

Bewertung des enteropathogenen Potentials von *Bacillus thuringiensis*

von Valerie Schwenk

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

Bewertung des enteropathogenen Potentials von *Bacillus thuringiensis*

von Valerie Schwenk

aus Wertheim

München 2021

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 P. Märtlbauer

Mitbetreuung durch: PD Dr. Nadja Jeßberger

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

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

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf
Prof. Dr. Monika Rinder
Priv.-Doz. Dr. Stefan Unterer
Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Tag der Promotion: 17. Juli 2021

Für meine Familie

und für Dani

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	<i>Bacillus cereus</i>.....	3
1.1.	Taxonomie.....	3
1.2.	Krankheitsbilder	4
1.3.	Virulenzfaktoren.....	5
1.3.1.	Hämolysin BL	5
1.3.2.	Nicht-hämolytisches Enterotoxin.....	7
1.3.3.	Zytotoxin K	8
1.3.4.	Weitere Virulenzfaktoren	8
1.4.	Sporen.....	9
2.	<i>Bacillus thuringiensis</i>	11
2.1.	Eigenschaften und Verwendung.....	11
2.2.	Virulenzfaktoren.....	12
2.2.1.	Cry Toxine.....	13
2.2.2.	Cyt Toxine.....	15
2.2.3.	Vip und Sip Proteine	16
2.3.	<i>B. thuringiensis</i> als potentiell humanpathogener Keim	16
2.4.	Kontroverse Debatte über den Einsatz von <i>B. thuringiensis</i> Biopestiziden	18
III.	ZIELSETZUNGEN DIESER ARBEIT	19
IV.	PUBLIKATION I: ASSESSING THE TOXIC POTENTIAL OF ENTEROPATHOGENIC <i>BACILLUS CEREUS</i>	21
V.	PUBLIKATION II: ENTEROPATHOGENIC POTENTIAL OF <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> ISOLATES FROM SOIL, ANIMALS, FOOD AND BIOPESTICIDES.....	37
VI.	DISKUSSION	61
1.	Komplettierung und Anwendung eines umfassenden Risikobewertungsschemas für präsumtive <i>B. cereus</i> in Lebensmitteln	61

2.	Vor- und Nachteile von <i>B. thuringiensis</i> in der biologischen Schädlingsbekämpfung.....	65
3.	Pflanzenextrakte als alternative antimikrobielle Substanzen.....	72
4.	Schlussfolgerung.....	74
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	77
VIII.	SUMMARY.....	79
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	81
X.	DANKSAGUNG	115

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ANI	average nucleotide identity
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
bp	base pair, Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
Bt bzw. <i>B. thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
CaCo-2-Zellen	humane Colonadenokarzinomzellen
CFU bzw. KBE	colony forming unit bzw. koloniebildende Einheit
CGY	casein-glucose-yeast, Casein-Glucose-Hefe
cRPMI	conditioned RPMI 1640 medium, konditioniertes RPMI 1640 Medium
Cry	crystal toxin, kristallines Toxin
Cyt	cytolytic toxin, zytolytisches Toxin
CytK	cytotoxin K, Zytotoxin K
dNTP	deoxynucleotides, Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFSA	European Food Safety Authority
EIA	Enzymimmunoassay
EntFM	Enterotoxin FM
EO	essential oil, pflanzlicher Extrakt
FCS	foetal calf serum, fetales Kälberserum
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Point, Gefahrenanalyse und Kontrolle kritischer Punkte
Hbl	haemolysin BL, Hämolysin BL
HlyII	Hämolysin II
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
InhA	Immuninhibitor A
mAb	monoclonal antibody, monoklonale Antikörper
MHI	Institut für Hygiene und Technologie der Milch, interne Isolatkennziffer

MIC	minimal inhibitory concentration, minimale inhibitorische Konzentration
MLST	multilocus sequence typing, Multi-Locus-Sequenztypisierung
MOI	multiplicity of infection, Multiplizität der Infektion
MSM	minimal sporulation medium
MTC	maximal tolerated concentration, maximal tolerierte Konzentration
Nhe	non-haemolytic enterotoxin, nicht-hämolytisches Enterotoxin
NprA	neutrale Protease A
OD ₅₄₀	Optische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 540 nm
OD ₆₀₀	Optische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm
OD ₆₂₀	Optische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 620 nm
PanC	Pantothenat Synthetase
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PlcR	Phospholipase C Regulator
RFU	relative fluorescence units, relative Fluoreszenzeinheiten
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
Sip	secreted insecticidal proteins, sekretierte, insektizide Proteine
SMase	Sphingomyelinase
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Vero-Zellen	Nierenzellen der Grünen Meerkatze
Vip	vegetative insecticidal proteins, vegetative, insektizide Proteine
WST	water-soluble tetrazolium salt, wasserlösliches Tetrazoliumsalz

I. EINLEITUNG

Die *Bacillus cereus* Gruppe (*Bacillus cereus sensu lato*) umfasst eine Reihe verschiedener Vertreter, welche von sehr unterschiedlicher Bedeutung sind. Es handelt sich um Gram-positive, stäbchenförmige, sporenbildende Bakterien, die regelmäßig aus natürlichen Umgebungen wie Staub, Bodenproben und von Pflanzenoberflächen, aber auch aus Lebensmitteln und in Zusammenhang mit Vergiftungsfällen isoliert werden (Stenfors Arnesen et al., 2008, Jessberger et al., 2020).

Bacillus cereus sensu stricto (*s. s.*) ist ein pathogenes Bakterium, dessen Eintrag in die Lebensmittelkette aufgrund seiner weiten Verbreitung und seiner Fähigkeit zur Sporenbildung nicht gänzlich verhindert werden kann (Stenfors Arnesen et al., 2008). Der Keim ist für zwei lebensmittelassoziierte Krankheitsbilder verantwortlich (Dietrich et al., 2021). Einerseits kann es durch Aufnahme des emetischen Toxins Cereulid zu einer Lebensmittelintoxikation kommen (Agata et al., 1995, Ehling-Schulz et al., 2004). Andererseits können, nach Ingestion von Sporen und anschließender Auskeimung im Dünndarm, vegetative, enteropathogene *B. cereus* Enterotoxine produzieren, was eine Lebensmittelinfektion zur Folge hat (Diarrhö-Form) (Stenfors Arnesen et al., 2008, Jessberger et al., 2020). Die Haupttoxine sind zwei drei-Komponenten-Toxine, Hämolysin BL und das nicht-hämolytische Enterotoxin, sowie Zytotoxin K (Beecher und Macmillan, 1991, Lund und Granum, 1996, Lund et al., 2000). Jedoch sind neben der Toxinproduktion und der Fähigkeit zur Auskeimung unter Darmbedingungen weitere entscheidende Voraussetzungen nötig, um zu einem Krankheitsausbruch zu führen. Dazu zählen unter anderem die Überlebensfähigkeit der Sporen im Magen, die Motilität, sowie das Adhäsionsvermögen an das Darmepithel (Mazzantini et al., 2016, Da Rioli et al., 2018, Gao et al., 2020, Jessberger et al., 2020, Liu et al., 2020b).

Bacillus thuringiensis wird weltweit zur biologischen Schädlingsbekämpfung in der Land- und Forstwirtschaft eingesetzt (Chattopadhyay und Banerjee, 2018). Die entomopathogene Wirkung beruht hauptsächlich auf der Bildung von kristallinen (Cry) und zytolytischen (Cyt) Toxinen während der Sporulation (Xu et al., 2014). Die hohe Toxizität und Spezifität gegenüber verschiedener Insektenarten sind klare

Vorteile, die den Einsatz von *B. thuringiensis* als Biopestizid befürworten. Allerdings wird dies im Hinblick auf die genetisch nahe Verwandtschaft zu *B. cereus s. s.* kontrovers diskutiert (EFSA, 2016b), insbesondere da nicht nur die Produktion von Enterotoxinen durch *B. thuringiensis* (Cho et al., 2015), sondern auch der Zusammenhang mit Lebensmittelinfektionen nachgewiesen werden konnte (McIntyre et al., 2008).

Im Hauptteil wurden 24 *B. thuringiensis* Stämme unterschiedlichen Ursprungs auf ihre potentiell enteropathogenen Eigenschaften untersucht. Die Stämme waren durchaus in der Lage Enterotoxine zu produzieren, sie erwiesen sich toxisch gegenüber CaCo-2 Zellen und zeigten neben der Fähigkeit zur Auskeimung auch Wachstum unter simulierten Darmbedingungen. Zusätzlich wurde die Empfindlichkeit der Stämme gegenüber alternativen antimikrobiellen Substanzen geprüft, um deren Einsatz in Hinsicht auf Risikoprävention im Lebensmittel zu evaluieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zusätzlich das Auskeimungsvermögen verschiedener *B. cereus* Sporen vergleichend getestet, um ein Risikobewertungsschema für enteropathogene *B. cereus* zu komplettieren, welches sich bereits aus mehreren Vorarbeiten zusammensetzte. Auf diese Weise kann die Enteropathogenität neuer *B. cereus* Isolate unter Berücksichtigung der vielen einzelnen Schritte dieses multifaktoriellen Lebensmittelinfektionsprozesses beurteilt werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. *Bacillus cereus*

1.1. Taxonomie

Bacillus cereus sensu stricto (s. s.) ist ein Gram-positives, stäbchenförmiges, sporenbildendes, ubiquitäres Bakterium. Es ist fakultativ anaerob, beweglich und zählt mit einigen weiteren Vertretern zu *Bacillus cereus sensu lato* (s. l.) (Lindbäck et al., 2004, Stenfors Arnesen et al., 2008). Diese so genannte *B. cereus* Gruppe umfasst eine Vielfalt an Spezies und wird kontinuierlich um neue erweitert. Neben der namesgebenden Spezies, *B. cereus* s. s., sind bekannte Vertreter wie *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. cytotoxicus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycooides*, *B. toyonensis* und *B. weihenstephanensis* dieser Gruppe zugehörig (Guinebretière et al., 2013, Liu et al., 2015, Fayad et al., 2019). Zudem wurden *B. wiedmannii*, *B. cereus* biovar *anthracis*, *B. bingmayongensis*, *B. gaemokensis* und *B. manliponensis* beschrieben (Jung et al., 2010, Jung et al., 2011, Liu et al., 2014, Brézillon et al., 2015, Miller et al., 2016).

Die klassische Einteilung der verschiedenen Spezies fand primär über ihre unterschiedlichen pathogenen, morphologischen und physiologischen Eigenschaften statt. Hinsichtlich ihrer nahen genetischen Verwandtschaft, welche schon früh mittels 16S rRNA Analysen gezeigt werden konnte, erscheint die Taxonomie der *B. cereus* Gruppe inkonsistent (Ash et al., 1991, Carroll et al., 2020). Besonders kontrovers wird die Klassifizierung von *B. cereus*, *B. thuringiensis* und *B. anthracis* diskutiert, da sich eine Unterscheidung dieser Spezies auch mit neuartigen molekularbiologischen Methoden als schwierig erweist (Rasko et al., 2005, Ehling-Schulz und Messelhäusser, 2013). Sowohl *B. thuringiensis* als auch *B. anthracis* differenzieren sich von *B. cereus* in erster Linie durch ihre Plasmide, welche die genetische Grundlage ihrer charakteristischsten Virulenzfaktoren bilden (Helgason et al., 2000b). Mobile, extrachromosomale genetische Elemente wie Plasmide bedingen durch dynamischen Austausch die fließenden Übergänge zwischen den Vertretern der *B. cereus* Gruppe (Hu et al., 2009, Brézillon et al., 2015). Infolge dessen wurde mehrfach vorgeschlagen, *B. cereus* als eine Spezies mit diversen Subspezies zu betrachten, welche sich vor allem durch ihren Plasmidgehalt differenzieren (Daffonchio et al., 2000, Helgason et al., 2000b,

Rasko et al., 2005).

Die Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums und die Einteilung der Spezies in verschiedene *Clades* wird unter anderem durch *whole genome sequencing* (WGS) ermöglicht. Ursprünglich wurden die Spezies in drei *Clades* unterteilt, dabei wurde *B. anthracis Clade I* zugeordnet, *B. cereus* und *B. thuringiensis Clade I* und *II*; *Clade III* umfasste beispielsweise Spezies wie *B. weihenstephanensis* und *B. mycoides* (Didelot et al., 2009). Guinebretière et al. ermittelten sieben *Clades* und bezogen unter anderem die Temperaturoptima der Spezies in die phylogenetischen Analysen ein (Guinebretière et al., 2008). *Singlelocus sequence typing* des *panC* Gens, welches die Pantothenat Synthetase kodiert, erlaubt die Klassifizierung in sieben Gruppen, welche eine hohe Übereinstimmung mit der WGS Phylogenie aufweist und deshalb häufig zur Einteilung herangezogen wird (Guinebretière et al., 2008, Kovac et al., 2016). Eine jüngere Studie bezog die Daten aller publizierten *B. cereus s. l.* Genome (n= 2231) ein und schlug eine neue Herangehensweise an die Nomenklatur der Gruppe vor. Hier wurde die grundlegende Einteilung der Spezies durch das Herabsetzen des Schwellenwertes der ANI (*average nucleotide identity*) von 95 % auf 92,5 % erreicht, wodurch sich weniger Überlappungen in verschiedenen Clustern ergaben. Zudem wurde der Vorschlag gebracht, Subspeziesnamen sowie Biovarbezeichnungen zu etablieren, welche medizinisch und industriell relevante Mitglieder der Gruppe hervorheben (Carroll et al., 2020).

1.2. Krankheitsbilder

B. cereus gilt als klassischer Erreger zweier lebensmittelassoziierter, gastrointestinaler Krankheitsbilder. Es kann die emetische von der Diarrhö-auslösenden Form unterschieden werden. Obwohl beide Arten meist relativ mild und selbstlimitierend auftreten, wurden auch einige schwer verlaufende Fälle beschrieben (Lund et al., 2000, Dierick et al., 2005, Stenfors Arnesen et al., 2008).

Das emetische Syndrom ist bedingt durch eine Lebensmittelintoxikation und wird ausgelöst durch die Aufnahme von Cereulid, ein hitze-, säure- und proteolysebeständiges Toxin (Agata et al., 1995, Granum und Lund, 1997, Rajkovic et al., 2008). Cereulid, ein zyklisches Dodecadepsipeptid, wird durch die *ces*-kodierte Cereulid Synthetase gebildet und führt 0,5-6 Stunden nach Verzehr des kontaminierten Lebensmittels zu Übelkeit und Erbrechen (Ehling-Schulz et al., 2005, Rouzeau-Szynalski et al., 2020). Häufig werden mehlhaltige Lebensmittel

wie Reis und Nudelprodukte mit diesem Krankheitsbild assoziiert (Ehling-Schulz et al., 2004).

Im Gegensatz zur emetischen Form handelt es sich beim Diarrhö-Syndrom um eine Lebensmittelinfektion. Die Bakterien werden meist als Sporen aufgenommen, welche die Magenpassage überdauern, im Dünndarm auskeimen und während ihres vegetativen Wachstums verschiedene krankheitsauslösende Enterotoxine produzieren (Ehling-Schulz et al., 2015, Jessberger et al., 2017, Jessberger et al., 2020). Die Leitsymptome der Erkrankung sind abdominale Schmerzen und Durchfall, welche nach etwa 8-16 Stunden in Erscheinung treten. Milch- und Fleischprodukte, Fisch und Gemüse, aber auch andere Nahrungsmittel wie Suppen können vegetative Zellen oder Sporen enthalten. Differentialdiagnostisch kommt auch eine Erkrankung durch *Clostridium perfringens* Toxine in Frage (Schoeni und Wong, 2005). Die infektiöse Dosis wird in der Literatur meist mit 10^5 - 10^8 koloniebildenden Einheiten pro Gramm Lebensmittel (KBE/g) angegeben (Granum und Lund, 1997, Stenfors Arnesen et al., 2008, EFSA, 2016b).

Neben lebensmittelbedingten Ausbrüchen kann *B. cereus* eine Reihe nicht-gastrointestinaler Erkrankungen hervorrufen. Kutane Infektionen, sowie Infektionen des zentralen Nervensystems, ebenso wie Endophthalmitis, Periodontitis, Sepsis oder Bakteriämie, aber auch respiratorische Erkrankungen, Endokarditis, Osteomyelitis oder Harnwegsinfektionen sind beschrieben worden (Beecher et al., 2000, Helgason et al., 2000a, Bottone, 2010, Sasahara et al., 2011, Tatara et al., 2013, Michelotti und Bodansky, 2015, Ishida et al., 2019, Koizumi et al., 2020).

1.3. Virulenzfaktoren

Im Wesentlichen werden drei Enterotoxine mit der Diarrhö-Form in Verbindung gebracht. Dazu zählt Zytotoxin K (CytK), und die beiden drei-komponenten-Toxine Hämolyisin BL (Hbl) und nicht-hämolytisches Enterotoxin (Nhe). Gene, welche für Nhe kodieren, können in nahezu 100 % der enteropathogenen *B. cereus* Stämme nachgewiesen werden, wohingegen die *hbl* Gene weniger frequent vorkommen (Guinebretière et al., 2002, Moravek et al., 2006).

1.3.1. Hämolyisin BL

Hämolyisin BL wurde erstmals aus dem Stamm F837/76 (Turnbull et al., 1979) isoliert und setzt sich aus einer bindenden Einheit, B, sowie den zwei lytischen

Komponenten L1 und L2 zusammen, welche alle zur Aktivität des Komplexes benötigt werden (Beecher und Macmillan, 1991, Beecher et al., 1995b). Ursprünglich ging man davon aus, dass die einzelnen Proteine unabhängig an die Oberfläche von Erythrozyten binden und daraufhin einen „Membran-attackierenden-Komplex“ formen, welcher durch Porenbildung eine kolloid-osmotische Lyse der Zelle nach sich zieht (Beecher und Wong, 1997). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Hbl B die entscheidende Komponente zur Bindung an die Zielzelle darstellt und das Fundament zur Anlagerung von Hbl L1 und anschließend L2 bildet (Sastalla et al., 2013, Jessberger et al., 2019). Eine neuere Studie konnte mittels CRISPR-Cas9 Knockout Screening LITAF (LPS-*induced* TNF- α factor) als primären Hbl Rezeptor identifizieren und zeigte auf, dass zelluläre Rezeptoren zur Ausbildung der Toxizität nötig sind (Liu et al., 2020a).

Stämme, die fähig sind Hbl zu produzieren, zeigen auf Blutagarplatten ein charakteristisches, diskontinuierliches Hämolysemuster: die Lysezone erscheint in deutlichem Abstand zur Kolonie (Beecher und Wong, 1997). Dies ergibt sich durch unterschiedliche Diffusionsgeschwindigkeiten der Hbl Komponenten, welche dadurch einen Konzentrationsgradienten bilden. An dem Punkt des geeigneten Konzentrationsverhältnisses kommt es zur Lyse der Erythrozyten (Beecher und Wong, 1997, Jessberger et al., 2019). Neben der namensgebenden hämolytischen Eigenschaft zeigten Tier- und Zellkulturversuche dermonekrotische Reaktionen durch vaskuläre Permeabilitäts-erhöhung, sowie okulare Nekrosen und vermehrte Flüssigkeitsansammlung im Darmschlingenligationstest infolge der Hbl Applikation (Beecher und Wong, 1994, Beecher et al., 1995a, Beecher et al., 1995b).

Hbl L2, L1 und B werden kodiert durch *hblC*, *hblD* und *hblA* (Ryan et al., 1997). Es konnte zusätzlich eine zweite Variante des *hbl* Operons mit einem weiteren Gen, *hblB*, nachgewiesen werden, dessen Transkription, Translation sowie die Sekretion des korrespondierenden Proteins im *B. cereus* Stamm ATCC 14579 gezeigt werden konnte (Clair et al., 2010). Die Expression des *hbl* Operons wird durch regulatorische Proteine wie PlcR, CodY, CcpA, ResD, SinR und Fnr beeinflusst (Duport et al., 2006, Esbelin et al., 2008, Gohar et al., 2008, van der Voort et al., 2008, Esbelin et al., 2009, Lindbäck et al., 2012, Fagerlund et al., 2014, Böhm et al., 2016). Der pleiotrope Phospholipase C Regulator, PlcR, dient der Expressionsregulation der Hauptvirulenzgene von *B. cereus* (Agaisse et al., 1999).

Die Genexpression von *plcR* wird durch Autoinduktion ermöglicht, welche mit dem Einsatz der stationären Phase beginnt (Lereclus et al., 1996). Die Repression ist vom Sporulationsfaktor Spo0A abhängig (Lereclus et al., 2000). Das Signalpeptid PapR dient der Bindung von PlcR an die DNA und ermöglicht die Regulation in Anpassung an die Umweltbedingungen (Slamti und Lereclus, 2002, EFSA, 2016b). Die Enterotoxigenexpression wird allerdings nicht nur von bekannten Regulationsfaktoren transkriptional beeinflusst, sondern vermutlich auch durch stammspezifische posttranskriptionale und posttranslationale Mechanismen (Jessberger et al., 2015).

1.3.2. Nicht-hämolytisches Enterotoxin

Das nicht-hämolytische Enterotoxin wurde erstmals 1995 aus dem Stamm NVH 0075-95 isoliert (Lund und Granum, 1996) und setzt sich aus den drei Komponenten NheA, NheB und NheC zusammen, welche durch die Gene *nheA*, *nheB* und *nheC* kodiert werden (Granum et al., 1999). Die Expression des *nhe* Operons wird durch dieselben Transkriptionsregulatoren moduliert, die auch die *hbl* Genexpression regulieren (Zigha et al., 2007, Gohar et al., 2008, van der Voort et al., 2008, Esbelin et al., 2009).

Im Widerspruch zur ursprünglichen Bezeichnung des Toxins konnten hämolytische Eigenschaften gegenüber Erythrozyten verschiedener Spezies nachgewiesen werden (Fagerlund et al., 2008). Der Nhe Komplex zeigt auch zytotoxische Eigenschaften gegenüber verschiedenen Zelllinien, wobei ein molares Verhältnis zwischen NheA:NheB:NheC von 10:10:1 die höchste Aktivität hervorruft (Lindbäck et al., 2004). Die Zytotoxizität beruht auf kolloid-osmotischer Lyse der epithelialen Zellen und ist Folge der Porenbildung in der Plasmamembran (Fagerlund et al., 2008). Zunächst kommt es, nach individueller Sekretion der einzelnen Proteine, zur Komplexbildung zwischen NheB und NheC mit darauffolgender Anlagerung des Oligomers an die Zelloberfläche, was eine Erhöhung der Membranpermeabilität zur Folge hat (Zhu et al., 2016). Konformationsänderungen im NheB-NheC-Komplex führen anschließend zur Bindung von freiem NheB. Schließlich kann NheA an das zellgebundene NheB-NheC binden und nachfolgende Konformationsänderungen führen zur Bildung der vollständigen Transmembranpore (Heilkenbrinker et al., 2013, Didier et al., 2016). Eine neuere Studie konnte zeigen, dass die hydrophobe Region der Untereinheit C die Verankerung an die Membran vermittelt (Fox et al., 2020).

1.3.3. Zytotoxin K

Zytotoxin K ist ein β -porenbildendes Toxin (*β -barrel pore formin toxin*), welches Ähnlichkeiten zu α -Hämolyysin von *Staphylococcus aureus* oder auch dem β -Toxin von *C. perfringens* aufweist (Stenfors Arnesen et al., 2008, Senesi und Ghelardi, 2010). Die Genexpression von *cytK* wird wie die meisten Hauptvirulenzfaktoren durch PlcR reguliert (Gohar et al., 2008). Ursprünglich wurde das Toxin aus dem Stamm NVH 391/98, welcher in Zusammenhang mit einem schweren Krankheitsausbruch der Diarrhö-Form stand, isoliert (Lund et al., 2000). Im Jahr 2004 wurde eine zweite Variante, CytK2, beschrieben, welche sich in Zellkulturversuchen weitaus weniger toxisch darstellte als CytK1 (Fagerlund et al., 2004). Die geringere Zytotoxizität ergibt sich durch eine schlechtere Ionenleitfähigkeit der gebildeten Poren (Fagerlund et al., 2004). Der essentielle Beitrag von CytK2 zur Pathogenese des Diarrhö-Syndroms ist unklar (Castiaux et al., 2015). CytK1, welches für die schweren nekrotischen Enteritiden im Jahr 2000 verantwortlich war, wird nur von einem separaten Cluster der *B. cereus* Gruppe produziert. Aus diesem Grund wurde eine neue Spezies, *B. cytotoxicus*, klassifiziert (Guinebretière et al., 2013). Eine Studie aus dem Jahr 2014 wies *B. cytotoxicus* in 35 % von 151 untersuchten Kartoffelproben nach, vermutlich stellte Bodenmaterial die Quelle der Kontaminationen dar. Eine hohe Prävalenz konnte in dehydrierten Kartoffelprodukten und Kartoffelpürees für den sofortigen Verzehr ermittelt werden (Contzen et al., 2014). Eine neuere Studie wies in neun von neun Kartoffelpüreeproben *B. cytotoxicus* nach. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass weitere Forschungen bezüglich der ökologischen Nischen von *B. cytotoxicus* erforderlich sind (Heini et al., 2018).

1.3.4. Weitere Virulenzfaktoren

In einer Studie aus dem Jahr 2008 wurde eine umfassende Liste an Genen erstellt, welche zum PlcR Regulon gehören. Dies ermöglichte den Überblick über weitere Faktoren, welche an der PlcR-basierten Virulenzantwort von *B. cereus* beteiligt sind (Gohar et al., 2008). Die Deletion des *plcR* Gens führte zu einer Verringerung, allerdings nicht zur vollständigen Aufhebung der Virulenz (Callegan et al., 2003). Faktoren wie InhA1 (Immuninhibitor A), NprA (neutrale Protease A) und HlyII (Hämolyysin II) sind PlcR-unabhängig und spielen ebenso eine Rolle beim Infektionsprozess (Ramarao und Lereclus, 2005, Cadot et al., 2010, Tran et al., 2011). Die Metalloproteasen InhA1 und NprA sind im Stande,

Gewebekomponenten wie Fibronectin, Laminin und Kollagen zu spalten (Chung et al., 2006). Der Abbau dieser Bestandteile durch Metalloproteasen ermöglicht das Überwinden von Barrieren des Wirts und das Eindringen in tiefere Schichten, was für den Infektionsvorgang entscheidend ist (Miyoshi und Shinoda, 2000, Cadot et al., 2010). In *inhA1*-produzierenden *B. cereus* Stämmen ist es durch Spaltung von *NprA* möglich, der zellulären Immunantwort durch Makrophagen zu entgehen (Ramarao und Lereclus, 2005, Haydar et al., 2018). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Expression von *nprA* und *inhA1* in pathogenen Stämmen vergleichsweise hoch ist (Cadot et al., 2010). Hämolyisin II ist, wie CytK, ein β -porenbildendes Toxin (Miles et al., 2002) und kann die Apoptose von Makrophagen induzieren (Tran et al., 2011). Zudem sind seine zytotoxischen Eigenschaften schon länger bekannt (Andreeva et al., 2006). Weitere Faktoren, wie beispielsweise die Sphingomyelinase (SMase), tragen zur Pathogenität des Organismus bei, indem sie synergistisch mit den Haupttoxinen Hbl und Nhe wirken (Beecher und Wong, 2000, Doll et al., 2013). SMase induziert außerdem den Tod epithelialer Zellen und ist *in vivo* pathogen (Doll et al., 2013). Die Pathogenität von *B. cereus* beruht jedoch nicht ausschließlich auf der Produktion verschiedener Toxine und Virulenzfaktoren sowie dem Zusammenspiel dieser, sie beinhaltet ebenso Fähigkeiten wie Motilität, Adhäsion oder Biofilmbildung, welche die Kolonisierung des Wirts ermöglichen (Ramarao und Lereclus, 2006, Ghelardi et al., 2007, Wijman et al., 2007, Mazzantini et al., 2016, Huang et al., 2020). Flagellin, als Hauptbestandteil des Flagellums, wird traditionell mit der Motilität in Verbindung gebracht, doch seine Funktion als Adhäsion gilt als wesentlicher Faktor im Infektionsprozess (Ramarao und Lereclus, 2006, Gao et al., 2020). Durch die direkte Interaktion mit dem Immunsystem des Wirts kommt Flagellin als Adjuvans im Bereich der Impfstoffentwicklung in Frage (Il Kim et al., 2018). Zusätzlich sezerniert *B. cereus* eine Reihe weiterer Faktoren, wobei Enterotoxin FM (EntFM), eine Zellwandpeptidase, zur Motilität, Adhäsion und Biofilmbildung beiträgt (Clair et al., 2010, Tran et al., 2010).

1.4. Sporen

B. cereus s. l. ist durch Sporulation dazu fähig, auf nachteilige Umweltbedingungen wie Nährstoffmangel zu reagieren (Hornstra et al., 2006, Swick et al., 2016). Dabei wird innerhalb der Mutterzelle in mehreren Phasen eine Endospore formiert und anschließend in die Umwelt entlassen (Errington, 2003, Vidic et al., 2020). Die

gebildeten Dauerformen sind metabolisch inaktiv und erweisen sich als extrem widerstandsfähig. Sie sind resistent gegenüber Austrocknung, Frost, feuchter und warmer Hitze, sowie UV- und γ -Strahlung, aber auch hohem Druck, extremen pH-Werten und verschiedener Chemikalien (Setlow, 2003, Setlow, 2014).

Die hohe Tenazität ergibt sich durch den kompakten Aufbau der Sporen, welche sich aus mehreren Hüllen zusammensetzen. Im Kern befindet sich die DNA, welche mit kleinen säurelöslichen Peptiden (*small acid-soluble proteins*) verbunden ist. Im innersten Kompartiment sind zudem Kationen und Pyridin-2,6-Dicarbonsäure enthalten, welche einen Chelatkomplex mit einem zweiwertigen Calciumion bildet (Ca^{2+}DPA) (Setlow, 2014). Umgeben ist der Kern von einer inneren Membran, welche die Diffusion von Wasser eindämmt. An diese schließen sich die Keimzellwand und der Cortex an. Auf eine zweite, äußere Membran folgt die Mantelschicht, welche vom Exosporium umgeben ist (Swick et al., 2016).

Der Auskeimungsprozess läuft kaskadenartig ab und beginnt mit der Registrierung von veränderten Umweltbedingungen, ausgelöst durch kleine Signalmoleküle wie Aminosäuren, Zucker, Purine oder Nukleoside (Atluri et al., 2006, Setlow et al., 2017). Anschließend folgt die Freisetzung von Ca^{2+}DPA , die Hydrolyse des Peptidoglycancortex, Hydratation des Kerns und die Umwandlung der Zellwand. Der Metabolismus der Zelle nimmt zu und schließlich beginnt die Wachstumsphase (Setlow et al., 2017).

Durch das allgegenwärtige Vorkommen in Böden, Sedimenten und Staub können *B. cereus* Sporen leicht aus natürlichen Reservoiren in die Lebensmittelkette transferiert werden (Stenfors Arnesen et al., 2008). Häufig sind rohe Produkte wie frisches Gemüse, Früchte, Samen, aber auch Milch mit Sporen kontaminiert (Berthold-Pluta et al., 2019, Vidic et al., 2020). Die Beschaffenheit der Sporen bildet die Voraussetzung, Maßnahmen der Lebensmittelindustrie wie Desinfektion oder Hitzebehandlungen zu überstehen (Alvarenga et al., 2018, Kim et al., 2019, Radmehr et al., 2020). Der Verderb von Nahrungsmitteln durch Kontamination mit sporenbildenden Bakterien ist neben Lebensmittelinfektionen gesellschaftlich bedeutsam, da hohe ökonomische Verluste damit einhergehen können (André et al., 2017, Vidic et al., 2020).

2. *Bacillus thuringiensis*

2.1. Eigenschaften und Verwendung

Bacillus thuringiensis ist ein weiterer Vertreter der *B. cereus* Gruppe und besonders durch seinen Einsatz als Biopestizid bekannt (Jouzani et al., 2017). *B. thuringiensis* Sporen sind in der Umwelt weit verbreitet und können aus einer großen Vielfalt an Ökosystemen wie Böden, Getreidestaub, Gewässern, Insekten, Insektivoren, aber auch aus Bestandteilen von Pflanzen isoliert werden (Raymond et al., 2010).

