 0075-95</i>	<i>MHI226</i>	<i>WSBC 10035</i>	<i>IP 5832</i>
0 h	6,77E+06	2,93E+06	6,00E+06	5,59E+06	2,16E+07	1,50E+07
1 h	2,57E+06	8,50E+05	3,45E+05	2,00E+06	5,30E+07	2,17E+07
2 h	2,00E+06	7,50E+05	2,23E+05	8,14E+05	4,40E+07	1,16E+07
3 h	1,09E+06	5,05E+05	1,68E+05	3,41E+05	2,86E+07	6,45E+06
4 h	9,55E+05	4,82E+05	5,91E+04	1,82E+04	2,57E+07	4,32E+06
5 h	5,32E+05	2,68E+05	2,73E+04	1,82E+04	2,38E+07	3,14E+06
6 h	4,09E+05	2,95E+05	3,64E+04	4,55E+03	2,21E+07	1,85E+06

STAB Mascarpone II	<i>F837/76</i>	<i>F528/94</i>	<i>NVH 0075-95</i>	<i>MHI226</i>	<i>WSBC 10035</i>	<i>IP 5832</i>
0 h	3,21E+05	1,91E+05	3,86E+05	4,50E+05	3,41E+06	1,22E+06
1 h	6,43E+03	7,07E+04	5,14E+04	1,86E+05	0,00E+00	3,15E+06
2 h	2,51E+05	1,09E+05	6,43E+03	1,61E+05	4,24E+06	1,93E+06
3 h	0,00E+00	6,43E+03	1,35E+05	4,50E+04	7,71E+05	3,86E+05
4 h	2,96E+05	1,16E+05	6,43E+03	1,29E+04	5,46E+06	1,93E+05
5 h	1,93E+04	4,50E+04	0,00E+00	1,29E+04	4,11E+06	5,29E+05
6 h	2,06E+05	6,43E+03	5,14E+04	6,43E+03	1,93E+05	8,28E+04

E

MW Sahne	<i>F837/76</i>	<i>F528/94</i>	<i>NVH 0075-95</i>	<i>MHI226</i>	<i>WSBC 10035</i>	<i>IP 5832</i>
0 h	4,23E+08	1,72E+07	1,42E+06	1,20E+07	7,64E+06	1,81E+07
1 h	1,25E+07	1,89E+06	1,14E+05	3,27E+05	7,55E+07	1,76E+07
2 h	1,19E+07	1,15E+06	1,23E+05	3,82E+05	2,47E+07	6,91E+06
3 h	6,55E+06	8,73E+05	4,55E+04	2,73E+04	2,01E+07	2,72E+06
4 h	7,40E+06	7,14E+05	1,82E+04	1,36E+04	1,56E+07	1,82E+06
5 h	3,95E+06	5,73E+05	9,09E+03	0,00E+00	1,19E+07	6,98E+05
6 h	3,50E+06	4,55E+05	4,55E+03	0,00E+00	1,15E+07	4,01E+05

STAB Sahne	<i>F837/76</i>	<i>F528/94</i>	<i>NVH 0075-95</i>	<i>MHI226</i>	<i>WSBC 10035</i>	<i>IP 5832</i>
0 h	2,08E+08	3,60E+06	1,59E+05	6,43E+04	6,43E+05	1,99E+06
1 h	3,04E+06	3,79E+05	3,21E+04	2,44E+05	0,00E+00	2,51E+06
2 h	2,19E+06	6,43E+04	1,35E+05	1,16E+05	2,76E+06	7,71E+05
3 h	4,95E+05	7,71E+04	3,86E+04	2,57E+04	2,12E+06	1,04E+06
4 h	4,24E+05	1,93E+04	2,57E+04	6,43E+03	1,48E+06	2,10E+05
5 h	6,36E+05	1,29E+04	1,29E+04	0,00E+00	2,44E+06	1,91E+04
6 h	4,24E+05	3,86E+04	6,43E+03	0,00E+00	1,29E+05	1,72E+05

F

MW lactosefreie Milch	<i>F837/76</i>	<i>F528/94</i>	<i>NVH 0075-95</i>	<i>MHI226</i>	<i>WSBC 10035</i>	<i>IP 5832</i>
0 h	2,88E+05	8,59E+06	8,29E+05	1,12E+07	1,21E+07	5,09E+06
1 h	9,09E+03	1,36E+05	1,36E+04	4,55E+03	2,71E+07	8,96E+05
2 h	4,55E+03	4,09E+04	4,55E+03	0,00E+00	2,27E+07	2,61E+05
3 h	0,00E+00	1,36E+04	0,00E+00	0,00E+00	1,51E+07	5,41E+04
4 h	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,35E+06	2,70E+04
5 h	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,25E+06	0,00E+00
6 h	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,80E+06	0,00E+00

STAB lactosefreie Milch	<i>F837/76</i>	<i>F528/94</i>	<i>NVH 0075-95</i>	<i>MHI226</i>	<i>WSBC 10035</i>	<i>IP 5832</i>
0 h	3,82E+04	9,64E+05	2,80E+05	1,22E+06	1,03E+06	1,29E+05
1 h	0,00E+00	1,16E+05	1,93E+04	6,43E+03	0,00E+00	5,73E+04
2 h	6,43E+03	1,93E+04	6,43E+03	0,00E+00	3,46E+06	1,91E+05
3 h	0,00E+00	1,93E+04	0,00E+00	0,00E+00	7,07E+05	1,27E+04
4 h	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	6,36E+05	1,27E+04
5 h	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,54E+05	0,00E+00
6 h	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,83E+05	0,00E+00