Erstmals isoliert wurde *B. thuringiensis* aus Larven des Seidenspinners (*Bombyx mori*) im Jahr 1901 in Japan (de Barjac und Bonnefoi, 1968). Wenig später, im Jahr 1911, wies Berliner das sporenbildende Bakterium in Larven der Mehlmotte (*Ephestia kühniella*) nach und gab ihm seinen aktuellen Namen *B. thuringiensis* (Berliner, 1915, de Barjac und Bonnefoi, 1968, Melo et al., 2016). Das Potential als Insektizid wurde schon früh beschrieben (Mattes, 1927, Sanahuja et al., 2011) und in Frankreich wurde 1938 das erste Präparat mit Namen Sporeine vermarktet (Sanahuja et al., 2011). *B. thuringiensis* ist heute der am häufigsten zur biologischen Schädlingsbekämpfung verwendete Mikroorganismus weltweit (Lacey et al., 2015). In Deutschland stehen der Land- und Forstwirtschaft 16 *B. thuringiensis* Präparate zur Verfügung, welchen fünf unterschiedliche Stämme zugrunde liegen (siehe Tab. 1). Elf dieser Produkte sind für den privaten Verbraucher frei zugänglich und sind für die Anwendung im Haus- und Kleingartenbereich zugelassen (BVL, 2020). Es wurden keine Rückstandshöchstgehalte für diese Präparate festgelegt (Europäisches Parlament und Rat der Europäischen Union, 2005, Anastassiadou et al., 2020a, 2020b, 2020c, 2020d, 2020e).

Tabelle 1: Übersicht über die derzeit in Deutschland zugelassenen *B. thuringiensis* Präparate inklusive Anwendungsbereiche (BVL, 2020). *: Zugelassen zur Anwendung im Haus- und Kleingartenbereich.

Bezeichnung	Wirkstoff und Wirkstoffgehalt	Einsatzgebiet
BACTOSPEINE ES*	33,2 g/l <i>Bacillus thuringiensis</i> spp. <i>kurstaki</i> Stamm ABTS-351 (Stamm HD-1)	Ackerbau, Gemüsebau, Obstbau, Weinbau, Zierpflanzenbau
DiPel DF	540 g/kg <i>Bacillus thuringiensis</i> spp. <i>kurstaki</i> Stamm ABTS-351 (Stamm HD-1)	Ackerbau, Gemüsebau, Obstbau, Weinbau, Zierpflanzenbau
Dipel ES*	33,2 g/l <i>Bacillus thuringiensis</i> spp. <i>kurstaki</i> Stamm ABTS-351 (Stamm HD-1)	Ackerbau, Gemüsebau, Obstbau, Weinbau, Zierpflanzenbau

FLORBAC*	540 g/kg <i>Bacillus thuringiensis</i> spp. <i>aizawai</i> Stamm ABTS-1857	Forst, Gemüsebau, Obstbau, Weinbau, Zierpflanzenbau
Gnatrol SC	123 g/l <i>Bacillus thuringiensis</i> spp. <i>israelensis</i> (Serotyp H-14) AM65-52	Zierpflanzenbau
Lepinox Plus	150 g/kg <i>Bacillus thuringiensis</i> spp. <i>kurstaki</i> Stamm EG-2348	Gemüsebau, Hopfenbau, Obstbau, Weinbau,
Lizetan Buchsbaumzünslerfrei*	33,2 g/l <i>Bacillus thuringiensis</i> spp. <i>kurstaki</i> Stamm ABTS-351 (Stamm HD-1)	Ackerbau, Gemüsebau, Obstbau, Weinbau, Zierpflanzenbau
Lizetan Raupen- & Zünslerfrei*	540 g/kg <i>Bacillus thuringiensis</i> spp. <i>aizawai</i> Stamm ABTS-1857	Forst, Gemüsebau, Obstbau, Weinbau, Zierpflanzenbau
Neudomück Pro	123 g/l <i>Bacillus thuringiensis</i> spp. <i>israelensis</i> (Serotyp H-14) AM65-52	Zierpflanzenbau
Turex	500 g/kg <i>Bacillus thuringiensis</i> spp. <i>aizawai</i> Stamm GC-91	Gemüsebau, Zierpflanzenbau
Universal-Raupenfrei Lizetan*	33,2 g/l <i>Bacillus thuringiensis</i> spp. <i>kurstaki</i> Stamm ABTS-351 (Stamm HD-1)	Ackerbau, Gemüsebau, Obstbau, Weinbau, Zierpflanzenbau
XenTari*	540 g/kg <i>Bacillus thuringiensis</i> spp. <i>aizawai</i> Stamm ABTS-1857	Forst, Gemüsebau, Obstbau, Weinbau, Zierpflanzenbau
Xentari BuchsbaumzünslerFrei*	540 g/kg <i>Bacillus thuringiensis</i> spp. <i>aizawai</i> Stamm ABTS-1857	Forst, Gemüsebau, Obstbau, Weinbau, Zierpflanzenbau
Xentari RaupenFrei*	540 g/kg <i>Bacillus thuringiensis</i> spp. <i>aizawai</i> Stamm ABTS-1857	Forst, Gemüsebau, Obstbau, Weinbau, Zierpflanzenbau
Zünsler- & Raupenfrei*	33,2 g/l <i>Bacillus thuringiensis</i> spp. <i>kurstaki</i> Stamm ABTS-351 (Stamm HD-1)	Ackerbau, Gemüsebau, Obstbau, Weinbau, Zierpflanzenbau
Zünsler & Raupenfrei Xentari*	540 g/kg <i>Bacillus thuringiensis</i> spp. <i>aizawai</i> Stamm ABTS-1857	Forst, Gemüsebau, Obstbau, Weinbau, Zierpflanzenbau

2.2. Virulenzfaktoren

B. thuringiensis produziert während der Sporulation kristalline Einschlüsse, welche hauptsächlich zwei insektizide Proteine beinhalten (Höfte und Whiteley, 1989, Chattopadhyay und Banerjee, 2018). Es handelt sich um zytolytische (Cyt) und kristalline (Cry) Toxine, welche in unterschiedlichem Maße gebildet werden und gegen verschiedene Arten von Insekten und Invertebraten aktiv sind. Zu diesen zählen unter anderem Spezies der Ordnungen Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hemiptera und Hymenoptera, aber auch Milben und Nematoden (Schnepf et al., 1998, Wei et al., 2003, Domínguez-Arrizabalaga et al., 2020). Wie bereits erwähnt unterscheidet sich *B. thuringiensis* von *B. cereus s. s.* im Wesentlichen durch Plasmide, welche die Gene für die insektiziden Toxine tragen (González und

Carlton, 1984, Gillis et al., 2018). Interessanterweise konnte eine Studie aus dem Jahr 2020 feststellen, dass die Fähigkeit zur Produktion von kristallinen Einschlüssen weniger mit der phylogenetischen Beziehung der einzelnen Stämme, sondern eher mit einer Nischenadaptation zusammenhängt. Die phylogenetischen Untersuchungen zeigten eine positive Korrelation der *cry* Gene auch mit *B. cereus* Spezies, was wiederum die fließenden Übergänge der Gruppe hervorhebt (Torres Manno et al., 2020).

2.2.1. Cry Toxine

Das erste *cry* Gen wurde 1985 kloniert und beschrieben (Schnepf et al., 1985), viele weitere Cry Proteine wurden seither identifiziert und anhand ihrer Aminosäuresequenz klassifiziert (Crickmore et al., 1998). Eine Einteilung der Toxine kann durch Subfamilien erfolgen, zu ihnen zählt beispielsweise die größte Gruppe, die drei-Domänen-Toxine, aber auch Etx_Mtx2 Proteine, Toxin_10 Proteine und α -helikale Toxine (Li et al., 1991, Kelker et al., 2014, Dementiev et al., 2016, Liu et al., 2018, Domínguez-Arrizabalaga et al., 2020). Mitte 2020 wurde eine strukturbasierte Nomenklatur der Toxine vorgeschlagen, welche ausschließlich drei-Domänen-Toxine als Cry Proteine bezeichnet (Crickmore et al., 2020). Der Großteil der Cry Proteine wird in diese Kategorie eingeordnet und ist deshalb am besten erforscht. Die folgenden Absätze beziehen sich auf diese.

Der Wirkungsmechanismus der Cry Toxine kann grob in zwei Modelle eingeteilt werden. Zum einen das Modell der sequentiellen Bindung (siehe Abb. 1), welches als der klassische Mechanismus bezeichnet werden kann, und zum anderen das Signalweg-Modell (Melo et al., 2016). Grundsätzlich ist die primäre Wirkung des ersten Modells die Lyse der Epithelzellen des Mitteldarms, bedingt durch die Formation einer Transmembranpore an der apikalen Mikrovillimembran (de Maagd et al., 2001, Bravo et al., 2007). Nach der Ingestion der kristallinen Einschlüsse kommt es in der alkalischen Umgebung des Insektendarms zur Lösung der Toxine und anschließend zur Aktivierung der Protoxine durch Proteasen des Darms (Lecadet und Martouret, 1967, Bravo et al., 2007). Durch bakterielle Chitinasen kann die peritrophische Membran des Insektendarms überwunden werden (Malovichko et al., 2019) und die Toxine können an spezifische Oberflächenproteine wie N-Aminopeptidase (APN) und alkalische Phosphatase (ALP) Rezeptoren binden (Knight et al., 1994, Jurat-Fuentes und Adang, 2004). Dies fördert die Bindung an Cadherin Rezeptoren, was proteolytische Spaltungen,

vor allem die Abspaltung einer α -1 Helix, und strukturelle Veränderungen im Toxin mit anschließender Bildung eines präporösen Oligomers zur Folge hat (siehe Abb. 1). Diese Prozesse erleichtern die Bildung einer Membranpore, die zum Zelltod durch osmotischen Schock führt (Vadlamudi et al., 1995, Gómez et al., 2002, Bravo et al., 2007).

Das Signalwegmodell beruht auf der Beeinflussung einer Mg^{2+} und Ca^{2+} abhängigen Signalkaskade. Durch die Aktivierung einer Adenylatzyklase kommt es zum Anstieg von zyklischem Adenosinmonophosphat, was wiederum eine Proteinkinase A aktiviert. Letzten Endes werden Ionenkanäle aktiv und ein Signalweg wird eingeleitet, der den Zelltod induziert (Zhang et al., 2005, Zhang et al., 2006, Castella et al., 2019).

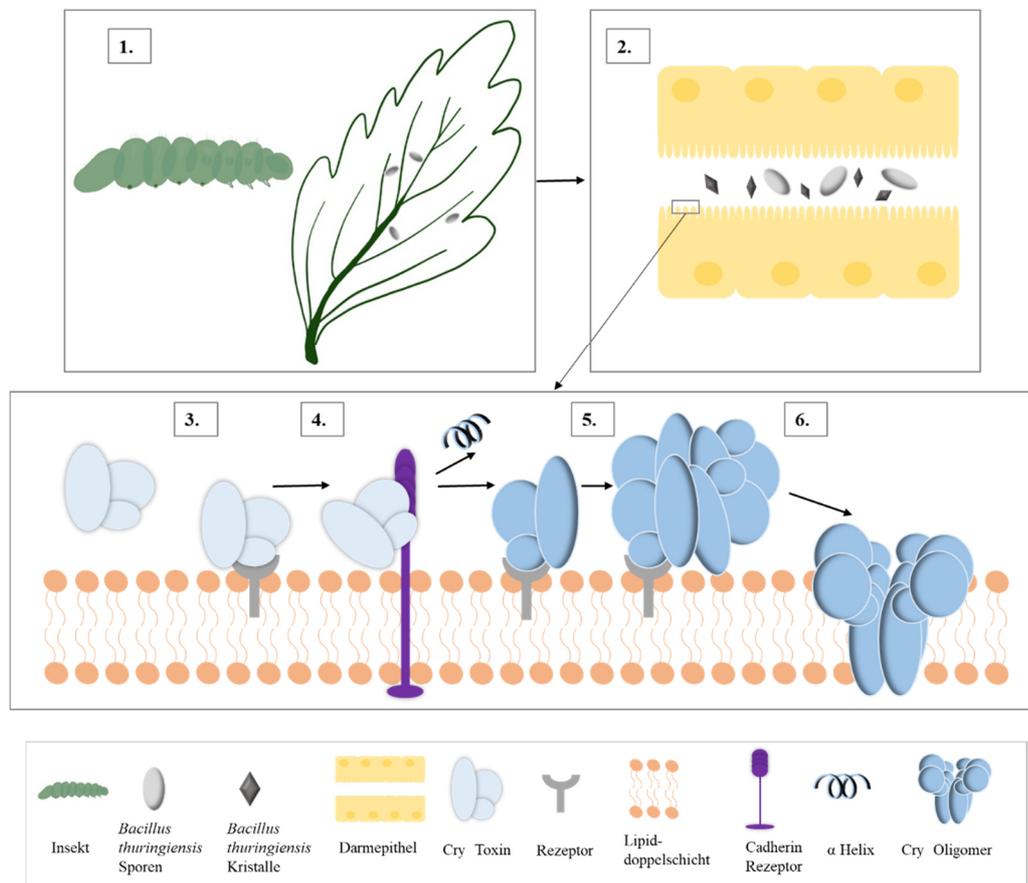


Abbildung 1: Modell der sequenziellen Bindung, modifiziert nach Xu et al., 2014. **1)** Aufnahme der *B. thuringiensis* Sporen durch das Insekt. **2)** Lösung der Cry Toxine im alkalischen Milieu des Mitteldarms. **3)** Bindung der Toxine an N-Aminopeptidase (APN) und alkalische Phosphatase (ALP) Rezeptoren. **4)** Bindung an Cadherin Rezeptoren mit anschließenden strukturellen Veränderungen des Toxins. **5)** und **6)** Erhöhung der Bindungsaffinität und Bildung eines Oligomers mit Folge der Porenbildung.

2.2.2. Cyt Toxine

In vivo konnte schon früh die spezifische Toxizität gegenüber Insekten der Ordnung Diptera nachgewiesen werden (de Maagd et al., 2003). Aus diesem Grund werden Cyt produzierende Stämme, wie *B. thuringiensis* spp. *israelensis* (Bti), in hohem Maße zur Stechmückenbekämpfung eingesetzt (Bravo et al., 2007, Mendoza-Almanza et al., 2020). Cyt Toxine weisen zudem zytolytische Eigenschaften gegenüber verschiedenen Säugetierzelllinien und Erythrozyten auf (Thomas und Ellar, 1983a, de Maagd et al., 2003). Die dreidimensionale Struktur besteht aus einem β -Faltblatt im Zentrum, welches aus sechs antiparallelen Strängen zusammengesetzt und von einer α -Helix-Schicht umgeben ist (Li et al., 1996, Cohen et al., 2008, Cohen et al., 2011). Strukturelle Übereinstimmungen bestehen mit Volvatoxin 2 (VVA2), welches aus einem Speisepilz, *Volvariella volvacea*, isoliert wurde (Lin et al., 1973, Cohen et al., 2008, Xu et al., 2014). Dieses formt zusammen mit Volvatoxin 1 Volvatoxin A, welches hämolytisch und zytotoxisch aktiv ist (Lin et al., 1973, Fassold et al., 1976).

Es werden zwei Modelle der Toxinwirkung beschrieben. Im Modell der Porenbildung kommt es zunächst zur Bindung des Monomers an Membranlipide wie Sphingomyelin, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin (Thomas und Ellar, 1983b, Mendoza-Almanza et al., 2020). Die C-terminale Region des Toxins bindet zunächst an die Membran, anschließend kommt es zu Konformationsänderungen im N-Terminus, was die Oligomerisierung fördert (Rodriguez-Almazan et al., 2011). Eine regenschirmähnliche Struktur wird gebildet, welche die Lipiddoppelschicht durchzieht und überspannt, Folge ist eine Änderung der Membranpermeabilität (Butko, 2003, Xu et al., 2014). Ein anderes Modell beschreibt einen Detergenz-Effekt, wobei die Toxine Membranbestandteile lösen und so die Lipiddoppelschicht zerstören, was den Zelltod verursacht. Es wird vermutet, dass niedrigere Toxinkonzentrationen eine Porenbildung nach sich ziehen, wobei die Lipiddoppelschicht bestehen bleibt. Wird ein kritischer Punkt des Verhältnisses zwischen Toxinen und Lipiden überschritten, resultiert die Auflösung der Membran in ihre Bestandteile (Butko, 2003).

Des Weiteren sind synergistische Effekte zwischen Cry und Cyt Toxinen bekannt, beispielsweise findet eine Bindung zwischen Cry11Aa und Cyt1Aa statt, welche die Bildung der Cry Oligomerstruktur erleichtert (Chang et al., 1993, Pérez et al., 2007).

2.2.3. Vip und Sip Proteine

B. thuringiensis synthetisiert neben den beiden Haupttoxinen weitere insektizide Proteine, die während des vegetativen Wachstums sekretiert werden. Zu diesen zählen Vip (vegetative, insektizide Proteine) und Sip (sekretierte, insektizide Proteine) (Palma et al., 2014).

Bisher wurden vier unterschiedliche Gruppen vegetativer, insektizider Proteine beschrieben. Vip1 und Vip2 bilden ein binäres Toxin, wobei Vip1 als Membranbindende Einheit dient und es Vip2 durch Porenbildung ermöglicht in die Zelle zu gelangen, wo es als enzymatischer Bestandteil wirkt (Leuber et al., 2006, Jucovic et al., 2008, Geng et al., 2019). Für Vip3 Toxine wird ein sequenzielles Porenbildungsmodell, ähnlich dem der Cry Toxine, in Betracht gezogen (Lee et al., 2003). Die Aktivierung durch Proteasen ist dabei erforderlich, um eine nadelähnliche Struktur zu formen, welche die Lipiddoppelschicht durchdringen kann (Núñez-Ramírez et al., 2020). Die insektiziden Eigenschaften von Vip4 sind bisher nicht bekannt, allerdings zeigt es Sequenzhomologien zu Vip1. Es wird vermutet, dass es mit einer anderen, bisher unbekanntem Komponente agiert, ähnlich dem Prinzip der Vip1/Vip2 Toxine (Palma et al., 2014).

2006 wurde das sekretierte, insektizide Protein erstmals aus Überständen des *B. thuringiensis* Stammes EG2158 isoliert (Donovan et al., 2006). Bisher wurden zwei Sip Proteine identifiziert (Donovan et al., 2006, Sha et al., 2018). Der Wirkungsmechanismus des Toxins ist bisher nicht bekannt, doch es besteht eine geringe Sequenzübereinstimmung zu Mtx3, welches von *Bacillus sphaericus* gebildet wird, weshalb ein Porenbildungsmodell in Betracht gezogen wird. Gezeigt werden konnte eine hohe Toxizität gegenüber Larven verschiedener Käferarten (Donovan et al., 2006).

2.3. *B. thuringiensis* als potentiell humanpathogener Keim

Angesichts der engen taxonomischen Beziehung zwischen *B. cereus* und *B. thuringiensis* erscheint es fragwürdig, solche Präparate extensiv in der Landwirtschaft zu gebrauchen. *B. thuringiensis* besitzt Enterotoxingene wie *nhe*, *hbl* und *cytK* und die Produktion dieser Toxine wurde mehrfach nachgewiesen (Damgaard, 1995, Kyei-Poku et al., 2007, Ankolekar et al., 2009, Kim et al., 2017a). Der Einsatz der Pestizide wurde schon früh in Frage gestellt und es wurde darauf hingewiesen, Landwirte und Verbraucher über den Gebrauch der Insektizide

und Methoden des Selbstschutzes aufzuklären (Green et al., 1990). Die Aufnahme der Biopestizidisolate durch den Anwender ist nicht nur wahrscheinlich, sondern konnte durch den Nachweis in humanen Fäzes bestätigt werden (Jensen et al., 2002). Zudem gibt es Belege über Immunreaktionen (Immunglobulin G und E) bei Mitarbeitern landwirtschaftlicher Betriebe nach Exposition mit *B. thuringiensis* Pestiziden (Bernstein et al., 1999, Baelum et al., 2012). Es wurde dokumentiert, dass keine respiratorischen Symptome oder Störungen der Lungenfunktion auftraten (Baelum et al., 2012), jedoch konnte bei Mäusen durch wiederholte Aerosolexposition mit kommerziellen *B. thuringiensis* Präparaten eine sub-chronische Lungenentzündung hervorgerufen werden (Barfod et al., 2010).

In einer Studie aus dem Jahr 2008 wurden retrospektiv *Bacillus* Spezies, welche im Zusammenhang mit 39 Lebensmittelausbrüchen standen, untersucht. In vier dieser Fälle wurde *B. thuringiensis* nachgewiesen. Die Patienten zeigten Symptome wie Erbrechen, Übelkeit, Diarrhö, abdominale Krämpfe, aber auch Fieber und Kopfschmerzen (McIntyre et al., 2008). Im Jahr 2015 wurde *B. thuringiensis* als Auslöser einer schweren, akuten Entzündung des Gastrointestinaltrakts beschrieben (Matsumoto et al., 2015). 2016 wurde ein Fall veröffentlicht, in dem drei von fünf Familienmitgliedern an Übelkeit und Diarrhö litten, nachdem sie Salat und ein Nudelgericht verzehrt hatten. Nur diejenigen, die den Salat aßen, wiesen die beschriebenen Symptome auf, zudem bestätigte der Hersteller die Anwendung von XenTari® (*B. thuringiensis* spp. *aizawai*). Darauf folgende Kontrollen der Salatproben ermittelten *B. thuringiensis*-Konzentrationen von bis zu $1,5 \times 10^5$ KBE/g (EFSA, 2016b).

Neben lebensmittelassoziierten Erkrankungen konnte *B. thuringiensis* mit nicht-gastrointestinalen Infektionen in Verbindung gebracht werden. Damgaard et al. konnten *B. thuringiensis* Stämme aus infizierten Brandwunden und Wasser, welches zur Reinigung dieser verwendet wurde, isolieren (Damgaard et al., 1997). Außerdem sind okulare und periorbitale Infektionen, ausgelöst durch *B. thuringiensis*, beschrieben worden, sowie Parodontitis (Helgason et al., 2000a, Callegan et al., 2006, Peker et al., 2010). Wenngleich sich die klinische Behandlung der Infektionen durch *B. cereus* und *B. thuringiensis* sehr ähnlich gestaltet, ist die Differenzierung der Spezies dennoch erforderlich, um das Risiko, das potentiell von Biopestiziden ausgeht, zu überwachen und einzuschätzen (Damgaard et al., 1997).

Ebenso wie sein naher Verwandter *B. cereus* kann *B. thuringiensis* Bakteriämien verursachen. 2009 konnten in einer Studie mehrere Stämme aus Blut der betroffenen Patienten, Katheterspitzen, Gaze und der Krankenhausumgebung isoliert werden. Das Vorkommen der Spezies in Kliniken und ihre Fähigkeit zur Biofilmbildung deutet darauf hin, dass *B. thuringiensis* nosokomiale Infektionen hervorrufen kann (Kuroki et al., 2009).

2.4. Kontroverse Debatte über den Einsatz von *B. thuringiensis* Biopestiziden

Die Debatte über die Verbrauchersicherheit bei der Verwendung von *B. thuringiensis* Stämmen in Biopestiziden wird seit langem geführt, jedoch wurde die Diskussion im Jahr 2016, nach Untersuchungen der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit, wieder aktuell (EFSA, 2016b). Es wurde hervorgehoben, dass in der Routinediagnostik keine Speziesdifferenzierung stattfindet. So werden mögliche lebensmittelassoziierte Infektionen, aber auch klinische Erkrankungen, welche durch *B. thuringiensis* verursacht sind, übersehen (EFSA, 2016b, Johler et al., 2018). Die Gesamtgenomsequenzierung der Biopestizidstämme soll in Zukunft eine Risikoanalyse und eindeutige Identifizierung der Isolate ermöglichen. Außerdem wurde ausdrücklich nach Kontrollmaßnahmen und Feldstudien zur Persistenz der Isolate nach der Applikation verlangt (EFSA, 2016b, Torres Manno et al., 2020). Die Befürworter erklärten die mikrobiellen Pestizide allerdings als außerordentlich sicher (Raymond und Federici, 2017). Nach lebensmittelassoziierten Ausbrüchen seien keine Biopestizidstämme, sondern ausschließlich natürlich vorkommende Stämme isoliert worden (Raymond und Federici, 2017, Raymond und Federici, 2018). Dies steht wiederum in Kontrast zu Resultaten anderer Autoren (Johler et al., 2018). Eine weitere Studie konnte Lebensmittelisolate nicht von Biopestizidstämmen unterscheiden, und kam ebenso zu dem Schluss, dass die Genomsequenzen aller verwendeter Pestizidstämme öffentlich zugänglich sein sollten, um Auswirkungen auf die Umwelt und Lebensmittel zu kontrollieren (Frentzel et al., 2020). Eine ausführliche Risikobewertung der verschiedenen Biopestizide und deren Rezepturen ist für viele Autoren unabdingbar (Johler et al., 2018).

III. ZIELSETZUNGEN DIESER ARBEIT

Ziel der vorliegenden Arbeit war zum einen die Vervollständigung eines bereits in Vorarbeiten etablierten Risikobewertungsschemas für enteropathogene *B. cereus*, durch die Untersuchung des Auskeimungsvermögens von Sporen unter simulierten Darmbedingungen. Auf diese Weise kann das toxische Potential neuer *B. cereus* Isolate wesentlich genauer abgeschätzt werden. Im Gegensatz zur bisherigen Routinediagnostik, die sich hauptsächlich auf das Toxinbildungsvermögen unter Laborbedingungen stützt, werden nun die einzelnen Schritte dieses multifaktoriellen Lebensmittelinfektionsprozesses mit einbezogen.

Zum anderen sollte auch das enteropathogene Potential des eng verwandten *B. thuringiensis* untersucht werden. Hierzu wurden Isolate aus Lebensmitteln, der Umwelt und Biopestiziden vergleichend untersucht. Sowohl Wachstum als auch Enterotoxinproduktion wurde unter simulierten intestinalen Bedingungen evaluiert. Es wurden außerdem die Auswirkungen auf CaCo-2 Zellen im Zytotoxizitätsassay getestet sowie weitere Pathogenitätsfaktoren, welche Teil des Infektionsprozesses sind. Darüber hinaus wurde die Empfindlichkeit der Isolate gegenüber alternativen antimikrobiellen Substanzen, welche als potentielle Dekontaminationsmittel genutzt werden können, ermittelt.

IV. PUBLIKATION I

Titel

„Assessing the toxic potential of enteropathogenic *Bacillus cereus*“

Autoren

Nadja Jessberger^a, Markus Kranzler^b, Claudia Da Riola^a, Valerie Schwenk^a, Tanja Buchacher^b, Richard Dietrich^a, Monika Ehling-Schulz^b, Erwin Märtlbauer^a

^a Department für Veterinärwissenschaften, Veterinärmedizinische Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München, Schönleutnerstr. 8, 85764, Oberschleißheim, Deutschland

^b Funktionelle Mikrobiologie, Institut für Mikrobiologie, Department für Pathobiologie, Veterinärmedizinische Universität Wien, 1210, Wien, Österreich

Journal

Food Microbiology (IF 2019: 4,155)

Status

akzeptiert am 20.07.2019

publiziert online am 22.07.2019

Food Microbiology 84 (2019) 103276

doi: 10.1016/j.fm.2019.103276

This article was published in Food Microbiology, 84, Nadja Jessberger^a, Markus Kranzler^b, Claudia Da Riola^a, Valerie Schwenk^a, Tanja Buchacher^b, Richard Dietrich^a, Monika Ehling-Schulz^b, Erwin Märtlbauer^a, Assessing the toxic potential of enteropathogenic *Bacillus cereus*, 103276, Copyright Elsevier (2019).



Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fmAssessing the toxic potential of enteropathogenic *Bacillus cereus*Nadja Jessberger^{a,*}, Markus Kranzler^{b,1}, Claudia Da Riola^a, Valerie Schwenk^a,
Tanja Buchacher^{b,2}, Richard Dietrich^a, Monika Ehling-Schulz^b, Erwin Märtlbauer^a^a Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Schönleutnerstr. 8, 85764, Oberschleißheim, Germany^b Functional Microbiology, Institute of Microbiology, Department of Pathobiology, University of Veterinary Medicine Vienna, 1210, Vienna, Austria

ARTICLE INFO

Keywords:
Bacillus cereus
 Food infections
 Enterotoxins
 Virulence assessment
 Exoproteases
 Marker proteins

ABSTRACT

The diarrheal type of food poisoning caused by enteropathogenic *Bacillus cereus* has been linked to various exotoxins. Best described are the non-hemolytic enterotoxin (Nhe), hemolysin BL (Hbl), and cytotoxin K (CytK). Due to the ubiquitous prevalence of *B. cereus* in soil and crops and its ability to form highly resistant endospores, contaminations during food production and processing cannot be completely avoided. Although phylogenetically closely related, enteropathogenic *B. cereus* strains show a high versatility of their toxic potential. Thus, functional tools for evaluating the pathogenic potential are urgently needed in order to predict hazardous food contaminations. As the diarrheal syndrome is the result of a toxico-infection with enterotoxin production in the intestine, the entire passage of the bacteria within the host, from spore survival in the stomach, spore germination, host cell adherence, and motility, to enterotoxin production under simulated intestinal conditions was compared in a panel of 20 strains, including high pathogenic as well as apathogenic ones. This approach resulted in an overarching virulence analysis scheme. In parallel, we searched for potential toxico-specific secreted markers to discriminate low and high pathogenic strains. To this end, we targeted known exotoxins using an easy to implement immunoblotting approach as well as a caseinolytic exoprotease activity assay. Overall, Nhe component B, sphingomyelinase, and exoproteases showed good correlation with the complex virulence analysis scheme and can serve as a template for future fast and easy risk assessment tools to be implemented in routine diagnostic procedures and HACCP studies.

1. Introduction

Bacillus cereus is an important pathogen involved in food poisoning outbreaks (Mead et al., 1999; Scallan et al., 2011; Anonymous, 2015; Messelhäußer and Ehling-Schulz, 2018). Although the course of disease is often mild and self-limiting, severe and even lethal cases are published (Lund et al., 2000; Dierick et al., 2005; Naranjo et al., 2011). Two types of gastrointestinal diseases, the emetic and the diarrheal syndrome, are known (Stenfors Arnesen et al., 2008; Ehling-Schulz et al., 2019). The emetic form, which manifests in vomiting and nausea, is caused by the heat-stable cyclic dodecadepsipeptide cereulide (Agata et al., 1995; Ehling-Schulz et al., 2004; Messelhäußer et al., 2014). Cereulide is pre-formed in contaminated foods and thus, food intoxication appears shortly after ingestion. Diagnostics of emetic *B. cereus* has been massively improved by developing PCR methods for the detection of emetic strains as well as mass-spectrometry for cereulide quantification in foods (Ehling-Schulz and Messelhäußer, 2013;

Messelhäußer et al., 2014; Ehling-Schulz et al., 2015). Recently, the identification of cereulide producing *B. cereus* by MALDI-TOF MS was described (Ulrich et al., 2019). These methods contribute to an easier and more reliable discrimination between hazardous and harmless food samples. Unlike the emetic toxin, the enterotoxins responsible for the diarrheal form are heat-, protease- and acid labile (Stenfors Arnesen et al., 2008). This means that enterotoxins pre-formed in foods do most certainly not contribute to the disease, but rather the enterotoxins produced in the intestine. Three enterotoxins have been linked to the diarrheal form of disease, which are the single protein CytK (cytotoxin K (Lund et al., 2000);) and mainly the two three-component toxin complexes Nhe (non-hemolytic enterotoxin (Lund and Granum, 1996; Didier et al., 2016);) and Hbl (hemolysin BL (Beecher and MacMillan, 1990; Beecher et al., 1995);). Nhe consists of the proteins NheA, NheB and NheC, while Hbl comprises the two lytic proteins L1 and L2 and the binding component B. Tools for the detection of these enterotoxins in culture supernatants of *B. cereus* are available, which are based on

* Corresponding author.