G

MW Folgemilch	<i>F837/76</i>	<i>F528/94</i>	<i>NVH 0075-95</i>	<i>MHI226</i>	<i>WSBC 10035</i>	<i>IP 5832</i>
0 h	3,38E+05	4,70E+07	6,22E+05	2,92E+06	1,15E+07	1,55E+07
1 h	5,00E+03	1,00E+05	0,00E+00	9,09E+03	1,93E+07	4,18E+06
2 h	5,00E+03	3,64E+04	0,00E+00	4,55E+03	1,14E+07	1,39E+06
3 h	0,00E+00	4,55E+03	0,00E+00	0,00E+00	7,91E+06	3,74E+05
4 h	0,00E+00	9,09E+03	0,00E+00	0,00E+00	4,23E+06	1,58E+05
5 h	0,00E+00	4,55E+03	0,00E+00	0,00E+00	2,45E+06	1,08E+05
6 h	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,73E+06	2,70E+04

STAB Folgemilch	<i>F837/76</i>	<i>F528/94</i>	<i>NVH 0075-95</i>	<i>MHI226</i>	<i>WSBC 10035</i>	<i>IP 5832</i>
0 h	9,56E+04	1,13E+07	1,53E+05	9,56E+04	1,48E+06	1,41E+06
1 h	6,43E+03	1,29E+04	0,00E+00	1,29E+04	0,00E+00	1,03E+06
2 h	6,43E+03	1,29E+04	0,00E+00	6,43E+03	5,14E+05	6,63E+05
3 h	0,00E+00	6,43E+03	0,00E+00	0,00E+00	6,43E+05	2,48E+05
4 h	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,79E+05	3,19E+04
5 h	0,00E+00	6,43E+03	0,00E+00	0,00E+00	3,86E+05	7,64E+04
6 h	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,14E+05	1,27E+04

H

MW Milchreis	<i>F837/76</i>	<i>F528/94</i>	<i>NVH 0075-95</i>	<i>MHI226</i>	<i>WSBC 10035</i>	<i>IP 5832</i>
0 h	5,32E+05	1,43E+07	1,76E+05	7,09E+06	1,01E+07	1,82E+07
1 h	1,82E+04	1,73E+05	2,27E+04	8,18E+04	8,60E+07	4,36E+06
2 h	1,36E+04	5,91E+04	4,55E+03	9,09E+03	1,03E+08	1,74E+06
3 h	4,55E+03	9,09E+03	0,00E+00	4,55E+03	6,00E+07	3,42E+05
4 h	0,00E+00	4,55E+03	0,00E+00	0,00E+00	4,85E+07	2,61E+05
5 h	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,47E+07	8,11E+04
6 h	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,50E+07	2,70E+04

STAB Milchreis	<i>F837/76</i>	<i>F528/94</i>	<i>NVH 0075-95</i>	<i>MHI226</i>	<i>WSBC 10035</i>	<i>IP 5832</i>
0 h	1,27E+05	2,38E+06	1,21E+05	1,54E+06	1,86E+06	2,06E+06
1 h	2,57E+04	1,93E+05	1,93E+04	1,16E+05	0,00E+00	7,71E+05
2 h	6,43E+03	4,50E+04	6,43E+03	1,29E+04	3,61E+07	1,85E+05
3 h	6,43E+03	0,00E+00	0,00E+00	6,43E+03	0,00E+00	6,37E+04
4 h	0,00E+00	6,43E+03	0,00E+00	0,00E+00	3,54E+06	1,27E+04
5 h	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,18E+06	8,92E+04
6 h	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,82E+06	0,00E+00

Phylogenetische Stammbäume wurden für die Gene der Flagellenbestandteile FlaA, FlhA und FlhF sowie für die Gene eines *S-layer proteins* und zwei Metalloproteasen (Sanchez *et al.*, 2009) erstellt (Tab. 8). Die Stammbäume der Flagellengene wurden mit den Motilitätsversuchen verglichen, den Adhäsionsversuchen wurden alle Stammbäume zugeordnet. Die Einteilung erfolgte dabei über die Prozentpunkte der neuen Stammsetbewertung (Tab. 9). Dabei wurden Stämme mit ≥ 50 % als gut bewertet und rot markiert, während Stämme ≤ 10 % als schlecht motil/adhärent eingestuft und blau markiert wurden.