E-mail address: N.Jessberger@mh.vetmed.uni-muenchen.de (N. Jessberger).¹ contributed equally.² Present address: Turku Center for Biotechnology, University of Turku and Åbo University, Tykistökatu 6, 20520 Turku, Finland.<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103276>

Received 9 April 2019; Received in revised form 18 July 2019; Accepted 20 July 2019

Available online 22 July 2019

0740-0020/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

monoclonal antibodies against the single toxin components (Dietrich et al., 1999, 2005; Tausch et al., 2017). In addition to these toxins, several other virulence factors have been described that might also contribute to enteropathogenicity. These virulence factors include enzymes such as the sphingomyelinase (SMase) and the phosphocholine-specific phospholipase C (PC-PLC), as well as proteinases such as immune inhibitor A metalloproteases (InhAs) and collagenase-specific matrix metalloproteases such as ColA (for review see Ehling-Schulz et al., 2019). However, for a holistic virulence assessment of enteropathogenic *B. cereus*, only investigating their ability to produce toxins is insufficient, as the establishment of a *B. cereus*-associated food infection also depends on several other factors. First of all, the ability of the bacteria, mainly spores, to survive the stomach passage (Clavel et al., 2004; Wijnands et al., 2009; Ceuppens et al., 2012; Berthold-Pluta et al., 2015) is of utmost importance. Only spores able to germinate will contribute to the onset of disease (Clavel et al., 2004; Wijnands et al., 2006, 2007). Furthermore, adherence to the intestinal epithelium, which helps the bacteria to settle in the intestine, as well as the ability to actively move towards the epithelium, can play a decisive role in the course of disease (Minnaard et al., 2004; Ramarao and Lereclus, 2006; Ghelardi et al., 2007; Salvetti et al., 2007; Mazzantini et al., 2016). Thus, for the prediction of the health risk originating from a certain enteropathogenic *B. cereus* isolate, the aforementioned parameters have to be considered. A strain, for instance, which produces high levels of toxins but its spores are not able to germinate in the host environment could be classified less hazardous than a lower toxin producer with high stomach survival rates. In an animal model, all these parameters could be addressed simultaneously, but currently no suitable animal model exists for *B. cereus*. Hence, the aim of this study was to create an overarching virulence assessment scheme for enteropathogenic *B. cereus*, considering parameters from bacterial survival during stomach passage to enterotoxin production under simulated intestinal conditions. To achieve this, the pathogenicity parameters mentioned above were compared in a set of 20 *B. cereus* strains, including high toxic as well as apathogenic isolates. However, since such in depth investigations are not suitable for fast and easy virulence assessment in routine diagnostics of food samples, we developed an easy to implement analysis tool, based on secreted bacterial virulence factors, which reflected the results of the detailed virulence assessment.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and culture conditions

The *B. cereus* strains used in this study are listed in Table 1. Additionally, strains 2/25, 1/26, 1/27, 1/28, 1/30, 11/6 II AR, 10/12 D from two food poisoning outbreaks in Austria (Schmid et al., 2016) were examined. Strains were pre-cultured in 20 ml CGY (casein-glucose-yeast) medium with 1% glucose at 37 °C and 120 rpm for 17 h. For motility assays, OD₆₀₀ of all strains was adjusted to 20. To adjust the MOI in adhesion assays, cfu of all strains at OD₆₀₀ = 0.05 was determined. For this, dilution series of 10⁻³ - 10⁻⁷ were applied to CGY agar plates. For incubation under simulated intestinal conditions, preparation of cRPMI medium was carried out as described previously (Jessberger et al., 2017). In brief, RPMI 1640 medium (with stable glutamine; Biochrom GmbH, Germany), supplemented with 1% glucose and 2% casein hydrolysate, was incubated with differentiated CaCo-2 cells for 22 h and filtered using a 0.2 µm filter. The pre-culture was adjusted to a start OD₆₀₀ of 0.05 in 45 ml cRPMI and incubated statically at 37 °C and 7% CO₂ atmosphere. Samples for analyses were taken after 2, 3, 4, and 6 h, and centrifuged at 3500 g at 4 °C for 15 min. For immunoblot and protease activity analyses, the supernatant was filtered through a 0.2 µm Filtropur filter (Sarstedt, Germany) and stored at -80 °C until use.

2.2. Cell lines and culture conditions

CaCo-2 cells were obtained from DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany), and cultivated in RPMI 1640 medium (with stable glutamine) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biochrom AG). For cultivation, 80 cm² culture flasks and a humidified incubator (37 °C and 7% CO₂) were used. Cells were passaged 1:6 every 3–4 d. For adhesion assays, 5 × 10⁴ CaCo-2 cells/well were seeded in 24 well plates and differentiated for 14 d. Medium was changed every 2–3 d. According to Jessberger et al. (2017), differentiated CaCo-2 cells were incubated for 22 h with RPMI 1640 medium containing 1% glucose and 2% casein hydrolysate to gain “CaCo-2 treated” (cRPMI) medium.

2.3. Spore preparation

B. cereus spores were prepared as described previously (Fricker et al., 2011; Da Rioli et al., 2018). Briefly, cultures were incubated for 3 d in minimal sporulation medium (1 M MgCl₂ × 6 H₂O, 1 M Ca (NO₃)₂ × 4 H₂O, 12.5 mM ZnCl₂, 2.5 mM CuCl₂, 2.5 mM CoCl₂ × 6 H₂O, 2.5 mM Na₂MoO₄ × 2 H₂O, 5 mM (NH₄)₂SO₄, 0.066 mM MnSO₄ × H₂O, 1 mM FeSO₄ and 1 M maltose in bacto nutrient broth (Oxoid; pH 7.6) until > 80% spore content was reached. Sporulation was monitored via bright-field microscopy. After centrifugation at 4000 g, 7 min and 4 °C, the cultures were washed three times in pre-cooled spore washing buffer (2 mM KH₂PO₄, 8 mM K₂HPO₄, pH 7.4) and stored at 4 °C. To determine spore concentrations, washed spore suspensions were again centrifuged (4000 g, 7 min, 4 °C) and resuspended in 5 ml spore washing buffer. OD₆₀₀ was adjusted to 0.44 × 200 µl were transferred to Eppendorf tubes. 2 × 200 µl were heated for 10 min at 80 °C. Subsequently, a 1:10 dilution series of all samples was prepared and plated on CGY agar. Heat treatment guaranteed the determination of the pure spore count by eliminating residual vegetative bacteria. Furthermore, the comparison of heat treated and untreated samples allowed verifying the purity of the spore preparations. For cfu determination, the weighted arithmetic mean of dilutions 10⁻² to 10⁻⁴ was used.

2.4. Adhesion to CaCo-2 cells

Adhesion assays were performed with vegetative cells and spores of 20 *B. cereus* strains. Overnight cultures as well as spore suspensions were adjusted to the desired MOI in RPMI 1640 medium. Differentiated CaCo-2 cells were washed twice with 1 ml PBS and infected with 1 ml bacterial suspension. MOI 1 and 10 were used for vegetative cells, MOI 1 for spores. After infection, samples were incubated at 37 °C and 7% CO₂ for 30 min. The bacterial suspension was siphoned, and cells were washed three times in 1 ml PBS and lysed in 1 ml H₂O. Spore suspensions were incubated at 80 °C for 10 min to eliminate putative residual or newly germinated vegetative cells. Serial dilutions were plated on CGY agar. After 24 h incubation at 37 °C, cfu were determined and the number of adhered bacteria or spores was calculated in relation to the inoculum. Each strain was tested in triplicates.

2.5. Germination

Germination of *B. cereus* spores was compared in CGY, RPMI and cRPMI medium, each with and without prior heat activation for 10 min at 80 °C. As described before (Jessberger et al., 2019), media were inoculated to an OD₆₀₀ = 1. Samples (200 µl, 3 technical replicates each) were incubated at 37 °C for 1 h in 96-well plates. Every 3 min the optical density at 620 nm was measured in a Tecan photometer using Ridawin software. At least 2 replicates per strain were examined. Germination is shown as the decrease of OD₆₂₀ (in %) per time.

Table 1

B. cereus strains used in this study. A set of 19 enteropathogenic and apathogenic strains has already been characterized in detail (Jessberger et al., 2015, 2017). Probiotic IP 5832 (Kniehl et al., 2003) was added to the analyses.

<i>B. cereus</i> strain	Origin	Genotype Clade (group)	Toxin gene profiling <i>ces hbl nhe cytK2</i> profile					Pathogenicity*
14294-3 (M6)	Ice cream	I (III)	-	+	+	+	A	m/hi
SDA KA96	Raw milk	I (III)	-	+	+	+	A	hi
INRA A3	Starch	II (IV)	-	+	+	+	A	m/lo
INRA C3	Pasteurized carrot	II (IV)	-	+	+	+	A	hi
6/27/S	Human feces	II (IV)	-	+	+	+	A	m
F3175/03 (D7)	Human feces	II (IV)	-	+	+	+	A	m
RIVM BC 934	Lettuce	II (IV)	-	+	+	+	A	lo
F528/94	Beef & chow mein and rice, outbreak	I (II)	-	+	+	-	C	lo
F837/76	Human, postoperative infection	I (III)	-	+	+	-	C	hi
RIVM BC 126	Human feces	I (II)	-	+	+	-	C	hi
MHI86	Infant food	I (III)	-	-	+	+	D	lo
F4429/71	Vanilla pudding	I (III)	-	-	+	+	D	hi
RIVM BC 964	Kebab	II (IV)	-	-	+	+	D	hi
F3162/03 (D8)	Human feces	I (III)	-	-	+	+	D	m/hi
MHI226	Milk and milk products	I (III)	-	-	+	-	F	lo
NVH 0075-95	Stew with vegetables, foodpoisoning	I (III)	-	-	+	-	F	hi
WSBC10035	Pasteurized milk	I (III)	-	-	+	-	F	m/hi
RIVM BC 90	Human feces	I (III)	-	-	+	-	F	lo
7/27/S	Human feces	I (III)	-	-	+	-	F	m/hi
IP 5832	Probiotic, Bactisubtil	n.d.	-	-	+	n.d.	n.d.	lo

*: according to NheB production and toxic activity against CaCo-2 cells (Jessberger et al., 2015). m: medium; hi: high; lo: low; n.d.: not determined.

2.6. Motility assay

Motility of 20 *B. cereus* strains was compared by investigating swimming behavior. In brief, 1 µl overnight culture (OD₆₀₀ = 20) was injected in the center of 53 mm diameter plates containing CGY medium with 0.25% agar. Each strain was tested at least in triplicates. After 24 h incubation at 30 and 37 °C, colony diameters were measured.

2.7. Immunoblotting

A representative subset of six strains - NVH0075-95, F4429/71, F837/76, 7/27/S (potentially/high pathogenic) and RIVM BC 90, MHI 86 (potentially low pathogenic) - was used to test the suitability of selected virulence factors as markers for enteropathogenicity. To this end, mouse monoclonal antibodies against NheA (mAb 1A8), NheB (mAb 1E11), NheC (mAb 3D6) (Dietrich et al., 2005), and sphingomyelinase (SMase; mAb 2A12) (Dietrich et al., 1999), as well as rabbit polyclonal antibodies against collagenase A (ColA) (Abfalter et al., 2016), immune inhibitor metalloprotease (InhA; SE4342, INRA, France) and phosphocholine-specific phospholipase C (PC-PLC; ABIN459259, antibodies-online, Germany) were used.

Samples from filtered culture supernatant were prepared as described above. For Western blots, proteins from the supernatants were precipitated with 100% trichloroacetic acid, washed with acetone and resuspended in 30 mM Tris buffer (pH 8.5) containing 7 M urea, 2 M thiourea, 1% serdolit, and 4% CHAPS. The protein concentration was determined using the 2D Quant Kit (GE Healthcare, UK). SDS-PAGE was carried out according to Laemmli (1970) and proteins were subsequently transferred onto a 0.45 µm nitrocellulose blotting membrane (Amersham™ Protran™ Premium, GE Healthcare, UK) with blotting buffer (50 mM Tris, 39 mM glycine, 0.0039% SDS), by using a BioRad Transblot SD Semi Dry Transfer Cell (Bio Rad, USA). Calculation of total protein load was carried out by staining with Ponceau S Solution (Applchem, Germany) and was adjusted for each target. 5 µg were loaded for the detection of NheA, NheB, SMase, and PC-PLC, 10 µg for the detection of InhA, and 20 µg for the detection of NheC, respectively.

For Slot blots, a defined volume of supernatant was applied directly. Slot blotting was performed using a Bio-Dot® SF Microfiltration Apparatus (Bio Rad, USA) with a 0.45 µm nitrocellulose blotting membrane (Amersham™ Protran™ Premium, GE Healthcare, UK). The volume of applied supernatant was determined by first using 500 µl of

the sample with lowest OD₆₀₀ and then by adjusting the other samples via [lowest OD₆₀₀ * 500 µl/OD₆₀₀], respectively. The protein solutions were loaded into the slots and proteins were transferred to the membrane via vacuum blotting for 45 min. Blocking of unspecific binding was carried out using 5% milk powder solved in 1x TBS at room temperature for 1 h. Primary antibodies were incubated with the membrane at 4 °C overnight and the respective secondary antibody (peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Dianova, Germany; Goat Anti rabbit IgG, HRP conjugated, Agrisera, Germany) was incubated with the membrane for 1 h at room temperature. The blots were developed using SuperSignal™ West Pico chemiluminescence substrate (Thermo Scientific, USA). Quantification of blot signals was performed using the Image Quant TL Software (GE Healthcare Life Sciences, UK). Values were calculated as arithmetic mean with standard deviation from two blot experiments.

2.8. Protease activity assay

Casein-specific activity of secreted proteases was determined using the Pierce™ Fluorescent Protease Activity Kit (ThermoFischer, USA), according to manufacturer's instructions, with modifications. The following dilutions of trypsin, based on a 1 µg/ml solution in TBS, were used as standards: 1,000, 750, 500, 250, 100, 75, 50, 25, 10, 0 ng/ml). 75 µl of a FITC casein working solution (10 µg/ml) were added to 75 µl of supernatant sample or standard in a black 96-well plate with transparent bottom (Greiner Bio One, Austria) and incubated for 60 min at 37 °C in the dark. After 10 min of cooling down, 50 µl of assay buffer was added to stabilize the pH value. The fluorescence signal was measured at 485 nm (cut off: 530 nm, 538 nm) in a SpectraMax™ M3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, USA). To determine the metalloprotease activity, 0.15 µl of 0.5 M EDTA (pH 8.0) were added. Final protease activity was depicted as relative fluorescence units (RFU). All values were obtained from two biological samples and two technical replicates, respectively.

2.9. Statistical analyses

Data were statistically validated using the column statistics program of GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Unpaired *t*-test was applied with two-tailed *p* values and 95% confidence interval. All data

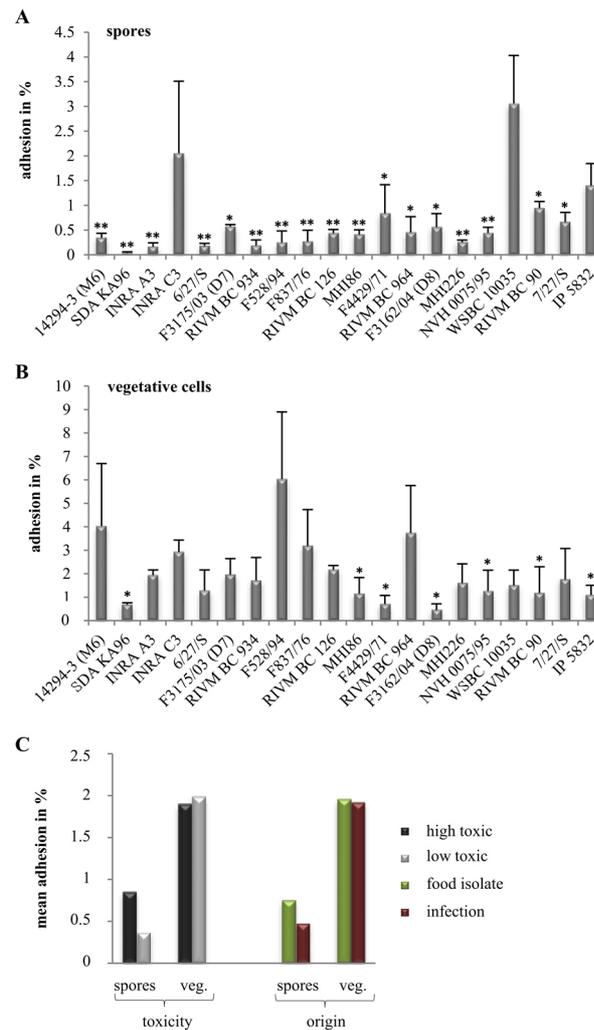


Fig. 1. Adhesion to CaCo-2 cells. Differentiated CaCo-2 cells were infected for 30 min with *B. cereus* spores (MOI 1) or vegetative cells (MOI 10). **A.** Percentage of adhered spores compared for 20 *B. cereus* strains. **B.** Percentage of adhered vegetative cells compared for 20 *B. cereus* strains. Statistically significant differences compared to the respective strain with highest adhesion (spores: WSBC 10035, vegetative cells: F528/94) are shown. *: p value < 0.05, **: p value < 0.01. **C.** Mean adhesion of high and low toxic strains as well as isolates from food samples and from infections.

were compared to the respective “best” strain - with strongest adhesion or germination, highest motility, virulence factor expression or protease activity. Significant differences were marked with * (p value < 0.05), ** (p value < 0.01) or *** (p value < 0.001).

3. Results

3.1. Strain-specific adhesion to CaCo-2 cells

The ability to adhere to human colon epithelial cells was compared

for 20 *B. cereus* strains. Ramarao and coworkers showed that *B. cereus* is generally capable of adhesion (Ramarao and Lereclus, 2006). As it is unclear if spore germination occurs in the lumen or at the epithelia, adhesion assays were performed with spores as well as vegetative *B. cereus*. To determine adhesion of spores, CaCo-2 cells were infected with MOI 1 for 30 min. Fig. 1A shows the percentage of adhered spores compared to the inoculum. Generally, spores of all strains were able to adhere, but with clear strain-specific differences. Strains WSBC 10035 and INRA C3, both high toxic strains isolated from pasteurized foods, showed the highest adhesion of 3 and 2%, respectively. With 1.4%,

former probiotic strain IP 5832 followed. Strain SDA KA96 had the lowest adhesion rate with 0.036%. To investigate adhesion of the respective vegetative bacteria, CaCo-2 cells were infected with MOI 10 for 30 min. Preliminary tests revealed no significant differences between MOI 1 and 10 for adhesion of vegetative *B. cereus* (data not shown). Again, all of the tested strains were able to adhere to the CaCo-2 cells (Fig. 1B). F528/94, a low toxic strain, showed the highest adhesion rate with 6%, followed by 14294-3 (M6), RIVM BC 964 and F837/76 (all > 3%). Strains SDA KA96 and F4429/71 adhered comparably low (< 1%). F3162/04 (D8) showed the lowest adhesion rate with 0.45%. Determining the mean of all tested samples, it became obvious that under the chosen conditions vegetative cells generally adhered with higher rates than spores (Fig. 1C). Furthermore, spores of high toxic strains adhered better than spores of low toxic strains and spores of food isolates showed a higher adhesion rate than spores of strains isolated from food infections. No differences could be determined among the vegetative cells.

3.2. Germination

Germination of *B. cereus* spores was tested in CGY, RPMI as well as cRPMI medium, with and without prior heat activation for 10 min at 80 °C. Generally, all tested spores were somehow able to germinate and germination was higher in CGY than in RPMI/cRPMI medium, and higher after previous heat treatment. While germination in CGY full medium varied from 10 to 50%, average germination in RPMI/cRPMI medium plus heat treatment was 2–30%. Only very poor germination was observed in RPMI/cRPMI medium without prior heat treatment. Nevertheless, high strain-specific differences were detected, which is exemplarily shown in Fig. 2. Strains with strong (RIVM BC 934) and weak (probiotic IP 5832) germination in CGY medium were found. In contrast to that, strain MHI86 responded rather to heat treatment than to the chosen medium (Fig. 2A). With approximately 30%, strain 7/27/S showed the strongest germination in RPMI and cRPMI medium, but highly dependent on heat treatment. On the contrary, heat treatment did not accelerate germination of strains F837/76 and RIVM BC 964, which responded better to CaCo-2-treated cRPMI than to RPMI medium (Fig. 2B). Besides newly produced spores, also three year old spore preparations were tested for their germination ability. For example, old spores of strain RIVM BC 934 germinated the same way as freshly prepared ones, while 7/27/S germinated even better in RPMI than in CGY medium, and MHI86 responded less clearly to heat treatment (Fig. 2C). To compare germination rates of all strains, decrease of OD₆₂₀ of all new spores at 20 min (CGY) and 40 min (cRPMI plus heat treatment) was chosen (see Table 2).

3.3. Strain-specific motility

To compare motility of the selected strains, their swimming ability on CGY plates containing 0.25% agar was investigated. While diameters were measured at different time points, the clearest differences were detected after 24 h incubation. At 30 °C, the two strains F3175/03 (D7) and RIVM BC 964, both highly toxic, had reached the plates' edge (maximum diameter 53 mm). On the other hand, strains RIVM BC 934, F528/94 and F837/76 showed no or only poor extension (≤ 2 mm) (Fig. 3A). At 37 °C, swimming diameters of 13 out of 20 strains were increased. Next to F3175/03 (D7) and RIVM BC 964, strains NVH 0075–95, WSBC 10035 (high toxic) as well as 6/27/S and RIVM BC 90 (low toxic) also showed maximum extension (Fig. 3B). Nevertheless, some strains were not affected by the increase of temperature, as for instance 14294-3 (M6) and MHI 226 (medium extension) or RIVM BC 934 and probiotic IP 5832 (no or low extension). Thus, it can be concluded that swimming motility of *B. cereus* is partially temperature-dependent, but highly strain-specific.

3.4. Detailed virulence assessment scheme

To achieve our overall goal, the creation of a holistic virulence assessment scheme for enteropathogenic *B. cereus*, the parameters *spore survival of the stomach passage* (Da Riou et al., 2018), *adhesion of spores* (this study), *germination under simulated intestinal conditions* (this study), *motility* (this study), *adhesion of vegetative cells* (this study), *enterotoxin (NheB) production under laboratory* (Jessberger et al., 2015) and *simulated intestinal conditions* (Jessberger et al., 2017) and *cytotoxicity towards CaCo-2 cells* (Jessberger et al., 2015, 2017) were compared for the set of 20 highly pathogenic and apathogenic strains. To reconcile these different data, the strain with the respective utmost result was set 100%, and the results of the remaining strains were adjusted to that (Table 3). The percentage points of each strain were totaled and according to that, the strain set was reclassified (Table 4I). Strains with a total amount of > 350 percentage points were defined potentially high pathogenic, strains with 240–350 percentage points potentially pathogenic, and strains with < 240 percentage points potentially apathogenic. This classification can serve as the basis for a scientifically substantiated and reliable risk evaluation of enteropathogenic *B. cereus* isolates. It is highly advantageous compared to the former routinely performed risk evaluation mainly based on toxin (NheB) production after cultivation under standard laboratory conditions. The old classification (Table 4. III) for instance overlooks highly toxic strains with mutated *nheB* genes, such as F3162/03 (D8), which occurs in approximately 2% of the isolates (Didier et al., 2015).

3.5. Identifying candidate markers displaying *B. cereus* cytotoxicity

Investigating all parameters mentioned above is highly time and resource consuming. For routine diagnostics of food samples, an equally reliable, but faster screening scheme is needed. Thus, we investigated *B. cereus* virulence factors as putative candidate markers on a subset of six representative strains (NVH0075–95, F4429/71, F837/76, 7/27/S, RIVM BC 90, MHI 86), according to their correlation with the established toxicity scheme. To this end, the proteins secreted by the bacteria under host mimicking conditions were subjected to Western blotting. The single components A, B, and C of the non-hemolytic enterotoxin (Nhe), sphingomyelinase (SMase), immune inhibitor metalloprotease (InhA), phosphocholine-specific phospholipase C (PC-PLC), and collagenase A (ColA) were tested (Fig. S1). The candidate virulence factors NheA, NheC, InhA, PC-PLC, and ColA showed differences in their expression. However, these differences were rather strain-specific and did not correlate with the enteropathogenic potential of the strains. By contrast, a good correlation to enteropathogenicity was observed for NheB and SMase. Maximum blot intensities were observed after 4 h and 6 h, however, strain F4429/71 showed a decrease after 6 h (Fig. S2). Therefore, NheB and SMase were selected as appropriate markers.

In another preliminary test, the relevance of exoprotease activity for the evaluation of the toxic potential was investigated on this subset of six strains. High toxic strains showed a more rapid and raised activity compared to low toxic strains (data not shown). Maximum activity of the high toxic strains was achieved after 3 h and 4 h, and decreased after 6 h. In contrast, the low toxic strains showed a diminished protease activity after 2 h, 3 h, and 4 h. Activity increased with progressing time, reaching a maximum after 6 h. Hence, exoprotease activity was compared after 4 h of incubation.

3.6. NheB/SMase expression and protease activity of the strain set

To establish diagnostic tools based on NheB/SMase expression and exoprotease activity for discrimination of high and low pathogenic *B. cereus* strains, a panel of the 20 pre-characterized strains was used (see Table 1). All strains were incubated for 4 h under host mimicking conditions and supernatants of strains, collected from the bacteria by centrifugation, were subsequently subjected to immunoblotting and

N. Jessberger, et al.

Food Microbiology 84 (2019) 103276

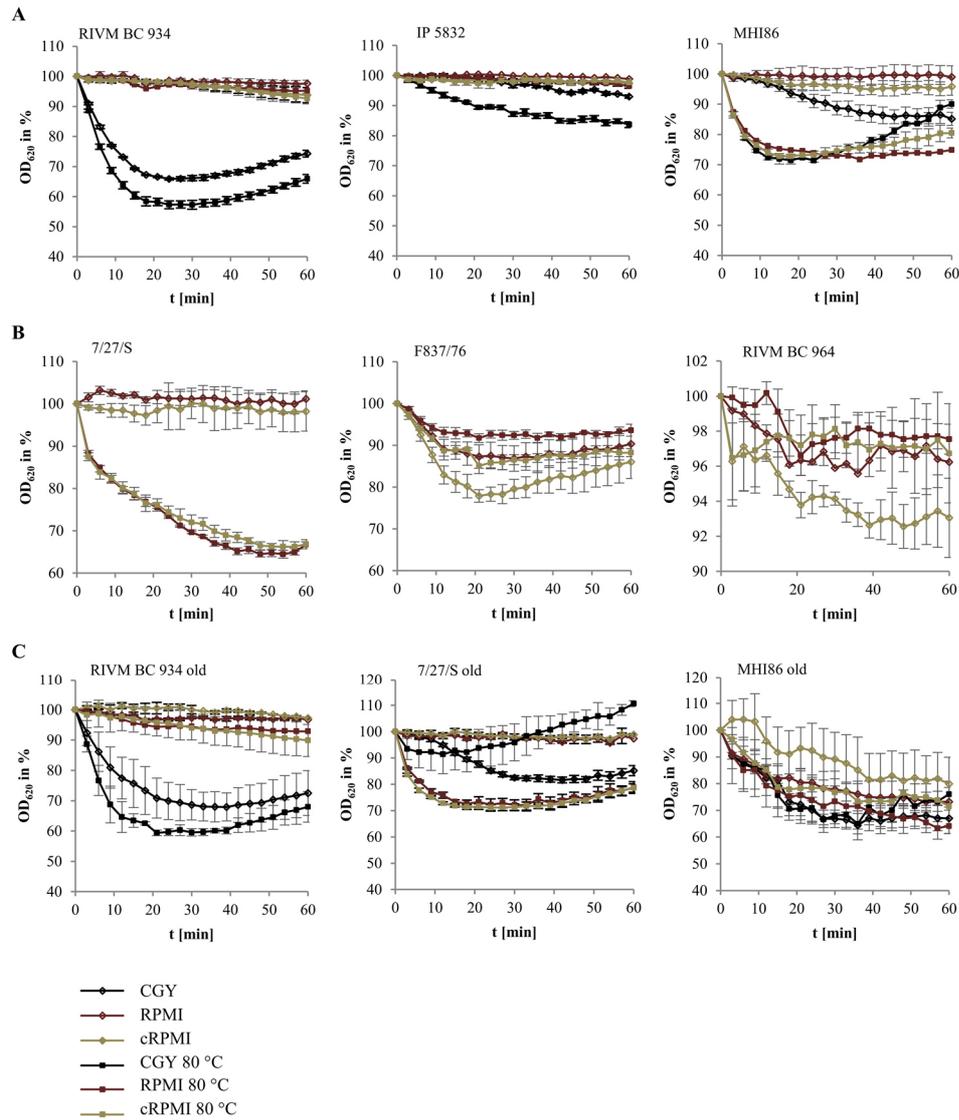


Fig. 2. Germination of *B. cereus* spores. Germination is depicted as the decrease of OD_{620} per unit of time. OD_{620} at time point 0 was set to 100%. One biological replicate (three technical replicates each) is exemplarily shown. **A.** CGY and cRPMI medium. **B.** Comparison of RPMI and cRPMI medium. **C.** Three year old spore preparations.

protease activity tests. Immunoblotting was carried out using a slot blot system with monoclonal antibodies against NheB and SMase. In parallel, exoprotein activity was tested with the commercially available Pierce™ Fluorescent Protease Activity Kit (ThermoFischer, USA), using FITC-labeled casein as a substrate.

Additionally, strains from two food poisoning outbreaks in Austria (2/25, 1/26, 1/27, 1/28, 1/30, 11/6 II AR, 10/12 D; Schmid et al., 2016) with hitherto unknown cytotoxicity and toxin titers were included in order to revise whether their NheB/SMase production and protease activity profile correlates with the epidemiological association

Table 2

Germination of *B. cereus* spores. Germination was measured as the decrease of OD₆₂₀ per unit of time. OD₆₂₀ at time point 0 was set to 100%. To compare germination rates of the 20 tested *B. cereus* strains, OD₆₂₀ (in %) after 20 min incubation in CGY full medium is shown, as well as OD₆₂₀ (in %) after 40 min incubation in cRPMI medium with prior heat treatment. Shown are means and standard deviations of at least two biological replicates, each comprising three technical replicates. p value < 0.05, **, p value < 0.01, ***, p value < 0.001 compared to the strain with best germination (F528/94 for CGY and 7/27/S for cRPMI 80 °C).

<i>B. cereus</i> strain	Germination (OD ₆₂₀ in %) 20 min CGY	40 min cRPMI 80 °C
14294-3 (M6)	78.19 ± 0.86***	96.62 ± 2.50***
SDA KA96	78.17 ± 6.8**	93.95 ± 6.53***
INRA A3	92.78 ± 7.11***	85.85 ± 7.17
INRA C3	68.92 ± 1.41***	93.97 ± 3.81***
6/27/S	78.02 ± 8.35**	97.71 ± 0.17***
F3175/03 (D7)	72.03 ± 1.18***	80.28 ± 6.12**
RIVM BC 934	64.26 ± 4.16	94.97 ± 1.62***
F528/94	55.61 ± 2.91	98.00 ± 1.59***
F837/76	80.44 ± 20.44	93.96 ± 4.75**
RIVM BC 126	83.94 ± 4.23***	97.47 ± 0.38***
MHI86	90.80 ± 3.96***	75.84 ± 0.20***
F4429/71	83.66 ± 8.85**	83.44 ± 6.99**
RIVM BC 964	58.25 ± 0.09	98.14 ± 1.70***
F3162/04 (D8)	96.64 ± 2.10***	87.83 ± 3.79***
MHI226	87.54 ± 10.64**	79.23 ± 10.52
NVH 0075/95	94.17 ± 0.90***	76.57 ± 10.53
WSBC 10035	95.89 ± 1.76***	89.09 ± 4.05***
RIVM BC 90	106.41 ± 7.94***	95.91 ± 0.79***
7/27/S	91.30 ± 3.62***	67.37 ± 2.22
IP 5832	97.13 ± 2.70***	97.74 ± 1.13***

and, thus, directly with enterotoxigenicity. The signal intensities of the respective blots are shown in Fig. 4. Most of the strains classified as high pathogenic, such as INRA C3 and RIVM BC 964, showed a strong expression of both proteins. In contrast, the five potentially low pathogenic strains expressed none or only marginal levels of NheB and/or SMase (RIVM BC 934, RIVM BC 90, MHI 86) or produced only one of the toxins in higher amounts (IP 5832: NheB, MHI 226: SMase). Additionally, all potentially low pathogenic strains showed a protease activity below 120 RFU, whereas those of the potentially high pathogenic strains showed values higher than 135 RFU (Fig. 5). The strains classified as potentially toxic showed diverse blot intensities and protease activities. Addition of EDTA inhibited the major part of protease activity which indicates a major contribution of metalloproteases to total proteolytic activity.

3.7. Virulence assessment based on NheB/SMase slot blots and protease activity

In order to establish a virulence assessment based on NheB/SMase expression and protease activity, a point assignment scheme was generated (Table 5). Toxin expression in slot blots (see Fig. 4) was determined as strong (blot signal intensity of 15 or higher), medium (between 5 and 15), low (between 1 and 5), and absent/marginal (below 1). Protease activity (see Fig. 5) was evaluated as strong with an RFU of 300 and above, medium between 200 and 300 RFU, low between 100 and 200, RFU and absent/marginal with an RFU below 100. The rating of the intensities was conducted as follows: 3 = strong, 2 = medium, 1 = low, 0 = absent/marginal. The sum reflects the actual pathogenic potential: 7–9 = potentially high pathogenic, 4–6 = potentially pathogenic, 0–3 = potentially low pathogenic/apathogenic. This classification (Tables 5 and 4. II) is congruent to the detailed virulence assessment scheme (Table 4I) to a large part. However, strains WSBC 10035, 14294-3 (M6) and F3175/03 (D7), classified in Table 4I as potentially high pathogenic, are reduced in rank to potentially pathogenic. Contrary, strain INRA A3 is upgraded from potentially pathogenic to highly pathogenic. Most important, all

potentially low pathogenic strains remain within their group. No potentially high pathogenic or pathogenic strain is underestimated following the combinatory scheme of NheB/SMase blot intensities and protease activity. For better comparison, results of the tests systems I, II and III were summarized in Table 4. IV.