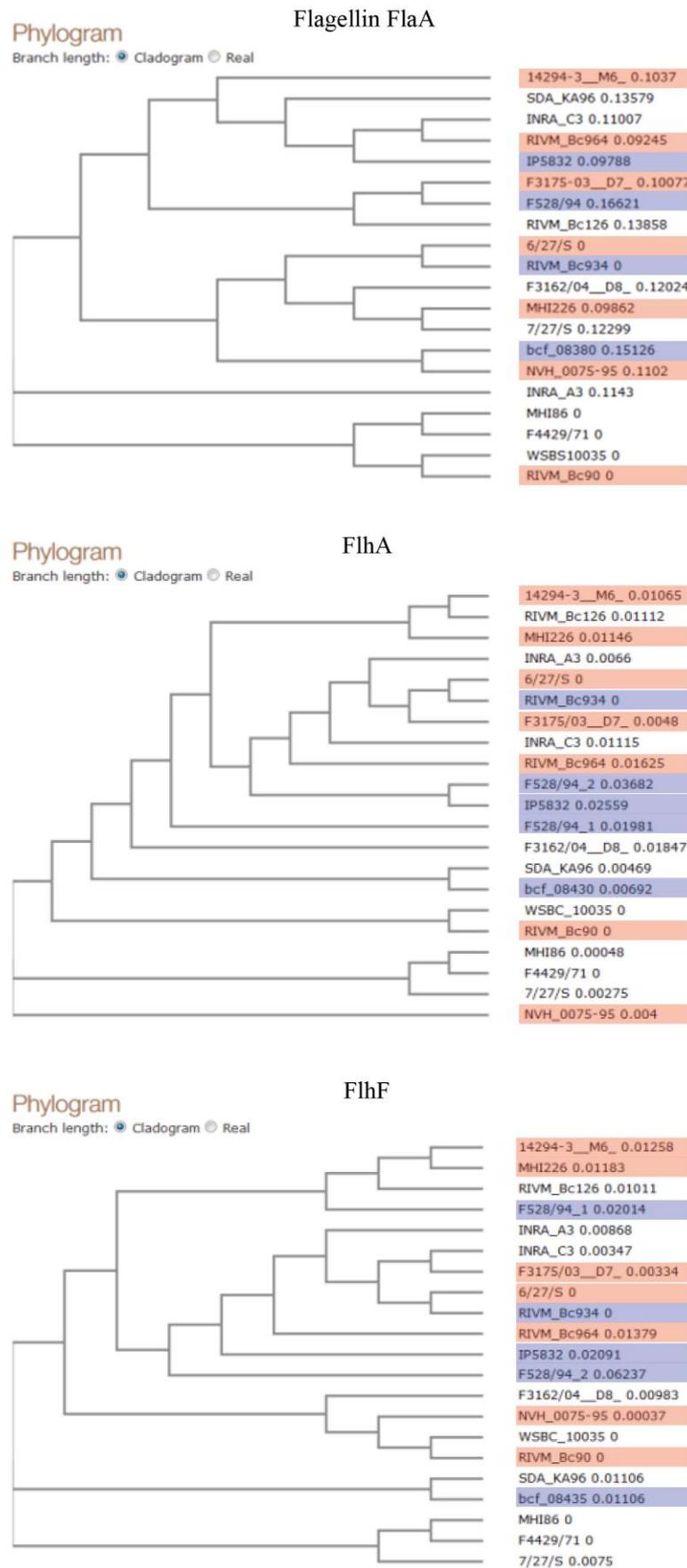


Abbildung 22: Phylogenetische Stammbäume für FlaA, FlhA und FlhF. Einteilung nach *swimming* bei 30 °C nach 24 h. Rot markierte Stämme erreichten Werte über 50 %, blaue lagen unter 10 %.