Next, we tested this scheme on isolates from foodborne outbreaks in Austria in 2013 (Schmid et al., 2016). Epidemiological association has been previously confirmed for the strains 2/25 (human feces), 1/26 (ragout) and 11/6II AR (soup powder). No epidemiological association could be proven for 1/27 (spinach) and 1/30 (potatoes dumpling). For strains 1/28 (buttermilk) and 10/12 D (parsley), epidemiological association has not been tested. Here, by applying the rating from NheB/SMase blot intensities and protease activity, we were able to confirm the toxic potential of strains 2/25, 1/26 and 11/6II AR, as well as the non-toxicity of strain 1/30. Strain 1/28 was evaluated as potentially high toxic and 10/12 D as potentially toxic. However, strain 1/27 would also be ranked here as potentially high toxic due to strong expression of both NheB and SMase and medium protease activity.

4. Discussion

A reliable risk analysis of products contaminated with *B. cereus* is essential for food industry. On the one hand, food poisoning outbreaks with sometimes severe consequences (Lund et al., 2000; Dierick et al., 2005; Naranjo et al., 2011; Schmid et al., 2016) can be prevented. On the other hand, product charges containing verifiably non-pathogenic *B. cereus* will not be destroyed in vain, which will contribute significantly to food security and prevent economic losses of the manufacturer. In contrast to emetic strains, toxin production in the host intestine has to be considered for enteropathogenic *B. cereus*, which makes risk analyses rather complex. The toxic potential of the strains used in this study has been previously determined by combining NheB toxin titers and cytotoxicity under laboratory (CGY medium, shaking, 30 °C, no CO₂) and intestinal conditions (cRPMI medium, static, 37 °C, 7% CO₂) (Jessberger et al., 2015, 2017). The strain set was complemented by the apathogenic strain IP 5832, which was in use as a probiotic (Kniewl et al., 2003). Simulated intestinal conditions have been previously shown to diminish bacterial growth, but also to trigger toxin production and protein secretion. Also, overall protein secretion was accelerated, with highest protein concentration after 2 h and highest reciprocal titers of NheB after 4 h of incubation in cRPMI medium (Jessberger et al., 2017). Thus, in the current study we maintained these parameters in order to determine the actual pathogenic potential of a strain as accurate as possible. Nevertheless, toxin production and cytotoxicity determined after growth under laboratory conditions (CGY medium) was also kept in the scheme (see Table 3) for reasons of comparison, since the latter conditions are still the method of choice in routine diagnostics.

We showed that a complex virulence assessment scheme including spore survival, adhesion of spores and vegetative cells, germination, motility, toxin production and cytotoxicity towards colon epithelial cells correlates well with a fast and comparably easy system comprising NheB/SMase blots and protease activity. This system could provide the basis for the development of rapid tests for routine diagnostics. So far, there are three systems for enterotoxin detection commercially available: BCET-RPLA kit (Oxoid, UK) detects Hbl L2, TECRA-BDE kit (Tecra Interational, Australia) detects NheA and Duopath[®] Cereus Enterotoxins kit detects NheB and Hbl L2. However, these tests provide only a relative indication of the amounts of the specific toxin compounds produced, and do barely allow to estimate the overall enterotoxigenicity of a given strain (Moravek et al., 2006; Jessberger et al., 2014).

Sphingomyelinases hydrolyze sphingomyelin to ceramide and phosphorylcholine. With acidic, secretory, Mg²⁺-dependent neutral, Mg²⁺-independent neutral and alkaline, different types of SMases are known (Goñi and Alonso, 2002). Bacterial SMases can contribute to virulence, as shown for *Staphylococcus aureus*, *Listeria ivanovii* or

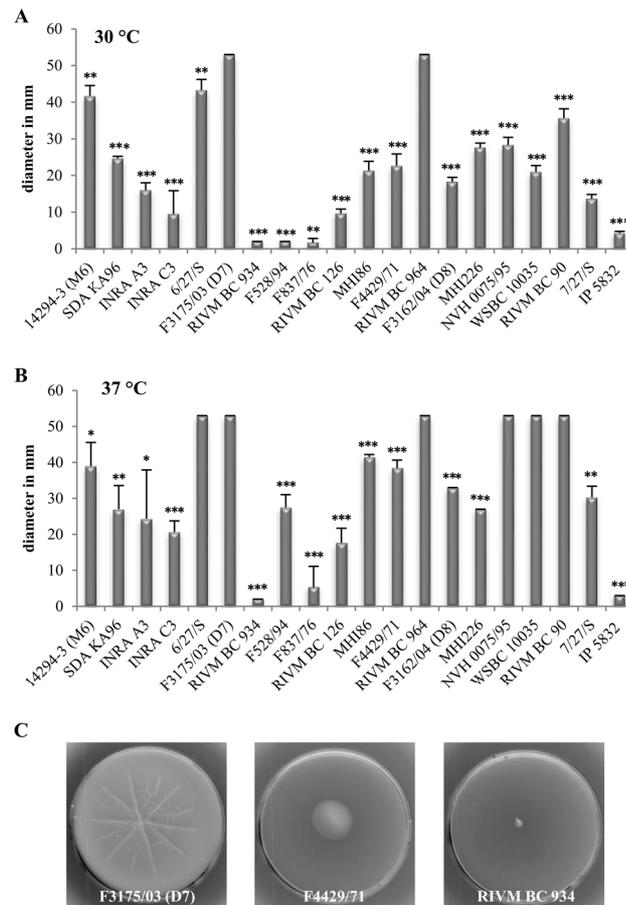


Fig. 3. Motility of the strain set. 1 μ l overnight culture ($OD_{600} = 20$) was injected in the center of CGY plates containing 0.25% agar. Swimming diameters were measured after 24 h incubation. A. 30 °C. B. 37 °C. Statistically significant differences compared to the respective strain with highest motility (F3175/03 (D7)) are shown. *: p value < 0.05, **: p value < 0.01, ***: p value < 0.001. C. Examples of high, medium and low motile strains after 24 h at 30 °C.

Corynebacterium pseudotuberculosis (McNamara et al., 1994; Gonzalez-Zorn et al., 1999; Hayashida et al., 2009; Huseby et al., 2010; Katayama et al., 2013; Flores-Diaz et al., 2016). *B. cereus* SMase is, like the enterotoxin genes, controlled by the global regulator PlcR (Pomerantsev et al., 2003; Gohar et al., 2008) and synergistic interactions between Nhe and SMase have been reported previously. Using the *Galleria mellonella* insect model, it has been shown that SMase enhances Nhe toxicity towards epithelial cells and substantially contributes to mortality of the larvae (Doll et al., 2013). In the present study, SMase was detected in all tested strains, except in the potentially apathogenic RIVM BC 90 and IP 5832. Considering the important role of SMase as virulence factor - in particular, when acting synergistically with Nhe - we reasoned that SMase can constitute a crucial marker protein for virulence assessment, though also requiring the consideration of NheB expression.

NheB is one of the three components of the non-hemolytic enterotoxin (Nhe), which is formed by nearly 100% of the *B. cereus* strains (Anderson Borge et al., 2001; Moravek et al., 2006; Ngamwongsati

et al., 2008). To acquire full cytotoxicity, all three components (A, B and C) are needed. Moreover, a molar ratio of NheA:NheB:NheC of 10:10:1 as well as a concerted binding order of the single components is required (Lund and Granum, 1996; Lindbäck et al., 2004, 2010). Confirming prior studies (Moravek et al., 2006; Jessberger et al., 2014), we observed that NheA and NheC expression did not correlate with cytotoxicity, and differences in blot intensities of these components appeared to be strain-specific only. The expression of NheB (refer to Fig. 4), however, showed rough concordances with strain toxicity, as it was formed by nearly all high and potentially toxic strains and was not detectable in the low pathogenic strains MHI86, MHI226, and RIVM BC 90. The second three-component enterotoxin of *B. cereus*, hemolysin BL (Beecher and MacMillan, 1990; Beecher et al., 1995) also contributes to pathogenicity, but is not suitable as a marker protein as it is produced only by 45–65% of the strains (Senesi and Ghelardi, 2010). The strain set of this study comprised 10 of 20 strains, which produce Hbl. Similarly, CytK2 – a beta-barrel channel forming toxin (Lund et al., 2000) - is produced by strains of different toxicity and therefore not reliable as

Table 3

Summary of the data (in %) of nine assays, in which the 20 pathogenic and apathogenic *B. cereus* strains were applied. To compare the different data, the strain with the respective utmost result (e.g. WSBC 10035 for spore survival) was set 100%, and the results of the remaining strains in each assay were adjusted to that.

<i>B. cereus</i> Strain	Stomach survival ^a	Adhesion spores ^b	Germination ^b	Motility ^b	Adhesion vegetative ^b	NheB (6 h CGY) ^c	NheB (6 h cRPMJ) ^d	Toxicity CaCo-2 (6 h CGY) ^c	Toxicity CaCo-2 (6 h cRPMJ) ^d	Total
14294-3 (M6)	6.15	11.96	10.35	73.58	60.29	41.54	93.85	50.14	32.13	379.99
SDA KA96	6.98	1.28	18.53	50.94	10.72	66.86	72.52	100.00	46.54	374.37
INRA A3	72.50	5.25	43.37	45.91	32.52	10.35	56.76	19.61	19.29	305.56
INRA C3	32.08	72.04	18.49	38.99	54.34	49.34	100.00	24.80	100.00	490.09
6/27/S	2.29	6.10	7.03	100.00	17.02	11.49	11.51	54.10	32.40	241.94
F3175/03 (D7)	0.31	19.89	60.44	100.00	32.59	27.98	40.05	48.96	25.61	355.83
RIVM BC 934	1.25	6.31	15.42	3.77	25.54	17.11	21.75	44.60	18.99	154.75
F528/94	14.69	7.96	6.12	51.89	100.00	8.08	23.68	38.90	21.98	273.30
F837/76	0.94	7.88	18.51	10.06	45.23	100.00	74.75	68.52	30.00	355.89
RIVM BC 126	0.21	15.26	7.75	33.33	35.60	36.51	43.74	75.67	34.07	282.14
MHI86	0.63	14.14	74.03	78.30	16.55	0.28	0.57	2.89	5.54	192.92
F4429/71	3.65	25.56	50.74	72.64	11.47	28.24	65.52	22.80	21.35	301.97
RIVM BC 964	61.67	15.92	5.69	100.00	59.36	47.92	56.09	53.05	42.63	442.33
F3162/04 (D8)	39.69	18.47	37.30	62.26	5.56	27.29	38.03	42.67	20.27	291.55
MHI226	21.56	8.65	63.66	50.94	25.00	3.49	8.10	31.41	10.84	223.66
NVH 0075/95	4.27	15.29	71.79	100.00	16.41	79.41	83.98	65.95	27.72	464.82
WSBC 10035	100.00	100.00	33.43	100.00	25.22	87.93	41.43	41.00	25.27	554.28
RIVM BC 90	1.04	35.59	12.55	100.00	10.80	3.05	2.49	2.74	1.91	170.16
7/27/S	44.06	22.49	100.00	57.23	22.64	49.63	50.37	45.12	12.50	404.05
IP 5832	10.73	47.40	6.91	5.70	17.30	1.90	6.30	9.60	29.40	135.24

^a Original data published in Da Rioli et al., (2018). Spore survival after 1 h in simulated stomach fluid was used for comparison.

^b This study.

^c Original data published in Jessberger et al. (2015).

^d Original data published in Jessberger et al. (2017).

Table 4

Virulence evaluation of 20 *B. cereus* strains determined with three different test systems. Red: potentially high pathogenic. Orange: potentially pathogenic. Green: potentially apathogenic.

I According to total percentage points achieved in nine different assays (see Table 3)		II According to Slot blots (SMase and NheB) and protease assays		III According to toxin production after cultivation under standard laboratory conditions		IV Summary of test systems I, II and III			
<i>B. cereus</i> strain	Total (%)	<i>B. cereus</i> strain	Total points	<i>B. cereus</i> strain	NheB Titer ¹	<i>B. cereus</i> strain	I	II	III
WSBC 10035	554.28	INRA A3	9	RIVM BC 964	10266	INRA C3			
INRA C3	490.09	INRA C3	8	7/27/S	9011	NVH 0075/95			
NVH 0075/95	464.82	F837/76	8	F837/76	8598	RIVM BC 964			
RIVM BC 964	442.33	SDA KA96	8	RIVM BC 126	7757	7/27/S			
7/27/S	404.05	RIVM BC 964	7	NVH 0075/95	7729	SDA KA96			
14294-3 (M6)	379.99	NVH 0075-95	7	SDA KA96	6481	F837/76			
SDA KA96	374.37	7/27/S	7	WSBC 10035	6205	WSBC 10035			
F837/76	355.89	F3175/03 (D7)	6	F3175/03 (D7)	5157	F3175/03 (D7)			
F3175/03 (D7)	355.83	F3162/03 (D8)	6	F4429/71	4907	F4429/71			
INRA A3	305.56	F4429/71	6	INRA C3	4460	RIVM BC 126			
F4429/71	301.97	14294-3 (M6)	6	14294-3 (M6)	2062	14294-3 (M6)			
F3162/04 (D8)	291.55	WSBC10035	5	6/27/S	1964	INRA A3			
RIVM BC 126	282.14	RIVM BC 126	5	F528/94	1759	F3162/04 (D8)			
F528/94	273.30	6/27/S	4	INRA A3	1299	F528/94			
6/27/S	241.94	F528/94	4	MHI226	930	6/27/S			
MHI226	223.66	RIVM BC 934	3	RIVM BC 934	769	MHI226			
MHI86	192.92	MHI226	3	IP 5832	406	MHI86			
RIVM BC 90	170.16	IP 5832	3	RIVM BC 90	146	RIVM BC 90			
RIVM BC 934	154.75	MHI86	1	MHI86	87	RIVM BC 934			
IP 5832	135.24	RIVM BC 90	1	F3162/04 (D8)	41	IP 5832			

¹: Titers were determined when a set of 136 *B. cereus* strains was pre-classified. Classification according to NheB titers: high: > 4000; Medium: 2000–4000, low: < 2000 (Jessberger et al., 2015).

a marker.

In this study, we determined that strains classified as high and potentially pathogenic showed an expression of both NheB and SMase, which appears to be stringent for effectual enterotoxicity of *B. cereus*. In

particular, both toxins have to be secreted and at least one of the two toxins has to be strongly expressed in order to deploy high toxicogenicity. In contrast, strains with low toxic potential showed an expression of none or only one of the toxins or - in case of strain RIVM BC 934 - both

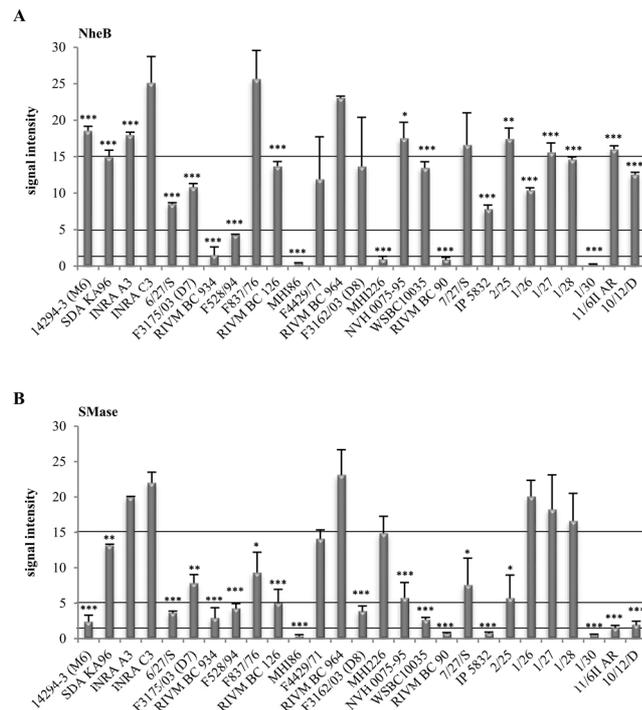


Fig. 4. NheB and SMase expression of all strains tested in this study. A. Quantification of blot signals for NheB using the Image Quant TL Software (GE Healthcare Life Sciences, UK). B. Quantification of blot signals for SMase. Statistically significant differences in blot signal intensity are depicted as asterisks and are referred to the strain RIVM BC 964, which showed highest intensity. *: p value < 0.05, **: p value < 0.01, ***: p value < 0.001.

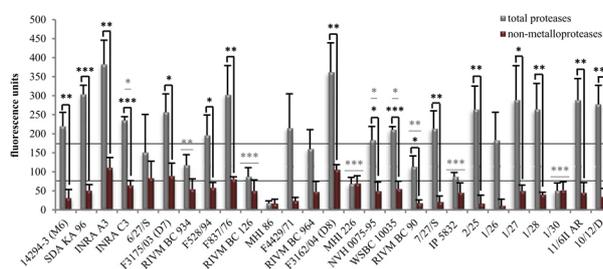


Fig. 5. Protease activity of the *B. cereus* strains tested in this study. Relative fluorescence units are shown. EDTA was added to determine the metalloprotease activity. Expressed results are from two technical replicates, each from two single experiments. Statistically significant differences between total protease and non-metalloprotease activity within each strain are depicted as black asterisks. Significant differences between the total protease activity of each strain, referred to the strain with strongest activity (INRA A3), are shown as grey asterisks with underline. *: p value < 0.05, **: p value < 0.01, ***: p value < 0.001.

with low intensity. Our results fit with the observations of Doll and coworkers (Doll et al., 2013), where pathogenicity of *B. cereus* NheB or SMase single deletion mutants was decreased, and even drastically attenuated when both toxin genes were knocked out.

Moreover, we included exoprotease activity in our virulence assessment scheme. Extracellular proteases play a crucial role for virulence in many pathogens. In *S. aureus*, they are characterized as key mediators of virulence-determinant stability (Kolar et al., 2013). Npr599 and InhA proteases are described as multifunctional pathogenic factors in *Bacillus anthracis* (Chung et al., 2006). CwpFM (EntFM) peptidase plays an important role in motility, adhesion and virulence of *B. cereus* (Tran et al., 2010). The InhA metalloproteases have also been

described as important pathogenicity factors of *B. cereus*, being involved in macrophage escape, toxicity and virulence (Guillemet et al., 2010). The results of protease activity assays in the present work generally complement the pattern observed by NheB and SMase intensities. The exception proves the rule, e.g. as shown for strain RIVM BC 964, displaying a low proteolytic activity. However, NheB and SMase expression were distinctly strong, thus rendering this strain as still highly toxic. On the other hand, proteolytic activity of each of the potentially apathogenic strains was diminished compared to those of all other strains.

By following this virulence assessment combined of NheB/SMase blots and exoprotease activity, we could observe a shift of certain

Table 5

Summary of slot blot analyses (NheB and SMase) and protease assays. 20 pre-characterized *B. cereus* strains were investigated (Jessberger et al., 2015, 2017), as well as seven isolates from a food poisoning outbreak in Austria (Schmid et al., 2016). Results of each test were classified as strong (= 3 points), medium (= 2 points), weak (= 1 point) or 0 and totaled. 7–9 points (red): potentially high pathogenic. 4–6 points (orange): potentially pathogenic. 0–3 points (green): potentially apathogenic.

<i>B. cereus</i> strain	Nhe B ^a	SMase ^a	Protease activity ^b	Score
INRA A3	3 (18)	3 (20)	3 (382)	9
INRA C3	3 (25)	3 (22)	2 (235)	8
F837/76	3 (25)	2 (9)	3 (302)	8
SDA KA96	3 (15)	2 (13)	3 (304)	8
RIVM BC 964	3 (23)	3 (23)	1 (160)	7
NVH 0075-95	3 (18)	2 (6)	2 (183)	7
7/27/S	3 (17)	2 (8)	2 (213)	7
F3175/03 (D7)	2 (10)	2 (8)	2 (256)	6
F3162/03 (D8)	2 (14)	1 (4)	3 (362)	6
F4429/71	2 (12)	2 (14)	2 (220)	6
14294-3 (M6)	3 (19)	1 (2)	2 (210)	5
WSBC10035	2 (14)	1 (3)	2 (210)	5
RIVM BC 126	2 (13)	2 (5)	1 (87)	5
6/27/S	2 (9)	1 (4)	1 (150)	4
F528/94	1 (4)	1 (4)	2 (195)	4
RIVM BC 934	1 (2)	1 (3)	1 (118)	3
MH1226	0 (0.9)	3 (15)	0 (68)	3
IP 5832	2 (8)	0 (0)	1 (87)	3
MH186	0 (0)	1 (3)	0 (17)	1
RIVM BC 90	0 (0)	0 (0)	1 (113)	1
1/27	3 (15)	3 (18)	2 (288)	8
2/25	3 (17)	2 (6)	2 (264)	7
1/26	2 (10)	3 (20)	2 (182)	7
1/28	2 (14)	3 (17)	2 (264)	7
11/6II AR	3 (16)	1 (1)	2 (288)	6
10/12/D	2 (13)	1 (2)	2 (288)	5
1/30	0 (0)	0 (0)	0 (50)	0

^a Slot blot signal intensities for NheB and SMase > 15: 3 points, 5–15: 2 points, 1–5: 1 point, < 1: 0 points.

^b Relative fluorescence units (protease activity) > 300: 3 points, 200–300: 2 points, 100–200: 1 point, < 100: 0 points.

strains, from formerly classified as potentially toxic to highly toxic (INRA A3) and vice versa (WSBC 10035, 14294-3 (M6), F3175/03 (D7), when compared to the virulence assessment comprising also phenotypic attributes (Table 4). However, no shift was observable in potentially low or apathogenic strains. Most important, no toxic strain could be rendered as false negatively apathogenic, which might be fatal in terms of food safety. We could also verify this virulence assessment scheme by using seven additional strains from two food outbreaks in Austria with previously unknown toxicity (Schmid et al., 2016). With the exception of one strain, three strains (2/25, 1/26, 11/6II AR) with epidemiological association would be ranked as highly or potentially toxic. One strain (1/30) with no epidemiological association showed no NheB/SMase expression or protease activity as well. Two strains with undetermined epidemiological association could be assigned as highly (1/28) and potentially toxic. This outcome depicts that epidemiological association does not necessarily give information on the toxicity of a strain. Hence, in order to ensure confident predictions, the pathogenic potential has to be determined as proposed in the current study.

In conclusion, this study provides the first holistic virulence assessment scheme for enteropathogenic *B. cereus*, including the most important steps of a foodborne infection - survival of the stomach passage, adhesion to epithelial cells, germination, motility, toxin production and cytotoxicity. An analogically precise and credible classification of the tested strains was achieved by determining NheB and SMase expression and exoprotease activity. These assays provide the fundament for rapid and easy to use tests in routine diagnostics of enteropathogenic *B. cereus*. To this date, the combinatory approach presented in this study is the most accurate and rapid test system for

determining the toxic potential of food-borne enteropathogenic *B. cereus*.

Acknowledgements

We are grateful to Silja Wessler (University of Salzburg, Austria) for the gift of the ColA antibody. We thank Tatjana Svoboda for excellent technical assistance. The IGF Project 18677 N of the FEI was supported via AiF within the program for promoting the Industrial Collective Research (IGF) of the German Ministry of Economic Affairs and Energy (BMWi), based on a resolution of the German Parliament.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103276>.

Author contributions statement

NJ and CDR were responsible for spore preparation, motility and adhesion experiments, and virulence assessment. MK and TB performed protease and slot blot assays including virulence assessment. VS and TB also prepared spores and performed germination assays. NJ and MK wrote the manuscript. EM, RD and MES were involved in study design and writing of the manuscript.

Conflicts of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any conflict of interest.

References

- Abfalder, C.M., Schönauer, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162433>.
- Agata, N., Ohta, M., Mori, M., Isobe, M., 1995. A novel dodecapeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 129 (1), 17–20. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00119-P](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00119-P).
- Anderson Borge, G.I., Skeie, M., Sorhaug, T., Langsrud, T., Granum, P.E., 2001. Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. *Int. J. Food Microbiol.* 69 (3), 237–246.
- Anonymous, 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 13, 3991.
- Beecher, D.J., MacMillan, J.D., 1990. A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* 58 (7), 2220–2227.
- Beecher, D.J., Schoeni, J.L., Wong, A.C., 1995. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* 63 (11), 4423–4428.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.03.015>.
- Ceuppens, S., Uyttendaele, M., Drieskens, K., Rajkovic, A., Boon, N., Wiele, T.V., 2012. Survival of *Bacillus cereus* vegetative cells and spores during in vitro simulation of gastric passage. *J. Food Prot.* 75 (4), 690–694. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-481>.
- Chung, M.C., Popova, T.G., Millis, B.A., Mukherjee, D.V., Zhou, W., Liotta, L.A., et al., 2006. Secreted neutral metalloproteases of *Bacillus anthracis* as candidate pathogenic factors. *J. Biol. Chem.* 281 (42), 31408–31418. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605526200>.
- Clavel, T., Carlin, F., Lairon, D., Nguyen-The, C., Schmitt, P., 2004. Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *J. Appl. Microbiol.* 97 (1), 214–219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02292.x>.
- Da Rioli, C., Dietrich, R., Märklbauer, E., Jessberger, N., 2018. Consumed foodstuffs have a crucial impact on the toxic activity of enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Front. Microbiol.* 9, 1946. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01946>.
- Didier, A., Dietrich, R., Märklbauer, E., 2016. Antibody binding studies reveal conformational flexibility of the *Bacillus cereus* non-hemolytic enterotoxin (Nhe) A-component. *PLoS One* 11 (10), e0165135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165135>.
- Didier, A., Jessberger, N., Krey, V., Dietrich, R., Scherer, S., Märklbauer, E., 2015. The mutation Glu151Asp in the B-component of the *Bacillus cereus* non-hemolytic enterotoxin (Nhe) leads to a diverging reactivity in antibody-based detection systems. *Toxins* 7 (11), 4655–4667. <https://doi.org/10.3390/toxins7114655>.

- Dierick, K., Van Coillie, E., Swiecicka, I., Meyfroidt, G., Devlieger, H., Meulemans, A., et al., 2005. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *J. Clin. Microbiol.* 43 (8), 4277–4279. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4277-4279.2005>.
- 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 (10), 4470–4474.
- Dietrich, R., Moravec, M., Bürk, 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 (12), 8214–8220. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8214-8220.2005>.
- Doll, V.M., Ehling-Schulz, M., Vogelmann, R., 2013. Concerted action of sphingomyelinase and non-hemolytic enterotoxin in pathogenic *Bacillus cereus*. *PLoS One* 8 (4), e61404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061404>.
- Ehling-Schulz, M., Frenzel, E., Gohar, M., 2015. Food-bacteria interplay: pathometabolism of enteric *Bacillus cereus*. *Front. Microbiol.* 6, 704. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00704>.
- 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 (7), 479–487. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200400055>.
- Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., Koehler, T.M., 2019. The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential. *Microbiol. Spectr.* 6 GPP3-0032-20181. (in press).
- Ehling-Schulz, M., Messelhäufer, U., 2013. *Bacillus* "next generation" diagnostics: moving from detection toward subtyping and risk-related strain profiling. *Front. Microbiol.* 4, 32. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00032>.
- Flores-Diaz, M., Monturroi-Gross, L., Naylor, C., Alape-Giron, A., Flieger, A., 2016. Bacterial sphingomyelinases and phospholipases as virulence factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80 (3), 597–628. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00082-15>.
- Fricker, M., Agren, J., Segeman, 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, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.036>.
- Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Ceragioli, M., Beecher, D.J., Senesi, S., et al., 2007. Swarming behavior of and hemolysin BL secretion by *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (12), 4089–4093. <https://doi.org/10.1128/AEM.02345-06>.
- Gohar, M., Faegri, K., Perchat, S., Ravnun, S., Økstad, O.A., Gominet, M., et al., 2008. The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS One* 3 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002793>. e2793.
- Goñi, F.M., Alonso, A., 2002. Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. *FEBS Lett.* 531 (1), 38–46.
- Gonzalez-Zorn, B., Dominguez-Bernal, G., Suarez, M., Ripio, M.T., Vega, Y., Novella, S., et al., 1999. The *smcI* gene of *Listeria ivanovii* encodes a sphingomyelinase C that mediates bacterial escape from the phagocytic vacuole. *Mol. Microbiol.* 33 (3), 510–523.
- Guillemet, E., Cadot, C., Tran, S.L., Guinebretière, M.H., Lereclus, D., Ramarao, N., 2010. The InHA metalloproteases of *Bacillus cereus* contribute concomitantly to virulence. *J. Bacteriol.* 192 (1), 286–294. <https://doi.org/10.1128/JB.00264-09>.
- Hayashida, A., Bartlett, A.H., Foster, T.J., Park, P.W., 2009. *Staphylococcus aureus* beta-toxin induces lung injury through syndecan-1. *Am. J. Pathol.* 174 (2), 509–518. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080394>.
- Huseby, M.J., Kruse, A.C., Digre, J., Köhler, P.L., Vocke, J.A., Mann, E.E., et al., 2010. Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (32), 14407–14412. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911032107>.
- 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. *Toxicol. 77*, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2013.10.028>.
- Jessberger, N., Krey, V.M., Rademacher, C., Böhm, M.E., Mohr, A.K., Ehling-Schulz, M., et al., 2015. From genome to toxicity: a combinatory approach highlights the complexity of enterotoxin production in *Bacillus cereus*. *Front. Microbiol.* 6, 560. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00560>.
- Jessberger, N., Rademacher, C., Krey, V.M., Dietrich, R., Mohr, A.K., Böhm, M.E., et al., 2017. Simulating intestinal growth conditions enhances toxin production of enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Front. Microbiol.* 8, 627. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00627>.
- Jessberger, N., Dietrich, R., Mohr, A.K., Da Riou, C., Märtlbauer, E., 2019. Porcine gastric mucin triggers toxin production of enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* 87 (4). <https://doi.org/10.1128/IAI.00765-18>. e00765-18.
- Katayama, Y., Baba, T., Sekine, M., Fukuda, M., Hiramatsu, K., 2013. Beta-hemolysin promotes skin colonization by *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 195 (6), 1194–1203. <https://doi.org/10.1128/JB.01786-12>.
- 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 (1), 33–38.
- Kolar, S.L., Ibarra, J.A., Rivera, F.E., Mootz, J.M., Davenport, J.E., Stevens, S.M., et al., 2013. Extracellular proteases are key mediators of *Staphylococcus aureus* virulence via the global modulation of virulence-determinant stability. *Microbiology (N. Y.)* 2 (1), 18–34. <https://doi.org/10.1002/mbo3.55>.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lindbäck, T., Fagerlund, A., Rodland, M.S., Granum, P.E., 2004. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology* 150 (12), 3959–3967. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27359-0>.
- Lindbäck, T., Hardy, S.P., Dietrich, R., Sodring, M., Didier, A., Moravec, M., et al., 2010. Cytotoxicity of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin requires specific binding order of its three exoprotein components. *Infect. Immun.* 78 (9), 3813–3821. <https://doi.org/10.1128/IAI.00247-10>.
- Lund, T., De Buyser, M.L., Granum, P.E., 2000. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol. Microbiol.* 38 (2), 254–261.
- 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 (2–3), 151–156.
- Mazzantini, D., Celandroni, F., Salvetti, S., Gueye, S.A., Lupetti, A., Senesi, S., et al., 2016. FlhF is required for swarming motility and full pathogenicity of *Bacillus cereus*. *Front. Microbiol.* 7, 1644. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01644>.
- McNamara, P.J., Bradley, G.A., Songer, J.G., 1994. Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 12 (6), 921–930.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., et al., 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5 (5), 607–625. <https://doi.org/10.3201/eid0505.990502>.
- Messelhäufer, U., Frenzel, E., Blochinger, C., Zuecker, R., Kampf, P., Ehling-Schulz, M., 2014. Emetic *Bacillus cereus* are more volatile than thought: recent foodborne outbreaks and prevalence studies in Bavaria (2007–2013). *Biomed Res Int* 2014 465603. <https://doi.org/10.1155/2014/465603>.
- Messelhäufer, U., Ehling-Schulz, M., 2018. *Bacillus cereus* - a multifaceted opportunistic pathogen. *Current Clinical Microbiology Reports* 5 (2), 120–125.
- Minnaard, J., Lievin-Le Moal, V., Coconnier, M.H., Servin, A.L., Perez, P.F., 2004. Disassembly of F-actin cytoskeleton after interaction of *Bacillus cereus* with fully differentiated human intestinal Caco-2 cells. *Infect. Immun.* 72 (6), 3106–3112. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.6.3106-3112.2004>.
- Moravec, M., Dietrich, R., Bürk, C., Broussolle, V., Guinebretière, M.H., Granum, P.E., et al., 2006. Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses. *FEMS Microbiol. Lett.* 257 (2), 293–298. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00185.x>.
- Naranjo, M., Denayer, S., Botteldoorn, N., Delbrassinne, L., Veyjs, J., Waegenaere, J., et al., 2011. Sudden death of a young adult associated with *Bacillus cereus* food poisoning. *J. Clin. Microbiol.* 49 (12), 4379–4381. <https://doi.org/10.1128/JCM.05129-11>.
- Ngamwongwatit, P., Buasri, W., Pianariyanon, P., Pulsrikarn, C., Ohba, M., Assavanig, A., et al., 2008. Broad distribution of enterotoxin genes (*hbcDA*, *nheABC*, *cytK*, and *entFM*) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. *Int. J. Food Microbiol.* 121 (3), 352–356. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.013>.
- Pomerantsev, A.P., Kalnin, K.V., Osorio, M., Leppla, S.H., 2003. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and sphingomyelinase activities in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Infect. Immun.* 71 (11), 6591–6606.
- Ramarao, N., Lereclus, D., 2006. Adhesion and cytotoxicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* to epithelial cells are FlhA and PlcR dependent, respectively. *Microb. Infect.* 8 (6), 1483–1491. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.01.005>.
- Salveti, S., Ghelardi, E., Celandroni, F., Ceragioli, M., Giannessi, 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 (8), 2541–2552. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/005553-0>.
- Scallan, E., Griffin, P.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Hoekstra, R.M., 2011. Foodborne illness acquired in the United States—unspecified agents. *Emerg. Infect. Dis.* 17 (1), 16–22. <https://doi.org/10.3201/eid1701.091101p2>.
- Schmid, D., Rademacher, C., Kanitz, E.E., Frenzel, E., Simons, E., Allerberger, F., et al., 2016. Elucidation of enterotoxigenic *Bacillus cereus* outbreaks in Austria by complementary epidemiological and microbiological investigations, 2013. *Int. J. Food Microbiol.* 232, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.011>.
- Senesi, S., Ghelardi, E., 2010. Production, secretion and biological activity of *Bacillus cereus* enterotoxins. *Toxins* 2 (7), 1690–1703. <https://doi.org/10.3390/toxins2071690>.
- Stenfor Arnesen, L.P., Fagerlund, A., Granum, P.E., 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Rev.* 32 (4), 579–606. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x>.
- Tausch, F., Dietrich, R., Schauer, K., Janowski, R., Niessing, D., Märtlbauer, E., et al., 2017. Evidence for complex formation of the *Bacillus cereus* haemolysin BL components in solution. *Toxins* 9 (9). <https://doi.org/10.3390/toxins9090288>.
- 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 (10), 2638–2642. <https://doi.org/10.1128/JB.01315-09>.
- Ulrich, S., Gottschalk, C., Dietrich, R., Märtlbauer, E., Gareis, M., 2019. Identification of cereulide producing *Bacillus cereus* by MALDI-TOF MS. *Food Microbiol.* 82, 75–81. <https://doi.org/10.1101/324756>.
- 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 (15), 5052–5054. <https://doi.org/10.1128/AEM.02390-06>.
- 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 (2), 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.015>.
- 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 (1), 258–267. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03999.x>.