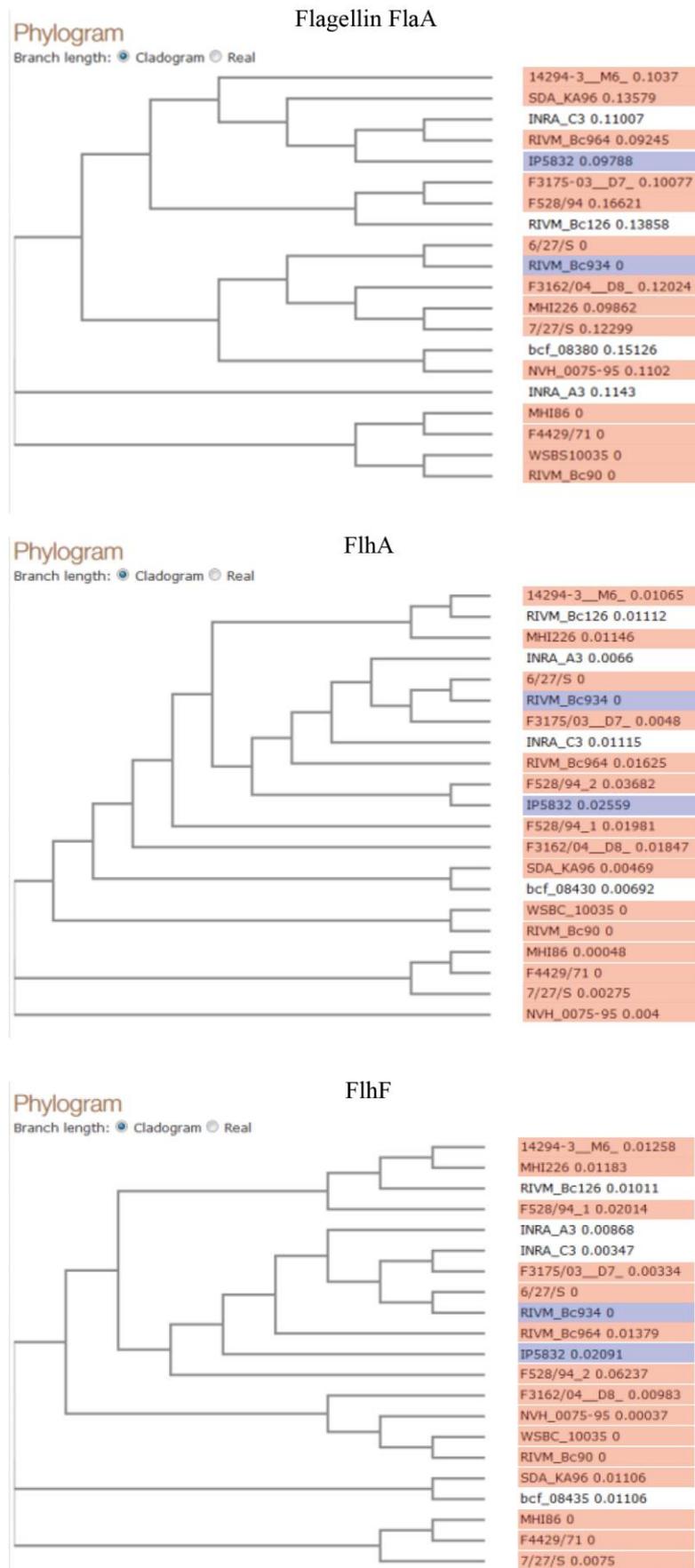


Abbildung 23: Phylogenetische Stammbäume für FlaA, FlhA und FlhF. Einteilung nach *swimming* bei 37 °C nach 24 h. Rot markierte Stämme erreichten Werte über 50 %, blaue lagen unter 10 %.

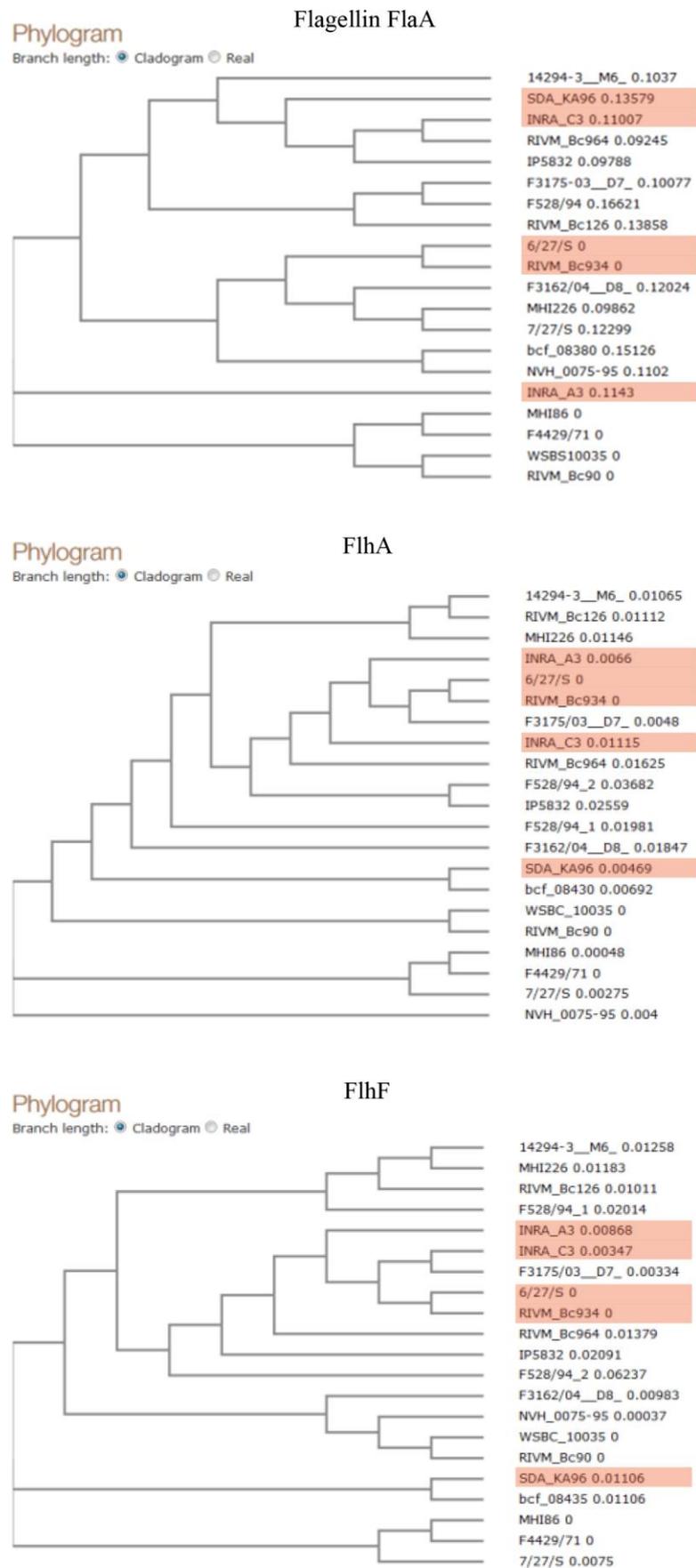


Abbildung 24: Phylogenetische Stammbäume für FlaA, FlhA und FlhF. Einteilung nach swarming bei 30 °C nach 24 h. Rot markierte Stämme erreichten Werte über 50 %, blaue lagen unter 10 %.

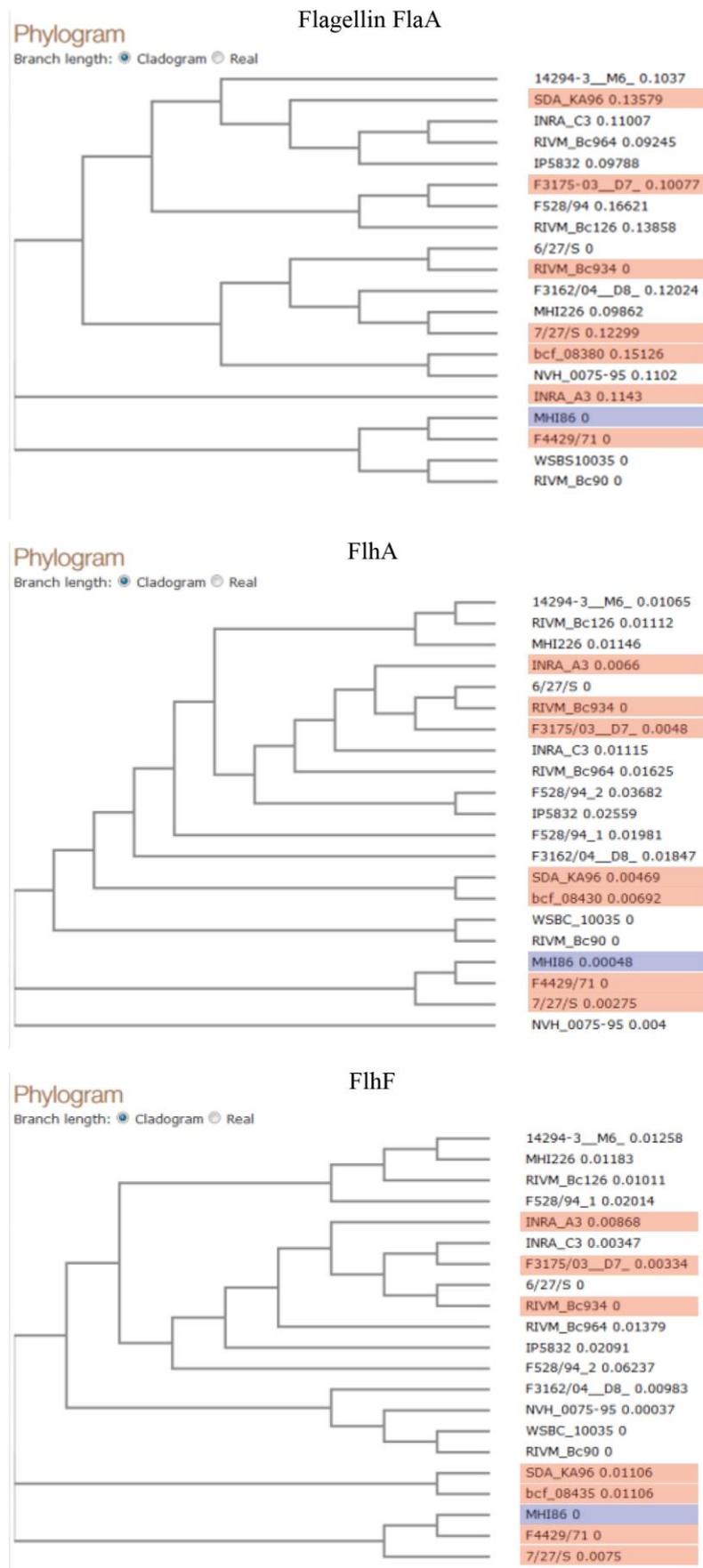


Abbildung 25: Phylogenetische Stammbäume für FlaA, FlhA und FlhF. Einteilung nach swarming bei 37 °C nach 24 h. Rot markierte Stämme erreichten Werte über 50 %, blaue lagen unter 10 %.