Supplementary Material

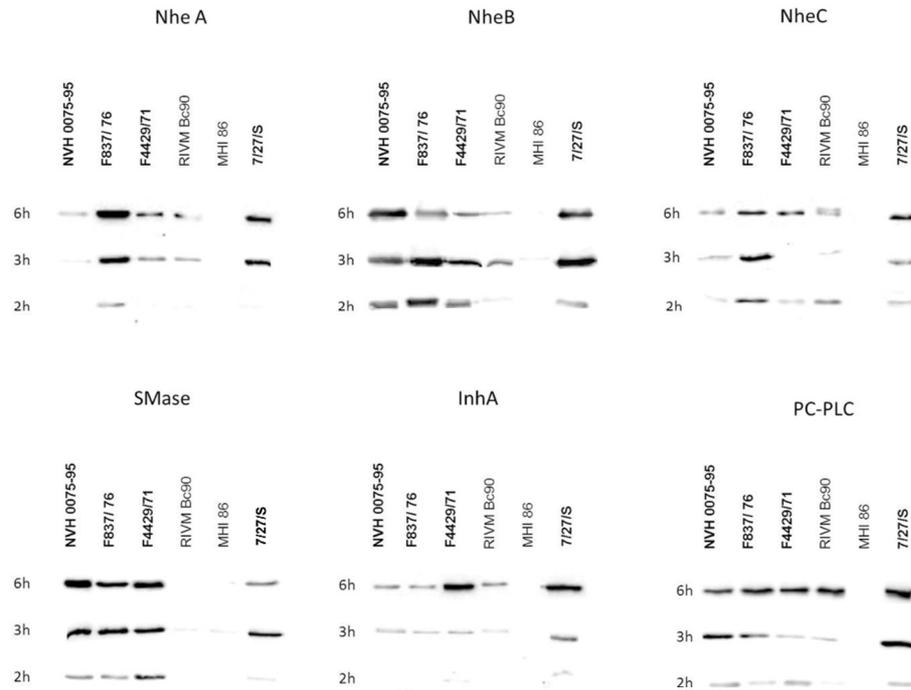


Fig. S1: Western Blots of virulence factors as putative candidate markers. Single components of non-hemolytic enterotoxin (NheA, NheB, NheC), sphingomyelinase (SMase), immune inhibitor metalloprotease (InhA) and phosphocholine-specific phospholipase C (PC-PLC) were investigated. A subset of six strains was tested, representing high (NVH0075-95, F837/76, F4429/71, 7/27/S; bold) and low toxic strains (MHI 86, RIVM BC 90).

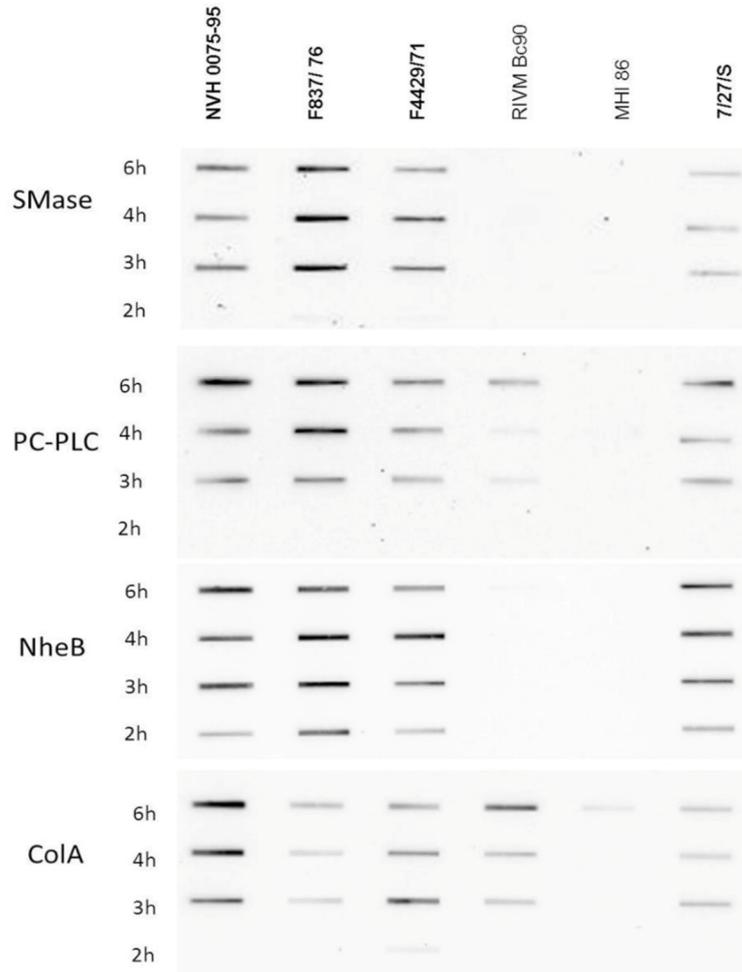


Fig. S2: Slot blots of virulence factors as putative candidate markers. Sphingomyelinase (SMase), phosphocholine-specific phospholipase C (PC-PLC), B component of non-hemolytic enterotoxin (NheB) and collagenase A (ColA) were tested. High toxic strains are bold.

V. PUBLIKATION II

Titel

„Enteropathogenic Potential of *Bacillus thuringiensis* Isolates from Soil, Animals, Food and Biopesticides“

Autoren

Valerie Schwenk¹, Janina Riegg¹, Monique Lacroix², Erwin Märtlbauer¹, Nadja Jessberger¹

¹ Department für Veterinärwissenschaften, Veterinärmedizinische Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München, Schönleutnerstr. 8, 85764, Oberschleißheim, Deutschland

² Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, 531, boul. des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Kanada

Journal

Foods (IF aktuell: 4,092)

Status

akzeptiert am 15.10.2020

publiziert online am 17.10.2020

Foods 2020, 9(10), 1484

doi:10.3390/foods9101484



Article

Enteropathogenic Potential of *Bacillus thuringiensis* Isolates from Soil, Animals, Food and Biopesticides

Valerie Schwenk ¹, Janina Riegg ¹, Monique Lacroix ², Erwin Märtlbauer ¹ 
and Nadja Jessberger ^{1,*}

¹ Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Schönleutnerstr. 8, 85764 Oberschleißheim, Germany;

Valerie.Schwenk@mh.vetmed.uni-muenchen.de (V.S.); janina.riegg@gmx.net (J.R.);
e.maertlbauer@mh.vetmed.uni-muenchen.de (E.M.)

² Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, 531, boul. des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada;
Monique.Lacroix@iaf.inrs.ca

* Correspondence: N.Jessberger@mh.vetmed.uni-muenchen.de

Received: 23 September 2020; Accepted: 15 October 2020; Published: 17 October 2020



Abstract: Despite its benefits as biological insecticide, *Bacillus thuringiensis* bears enterotoxins, which can be responsible for a diarrhoeal type of food poisoning. Thus, all 24 isolates from foodstuffs, animals, soil and commercially used biopesticides tested in this study showed the genetic prerequisites necessary to provoke the disease. Moreover, though highly strain-specific, various isolates were able to germinate and also to actively move, which are further requirements for the onset of the disease. Most importantly, all isolates could grow under simulated intestinal conditions and produce significant amounts of enterotoxins. Cytotoxicity assays classified 14 isolates as highly, eight as medium and only two as low toxic. Additionally, growth inhibition by essential oils (EOs) was investigated as preventive measure against putatively enteropathogenic *B. thuringiensis*. Cinnamon Chinese cassia showed the highest antimicrobial activity, followed by citral, oregano and winter savory. In all tests, high strain-specific variations appeared and must be taken into account when evaluating the hazardous potential of *B. thuringiensis* and using EOs as antimicrobials. Altogether, the present study shows a non-negligible pathogenic potential of *B. thuringiensis*, independently from the origin of isolation. Generally, biopesticide strains were indistinguishable from other isolates. Thus, the use of these pesticides might indeed increase the risk for consumers' health. Until complete information about the safety of the applied strains and formulations is available, consumers or manufacturers might benefit from the antimicrobial activity of EOs to reduce the level of contamination.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; *Bacillus cereus*; food infections; enterotoxins; cytotoxicity; essential oils; risk evaluation; biopesticide

1. Introduction

Bacillus thuringiensis is a Gram-positive and spore-forming bacterium, which is used worldwide as biopesticide due to its capability to produce insecticidal proteins [1–3]. The two main parasporal toxins are Cyt (cytolytic) and Cry (crystal) toxins [4]. In addition to that, *B. thuringiensis* produces other entomopathogenic factors such as vegetative insecticidal proteins (Vip) and secreted insecticidal proteins (Sip) [1,5,6]. As a result of its distinct types of toxins, *B. thuringiensis* is virulent to a wide range of insect orders and species, e.g., *Coleoptera*, *Diptera* and *Lepidoptera*, as well as nematodes and even plant and animal pathogenic microorganisms [2,7,8]. A clear advantage is the host-specific mode of action of the mentioned toxins, which do rarely harm non-target species.

Despite the benefits, the close relation to other members of the *Bacillus cereus* group must not be neglected. The *B. cereus* group includes at least eight species: *B. cereus sensu stricto*, *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycooides*, *B. cytotoxicus*, *B. toyonensis* and *B. thuringiensis* [9–12], while recently, more and more additional species are described. *B. cereus* s. s. is a human pathogen that causes two types of foodborne diseases, the emetic syndrome due to cereulide intoxication and the diarrhoeal type of disease [12]. The latter arises from an infection with vegetative cells, which produce enterotoxins, mainly the non-haemolytic enterotoxin (Nhe), haemolysin BL (Hbl) and cytotoxin K (CytK), in the human intestine [13–17]. Like *B. cereus*, *B. thuringiensis* exhibits the enterotoxin genes *nhe*, *hbl* and *cytK* [18–20]. Moreover, *B. thuringiensis* could be related to food-borne outbreaks [21]. These facts led to the debate if the biopesticides represent a risk for public health and thus, it seems questionable using potential harmful preparations extensively in agriculture. A further problem is that routine clinical and food diagnostics does not usually differentiate the *B. cereus* group species [22,23]. Thus, food-borne diseases and clinical infections caused by *B. thuringiensis* might be significantly under-reported. The aim of this study was to investigate the toxic and enteropathogenic potential of *B. thuringiensis* isolates gained from food, animal and soil samples, as well as from commercially used biopesticides. These 24 isolates were systematically characterized regarding their phylogenetic relationship, occurrence of toxin genes, growth and enterotoxin production under simulated intestinal conditions, cytotoxic activity, as well as further pathogenicity factors involved in the onset of *B. cereus*-associated food infections, such as spore germination and motility. Moreover, growth inhibition by essential oils (EOs) was investigated as preventive measure against putatively enteropathogenic *B. thuringiensis*.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Strains and Culture Conditions

The *B. thuringiensis* strains used in this study are listed in Table 1. For gaining cell-free culture supernatants, they were pre-cultured in casein glucose yeast (CGY) medium with 1% glucose for 17 h at 32 °C and 200 rpm. Samples of 20 mL fresh CGY medium were inoculated to an optical density (OD_{600}) = 0.2 and cultured for further 6 h. After centrifugation at 3500 rpm and 4 °C for 12 min, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was added, the supernatants were filtered through a 0.2 µm filter, aliquoted and stored at –20 °C. For cultivation under simulated intestinal conditions, preparation of “conditioned” (cRPMI) medium was carried out as described previously [15]. In brief, RPMI 1640 medium (with stable glutamine; Biochrom AG, Berlin, Germany), supplemented with 1% glucose and 2% casein hydrolysate, was incubated with differentiated CaCo-2 cells for 22 h and filtered using a 0.2 µm filter. Overnight cultures obtained as described above were incubated at 37 °C and adjusted to a start OD_{600} of 0.05 in 20 mL cRPMI. They were incubated statically at 37 °C and 7% CO₂ atmosphere. For growth analyses, OD_{600} was measured every hour for eight hours. Cell-free culture supernatants were harvested after six hours as described above.

Table 1. Overview of the 24 *B. thuringiensis* strains used in this study. Origin of the isolates: A: animal, F: food, P: pesticide, S: soil, U: undefined. +: positive PCR result for toxin gene. -: negative PCR result for toxin gene. *: NheB production determined in sandwich enzyme immunoassays (EIAs) after growth under simulated intestinal conditions according to Jessberger et al. [15]. **: Cytotoxicity towards CaCo-2 cells after growth under simulated intestinal conditions according to Jessberger et al. [15].

Internal Number (MHI)	Other Designation	Source	Origin	panC Type	cry	nhe	libl	ces	cyfK1	cyfK2	NheB *	Toxicity **
271	<i>B. thuringiensis</i> Berliner 1915, DSM 6029	Animal tissue	A	IV	1	+	+	-	-	+	High	High
2873	<i>B. thuringiensis</i> Berliner 1915, ATCC® 10792™, DSM 2046	Mediterranean flour moth	A	IV	1	+	+	-	-	+	High	High
2882	<i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>israelensis</i> , BCSC 4Q2 (HD500)	Culicidae larva	A	IV	4	+	+	-	-	+	High	Medium
3370	<i>B. thuringiensis</i> Bt 407	<i>Ephesia kuehniella</i> larva; Cry-	A	IV	-	+	+	-	-	+	High	High
2880	<i>B. thuringiensis</i> WSBC 28025	Vegetables for infant food	F	IV	1,2	+	+	-	-	+	Medium	High
3163	<i>B. thuringiensis</i>	Ready-to-eat salad 1	F	IV	1,2	+	+	-	-	+	High	High
3164	<i>B. thuringiensis</i>	Ready-to-eat salad 2	F	IV	1,2	+	+	-	-	+	High	High
3189	<i>B. thuringiensis</i>	Ready-to-eat salad 3	F	IV	1,2	+	+	-	-	+	Low	Medium
3190	<i>B. thuringiensis</i>	Ready-to-eat salad 4	F	IV	1,2	+	+	-	-	+	Low	Medium
3191	<i>B. thuringiensis</i>	Ready-to-eat salad 5	F	IV	1	+	+	-	-	+	Low	High
2878	<i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>tenebrionis</i>	Undefined biopesticide	P	IV	3	+	+	-	-	-	Low	Medium
3186	<i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>aitawai</i>	Biopesticide granulate 1	P	IV	1,2	+	+	-	-	+	Low	High
3187	<i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>aitawai</i>	Biopesticide granulate 1	P	IV	1,2	+	+	-	-	+	Low	Medium
3188	<i>B. thuringiensis</i>	Isolate from Biopesticide 1	P	IV	1,2	+	+	-	-	+	Low	High
3240	<i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i>	Biopesticide 2	P	IV	1,2	+	+	-	-	+	Medium	High
3241	<i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>tenebrionis</i>	Biopesticide 3, solids	P	IV	3	+	+	-	-	+	Medium	Low
3369	<i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>aitawai</i>	Biopesticide 4	P	IV	1,2	+	+	-	-	+	Low	High
2874	<i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> , PO1	Soil	S	IV	1	+	+	-	-	+	High	Medium
2875	<i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> , PO6	Soil	S	IV	1	+	+	-	-	+	High	High
2876	<i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> , PO10	Soil	S	IV	1	+	+	-	-	+	Medium	High
2877	<i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> , PO14	Soil	S	IV	1	+	+	-	-	+	High	High
2870	<i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>entomocidus</i> bv. <i>subtoxicaus</i> , IEBC-T06A001	Canada	U	IV	1,2	+	+	-	-	+	Medium	Low
2871	<i>B. thuringiensis</i>	Undefined	U	IV	1,2	+	+	-	-	+	Medium	Medium
2872	<i>B. thuringiensis</i> HER 1404	Undefined	U	IV	1,2	+	+	-	-	+	Medium	Medium

2.2. Cell Lines and Culture Conditions

CaCo-2 cells from DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Lower Saxony, Germany) were cultivated in RPMI 1640 medium (with stable glutamine) supplemented with 10% foetal bovine serum (Biochrom AG, Berlin, Germany). For cultivation, 80 cm² culture flasks and a humidified incubator (37 °C and 7% CO₂) were used. Cells were passaged 1:6 every three to four days. For differentiation, cells were incubated for 14 days. Medium was changed every three to four days.

2.3. PCR Analyses

Generally, amplification was performed with a total volume of 50 µL in a Biometra thermocycler (Analytik Jena, Jena, Thuringia, Germany). The reaction mixtures contained 5 µL 10× buffer, 4 µL MgCl₂ (25 mM), 1 µL dNTP suspension (10 mM each), 0.5 µL Taq DNA polymerase, 2.5 µL of each primer (10 µM) and 2 µL template DNA (colony material). Initial denaturation at 95 °C for five minutes was followed by 30 reaction cycles: denaturation at 95 °C for 15–60 s, annealing for 15–60 s at the appropriate temperature (see Table S1) and extension for 20–60 s at 72 °C. The final extension was performed at 72 °C for seven minutes. PCR fragments were separated on 1% agarose gels by electrophoresis and made visible by UV illumination. Primers used for all PCR analyses are listed in Table S1. First, the *panC* (pantothenate synthetase) gene was amplified for sequence analysis (see Section 2.4). Subsequently, all strains were screened for *cry* toxin genes and allocated to five groups according to Ben-Dov et al. [24]. Furthermore, the strain set was tested for the presence of the (entero)toxin genes *hblC*, *nheA*, *ces* and *cytK1* via multiplex PCR according to Wehrle et al. [25], as well as *cytK2* according to Ehling-Schulz et al. [26].

2.4. PanC Sequence Typing

To allocate the *B. thuringiensis* isolates tested in this study to phylogenetic groups, sequencing of a 485 bp fragment of the pantothenate synthetase gene (*panC*; [27]) was applied (Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Bavaria, Germany). Sequences were aligned using CLUSTAL Ω [28]. Further cluster analysis was carried out using SplitsTree software (version 4, Eberhard Karls University Tübingen, Tübingen, Baden-Württemberg, Germany) [29]. The sequences of the following reference strains were added to the analysis: type I: *B. pseudomycoides* 219,298 (CP007626.1); type II: *B. wiedmannii* SR52 (CP032365.1); type III: *B. anthracis* Ames (AE016879.1); type IV: *B. cereus* ATCC 14579 (NC_004722.1); type V: *B. toyonensis* BCT-7112 (CP006863.1); type VI: *B. weihenstephanensis* WSBC 10,204 (DQ301426.1); type VII: *B. cytotoxicus* NVH391-98 (CP000764.1) [23,27,30].

2.5. Spore Preparation

B. thuringiensis spores were prepared as described previously [14,31,32]. Briefly, 100 mL of minimal sporulation medium (1 mM MgCl₂ × 6 H₂O, 1 mM Ca(NO₃)₂ × 4 H₂O, 12.5 µM ZnCl₂, 2.5 µM CuCl₂, 2.5 µM CoCl₂ × 6 H₂O, 2.5 µM Na₂MoO₄ × 2 H₂O, 5 µM (NH₄)₂SO₄, 0.066 µM MnSO₄ × H₂O, 1 mM FeSO₄ and 1 M maltose in bacto nutrient broth (Oxoid, Wesel, Northrhine-Westphalia, Germany); pH 7.6) were inoculated with 0.5% overnight culture (see Section 2.1) and incubated for three days at 32 °C and 200 rpm. Sporulation was monitored via bright-field microscopy. When >80% spore content was reached, the cultures were centrifuged at 3500 rpm and 4 °C for 10 min, washed three times in pre-cooled spore washing buffer (1 M KH₂PO₄, 1 M K₂HPO₄, pH 7.4) and stored at 4 °C.

2.6. Germination

For assessing germination of *B. thuringiensis* spores, media were inoculated to OD₆₀₀ = 1. Two biological with three technical replicates for each strain were incubated in 96-well plates at 37 °C for one hour. As described before [14], OD₆₂₀ was measured every three minutes in a Tecan photometer using Ridawin software. Germination is shown as the decrease of OD₆₂₀ (in %) per time. Germination

was compared in CGY and cRPMI medium, as well as with and without prior heat activation for 10 min at 80 °C.

2.7. Motility Assay

To evaluate swimming behaviour of the *B. thuringiensis* strains, three replicates each were tested. For this, 1 µL CGY overnight culture was injected into the centre of 53 mm diameter CGY agar plates containing 0.25% agar and incubated at 37 °C. Motility diameters were assessed after 24 h.

2.8. Enzyme Immunoassays (EIAs)

Sandwich enzyme immunoassays for the detection of the enterotoxin components NheB and Hbl L2 were performed as described previously [33–35]. The following antibodies were used for detection: 5 µg/mL mAb 2B11/1E11-HRP 1:2000 (NheB) and 10 µg/mL mAb 1A12/1H9-HRP 1:1000 (Hbl L2). Titres are defined as the reciprocal of the highest dilutions resulting in an absorbance value of ≥ 1.0 . Results were compared according to those titres, which were calculated from at least three replicates each.

2.9. WST-1 Bioassay

WST-1 bioassays were performed on CaCo-2 cells as described earlier [15]. Briefly, serial dilutions of the culture supernatants were applied to 96-well plates in RPMI 1640 medium (100 µL/well) before 2×10^4 three days old CaCo-2 cells/well (100 µL) were added. After 24 h incubation at 37 °C and 7% CO₂, cell viability was determined by addition of the cell proliferation reagent WST-1 (water soluble tetrazolium, Roche diagnostics, Penzberg, Bavaria, Germany). Increasing amounts of formazan were detected in a Tecan infinite F50 photometer at 450 nm. Dose-response curves and thus, 50% lethal concentrations of at least two replicates were calculated with Magellan software and are shown as reciprocal titres.

2.10. Haemolysis Assays

CGY culture supernatants (10 µL) were filled into stamp holes with five mm diameter on sheep blood agar plates. After five hours incubation at 32 °C, haemolysis patterns were assessed.

2.11. Disk Diffusion Assays

To investigate antimicrobial effects of essential oils (EOs) on the *B. thuringiensis* isolates, disk diffusion assays were carried out according to Dussault et al. [36]. Cinnamon Chinese cassia and cinnamon OR (*Cinnamomum cassia*), citral (pure; 2,6-octadienal,3,7-dimethyl), oregano (*Thymus capitatus* Hoff.) and thyme (red; *Thymus vulgaris* and *Thymus zygis* L. var. *gacilis* Boissier) were provided by BSA Food Ingredients s.e.c./l.p. (Montréal, Canada). Winter savory (*Satureja montana* L.) was purchased from Alixir Essential Oils (Grondines, Canada). For the disk diffusion assays, CGY overnight cultures (see Section 2.1) were set to OD₆₀₀ = 0.5 (approx. 10⁷ CFU/mL) and 100 µL were plated onto CGY agar. A sterile Whatmann paper disk (Ø 5 mm) was placed in the middle of the plate and 1 µL EO was dripped on it. After 24 h incubation at 37 °C, growth inhibition zones were measured. At least three replicates were prepared and examined.

2.12. Antimicrobial Broth Dilution Assays

EOs with antibacterial effects in the disk diffusion tests (see Section 2.11) were applied in antimicrobial broth dilution assays to determine minimal inhibitory as well as maximal tolerated concentrations according to Dussault et al. [36]. The EOs were set to a concentration of 2.5% (dissolved in sterile H₂O with 5% Tween 80). The first column of a 96-well microtitre plates was filled with 167.7 µL CGY medium and 33.3 µL of the prepared EO solution. Columns two to 12 were filled with 100 µL CGY and a two-fold dilution series was prepared. EO concentrations thus ranged from 0.42 to

0.00041%. Column 12 was not filled with EOs and served as positive control. The *B. thuringiensis* CGY overnight cultures were set to $OD_{600} = 0.5$ (approx. 10^7 CFU/mL) and further diluted to approx. 10^4 CFU/mL. Rows A and H served as negative control, the remaining wells were filled with 10 μ L bacterial suspension. For the determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) a total of 10^6 CFU/mL were used, 10^3 CFU/mL to establish the maximal tolerated concentration (MTC). After 24 h incubation at 37 °C, 10 μ L iodinitrotetrazolium chloride (Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Hesse, Germany) were added to each well. After further 60 min incubation at 37 °C, bacterial growth was measured at OD_{540} in a Tecan infinite F50 photometer. The MIC was calculated from the mean values of the lowest EO concentrations that prevented bacterial growth. The MTC was determined by the mean values of the maximal concentrations that allowed bacterial growth. The experiment was done twice with three technical replicates per strain.

2.13. Statistical Analyses

Data were statistically validated using the column statistics program of GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA USA). Unpaired *t*-tests were applied with two-tailed *p*-values and 95% confidence interval. Significant differences were marked with * (*p*-value ≤ 0.05). Furthermore, Spearman correlation tests were performed with two-tailed *p*-values and 95% confidence interval to determine correlations between data sets. Significant correlation was marked with * (*p*-value ≤ 0.05).

3. Results

3.1. Genetic Prerequisites of the Tested Strains

In this study, 24 *B. thuringiensis* isolates of different origin (see Table 1) were characterized. For a rough overview on their phylogenetic relationship, the isolates were subjected to *panC* sequence typing, allocating them to *panC* type IV (Figure 1A). Distinct clusters within this group appeared (Figure 1B). In cluster a, MHI 2882 (*B. thuringiensis* ssp. *israelensis* isolated from larva) was found, as well as MHI 3241 and the older, barely documented isolate MHI 2878 (both *B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis*), which might be identical. Cluster b comprised MHI 271, MHI 2873 (ATCC type strain) and MHI 3370. The reference strain *B. cereus* ATCC 14579 and MHI 2870 (*B. thuringiensis* ssp. *entomocidus*) belonged to cluster c. All further isolates clustered closer together. Cluster d comprised four biopesticidal strains and four food isolates, while in cluster e mainly soil and salad isolates appeared, with the exception of biopesticidal isolate MHI 3240. Interestingly, MHI 2872 and MHI 3189 (from ready-to-eat salad) in cluster d as well as MHI 2874 (*B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*, isolated from soil) and MHI 3164 (also from ready-to-eat salad) in cluster e seemed to be identical.

Furthermore, all isolates were tested for the presence of *cry* genes via PCR with universal primers according to Ben-Dov et al. [24]. Thus, they could be verified as *B. thuringiensis* and additionally grouped in *cry*-type gene profiles (see Table 1). Twenty strains (83%) were classified as *cry1*, while 13 of those (54%) were also positive for *cry2*. Two strains (MHI 2878 and MHI 3241; *B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis*) were allocated to the *cry3*-type and one strain (MHI 2882; Culicidae larva isolate) to *cry4*. MHI 3370, the ancrystalliferous derivate Bt 407 Cry⁻ [37,38], was negative for all *cry*-types. Equally, all isolates were screened for the presence of (entero)toxin genes. All isolates harboured *nheA* as well as *hblC*, but were negative for *ces* as well as *cytK1* (see Table 1). Twenty two strains (92%) were tested positive for *cytK2* and could thus be assigned to toxin profile A (*nhe+*, *hbl+*, *cytK2+*), while only two isolates (MHI 2878 and MHI 3241; *B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis*) were *cytK2* negative and thus, allocated to toxin profile C (*nhe+*, *hbl+*) [39]. Interestingly, these were the two isolates assigned to the *cry3*-type. However, investigating a larger set of strains would be necessary to contextualize these observations.

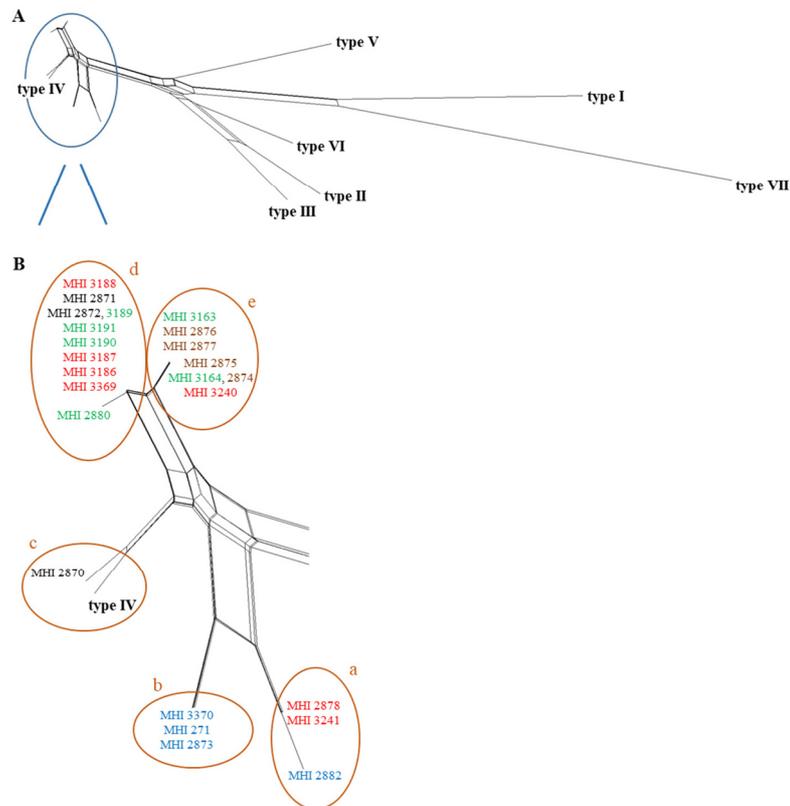


Figure 1. Phylogenetic relationship between the 24 tested *B. thuringiensis* strains, based on *panC* sequence analysis. Sequences were aligned with Clustal Ω [28] and further analysed using SplitsTree4 [29]. (A) Overview. (B) Enlargement of the *B. thuringiensis* isolates, which were all assigned to *panC* type IV. Within these, five distinct clusters (a–e) were identified. Blue: animal isolate, green: food, red: biopesticide, brown: soil, black: unknown origin.

3.2. Strain-Specific Germination and Motility

So far, all *B. thuringiensis* isolates in this study showed the genetic premises (presence of enterotoxin genes) to provoke the diarrhoeal type of food poisoning. Nevertheless, prerequisites for *B. cereus* enterotoxin production and cytotoxicity are also spore germination [14,40–43] and motility [14,44–46] in the host's intestine.