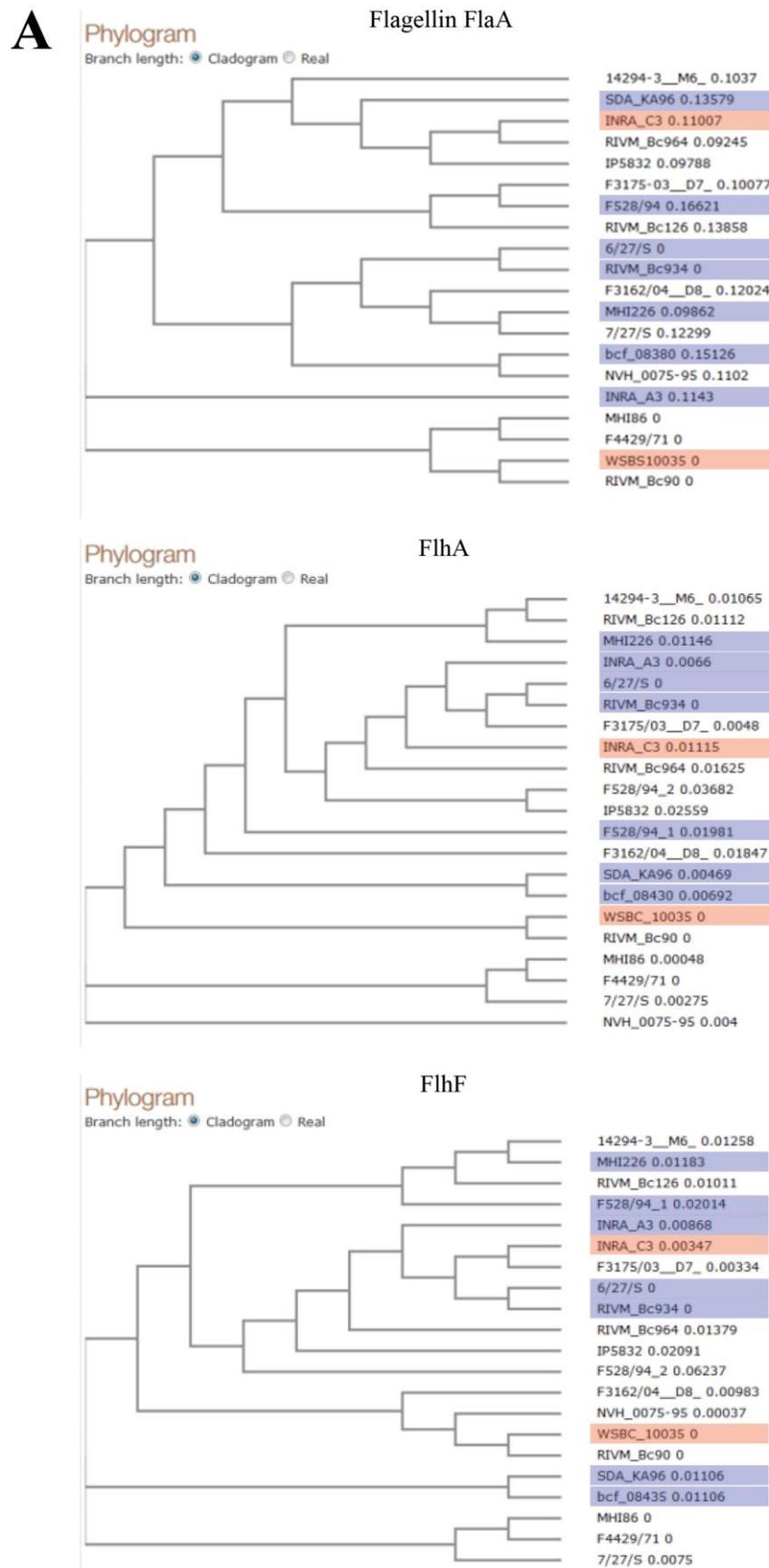
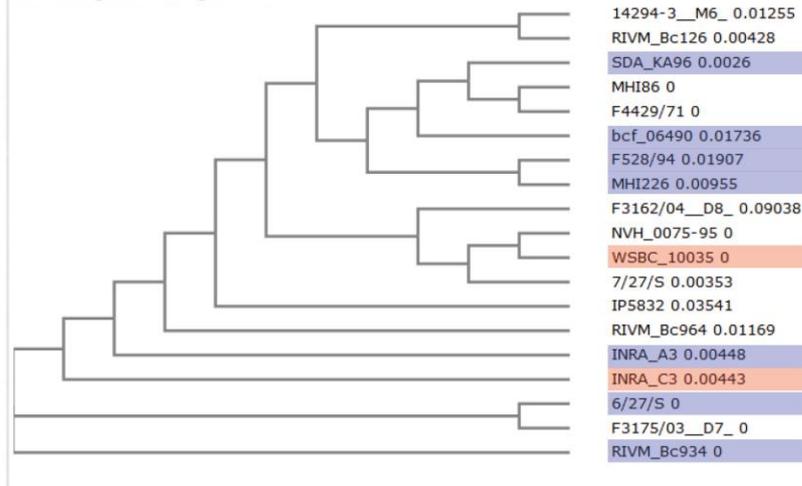


Abbildung 26: Phylogentische Stammbäume für FlaA, FlhA und FlhF (A) sowie für *s-layer protein*, *zinc metalloproteinase* und *cell-envelope-bound metalloprotease* (Sanchez *et al.*, 2009) (B). Einteilung nach Adhäsion von Sporen an CaCo-2-Zellen. Rot markierte Stämme erreichten Werte über 50 %, blaue lagen unter 10 %.

B

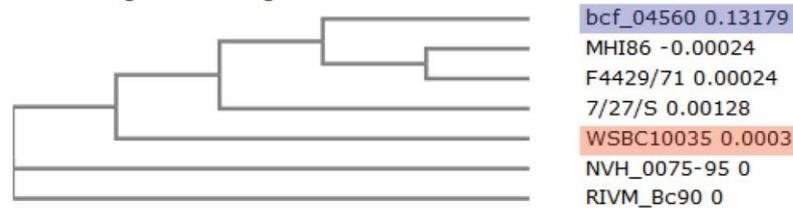
Phylogram *cell-envelope-bound metalloprotease*