Within the *B. thuringiensis* strain set a high variability was detected, from maximal germination of 45% in CGY medium with heat activation to no germination. Furthermore, different germination patterns emerged (see Figure 2 and Table 2). Pattern A is characterized by minimal or no germination (MHI 2870 and MHI 2873). Strong germination in nutrient-rich medium with heat activation, but little germination in cRPMI medium was classified as pattern B (six food isolates, three biopesticidal strains and MHI 2882 isolated from larva). Pattern C germination seemed to be heat- as well as nutrient-dependent. This was detected for spores of biopesticidal strains as well as isolates of unknown origin. Pattern D comprised mostly soil isolates, which showed heat- and nutrient-independent germination. Spores with heat-dependent, but mostly nutrient-independent germination were summarized in pattern E.

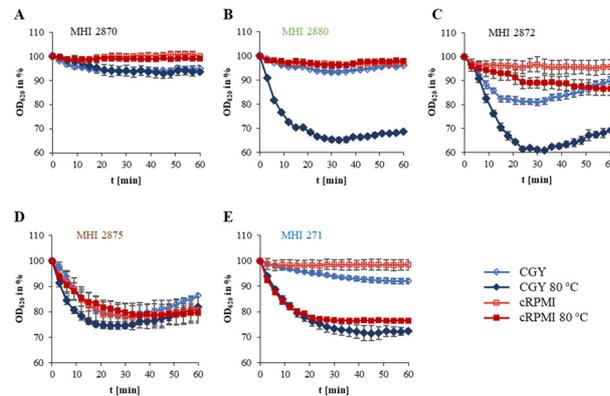


Figure 2. Germination of *B. thuringiensis* spores. Germination is depicted as the decrease of OD₆₂₀ per unit of time. OD₆₂₀ at time point 0 was set to 100%. Due to different patterns, strains were assigned to five germination types. (A) Minimal to no germination. (B) Strong germination in nutrient-rich medium plus heat activation with little germination in cRPMI medium. (C) Heat- and nutrient-dependent germination. (D) Heat- and nutrient-independent germination. (E) Germination heat-dependent, but mostly nutrient-independent. Blue: animal isolate, green: food, red: biopesticide, brown: soil, black: unknown origin. CGY: casein-glucose-yeast full medium. CGY 80 °C: casein-glucose-yeast full medium with prior heat activation for 10 min at 80 °C. cRPMI: RPMI 1640 cell culture medium pre-incubated with CaCo-2 cells. cRPMI 80 °C: RPMI 1640 cell culture medium pre-incubated with CaCo-2 cells and additional prior heat activation for 10 min at 80 °C.

Table 2. Germination of *B. thuringiensis* spores. Germination was measured as the decrease of OD₆₂₀ per time. OD₆₂₀ at time point 0 was set to 100%. To compare germination rates of the 24 tested isolates, OD₆₂₀ (in %) after 15 min incubation is shown. Shown are means and standard deviations of at least two biological replicates, each comprising three technical replicates. Origin of the isolates: A: animal, F: food, P: pesticide, S: soil, U: unknown. Strains are sorted according to their germination patterns: A. Minimal to no germination. B. Strong germination in nutrient-rich medium plus heat activation with little germination in cRPMI medium. C. Heat- and nutrient-dependent germination. D. Heat- and nutrient-independent germination. E. Germination heat-dependent, but mostly nutrient-independent.

Internal Number (MHI)	Origin	Germination (OD ₆₂₀ in %) after 15 min				Germination Pattern
		CGY	CGY 80 °C	cRPMI	cRPMI 80 °C	
2870	U	94.2 ± 0.6	96.4 ± 0.5	97.8 ± 1.3	98.1 ± 0.6	A
2873	A	96.6 ± 0.8	96.8 ± 0.1	98.5 ± 1.3	94.2 ± 1.9	A
2880	F	93.5 ± 2.8	71.4 ± 1.4	98.1 ± 1.5	98.9 ± 1.4	B
2882	A	85.2 ± 4.1	78.0 ± 1.0	97.2 ± 1.6	96.4 ± 2.8	B
3163	F	94.8 ± 0.6	86.5 ± 1.2	98.8 ± 0.7	97.6 ± 1.3	B
3164	F	94.1 ± 0.3	86.9 ± 2.5	98.6 ± 1.7	96.6 ± 1.1	B
3186	P	98.5 ± 0.3	88.5 ± 2.5	99.8 ± 0.3	100.1 ± 0.6	B
3187	P	98.9 ± 0.9	90.4 ± 2.7	99.4 ± 0.7	99.7 ± 0.5	B
3188	P	96.0 ± 0.4	78.8 ± 0.3	98.4 ± 0.5	100.5 ± 1.1	B
3189	F	96.2 ± 1.6	88.2 ± 2.3	98.6 ± 0.4	100.6 ± 0.8	B
3190	F	98.4 ± 0.6	94.8 ± 2.0	99.1 ± 0.9	99.6 ± 0.2	B
3191	F	93.1 ± 0.4	77.2 ± 0.7	99.3 ± 0.8	99.2 ± 0.1	B
2871	U	90.6 ± 3.2	82.4 ± 2.1	89.7 ± 4.4	91.3 ± 3.0	C
2872	U	81.5 ± 1.2	72.6 ± 2.9	96.5 ± 0.2	93.4 ± 0.4	C
3240	P	98.1 ± 1.9	79.2 ± 1.3	90.3 ± 5.8	93.0 ± 1.9	C
3241	P	86.5 ± 7.1	75.6 ± 10.9	119.1 ± 24.7	85.2 ± 11.1	C
3369	P	87.3 ± 1.6	75.2 ± 2.7	96.9 ± 1.9	95.0 ± 1.6	C
2874	S	82.9 ± 31.5	62.0 ± 4.1	74.4 ± 1.5	81.7 ± 1.5	D
2875	S	78.8 ± 6.2	74.8 ± 1.9	83.9 ± 2.0	82.7 ± 1.8	D
2876	S	87.1 ± 1.9	89.9 ± 1.0	90.1 ± 4.9	89.1 ± 0.4	D
2877	S	81.3 ± 7.8	75.6 ± 9.6	91.3 ± 2.2	93.5 ± 1.4	D
3370	A	71.9 ± 6.8	64.5 ± 8.2	78.6 ± 9.1	78.2 ± 9.5	D
271	A	95.2 ± 1.3	81.9 ± 3.3	97.7 ± 0.6	80.2 ± 0.1	E
2878	P	96.1 ± 1.8	88.8 ± 2.2	96.4 ± 2.0	92.3 ± 2.1	E

Beyond germination, the swimming ability of the isolates was investigated using CGY plates with 0.25% agar. With the exception of insect isolates MHI 2873 and MHI 2882, and biopesticide isolate MHI 3241, all strains were able to actively move after 24 h incubation at 37 °C, while MHI 2870, as well as the salad and biopesticide isolates MHI 3186, MHI 3187, MHI 3188, MHI 3189 and MHI 3190 showed maximal diameters (Figure 3). Generally, various strains—including isolates from biopesticides—were able to germinate in low-nutrient cRPMI medium and also to actively move; hence, further prerequisites for the onset of the disease are given.

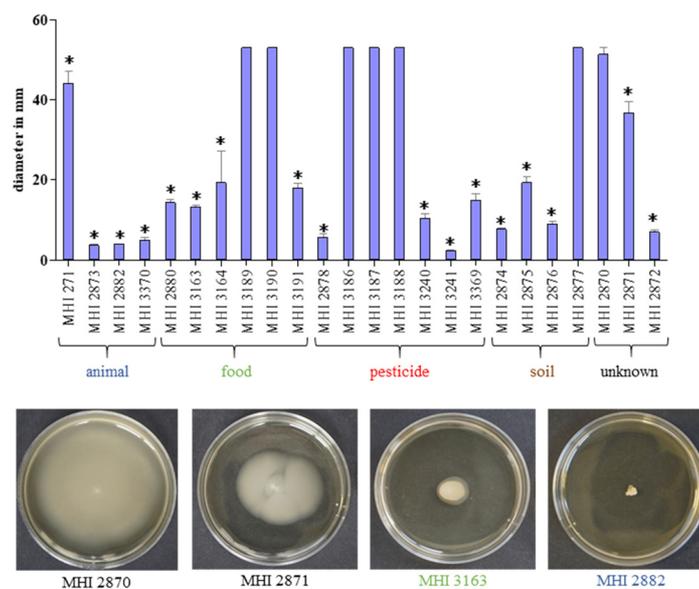


Figure 3. Motility of the *B. thuringiensis* isolates. The 1 μ L overnight culture was injected into the centre of CGY plates with 0.25% agar. Swimming diameters were measured after 24 h incubation at 37 °C. *: Significant difference compared to full-plate expansion (p -value ≤ 0.05 ; unpaired t -test, 95% confidence interval). Blue: animal isolate, green: food, red: biopesticide, brown: soil, black: unknown origin.

3.3. Growth under Simulated Intestinal Conditions and Production of Enterotoxins

The crucial step for *B. cereus*-associated food infections is growth and enterotoxin production of the bacteria in the human intestine. Representatively, reciprocal titres of toxin components NheB and Hbl L2 were determined in culture supernatants after six hours of growth. All *B. thuringiensis* isolates tested in this study were able to grow under simulated intestinal conditions (cRPMI medium, 37 °C, 7% CO₂) and to secrete significant amounts of NheB (Figure 4A,B). Applying a classification scheme developed for *B. cereus* (high NheB production: titres >2000; medium: 1000–2000; low: <1000; [15]), a uniform distribution of high, medium and low toxin producing strains was observed (see Table 1 and Figure 4B). Under these terms, eight strains (mainly biopesticide and salad isolates) showed NheB titres below 1000 (Figure 4B), but conclusions should be drawn carefully, as this is still sufficient to cause significant damage to CaCo-2 cells (see Section 3.4). Additionally, NheB titres were determined after six hours growth in CGY medium, as this is applied in routine diagnostics of *B. cereus* [39]. Due to accelerated growth, titres were enhanced in CGY medium compared to cRPMI. Furthermore, all isolates secreted significant amounts of Hbl L2 under both conditions, similar to *B. cereus* [15,39], with the exception of Culicidae larva isolate MHI 2882 (Figure 4C).

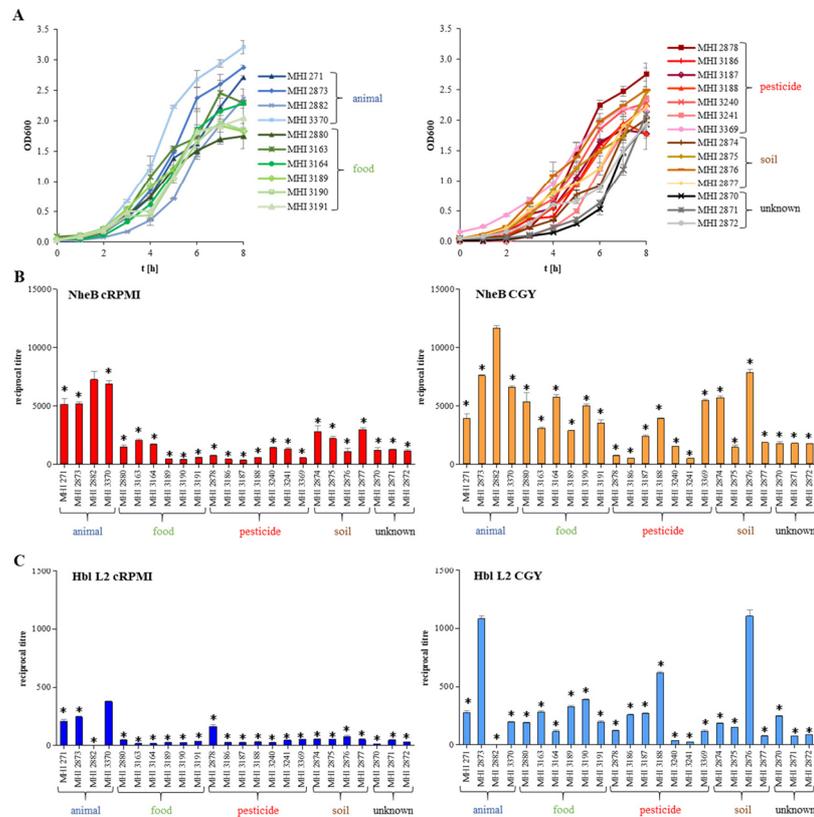


Figure 4. Growth and enterotoxin production of the *B. thuringiensis* strains. (A) Growth under simulated intestinal conditions (RPMI 1640 medium treated with CaCo-2 cells, 37 °C, 7% CO₂). (B) NheB production after six hours growth under simulated intestinal conditions (cRPMI, red). Reciprocal NheB titres after six hours growth in CGY medium (nutrient-rich, aerobic conditions) are shown for comparison (orange). (C) Hbl L2 production after six hours growth under simulated intestinal conditions (cRPMI, dark blue). Reciprocal Hbl L2 titres after six hours growth in CGY medium (nutrient-rich, aerobic conditions) are shown for comparison (light blue). *: Significant difference compared to the isolate with highest toxin production (p -value ≤ 0.05 ; unpaired t -test, 95% confidence interval). Blue: animal isolate, green: food, red: biopesticide, brown: soil, black: unknown origin.

3.4. Exhibition of Cytotoxic and Haemolytic Activity

Beyond toxin production, all tested *B. thuringiensis* isolates grown under simulated intestinal conditions showed cytotoxic activity towards the human colon adenocarcinoma cell line CaCo-2 (Figure 5A). According to a prior classification of *B. cereus* strains [15], 14 of the tested *B. thuringiensis* isolates were classified as highly (titres > 100) and eight isolates as medium (titres from 50 to 100) toxic (see Table 1). Only two strains exhibited low cytotoxicity (titres < 50), which were MHI 2870 and biopesticide isolate MHI 3241. Similar to toxin production (see Section 3.3), cytotoxicity titres were accordingly enhanced when the strains were grown in CGY medium (Figure 5A). Data from WST-1 bioassays were supported by haemolysis (Figure 5B). Only strain MHI 3241 exhibited no haemolytic activity on sheep blood agar. Extension of the haemolytic zone varied strain-specifically, with isolates MHI 271, MHI 2873 and MHI 3370 showing the discontinuous haemolysis zone phenomenon [13,47,48]. Furthermore, data obtained from EIAs and WST-1 bioassays were statistically analysed. Spearman correlation tests revealed that NheB, Hbl L2 and cytotoxicity titres of all tested *B. thuringiensis* isolates generally tended to increase together, but weakly and in a non-significant manner (Table 3A).

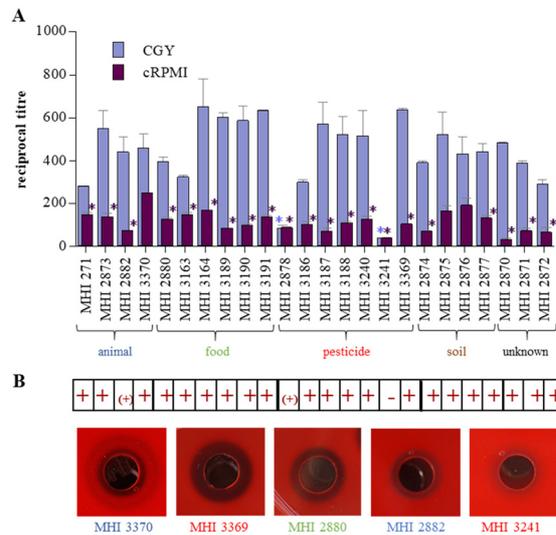


Figure 5. Cytotoxic activity of the 24 tested *B. thuringiensis* isolates. **A.** Results of WST-1 bioassays on CaCo-2 cells. Reciprocal titres for 50% lethal doses are shown. *: Significant difference compared to the isolate with highest cytotoxicity (p -value ≤ 0.05 ; unpaired t -test, 95% confidence interval). **B.** Haemolytic activity of the 24 isolates obtained after five hours incubation on sheep blood agar plates. +: Haemolysis clearly detectable. -: Haemolysis not detectable. (+): Weak haemolysis. Further, examples of five different haemolysis patterns are shown. Blue: animal isolate, green: food, red: biopesticide, brown: soil, black: unknown origin.

Table 3. Results of Spearman correlation tests. Correlation between reciprocal titres from EIAs and cytotoxicity tests (**A**), as well as correlation between MICs and MTCs of EOs (**B**) was determined for the 24 tested *B. thuringiensis* isolates. Pairs with positive correlation coefficients are shown, which tended to increase together. R: correlation coefficient. *: significant correlation (p -value ≤ 0.05). ns: not significant.

A		WST-1 CGY	NheB CGY	
NheB CGY	R = 0.37 (ns)	NheB cRPMI	R = 0.35 (ns)	
Hbl L2 CGY	R = 0.237 (ns)	Hbl L2 CGY	R = 0.297 (ns)	
		WST-1 cRPMI	NheB cRPMI	
NheB cRPMI	R = 0.381 (ns)	Hbl L2 cRPMI	R = 0.283 (ns)	
Hbl L2 cRPMI	R = 0.375 (ns)			
		WST-1 CGY	Hbl L2 CGY	
WST-1 cRPMI	R = 0.237 (ns)	Hbl L2 cRPMI	R = 0.13 (ns)	
B		MIC Citral	MIC Oregano	
MTC Citral	R = 0.35 (ns)	MTC Oregano	R = 0.65 (*)	
		MIC Cassia	MIC Winter s.	
MIC Citral	R = 0.126 (ns)	MIC Citral	R = 0.322 (ns)	
		MIC Oregano	R = 0.446 (*)	
		MTC Cassia	MTC Winter s.	
MTC Oregano	R = 0.285 (ns)	MTC Oregano	R = 0.16 (ns)	

3.5. Growth Inhibition by Essential Oils (EOs)

Nearly all *B. thuringiensis* isolates tested in this study secreted sufficient amounts of enterotoxins under simulated intestinal conditions to harm human colon cells in a *B. cereus*-like magnitude. Thus, the antimicrobial activity of essential oils (EOs) was assessed as a preventive measure against putatively enteropathogenic *B. thuringiensis*. Initially, inhibition zones in disk diffusion assays were investigated. Except thyme, each EO was able to inhibit growth of all tested *B. thuringiensis* strains (Figure 6A and Figure S1). Susceptibility of all isolates to cinnamon OR was similar (inhibition zone approx. 11 mm), with the exception of highly sensitive MHI 3241 (22 mm). For the other EOs, especially oregano, winter savory and citral, higher strain-specific variations were detected (Figure 6A and Figure S1).

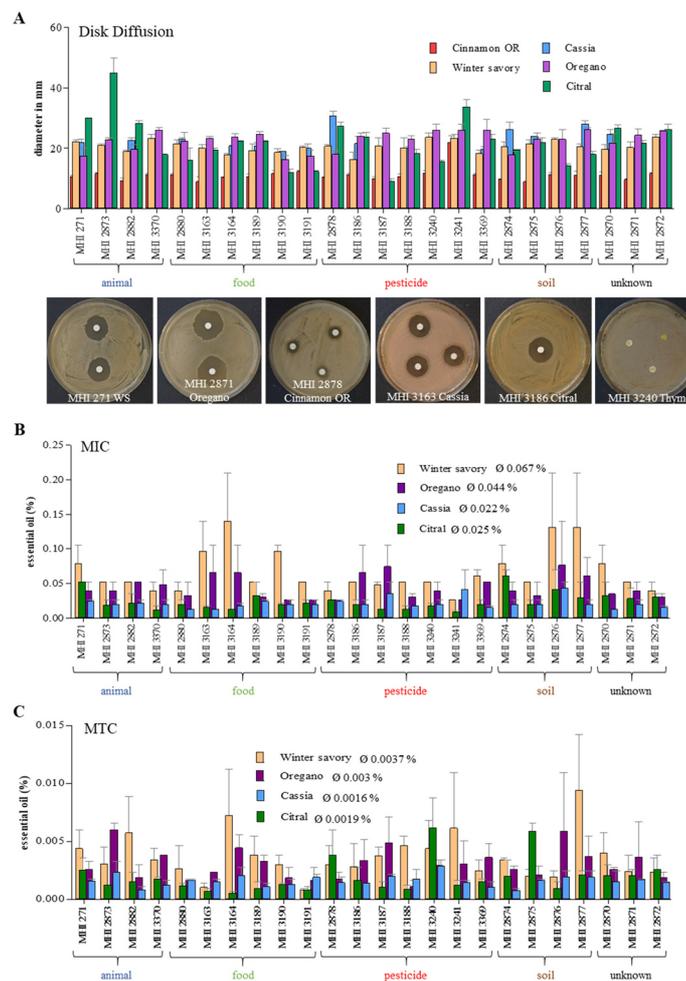


Figure 6. Antimicrobial activity of essential oils (EOs). (A) Disk diffusion assay. Approx. 10^7 CFU/mL were plated onto CGY agar, a sterile paper disk was placed in the middle of the plate and 1 μ L EO was dripped on it. Growth inhibition zones were measured after 24 h incubation at 37 °C. (B) The minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined in antimicrobial broth dilution assays using 10^6 CFU/mL. $\bar{\phi}$: Average MIC value for all strains. (C) The maximal tolerated concentrations (MTCs) were determined in antimicrobial broth dilution assays using 10^3 CFU/mL. $\bar{\phi}$: Average MTC value for all strains. For a better overview, separate diagrams including statistics are depicted in Figures S1–S3. Blue: animal isolate, green: food, red: biopesticide, brown: soil, black: unknown origin.

Cinnamon Chinese cassia, citral, oregano and winter savory were then chosen to evaluate MIC and MTC values by performing antimicrobial broth dilution assays (Figure 6B,C, Figures S2 and S3). Average MICs were 0.067% for winter savory, 0.044% for oregano, 0.025% for citral and 0.022% for cinnamon Chinese cassia. Average MTCs were 0.0037% for winter savory, 0.003% for oregano, 0.0019% for citral and 0.0016% for cinnamon Chinese cassia. Thus, cinnamon Chinese cassia showed the highest antimicrobial activity towards the tested *B. thuringiensis* isolates, followed by citral, oregano and winter savory. Nonetheless, the previously observed highly strain-specific antimicrobial activity was further intensified (Figure 6B,C, Figures S2 and S3). MIC and MTC values of the strain set were also statistically analysed. Results of Spearman correlation tests are summarized in Table 3B. With the exception of oregano, MIC and MTC values did not significantly correlate. MIC values of citral and cinnamon Chinese cassia (not significantly), citral and winter savory (not significantly), and winter savory and oregano (significantly) tended to increase together. This was also observed for the MTC values of cinnamon Chinese cassia and oregano, and winter savory and oregano (not significant). Thus, despite some correlation, the great variability between the tested isolates became yet again obvious. Nevertheless, soil isolate MHI 2876, which showed highest resistance to all tested EOs, as well as biopesticide isolate MHI 3241 (*B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis*), which was most susceptible to all tested EOs except cinnamon Chinese cassia, were particularly remarkable.

4. Discussion

Over 400 *B. thuringiensis*-based formulations have been registered, mostly consisting of insecticidal toxins and viable spores [22]. In Germany, there are currently 16 authorized plant protection products containing *B. thuringiensis*, including biopesticides 1, 2 and 4 tested in the present study. The license for biopesticide 3 ended in 2019, its grace period ends in October 2020. *B. thuringiensis* concentrations of up to 540 g/kg are used in these products [49]. The present study aimed to investigate the enteropathogenic potential of *B. thuringiensis* as well as its susceptibility to essential oils, with special attention being paid to differences between the single isolates from soil, animals, food and commercially available biopesticides. It is already known that *B. thuringiensis*, as member of the *B. cereus* group, harbours genes encoding enterotoxins, which were also detected in the present study (see Table 1). Remarkably, all strains harboured *hbl*, which is typically found in 40–70% of *B. cereus* group isolates under investigation [26,50,51]. One older study also described a significantly higher presence of *hblCDA* in *B. thuringiensis* than in *B. cereus* [52].

Furthermore, all isolates investigated in the present study were assigned to *panC* type IV. The authors of a previous study with similar results concluded that biopesticide strains can thus indeed be present in foods [23]. Meanwhile, *B. cereus* group isolates of *panC* type IV cannot only be found in soil, water or insects, but also in conjunction with diarrhoeal outbreaks [23,27,39]. Additionally, potentially toxigenic pesticidal strains were isolated from tomatoes, cucumbers and peppers [53]. *B. thuringiensis* strains from tomatoes and bell pepper matched MLST (Multilocus Sequence Typing) types of the biopesticidal strains *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* ABTS-351 and *B. thuringiensis* ssp. *aizawai* ABTS-1857 [54]. In another study, isolates from food and beverage samples were indistinguishable from *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* from commercial biopesticides [55]. *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD1 was detected in cabbage products for human consumption [56], and a biopesticidal strain was even isolated from faecal samples of greenhouse workers who were exposed to *B. thuringiensis*-based insecticides [57].

In order to assess the potential health risk originating from (biopesticidal) *B. thuringiensis* isolates in more detail, we additionally investigated germination and motility behaviour of the strain set, which are further crucial prerequisites for the onset of the diarrhoeal disease [14,40–46]. Although different germination patterns emerged, spores of most isolates were able to germinate, even in cRPMI medium with preceding heat treatment mimicking re-heating of stored foods and subsequent consumption. Although highly strain-specific, no significant differences between biopesticidal and other isolates were detected, which was also true for swimming motility (see Figures 2 and 3 and

Table 2). A connection between motility and enterotoxin secretion in *B. thuringiensis* has already been made [58,59].

Despite all important prerequisites, production of enterotoxins in the intestine is the most relevant factor for the manifestation of the diarrhoeal disease. Although enterotoxin production by *B. thuringiensis* isolated from different sources including biopesticides has been shown in previous studies, comparative cytotoxicity assays were rarely performed [23,60–63]. Moreover, to our knowledge, the present study is the first one to compare enterotoxin production and cytotoxicity of a set of *B. thuringiensis* isolates grown under simulated intestinal conditions. Generally, enterotoxin production as well as cytotoxic activity is highly variable within enteropathogenic *B. cereus* strains. The reasons for this are still not completely explored [39,64]. A similar variability in NheB and Hbl L2 production as well as cytotoxicity towards CaCo-2 cells could be shown for the *B. thuringiensis* isolates investigated in the present study (see Figures 4 and 5). Nevertheless, applying a classification scheme established for enteropathogenic *B. cereus* grown under simulated intestinal conditions [15], the majority of our *B. thuringiensis* isolates had to be classified as medium or highly toxic, including biopesticide strains (see Table 1). Hence, despite high strain-specific variations, a considerable hazardous potential due to *B. thuringiensis* isolates from various origins is indisputable.

Due to these facts, the scientific opinion of the EFSA (European Foods Safety Authority) BIOHAZ Panel (2016) is entirely comprehensible. Clear discrimination between *B. cereus* and *B. thuringiensis* in routine food and clinical diagnostics is required as well as unequivocal identification of biopesticide strains by whole genome sequencing or additional, specific markers. For an improved risk assessment, further data on dose-response and characterization of *B. thuringiensis* are urgently needed, as well as field studies after application of the biopesticides to determine pre-harvest intervals [22]. On the other hand, the major advantage of *B. thuringiensis*—its high specificity towards single insect species—must not be neglected, which led to a significant reduction of the use of chemical insecticides [1,65]. Moreover, defenders of *B. thuringiensis* claim that the genotypes of biopesticidal strains have never been found in outbreaks, and that only environmental isolates, not biopesticidal strains, have been detected in high concentrations in foodstuffs [66]. However, particularly to prove this, more data on the biopesticide strains as well as reliable tools for their clear identification are necessary.

Until these data are available, the use of EOs can be an additional preventive strategy against putatively enteropathogenic *B. thuringiensis*. It has been shown that *B. cereus* is sensitive to EOs from nutmeg, mint, clove, oregano, cinnamon, saffron, sage, thyme and rosemary [67–72], *Satureja*, *Origanum* and *Thymus* species [73,74], lemon, orange and bergamot [75], cumin, black pepper and black cumin [76,77], *Daucus gracilis* [78], as well as carvacrol [79–82] and many others. Nevertheless, most of these studies have been conducted with only one or few representative isolates, and a comparative study including *B. cereus* strains of different origin, toxin profile, cytotoxic activity etc. is missing. Studies on the sensitivity of *B. thuringiensis* are rarely found, and—due to the high variability inside the *B. cereus* group—conclusions cannot necessarily be drawn for *B. thuringiensis*. Only two earlier studies showed susceptibility of *B. thuringiensis* towards EOs of *Thymus vulgaris* [83] and *Ferulago angulata* [84]. In contrast to that, none of the tested strains in the present study was inhibited by thyme oil (Figure 6), which once more underlines the high variability of EO effects. Comparing average MIC values, we determined an antimicrobial activity of cinnamon Chinese cassia > citral > oregano > winter savory, which largely corresponds with earlier studies on *B. cereus* [72]. However, as in all tests applied in this study, strain-specific differences must be considered.

5. Conclusions

Altogether, the present study stresses the enteropathogenic potential of *B. thuringiensis*, even of biopesticidal strains, which were generally indistinguishable from other isolates in the applied tests. Application of these pesticides might thus indeed constitute a hazard to human health. On the other hand, the use of *B. thuringiensis* in agriculture significantly reduced the application of chemical insecticides. We conclude that banning of *B. thuringiensis* biopesticides is not implementable due to

its various advantages. Nevertheless, the applied strains have to be extremely well characterized (for instance by whole genome sequencing) and labelled to provide gapless information about their safety and to eliminate any human health hazard. At this, routine discrimination between *B. cereus* and *B. thuringiensis* is as important as controlled application of the biopesticides. Additionally, clear labelling of foods treated with *B. thuringiensis* can benefit consumers.

Until then, the use of essential oils as antimicrobials might diminish the risks by reducing the level of contamination, especially in times of increased antibiotic resistance and enhanced consumers' demand for natural antimicrobial agents. It can also be concluded from the present study that, whenever predicting the hazardous potential or using antimicrobials, the high variety within *B. cereus* group strains, even *B. thuringiensis*, must be taken into account, whether it be their ability to produce enterotoxins, their cytotoxic activity, or their resilience towards antimicrobials.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2304-8158/9/10/1484/s1>, Table S1: Primers used in this study, Figure S1: Disk diffusion assay, Figure S2: Determination of minimal inhibitory concentrations (MICs) in antimicrobial broth dilution assays, Figure S3: Determination of maximal tolerated concentrations (MTCs) in antimicrobial broth dilution assays.

Author Contributions: Conceptualization, V.S., M.L., E.M. and N.J.; formal analysis, V.S. and N.J.; investigation, V.S., J.R. and N.J. writing—original draft, V.S. and N.J.; writing—review and editing, M.L. and E.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Deutsche Forschungsgemeinschaft, grant number JE 871/2-1.