Branch length: Cladogram Real



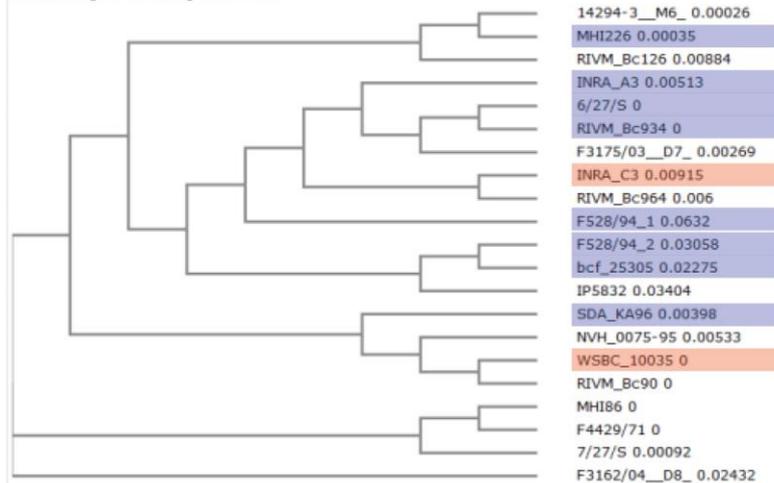
Phylogram *s-layer protein*

Branch length: Cladogram Real



Phylogram *zinc metalloproteinase*

Branch length: Cladogram Real



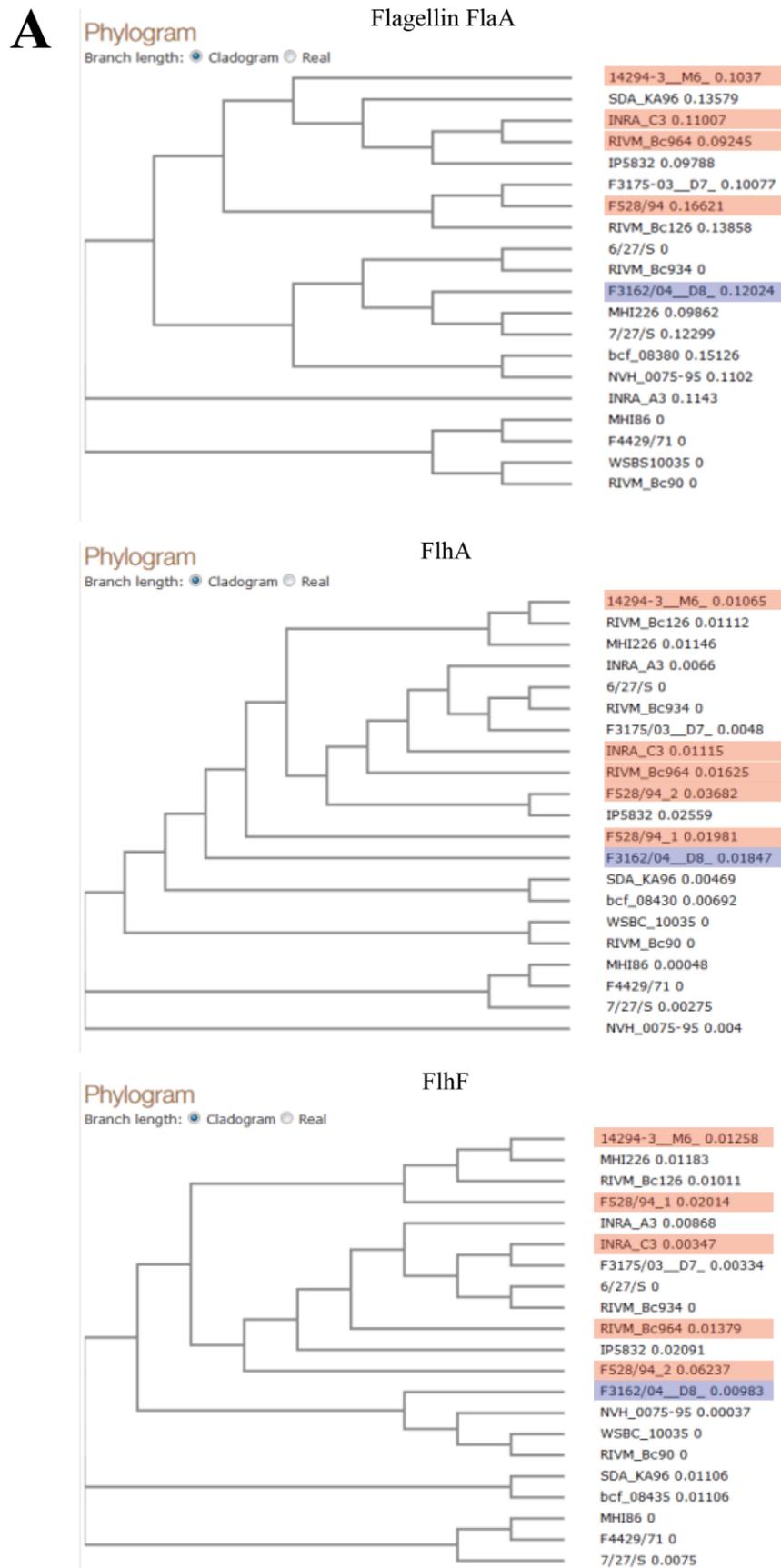
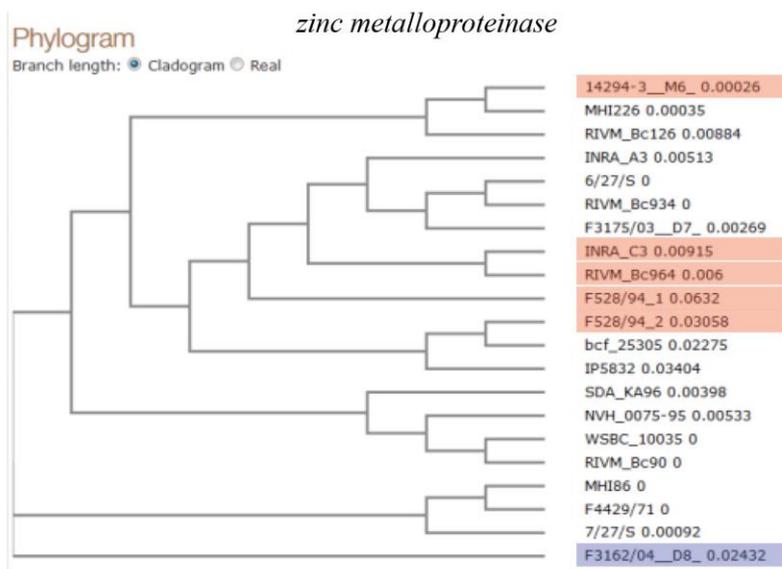
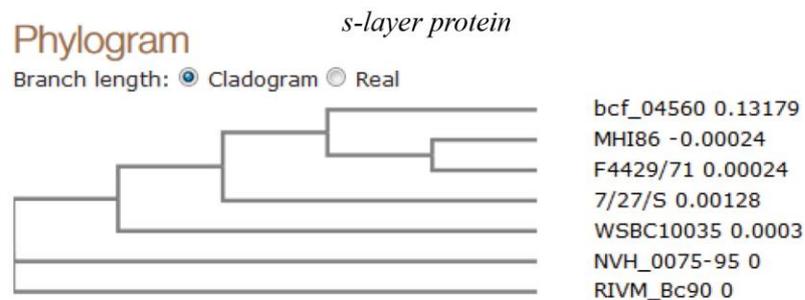
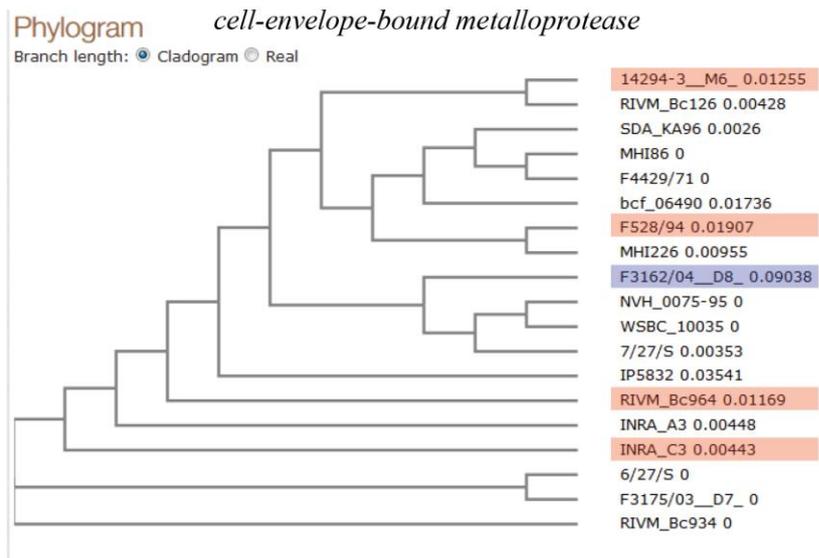


Abbildung 27: Phylogentische Stammbäume für FlaA, FlhA und FlhF (A) sowie für *s-layer protein*, *zinc metalloproteinase* und *cell-envelope-bound metalloprotease* (Sanchez *et al.*, 2009) (B). Einteilung nach Adhäsion von vegetativen Zellen an CaCo-2-Zellen. Rot markierte Stämme erreichten Werte über 50 %, blaue lagen unter 10 %.

B



XII. DANKSAGUNG

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin Märtlbauer für die Überlassung des interessanten Themas und seine stets freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Nadja Jeßberger für die hervorragende Betreuung, ihre Hilfestellung bei großen und kleinen Problemen und ihre begeisternde und außerordentlich motivierende Art für die Arbeit im Labor. Vielen Dank!

Ein herzlicher Dank geht auch an Dr. Kristina Schauer für die Bereitstellung der Nhe-Mutante und ihre große Hilfsbereitschaft. An dieser Stelle sei auch Dr. Andrea Didier und Dr. Richard Dietrich für die Beantwortung so mancher Frage gedankt.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für die schöne Zeit am Lehrstuhl und die immer gewährte Hilfe bedanken, insbesondere bei Angela Tischler und Gabi Açar.

Ein großes Dankeschön gilt den Milchmädchen Joyce, Eva und Franziska für ihre Unterstützung, Freundschaft und die lustige Zeit im Büro und darüber hinaus.

Meinen Freundinnen Steffi und Anna danke ich außerordentlich für ihre Verbundenheit während der letzten Jahre, die unseren gemeinsamen Weg so viel leichter gemacht hat.

Der allergrößte Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern und Großeltern, die mich auf diesem Weg immer unterstützt und an mich geglaubt haben. Danke, dass ihr immer für mich da seid!

Von ganzem Herzen danke ich Tom für seinen bedingungslosen Rückhalt, seine Unterstützung und Geduld. Was wäre das Leben ohne Mr. Darcy.