Acknowledgments: The authors thank Nele Maxseiner for excellent technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Chattopadhyay, P.; Banerjee, G. Recent advancement on chemical arsenal of Bt toxin and its application in pest management system in agricultural field. *3 Biotech* **2018**, *8*, 201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Jouzani, G.S.; Valijanian, E.; Sharafi, R. *Bacillus thuringiensis*: A successful insecticide with new environmental features and tidings. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 2691–2711. [[CrossRef](#)]
3. Schnepf, E.; Crickmore, N.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D.R.; Dean, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**, *62*, 775–806. [[CrossRef](#)]
4. Xu, C.; Wang, B.C.; Yu, Z.; Sun, M. Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. *Toxins* **2014**, *6*, 2732–2770. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Donovan, W.P.; Engleman, J.T.; Donovan, J.C.; Baum, J.A.; Bunkers, G.J.; Chi, D.J.; Clinton, W.P.; English, L.; Heck, G.R.; Ilagan, O.M.; et al. Discovery and characterization of Sip1A: A novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *72*, 713–719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Hernández-Rodríguez, C.S.; Boets, A.; Van Rie, J.; Ferré, J. Screening and identification of *vip* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. *J. Appl. Microbiol.* **2009**, *107*, 219–225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Höfte, H.; Whiteley, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **1989**, *53*, 242–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Zhong, C.; Ellar, D.J.; Bishop, A.; Johnson, C.; Lin, S.; Hart, E.R. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin which is toxic to insects in three orders. *J. Invertebr. Pathol.* **2000**, *76*, 131–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Guinebretière, M.H.; Auger, S.; Galleron, N.; Contzen, M.; De Sarrau, B.; De Buyser, M.L.; Lamberet, G.; Fagerlund, A.; Granum, P.E.; Lereclus, D.; et al. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2013**, *63*, 31–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

10. Jiménez, G.; Urdiain, M.; Cifuentes, A.; López-López, A.; Blanch, A.R.; Tamames, J.; Kämpfer, P.; Kolstø, A.B.; Ramón, D.; Martínez, J.F.; et al. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Syst. Appl. Microbiol.* **2013**, *36*, 383–391. [[CrossRef](#)]
11. Liu, Y.; Lai, Q.; Göker, M.; Meier-Kolthoff, J.P.; Wang, M.; Sun, Y.; Wang, L.; Shao, Z. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 14082. [[CrossRef](#)]
12. Stenfors Arnesen, L.P.; Fagerlund, A.; Granum, P.E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 579–606. [[CrossRef](#)]
13. Beecher, D.J.; Schoeni, J.L.; Wong, A.C. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* **1995**, *63*, 4423–4428. [[CrossRef](#)]
14. Jessberger, N.; Kranzler, M.; da Rioli, C.; Schwenk, V.; Buchacher, T.; Dietrich, R.; Ehling-Schulz, M.; Märtlbauer, E. Assessing the toxic potential of enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Food Microbiol.* **2019**, *84*, 103276. [[CrossRef](#)]
15. Jessberger, N.; Rademacher, C.; Krey, V.M.; Dietrich, R.; Mohr, A.K.; Böhm, M.E.; Scherer, S.; Ehling-Schulz, M.; Märtlbauer, E. Simulating intestinal growth conditions enhances toxin production of enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 627. [[CrossRef](#)]
16. Lund, T.; De Buyser, M.L.; Granum, P.E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol. Microbiol.* **2000**, *38*, 254–261. [[CrossRef](#)]
17. Lund, T.; Granum, P.E. Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiol. Lett.* **1996**, *141*, 151–156. [[CrossRef](#)]
18. Cho, S.H.; Kang, S.H.; Lee, Y.E.; Kim, S.J.; Yoo, Y.B.; Bak, Y.S.; Kim, J.B. Distribution of toxin genes and enterotoxins in *Bacillus thuringiensis* isolated from microbial insecticide products. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *25*, 2043–2048. [[CrossRef](#)]
19. Kim, M.J.; Han, J.K.; Park, J.S.; Lee, J.S.; Lee, S.H.; Cho, J.I.; Kim, K.S. Various enterotoxin and other virulence factor genes widespread among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *25*, 872–879. [[CrossRef](#)]
20. Swiecicka, I.; Van der Auwera, G.A.; Mahillon, J. Hemolytic and nonhemolytic enterotoxin genes are broadly distributed among *Bacillus thuringiensis* isolated from wild mammals. *Microb. Ecol.* **2006**, *52*, 544–551. [[CrossRef](#)]
21. McIntyre, L.; Bernard, K.; Beniac, D.; Isaac-Renton, J.L.; Naseby, D.C. Identification of *Bacillus cereus* group species associated with food poisoning outbreaks in British Columbia, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 7451–7453. [[CrossRef](#)]
22. EFSA, European Food Safety Authority, Panel on Biological Hazards. Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA J.* **2016**, *14*, 4524. [[CrossRef](#)]
23. Jöhler, S.; Kalbhenn, E.M.; Heini, N.; Brodmann, P.; Gautsch, S.; Bagcioglu, M.; Contzen, M.; Stephan, R.; Ehling-Schulz, M. Enterotoxin production of *Bacillus thuringiensis* isolates from biopesticides, foods, and outbreaks. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1915. [[CrossRef](#)]
24. Ben-Dov, E.; Zaritsky, A.; Dahan, E.; Barak, Z.; Sinai, R.; Manasherob, R.; Khamraev, A.; Troitskaya, E.; Dubitsky, A.; Berezina, N.; et al. Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 4883–4890. [[CrossRef](#)]
25. Wehrle, E.; Moravek, M.; Dietrich, R.; Bürk, C.; Didier, A.; Märtlbauer, E. Comparison of multiplex PCR, enzyme immunoassay and cell culture methods for the detection of enterotoxinogenic *Bacillus cereus*. *J. Microbiol. Methods* **2009**, *78*, 265–270. [[CrossRef](#)]
26. Ehling-Schulz, M.; Guinebretiére, M.H.; Monthan, A.; Berge, O.; Fricker, M.; Svensson, B. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, *260*, 232–240. [[CrossRef](#)]
27. Guinebretiére, M.H.; Thompson, F.L.; Sorokin, A.; Normand, P.; Dawyndt, P.; Ehling-Schulz, M.; Svensson, B.; Sanchis, V.; Nguyen-The, C.; Heyndrickx, M.; et al. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environ. Microbiol.* **2008**, *10*, 851–865. [[CrossRef](#)]
28. Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T.J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Soding, J.; et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **2011**, *7*, 539. [[CrossRef](#)]

29. Huson, D.H.; Bryant, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* **2006**, *23*, 254–267. [[CrossRef](#)]
30. Miller, R.A.; Jian, J.; Beno, S.M.; Wiedmann, M.; Kovac, J. Intraclade variability in toxin production and cytotoxicity of *Bacillus cereus* group type strains and dairy-associated isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*. [[CrossRef](#)]
31. Fricker, M.; Agren, J.; Segerman, B.; Knutsson, R.; Ehling-Schulz, M. Evaluation of *Bacillus* strains as model systems for the work on *Bacillus anthracis* spores. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *145*, 129–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. da Riol, C.D.; Dietrich, R.; Märtlbauer, E.; Jessberger, N. Consumed foodstuffs have a crucial impact on the toxic activity of enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Dietrich, R.; Fella, C.; Strich, S.; Märtlbauer, E. Production and characterization of monoclonal antibodies against the hemolysin BL enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 4470–4474. [[CrossRef](#)]
34. Dietrich, R.; Moravek, M.; Bürk, C.; Granum, P.E.; Märtlbauer, E. Production and characterization of antibodies against each of the three subunits of the *Bacillus cereus* nonhemolytic enterotoxin complex. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 8214–8220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Tausch, F.; Dietrich, R.; Schauer, K.; Janowski, R.; Niessing, D.; Märtlbauer, E.; Jessberger, N. Evidence for complex formation of the *Bacillus cereus* haemolysin BL components in solution. *Toxins* **2017**, *9*, 288. [[CrossRef](#)]
36. Dussault, D.; Vu, K.D.; Lacroix, M. *In vitro* evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. *Meat Sci.* **2014**, *96*, 514–520. [[CrossRef](#)]
37. Lereclus, D.; Arantes, O.; Chaufaux, J.; Lecadet, M. Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1989**, *51*, 211–217. [[CrossRef](#)]
38. Sheppard, A.E.; Poehlein, A.; Rosenstiel, P.; Liesegang, H.; Schulenburg, H. Complete Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* Strain 407 Cry. *Genome Announc.* **2013**, *1*. [[CrossRef](#)]
39. Jessberger, N.; Krey, V.M.; Rademacher, C.; Böhm, M.E.; Mohr, A.K.; Ehling-Schulz, M.; Scherer, S.; Märtlbauer, E. From genome to toxicity: A combinatory approach highlights the complexity of enterotoxin production in *Bacillus cereus*. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 560. [[CrossRef](#)]
40. Wijnands, L.M.; Dufrenne, J.B.; Zwietering, M.H.; van Leusden, F.M. 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.* **2006**, *112*, 120–128. [[CrossRef](#)]
41. Wijnands, L.M.; Dufrenne, J.B.; van Leusden, F.M.; Abee, T. 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.* **2007**, *73*, 5052–5054. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Hornstra, L.M.; van der Voort, M.; Wijnands, L.M.; Roubos-van den Hil, P.J.; Abee, T. Role of germinant receptors in Caco-2 cell-initiated germination of *Bacillus cereus* ATCC 14579 endospores. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 1201–1203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Jessberger, N.; Dietrich, R.; Mohr, A.K.; da Riol, C.; Märtlbauer, E. Porcine gastric mucin triggers toxin production of enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* **2019**, *87*, e00765-18. [[CrossRef](#)]
44. Ghelardi, E.; Celandroni, F.; Salvetti, S.; Ceragioli, M.; Beecher, D.J.; Senesi, S.; Wong, A.C. Swarming behavior of and hemolysin BL secretion by *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 4089–4093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Mazzantini, D.; Celandroni, F.; Salvetti, S.; Gueye, S.A.; Lupetti, A.; Senesi, S.; Ghelardi, E. FlhF is required for swarming motility and full pathogenicity of *Bacillus cereus*. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1644. [[CrossRef](#)]
46. Salvetti, S.; Ghelardi, E.; Celandroni, F.; Ceragioli, M.; Giannesi, F.; Senesi, S. FlhF, a signal recognition particle-like GTPase, is involved in the regulation of flagellar arrangement, motility behaviour and protein secretion in *Bacillus cereus*. *Microbiology* **2007**, *153*, 2541–2552. [[CrossRef](#)]
47. Beecher, D.J.; Macmillan, J.D. Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* **1991**, *59*, 1778–1784. [[CrossRef](#)]
48. Beecher, D.J.; Wong, A.C. Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Hemolytic analysis of component interactions and a model for its characteristic paradoxical zone phenomenon. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 233–239. [[CrossRef](#)]

49. BVL (Federal Office of Consumer Protection and Food Safety). List of Authorised Plant Protection Products in Germany with Information on Terminated Authorisations. Available online: www.bvl.bund.de (accessed on 12 October 2020).
50. Ankolekar, C.; Rahmati, T.; Labbe, R.G. Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *128*, 460–466. [[CrossRef](#)]
51. Böhm, M.E.; Huptas, C.; Krey, V.M.; Scherer, S. Massive horizontal gene transfer, strictly vertical inheritance and ancient duplications differentially shape the evolution of *Bacillus cereus* enterotoxin operons *hbl*, *cytK* and *nhe*. *BMC Evol. Biol.* **2015**, *15*, 246. [[CrossRef](#)]
52. Ngamwongsatit, P.; Buasri, W.; Pianariyanon, P.; Pulsrikarn, C.; Ohba, M.; Assavanig, A.; Panbangred, W. Broad distribution of enterotoxin genes (*hblCDA*, *nheABC*, *cytK*, and *entFM*) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *121*, 352–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Frederiksen, K.; Rosenquist, H.; Jørgensen, K.; Wilcks, A. Occurrence of natural *Bacillus thuringiensis* contaminants and residues of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides on fresh fruits and vegetables. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 3435–3440. [[CrossRef](#)]
54. Frenzels, H.; Juraschek, K.; Pauly, N.; Kelner-Burgos, Y.; Wichmann-Schauer, H. Indications of biopesticidal *Bacillus thuringiensis* strains in bell pepper and tomato. *Int. J. Food Microbiol.* **2020**, *321*, 108542. [[CrossRef](#)]
55. Zhou, G.; Yan, J.; Dasheng, Z.; Zhou, X.; Yuan, Z. The residual occurrences of *Bacillus thuringiensis* biopesticides in food and beverages. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *127*, 68–72. [[CrossRef](#)]
56. Hendriksen, N.B.; Hansen, B.M. Detection of *Bacillus thuringiensis* *kurstaki* HD1 on cabbage for human consumption. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, *257*, 106–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Jensen, G.B.; Larsen, P.; Jacobsen, B.L.; Madsen, B.; Wilcks, A.; Smidt, L.; Andrup, L. Isolation and characterization of *Bacillus cereus*-like bacteria from faecal samples from greenhouse workers who are using *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **2002**, *75*, 191–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Ghelardi, E.; Celandroni, F.; Salvetti, S.; Beecher, D.J.; Gominet, M.; Lereclus, D.; Wong, A.C.; Senesi, S. Requirement of *flhA* for swarming differentiation, flagellin export, and secretion of virulence-associated proteins in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 6424–6433. [[CrossRef](#)]
59. Bouillaut, L.; Ramarao, N.; Buisson, C.; Gilois, N.; Gohar, M.; Lereclus, D.; Nielsen-Leroux, C. FlhA influences *Bacillus thuringiensis* PlcR-regulated gene transcription, protein production, and virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 8903–8910. [[CrossRef](#)]
60. Gaviria Rivera, A.M.; Granum, P.E.; Priest, F.G. Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *190*, 151–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Yang, C.Y.; Pang, J.C.; Kao, S.S.; Tsen, H.Y. Enterotoxigenicity and cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* strains and development of a process for Cry1Ac production. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 100–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Damgaard, P.H. Diarrhoeal enterotoxin production by strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from commercial *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **1995**, *12*, 245–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Damgaard, P.H.; Larsen, H.D.; Hansen, B.M.; Bresciani, J.; Jørgensen, K. Enterotoxin-producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food. *Lett. Appl. Microbiol.* **1996**, *23*, 146–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Böhm, M.E.; Krey, V.M.; Jessberger, N.; Frenzels, E.; Scherer, S. 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.* **2016**, *7*, 768. [[CrossRef](#)]
65. Bravo, A.; Gomez, I.; Porta, H.; Garcia-Gomez, B.I.; Rodriguez-Almazan, C.; Pardo, L.; Soberon, M. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microb. Biotechnol.* **2013**, *6*, 17–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Raymond, B.; Federici, B.A. In defense of *Bacillus thuringiensis*, the safest and most successful microbial insecticide available to humanity—A response to EFSA. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2017**, *93*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Unlu, M.; Ergene, E.; Unlu, G.V.; Zeytinoglu, H.S.; Vural, N. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 3274–3280. [[CrossRef](#)]
68. Valero, M.; Giner, M.J. Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. *Int. J. Food Microbiol.* **2006**, *106*, 90–94. [[CrossRef](#)]

69. Valero, M.; Salmeron, M.C. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *85*, 73–81. [[CrossRef](#)]
70. Ghosh, I.N.; Patil, S.D.; Sharma, T.K.; Srivastava, S.K.; Pathania, R.; Navani, N.K. Synergistic action of cinnamaldehyde with silver nanoparticles against spore-forming bacteria: A case for judicious use of silver nanoparticles for antibacterial applications. *Int. J. Nanomedicine* **2013**, *8*, 4721–4731. [[CrossRef](#)]
71. Kwon, J.A.; Yu, C.B.; Park, H.D. Bacteriocidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on *Bacillus cereus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **2003**, *37*, 61–65. [[CrossRef](#)]
72. Friedman, M.; Buick, R.; Elliott, C.T. Antibacterial activities of naturally occurring compounds against antibiotic-resistant *Bacillus cereus* vegetative cells and spores, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. *J. Food Prot.* **2004**, *67*, 1774–1778. [[CrossRef](#)]
73. Chorianopoulos, N.; Kalpoutzakis, E.; Aligiannis, N.; Mitaku, S.; Nychas, G.J.; Haroutounian, S.A. Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: Chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 8261–8267. [[CrossRef](#)]
74. Oke, F.; Aslim, B.; Ozturk, S.; Altundag, S. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chem.* **2009**, *112*, 874–879. [[CrossRef](#)]
75. Fisher, K.; Phillips, C.A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems. *J. Appl. Microbiol.* **2006**, *101*, 1232–1240. [[CrossRef](#)]
76. Singh, G.; Marimuthu, P.; Murali, H.S.; Bawa, A.S. Antioxidative and antibacterial potentials of essential oils and extracts isolated from various spice materials. *J. Food Saf.* **2005**, *25*, 130–145. [[CrossRef](#)]
77. Singh, S.; Das, S.S.; Singh, G.; Schuff, C.; de Lampasona, M.P.; Catalan, C.A. Composition, *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and oleoresins obtained from black cumin seeds (*Nigella sativa* L.). *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 918209. [[CrossRef](#)]
78. El Kolli, M.; Laouer, H.; El Kolli, H.; Akkal, S.; Sahli, F. Chemical analysis, antimicrobial and anti-oxidative properties of *Daucus gracilis* essential oil and its mechanism of action. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2016**, *6*, 8–15. [[CrossRef](#)]
79. Ultee, A.; Bennik, M.H.; Moezelaar, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 1561–1568. [[CrossRef](#)]
80. Ultee, A.; Gorris, L.G.; Smid, E.J. Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.* **1998**, *85*, 211–218. [[CrossRef](#)]
81. Ultee, A.; Kets, E.P.; Alberda, M.; Hoekstra, F.A.; Smid, E.J. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch. Microbiol.* **2000**, *174*, 233–238. [[CrossRef](#)]
82. Ultee, A.; Smid, E.J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *64*, 373–378. [[CrossRef](#)]
83. Marino, M.; Bersani, C.; Comi, G. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *J. Food Prot.* **1999**, *62*, 1017–1023. [[CrossRef](#)]
84. Moghaddam, M.; Mehdizadeh, L.; Mirzaei Najafgholi, H.; Ghasemi Pirbalouti, A. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of seed essential oil of *Ferulago angulata*. *Int. J. Food Prop.* **2018**, *21*, 158–170. [[CrossRef](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary Material

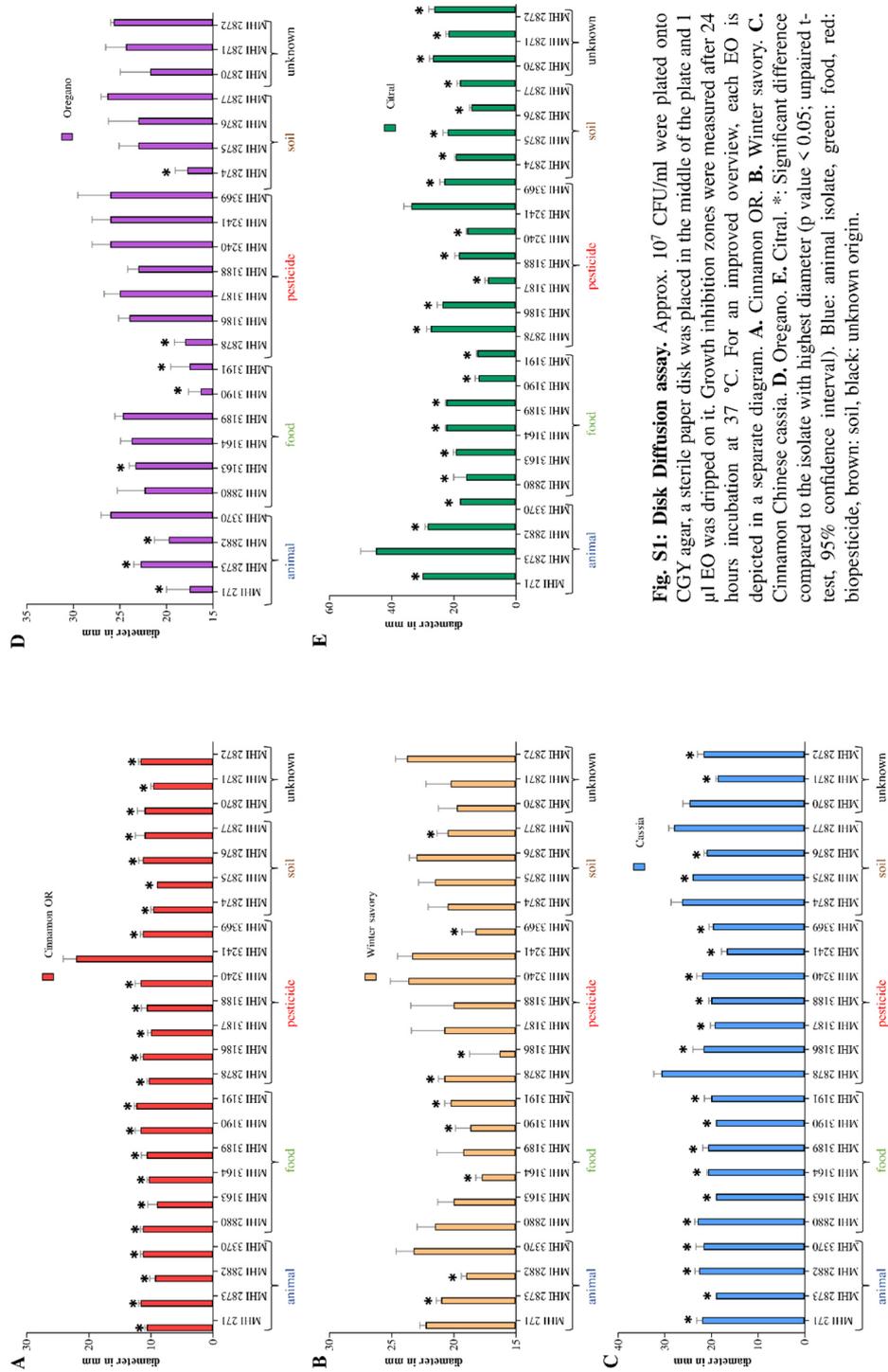


Fig. S1: Disk Diffusion assay. Approx. 10^7 CFU/ml were plated onto CGY agar, a sterile paper disk was placed in the middle of the plate and 1 μ l EO was dripped on it. Growth inhibition zones were measured after 24 hours incubation at 37 °C. For an improved overview, each EO is depicted in a separate diagram. **A.** Cinnamon OR. **B.** Winter savory. **C.** Cinnamon Chinese cassia. **D.** Oregano. **E.** Citral. *: Significant difference compared to the isolate with highest diameter (p value < 0.05; unpaired t-test, 95% confidence interval). Blue: animal isolate, green: food, red: biopesticide, brown: soil, black: unknown origin.

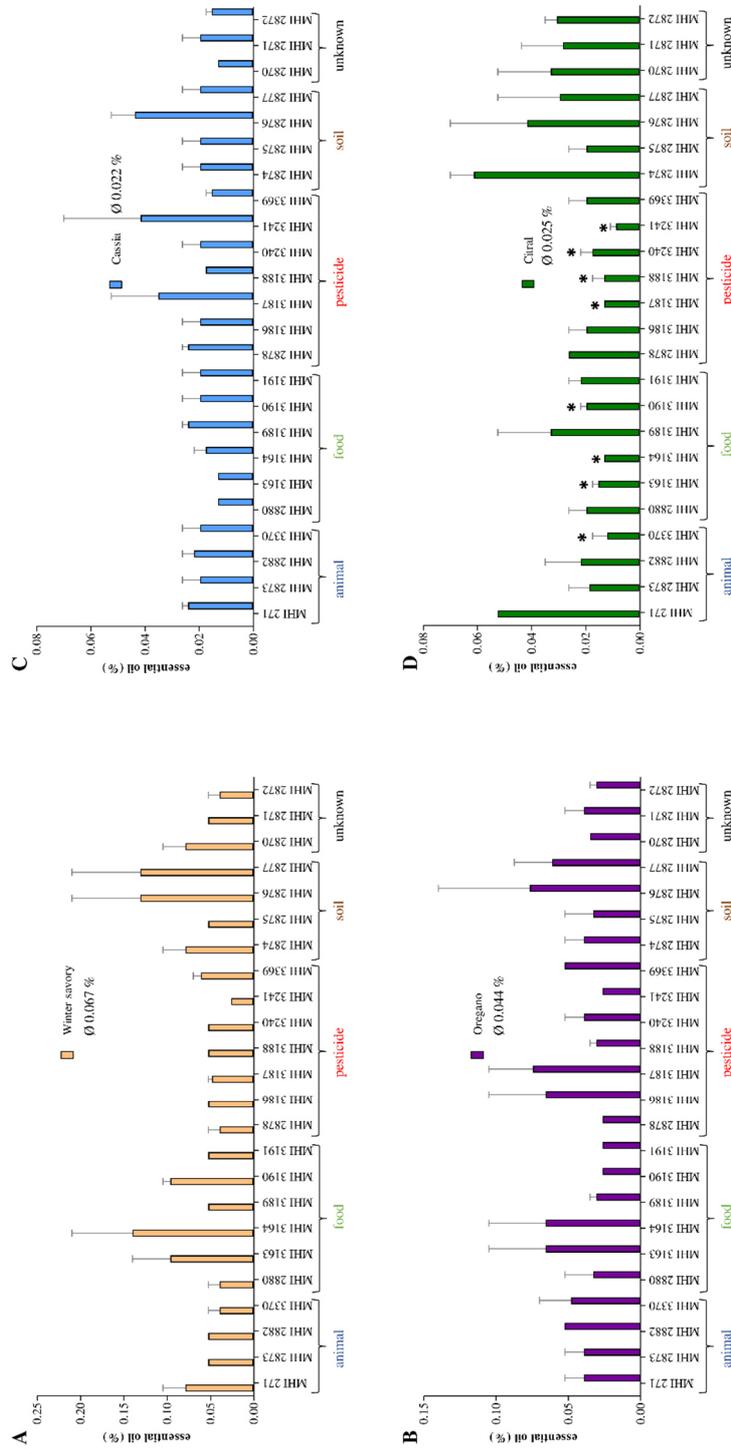


Fig. S2: Determination of minimal inhibitory concentrations (MICs) in antimicrobial broth dilution assays. For an improved overview, each EO is depicted in a separate diagram. A. Winter savory. B. Oregano. C. Cinnamon Chinese cassia. D. Citral. * : Significant difference compared to the isolate with highest MIC (p value < 0.05; unpaired t-test, 95% confidence interval). Blue: animal isolate, green: food, red: biopesticide, brown: soil, black: unknown origin.

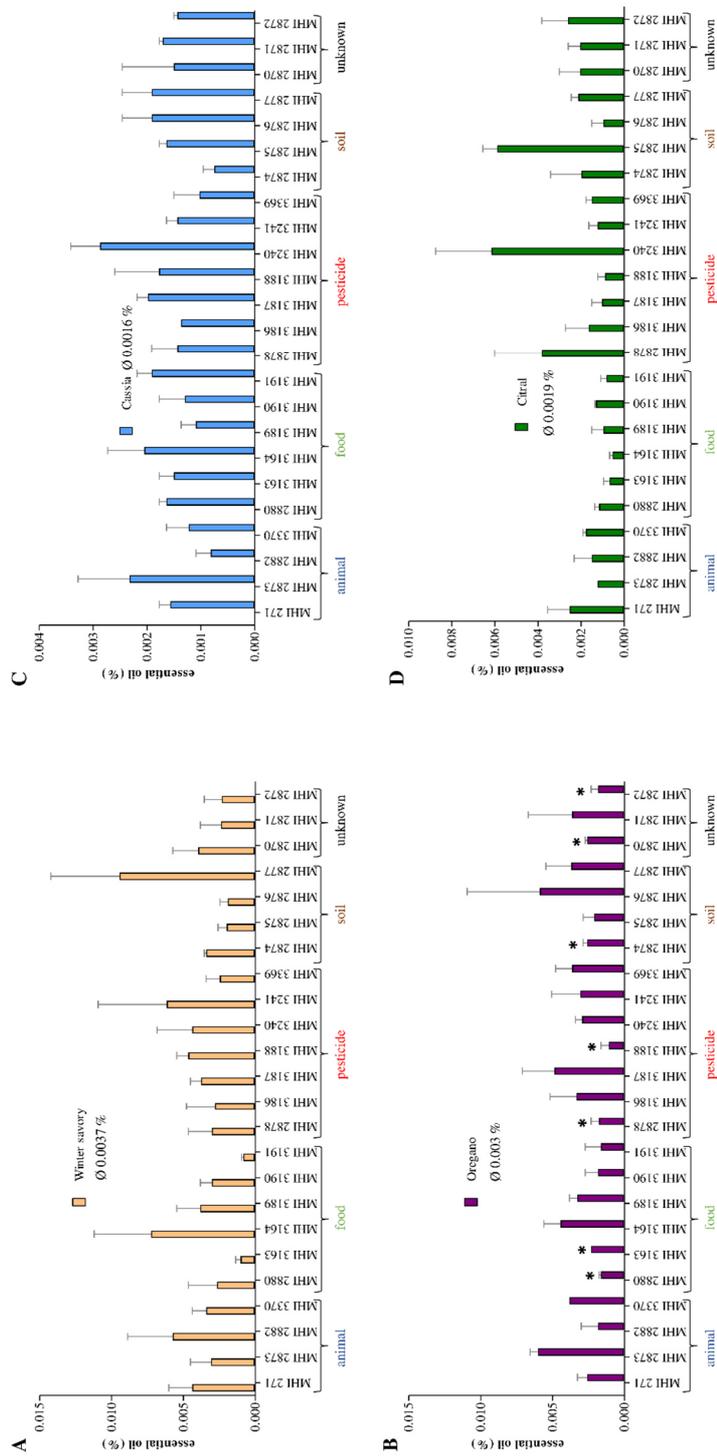


Fig. S3: Determination of maximal tolerated concentrations (MTCs) in antimicrobial broth dilution assays. For an improved overview, each EO is depicted in a separate diagram. **A.** Winter savory. **B.** Oregano. **C.** Cinnamon Chinese cassia. **D.** Citral. *: Significant difference compared to the isolate with highest MTC (p value < 0.05; unpaired t-test, 95% confidence interval). Blue: animal isolate, green: food, red: biopesticide, brown: soil, black: unknown origin.

Table S1: Primers used in this study.

Primer	Sequence 5' – 3'	Gene	Ta (°C)	Product (bp)	Reference
panC-fw	ATGAAAATCGTAACTACAGTGC	<i>panC</i>	50	849	-
panC-rev	TTATTTAACCGTTAATGTTATATTGTC				
cry1-un-fw	CATGATTCATGCGGCAGATAAAC	<i>cry1</i>	53	276	[24]
cry1-un-rev	TTGTGACA CTTCTGCTTCCCAAT				
cry2-un-fw	GTTATTCCTAATGCAGATGAATGGG	<i>cry2</i>	53	700	[24]
cry2-un-rev	CGGATAAAAATAATCTGGGAAATAGT				
cry3-un-fw	CGTTATCGCAGAGAGATGACATTAAC	<i>cry3</i>	55	600	[24]
cry3-un-rev	CATCTGTGTTTCTGGAGGCAAT				
cry4-un-fw	GCATATGATGTAGCGAAACAAGCC	<i>cry4</i>	55	439	[24]
cry4-un-rev	GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC				
cry7/8-un-fw	AAGCAGTGAATGCCTTGTTTAC	<i>cry7/8</i>	50	420	[24]
cry7/8-un-rev	CTTCTAAACCTT GACTACTT				
45c1	GAG GGG CAA ACA GAA GTG AA	<i>nheA</i>	49	186	[25]
45c2	TGC GAA CTT TTG ATG ATT CG				
L2aF	CGA AAA TTA GGT GCG CAA TC	<i>hblC</i>	49	411	[25]
L2aR	TAA TAT GCC TTG CGC AGT TG				
CesF1	GGT GAC ACA TTA TCA TAT AAG GTG	<i>ces</i>	49	1271	[25]
CesR2	GTA AGC GAA CCT GTC TGT AAC AACA				
F2	AAC AGA TAT CGG TCA AAA TGC	<i>cytK1</i>	49	623	[25]
R7	CGT GCA TCT GTT TCA TGA GG				
CK-F2	ACA GAT ATC GGT CAA AAT GC	<i>cytK2</i>	50	421	[26]
CK-R5	CAA GTT ACT TGA CCT GTT GC				

VI. DISKUSSION

1. Komplettierung und Anwendung eines umfassenden Risikobewertungsschemas für präsumtive *B. cereus* in Lebensmitteln

Das Risiko für den Verbraucher, das von Lebensmitteln ausgeht, die mit enteropathogenen *B. cereus* kontaminiert sind, ist schwer vorherzusagen. Dies liegt zum einen an der enormen Variabilität in der Enterotoxinproduktion verschiedener Isolate, zum anderen daran, dass eine Reihe weiterer Faktoren Einfluss auf den Verlauf dieser typischen Lebensmittelinfektion nimmt. Daher ist ein detailliertes Verständnis der einzelnen Schritte des multifaktoriellen Infektionsprozesses essentiell. Durch sein allgegenwärtiges Vorkommen in Böden, Staub, aber auch auf der Oberfläche von (Nutz-)Pflanzen ist ein Eintrag von *B. cereus* in die Lebensmittelkette nahezu unvermeidbar (Stenfors Arnesen et al., 2008). Die extrem resistenten Sporen (siehe 1.4.) widerstehen sowohl verschiedenen Umweltfaktoren, als auch Prozessen der Lebensmittelherstellung. Selbst hohe Temperaturen können Sporen nicht vollständig eliminieren, weshalb Konservierungsprozesse häufig unzureichend sind (Radmehr et al., 2020). *B. cereus* ist außerdem zur Biofilmbildung fähig, was die Wirksamkeit von Desinfektionsmaßnahmen einschränkt (Ryu und Beuchat, 2005). *B. cereus* zeigt Wachstum in einem großen Temperaturbereich, von ca. 7 °C bis 50 °C, und ebenso bei pH-Werten zwischen ca. 4,6-7,5 (Guinebretière et al., 2008, Carlin et al., 2013). Dies ermöglicht das Überleben in einer Bandbreite an Lebensmitteln und während unterschiedlicher Prozessstufen und Lagerungsbedingungen in der Lebensmittelkette. Die beschriebene Problematik kann mitunter hohe wirtschaftliche Einbußen nach sich ziehen. Das im Rahmen dieser Arbeit vervollständigte Risikobewertungsschema stellt einen umfassenden und präzisen Leitfaden zur Beurteilung von neuen *B. cereus s. l.* Isolaten dar. Durch die korrekte Kategorisierung der Stämme können zum einen hoch risikobehaftete Lebensmittel identifiziert werden und Chargen gesperrt werden, zum anderen Produkte, die mit geringen Mengen oder nachweislich apathogenen *B. cereus* kontaminiert sind, freigegeben werden, was weitere wirtschaftliche Verluste minimiert (siehe Publikation I).

In der Routinediagnostik findet grundsätzlich keine Unterscheidung der Vertreter

der *B. cereus* Gruppe statt (ISO, 2004, Ehling-Schulz und Messelhäusser, 2013), weshalb eine Einschätzung des Beitrags von *B. thuringiensis* zu lebensmittelassoziierten Ausbrüchen momentan nicht gegeben werden kann. Aufgrund der engen Verwandtschaft der Spezies (siehe 1.1.) kann davon ausgegangen werden, dass das von uns etablierte Risikobewertungsschema nicht nur für *B. cereus* s. s., sondern auch für weitere Mitglieder der *B. cereus* Gruppe angewandt werden kann. Auch das Gefährdungspotential der hoch umstrittenen *B. thuringiensis* Isolate, welche Hauptgegenstand dieser Arbeit sind, kann durch dieses Testsystem eingeschätzt werden. Da nur die Enterotoxine, die von viablen, vegetativen Bakterien im Darm produziert werden, zum Krankheitsgeschehen beitragen, flossen viele einzelne Schritte dieser „Toxiko-Infektion“ in die Risikobewertung mit ein. Diese ist in Abbildung 2 zusammengefasst (siehe auch Publikation I, Tabelle 3 und Tabelle 4).

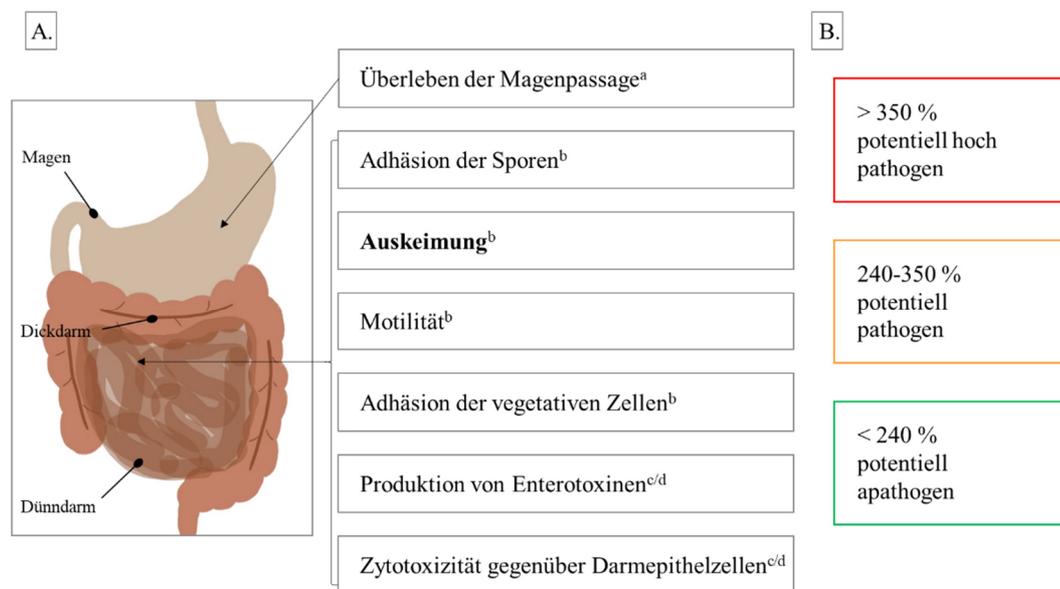


Abbildung 2: Umfassendes Risikobewertungsschema für enteropathogene *B. cereus*. **A.** Berücksichtigung des gesamten Infektionsprozesses in der Risikobewertung. Die Bewertung des Auskeimungsvermögens wurde im Rahmen dieser Arbeit vorgenommen. Insgesamt werden das Überleben von Sporen im Magensaft, deren Adhäsion an Darmepithelzellen, deren Auskeimungsvermögen, Motilität und Adhäsion von vegetativen Zellen in das Bewertungsschema mit einbezogen. Außerdem wird die Produktion der Toxinkomponente NheB im Vollmedium und unter simulierten intestinalen Bedingungen ermittelt, sowie die toxische Aktivität der Zellkulturüberstände gegenüber CaCo-2 Zellen. Der Stamm mit dem jeweils höchsten Ergebnis wird gleich 100 % gesetzt, alle anderen daran angepasst. **B.** Nach Addition aller Prozentpunkte lassen sich die Isolate in drei Kategorien einteilen- potentiell hoch pathogen, pathogen und apathogen. ^a Da Riolo et al., 2018., ^b Publikation I., ^c Jessberger et al., 2015., ^d Jessberger et al., 2017.

Am Beginn des Infektionsprozesses steht das Überleben von *B. cereus* Sporen in der Magenpassage, welches stammspezifisch stark variiert. Außerdem können sich verschiedene Lebensmittel schützend auf *B. cereus* Sporen im Magen auswirken. Die Art des Lebensmittels beeinflusst nicht nur die Anzahl der Bakterien im Magen-Darm-Trakt, sondern später auch die zytotoxischen Eigenschaften der Enterotoxine (Da Rioli et al., 2018). *B. cereus* Sporen müssen sich nicht nur niedrigen und wechselnden pH Milieus stellen, die Interaktion mit Mikroorganismen des Gastrointestinaltrakts, sowie der Einfluss von Verdauungsenzymen und vieler weiterer Wirtsfaktoren müssen in die Evaluierung der Widerstandsfähigkeit, und somit der Enteropathogenität der einzelnen Stämme einbezogen werden (Ceuppens et al., 2012, Berthold-Pluta et al., 2015).

Ein weiterer essentieller Bestandteil für die Ausbildung der Lebensmittelinfektion ist die Auskeimung der *B. cereus* Sporen im Darm. Da die experimentelle Untersuchung des Auskeimungsverhaltens Gegenstand dieser Arbeit war, wird dieses im Folgenden detailliert diskutiert. Grundsätzlich waren die Sporen nahezu aller getesteter *B. cereus* Stämme in der Lage auszukeimen, wobei starke stammspezifische Unterschiede beobachtet wurden. In CGY (Casein-Glucose-Hefe) Medium zeigten sich nach 20 Minuten Auskeimungsraten von 0 % (Fäzesisolat RIVM Bc 90) bis 45 % (Ausbruchsisolat F528/94). Diese starke Variabilität im Auskeimungsverhalten zwischen den getesteten Stämmen kann in der Sensitivität und der Anzahl von Auskeimungsrezeptoren an der Bakterienoberfläche begründet sein, die spezifisch für Signalmoleküle wie Inosin und L-Alanin sind (Broussolle et al., 2008). Um das Auskeimungsverhalten unter simulierten intestinalen Bedingungen zu testen, wurden die Sporen in RPMI 1640-Zellkulturmedium gegeben, welches zusätzlich mit der humanen Colonkarzinom-Zelllinie CaCo-2 vorinkubiert wurde. Außerdem wurde ein Zellkultur-Inkubator (37 °C, 7 % CO₂) gewählt, und die Sporen zuvor für 10 Minuten bei 80 °C erhitzt. Dies aktiviert zum einen die Auskeimung und simuliert zum anderen auch ein Wiederaufwärmen kontaminierter Nahrung kurz vor dem Verzehr. Auch unter diesen Bedingungen zeigte sich eine stammspezifische Auskeimung mit Raten von ca. 2 bis 30 %. Besonders interessant war der Vergleich zwischen CaCo-2-vorinkubiertem/ „konditioniertem“ und „nicht konditioniertem“ RPMI 1640 Medium, bei sonst gleichbleibenden Inkubationsbedingungen. Hierbei zeigte sich eine Steigerung der Auskeimung durch den vorherigen Kontakt des Mediums mit

CaCo-2 Zellen. Es kann also geschlussfolgert werden, dass sekretierte Faktoren dieser Zelllinie die Sporen beeinflussen und die Auskeimung aktivieren. Ähnliches beobachteten bereits Wijnands et al. (2007). Zudem konnten sie feststellen, dass die Auskeimungs-aktivierenden Komponenten, die von CaCo-2 Zellen sekretiert werden, sehr klein, hitze- und proteolysestabil sind, sowie vermutlich durch die Sporen gebunden oder inaktiviert werden (Wijnands et al., 2007). Es wird vermutet, dass es sich bei den sekretierten Molekülen um Aminosäuren oder Purine handelt (Hornstra et al., 2009). Durch weitere, vergleichende Untersuchungen mit HEP-2 Zellen (Larynxkarzinomzellen) kamen Wijnands et al. allerdings zu dem Schluss, dass eine Auslösung der Sporenauskeimung nicht generell von epithelialen Zelllinien zu erwarten ist (Wijnands et al., 2007). Trotz der detaillierten Experimente in der Zellkultur bleibt das Auskeimungsverhalten der Sporen unter den tatsächlich gegebenen Bedingungen im Gastrointestinaltrakt schwer vorherzusagen, da beispielweise auch Lebensmittelinhaltsstoffe Einfluss auf die Auskeimung nehmen können.

Liegen vegetative *B. cereus* im Darm vor, ist ein weiterer wichtiger Faktor zur Besiedelung des Wirts ihre Fähigkeit zur aktiven Bewegung. Diese wird auch als „*swimming*“ bezeichnet, wohingegen „*swarming*“ (kooperative Bewegung, Differenzierung zu Schwarmzellen) eher im Bereich der Biofilmbildung eine Rolle spielt (Senesi et al., 2010, Mazzantini et al., 2016). Zur Fortbewegung werden Flagellen genutzt, welche sich aus verschiedenen Proteinen, unter anderem Flagellin, zusammensetzen. Ihr Beitrag zur Adhäsion von *B. cereus* an Darneptihelzellen und letztendlich zur akuten Infektion wurde ebenfalls nachgewiesen (Gao et al., 2020). So stellt auch die Verweildauer im Darmtrakt, welche maßgeblich durch die Adhäsionsfähigkeit der Bakterien beeinflusst wird, einen entscheidenden Faktor zur Enteropathogenität dar (Stones und Krachler, 2016). Außerdem wurden neben Flagellin auch S-Layer Komponenten und Proteasen als Adhäsionsfaktoren identifiziert, sie binden an Muzin oder Fibronectin (Sánchez et al., 2009). Wenngleich alle beschriebenen Elemente entscheidend für den Ausbruch der Krankheit sind, kommt dem Grad der Kontamination, sowie dem Ausmaß der Enterotoxinproduktion im Darm die wichtigste Rolle zu (Wijnands et al., 2006). Die Haupttoxine Nhe, Hbl und CytK sind in den Kapiteln 1.3.1. bis 1.3.3. ausführlich beschrieben.

Mit dem erarbeiteten, vollständigen Risikobewertungsschema können neue *B.*

cereus Isolate präzise und zuverlässig eingeordnet werden. Hierfür wurden alle oben beschriebenen Parameter für ein ausgewähltes Set an 20 enteropathogenen und apathogenen Stämmen vergleichend getestet. Dem Stamm mit dem jeweils höchsten Ergebnis je Test wurden 100 Prozentpunkte zugeordnet, alle übrigen daran angepasst. Anschließend erfolgte die Addition aller Prozentpunkte und die darauffolgende Einteilung in drei Kategorien. Lebensmittelisolate können durch dieses Testsystem sicher in hoch (> 350 Prozentpunkte), mittel (240-350 Prozentpunkte) und gering (< 240 Prozentpunkte) pathogen eingestuft werden (siehe Abb. 2). Hervorzuheben ist, dass auch andere Vertreter der *B. cereus* Gruppe, wie beispielsweise *B. thuringiensis*, in diesem System sicher beurteilt werden können.

2. Vor- und Nachteile von *B. thuringiensis* in der biologischen Schädlingsbekämpfung

B. thuringiensis Präparate bieten im Einsatz gegen Schädlinge in der Land- und Forstwirtschaft eine wirksame Alternative gegenüber chemischen Pestiziden. Diese werden vom Verbraucher häufig mit Kontamination und Verschmutzung der Umwelt, Beeinflussung und Schädigung von Organismen, welche nicht Ziel der Applikation sind, und Risiken für die Lebensmittelsicherheit und Gesundheit assoziiert (Kim et al., 2017b, Main et al., 2018). Ähnlich wie chemische Pestizide weisen *B. thuringiensis* Präparate einen schnellen Wirkeintritt auf, können mit niedrigem Kostenaufwand produziert werden und besitzen eine lange Haltbarkeit. Durch ihre selektive und spezifische Wirkungsweise sind sie ferner dem breiten Wirkspektrum chemischer Pflanzenschutzmittel vorzuziehen (Lacey et al., 2015).

Der größte Vorteil bei der Anwendung der *B. thuringiensis*-basierten Pestizide liegt in der hohen Spezifität. Die Wirkungsweise schließt Solubilisierung sowie Aktivierung der Toxine im Insektendarm und Bindung an spezifische Rezeptoren ein (siehe 2.2.1. und 2.2.2.), was die Aktivität auf bestimmte Ordnungen von Insekten beschränkt (EFSA, 2016b). Der Selektionsdruck durch unterschiedliche, physiologische Wirtsfaktoren, welche bei der Wirkungskaskade der Cry und Cyt Toxine eine Rolle spielen, könnte unter anderem zu der großen Vielfalt und Spezifität dieser Toxine geführt haben (de Maagd et al., 2003, Palma et al., 2014). Auch die Wirkung der Vip Proteine ist abhängig von der Bindung an spezifische

Rezeptoren der Darmoberfläche, weshalb Spezies bestimmter Ordnungen wie Coleoptera, Hemiptera und Lepidoptera besonders anfällig sind (Chakroun et al., 2016). *B. thuringiensis* Stämme, welche Sip Proteine sekretieren, sind spezifisch toxisch für Coleoptera Larven (Donovan et al., 2006, Sha et al., 2018).

Doch nicht nur die Land- und Forstwirtschaft profitiert von den Eigenschaften der mikrobiellen Pestizide, *B. thuringiensis* ist ebenso für den medizinischen Sektor von Relevanz. In Bezug auf vektorübertragene Krankheiten, für die weder eine geeignete Behandlung noch ein Impfstoff vorhanden ist, ist die Reduktion der Krankheitsüberträger die einzige Methode zur Eindämmung von Ausbrüchen (Setha et al., 2016). In einer Studie aus dem Jahr 2016 wurde der Einsatz von *B. thuringiensis* spp. *israelensis* (Stamm AM 65-52) und dessen Einfluss auf die Übertragung des Dengue Fiebers durch *Aedes aegypti* analysiert. Die Anwendung der Biopestizide in zwei Zyklen konnte die Übertragung deutlich verringern (Setha et al., 2016). Die Bekämpfung von *A. aegypti* durch *B. thuringiensis* ist auch bei der Prävention von Ausbreitungen des Chikungunya und Zika Virus von Bedeutung (Pruszyński et al., 2017). Eine neuere Studie konnte belegen, dass Malaria Vektoren durch die biologischen Larvizide stark reduziert wurden (Dambach et al., 2020). Besonders Länder, deren Wasserversorgung von Wasserspeichern abhängig ist, müssen regelmäßig Präventionsmaßnahmen durchführen, um eine Eliminierung der verschiedenen Entwicklungsstadien der Vektoren zu gewährleisten (Setha et al., 2016).

Kontrollprogramme ergaben eine bemerkenswerte Sicherheitsbilanz der *B. thuringiensis* Insektizide und stuften die Produkte als umweltfreundlich ein (Siegel, 2001). Eine Studie aus dem Jahr 2006 untersuchte die Überlebensfähigkeit, die Auskeimung und die Kolonisierung von *B. thuringiensis* Biopestizidstämmen in HFA (*human-flora-associated*) Ratten und kam zu dem Schluss, dass keine schwerwiegenden Gesundheitsprobleme durch die Pestizide auftraten (Wilcks et al., 2006). Autoren der EFSA erklärten kürzlich, dass medizinische Daten der Präparate, welche *B. thuringiensis* spp. *israelensis* (serotype H-14) AM65-52, *B. thuringiensis* spp. *kurstaki* SA-12 und SA-11, sowie *B. thuringiensis* spp. *aizawai* ABTS-1857 und GC-91 enthalten, keine Hinweise auf negative Auswirkungen auf Personen während der Prozesskette (Entwicklung, Herstellung, Zubereitung, Feldanwendung) enthielten (Anastassiadou et al., 2020a, 2020b, 2020c, 2020d, 2020e).

Mitte der 1990er Jahre wurden außerdem die ersten transgenen *B. thuringiensis* Nutzpflanzen hergestellt, welche zunächst *cry* (Llewellyn et al., 1994), später aber auch *vip* Gene trugen (Pradhan et al., 2016). Diese Entwicklung hatte primär die Reduktion des Einsatzes konventioneller Pestizide zur Folge und reduzierte zudem den Schaden an anderen Organismen (Huang et al., 2005, Cattaneo et al., 2006, Marvier et al., 2007). Weltweit sind wirtschaftlich bedeutsame, genetisch modifizierte Nutzpflanzen wie Mais, Baumwolle, aber auch Sojabohnen und Reis zugelassen und verhindern durch ihre Resistenz Schäden und Ausfälle durch Coleoptera, Hemiptera und Lepidoptera (Xiao und Wu, 2019). In Europa ist derzeit eine gentechnisch veränderte Pflanze, die Bt-Maislinie MON810, zum Anbau zugelassen. In Deutschland wurde allerdings 2009, unter Berufung auf die so genannte Schutzklausel, der Anbau dieser Pflanzensorte verboten (Consmüller et al., 2010).

Trotz aller genannten Vorteile lässt vor allem die nahe genetische Verwandtschaft zwischen *B. thuringiensis* und *B. cereus* den hohen Einsatz eines potentiell schädlichen Bakteriums fragwürdig erscheinen. Durch 16S rRNA Analysen konnte eine Gensequenzübereinstimmung von über 99 % festgestellt werden (Ash et al., 1991), weshalb sich die Identifizierung und die taxonomische Einteilung als sehr komplex erweist (siehe 1.1.).

Wie bereits erläutert ist die Spezifität der insektiziden Toxine sehr hoch, doch kommerzielle Biopestizide setzen sich meist aus einer Mischung aus Toxinen und getrockneten *B. thuringiensis* Sporen zusammen (EFSA, 2016b). Es bleibt zu klären, ob die Vorteile der Präparate schwerer wiegen als ihre möglichen Auswirkungen auf die Lebensmittelsicherheit. Wahrscheinlich ist, dass durch den extensiven Einsatz der Präparate die Dunkelziffer der durch *B. thuringiensis* ausgelösten lebensmittelassoziierten Krankheitsausbrüche weitaus höher ist als bisher angenommen (EFSA, 2016b). Diagnostisch werden im Lebensmittelsektor nach internationalem Standard (ISO 7932:2004) mittels Selektivmedien und Auszählung der Kolonien präsumtive *B. cereus* nachgewiesen (ISO, 2004, Ehling-Schulz und Messelhäusser, 2013). Eine Unterscheidung der Mitglieder der *B. cereus* Gruppe ist mit diesen Methoden nicht sicher möglich (Märtlbauer und Becker, 2016). Der Ausschuss der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit empfahl deshalb, in der Routinediagnostik Differenzierungsmethoden einzuführen (EFSA, 2016b). Eine unkomplizierte und

schnelle Methode zur Unterscheidung ist durch Phasenkontrastmikroskopie möglich, doch dies erfordert ein geschultes Auge, um kristalline Einschlüsse (*B. thuringiensis*) zweifelsfrei von anderen Bestandteilen zu differenzieren (EFSA, 2016b).

Lebensmittelinfektionen, welche mit *B. cereus s. l.* in Zusammenhang stehen, werden meist mit Konzentrationen von über 10^5 KBE/g assoziiert (EFSA, 2016b), allerdings sind auch Ausbrüche mit weitaus niedrigerer Keimbelastung, teilweise unter 10^3 KBE/g, dokumentiert (Glasset et al., 2016). Kommerzielle *B. thuringiensis* Präparate, die bis zum Beginn der Ernte eingesetzt werden dürfen (Lacey et al., 2015), weisen Sporenkonzentrationen von bis zu $6,4 \times 10^{10}$ KBE/g (EFSA, 2016a) auf, um eine ausreichende Wirksamkeit zu ermöglichen. Es ist kaum möglich, Schlussfolgerungen über den Verbleib der Sporen oder vegetativen *B. thuringiensis* auf Pflanzen oder in den Produkten zu ziehen, da das Schicksal der Sporen nach dem Auftragen von einer Vielzahl an Faktoren (Wetterbedingungen, Temperaturen, UV-Strahlung, Art der Kultivierung und Prozessierung etc.) abhängt (EFSA, 2016b). Eine Studie aus dem Jahr 2020 untersuchte die Prävalenz von *B. cereus s. l.* auf Paprika und Tomaten, wobei *B. thuringiensis* 93 % und 99 % der Isolate ausmachte. Die Autoren stellten dar, dass nicht selten Koloniezahlen von 10^3 - 10^4 KBE/g erreicht wurden, einige Proben lagen in einem Bereich, der als kritisch für die Lebensmittelsicherheit betrachtet werden kann (über 10^5 KBE/g). Außerdem konnten MLST Analysen die Isolate nicht eindeutig von Biopestizidstämmen unterscheiden (Frentzel et al., 2020).

B. cereus Stämme variieren sehr stark in ihrem toxischen Potential (Jessberger et al., 2015), weshalb zur exakten Einschätzung komplexe Analyseschemata herangezogen werden müssen. Eine ähnliche Herangehensweise ist zur Beurteilung von *B. thuringiensis* erforderlich. In dieser Arbeit wurden 24 *B. thuringiensis* Stämme auf ihr toxisches und enteropathogenes Potential untersucht. Dabei wurden Isolate aus Lebensmittelproben, Bodenproben, Biopestiziden, sowie tierischen und unbekanntem Ursprungs systematisch untersucht. Die phylogenetische Beziehung wurde anhand von DNA-Sequenzhomologien des *panC* Gens ermittelt, zudem wurde das Vorkommen von Enterotoxigenen, Wachstum und Enterotoxinproduktion unter simulierten Darmbedingungen, zytotoxische Aktivität, Auskeimungsvermögen und Motilität untersucht.

Alle Isolate in dieser Studie wurden dem *panC* Typ IV zugeordnet, was mit anderen

Arbeiten übereinstimmt (Johler et al., 2018). Dort kamen die Autoren zu dem Schluss, dass die enge genetische Verwandtschaft zwischen den Isolaten auf ein Vorkommen von Biopestizidstämmen in Lebensmitteln hindeutet. Wenngleich das Risiko zur Auslösung einer Lebensmittelinfektion für Stämme mit *panC* Typ III am höchsten eingeschätzt wurde (Guinebretière et al., 2010), konnten Typ IV Stämme mit Ausbrüchen in Verbindung gebracht werden (Guinebretière et al., 2008, Jessberger et al., 2015). Aus diesen Gründen sollten Mitglieder dieser Gruppe in der Risikobewertung eine besondere Berücksichtigung finden.

Die Präsenz der Enterotoxingene bietet eine erste Einschätzung des pathogenen Potentials der *B. thuringiensis* Isolate. Die Gene sind chromosomal kodiert und eine Unterscheidung von *B. cereus* ist deshalb auf chromosomaler Ebene kaum möglich (EFSA, 2016b). Für alle 24 Isolate konnte ein Nachweis für *hblC* und *nheA* erbracht werden, was mit Resultaten anderer Studien übereinstimmt (Kim et al., 2014, Kim et al., 2017a). Diese Autoren konnten zudem eine Prävalenz von bis zu 100 % für *hblD*, *hblA*, *nheB* und *nheC* in den getesteten *B. thuringiensis* Stämmen nachweisen (Kim et al., 2014, Kim et al., 2017a). Erwartungsgemäß wies keiner der hier untersuchten *B. thuringiensis* Stämme *cytK1* auf, wohingegen *cytK2* in 92 % nachgewiesen wurde. Die ermittelte (*cytK2*) Prävalenz erscheint im Vergleich zu den Daten früherer Studien relativ hoch (Kovac et al., 2016, Kim et al., 2017a). Im Gegensatz dazu wurde in einer weiteren Arbeit, welche ebenso *B. thuringiensis* Stämme vielfältiger Ursprungsorte analysierte, eine ähnliche Prävalenz festgestellt (Johler et al., 2018). Interessanterweise besitzen *B. cereus s. l.* Stämme, welche *panC* Typ IV zugeordnet sind, besonders häufig *cytK* (Johler et al., 2018, Miller et al., 2018).

Enterotoxingene scheinen, unabhängig des Ursprunges der Isolate (inklusive Biopestizidstämmen, Isolaten aus Lebensmitteln und Bodenproben), regelmäßig in *B. thuringiensis* vorzukommen, folglich ist die genetische Voraussetzung zur Auslösung einer *B. cereus*-ähnlichen Infektion vorhanden. Zur Einschätzung des Risikopotentials sind allerdings weitere Charakterisierungsmethoden unbedingt nötig. In dieser Arbeit wurde besonders darauf Wert gelegt, das Stammset unter simulierten Darmbedingungen zu analysieren, da Wirtsfaktoren und Darmparameter eine entscheidende Rolle für die Enteropathogenität darstellen (Jessberger et al., 2017). Stämme, welche ein besonders gutes Auskeimungsvermögen, vor allem unter dem Einfluss von Faktoren des

Gastrointestinaltrakts aufweisen, können mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zur Auslösung des Diarrhö-Syndroms führen. Die untersuchten Stämme zeigten sich in ihrer Fähigkeit zur Auskeimung sehr variabel. Bis auf zwei Isolate konnten alle in nährstoffreichem Medium auskeimen. Der größte Anteil der Isolate (42 %) keimte dabei besonders unter vorheriger Hitzeaktivierung aus. Einige Stämme wiesen auch deutliche Auskeimung unter simulierten Darmbedingungen auf, wobei Stamm MHI 3370 (isoliert aus Mehlmotten-Larven) mit 32 % am deutlichsten auskeimte. Auch kommerziell erhältliche Biopestizidisolate keimten unter simulierten intestinalen Bedingungen aus. Dies steht in Kontrast zu den Resultaten eines anderen Autors, der die Sicherheit dieser Biopestizidstämme vertritt (Zommick, 2018). In der Arbeit, die bislang nur als Konferenzbeitrag veröffentlicht wurde, werden Überleben, sowie Auskeimung und Adhäsion von zwei kommerziell verwendeten Biopestizidstämmen im SHIME® System (*Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem*) getestet. Beide schneiden im Vergleich zum *B. cereus* Referenzstamm ATCC 14579 gut ab und werden als dementsprechend harmlos dargestellt. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Rahmenbedingungen und angewandten Methoden lassen sich die beiden Studien allerdings nur schwer miteinander vergleichen. Nichtsdestotrotz werden auch hier in verschiedenen Darmabschnitten zwischen 10^4 - 10^5 KBE/ml überlebende Bakterien, inklusive ausgekeimter Sporen, verzeichnet (Zommick, 2018).

Die Fähigkeit zur aktiven Fortbewegung stellt, wie bereits erwähnt, einen wichtigen Mechanismus der Pathogenese dar. Außerdem steht die Motilität in Zusammenhang mit Adhäsion und der Enterotoxinproduktion, wodurch ihre Bedeutung als Virulenzfaktor bekräftigt wird (Ghelardi et al., 2007, Salvetti et al., 2007, Senesi et al., 2010, Mazzantini et al., 2016). Eine Studie aus dem Jahr 2005 untersuchte den Einfluss der Motilität von *B. thuringiensis* auf die Entwicklung einer Endophthalmitis. Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust der Retinafunktion in nicht-motilen Stämmen, verglichen mit dem Wildtyp-Stamm, signifikant reduziert ist und die Fähigkeit zur Migration zur Pathogenese beiträgt (Callegan et al., 2005). Das vorliegende Stammset wurde auf „swimming“ (CGY Platten mit 0,25 % Agar, Inkubation bei 37 °C über 24 h) untersucht, bei dieser Form der Motilität bewegen sich die Bakterien individuell in flüssigen Medien fort (Senesi et al., 2010). Ebenso wie beim Auskeimungsvermögen wurde bei der Auswertung der Motilität eine stammspezifische Ausprägung der Fähigkeit festgestellt. Sechs der Isolate zeigten

eine sehr hohe Motilität und erreichten nach 24 h den maximalen Plattendurchmesser. Unter diesen waren auch drei Biopestizidisolat.

Dennoch bleibt der entscheidende Schritt zur Auslösung des Diarrhö-Syndroms das Wachstum der Bakterien und die damit einhergehende Produktion von Enterotoxinen im menschlichen Darmtrakt. Unter den simulierten Darmbedingungen, die in dieser Arbeit angewendet wurden, waren alle 24 *B. thuringiensis* Isolate, inklusive der Biopestizidstämme, dazu fähig zu wachsen. Zudem konnte mittels ELISA der Nachweis für die Produktion der Enterotoxin-Komponenten NheB und Hbl L2 erbracht werden. Bei der Anwendung eines *B. cereus*-Klassifizierungsschemas für NheB Produktion unter simulierten Darmbedingungen (reziproke Titer im ELISA, Jessberger et al., 2017) konnte acht *B. thuringiensis* Stämmen eine geringe, ebenso vielen eine mittlere und hohe Toxinproduktion zugeschrieben werden. Fünf der Stämme, welche eine geringere Produktion im ELISA aufwiesen, waren Biopestizidisolat. Allerdings wurden diese nach den Resultaten des WST-1 Zellkulturassays (reziproke Titer, Jessberger et al., 2017) als mittel und sogar hoch toxisch eingestuft. Generell wurde die Mehrheit der Stämme aufgrund ihrer biologischen Aktivität im CaCo-2 Zellkulturtest als mittel und hoch toxisch klassifiziert, mit Ausnahme von MHI 2870 und des Biopestizidisolats MHI 3241. Gaviria Rivera et al. stellten eine ähnliche Toxizität von *B. thuringiensis* gegenüber Vero-Zellen fest, wie es auch auf *B. cereus* Stämme zutraf, die aus Lebensmittelinfektionen isoliert worden waren (Gaviria Rivera et al., 2000). Allerdings erscheint der Einsatz der humanen Colonkarzinom-Zelllinie CaCo-2 zur Evaluierung des enteropathogenen Potentials besser geeignet als die standardmäßig verwendeten Vero-Zellen. Die Produktion und Sekretion von Enterotoxinen durch *B. thuringiensis* konnte schon vielfach mittels ELISA nachgewiesen werden, allerdings vergleichen bislang wenige Studien diese mit deren zytotoxischer Aktivität in Zellkulturassays (Damgaard, 1995, Gaviria Rivera et al., 2000, Kim et al., 2014). Die in dieser Arbeit untersuchten *B. thuringiensis* Stämme zeigten sich bezüglich ihrer Enterotoxinproduktion und der gemessenen Zytotoxizität zum einen sehr variabel. Zum anderen konnte in keinem der angewandten Tests eindeutig zwischen Biopestizidisolaten und anderen Isolaten unterschieden werden. Die zytotoxische Aktivität entsprach im Allgemeinen durchaus der von bekannten enteropathogenen *B. cereus* Isolaten.

Nach den hier dargestellten Ausführungen halten sich die Vor- und Nachteile der Verwendung von *B. thuringiensis* in der biologischen Schädlingsbekämpfung die Waage. *B. thuringiensis* ist aufgrund seiner vielen Vorteile und der unterschiedlichen Anwendungsmöglichkeiten aus der Land- und Forstwirtschaft nicht mehr wegzudenken. Andererseits gibt es ein berechtigtes Sicherheitsrisiko für den Verbraucher. Daher muss zum einen in der Diagnostik genau zwischen *B. thuringiensis* und *B. cereus* differenziert werden und zum anderen müssen Gesamtgenomsequenzen und eindeutige (genetische) Marker für die Biopestizidstämme zugänglich sein, um sie im Verdachtsfall als Erreger gastrointestinaler Erkrankungen ausschließen zu können.

3. Pflanzenextrakte als alternative antimikrobielle Substanzen

Der zweite Teil der Arbeiten zu *B. thuringiensis* bezog sich auf die Reduktion der Keime durch den Einsatz von Pflanzenextrakten. Aufgrund zunehmender Entwicklung von Antibiotikaresistenzen steigt die Nachfrage nach alternativen antimikrobiellen Stoffen. Außerdem wird der Verbraucherwunsch nach reduziertem Einsatz chemischer Substanzen in der Lebensmittelproduktion immer deutlicher (Calo et al., 2015).

Im Gegensatz zu *B. cereus* beschäftigten sich weniger Studien mit der Sensitivität von *B. thuringiensis* gegenüber pflanzlichen Extrakten (Marino et al., 1999, Moghaddam et al., 2018). *B. cereus* kann beispielsweise durch die Essenzen von *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Ceylon Zimtbaum) und *Coriandrum sativum* (Echter Koriander) inhibiert werden (Matasyoh et al., 2009, Unlu et al., 2010). Eine neuere Studie konnte eine Wachstumshemmung von *B. cereus* (LSPQ 2872) durch den Extrakt von *Thymus vulgaris* (Echter Thymian) nachweisen (Ayari et al., 2020). Die antibakterielle Aktivität dieses Öls wurde auch für *B. thuringiensis* gezeigt (Marino et al., 1999), was in Kontrast zu den Ergebnissen dieser Arbeit steht, in der keiner der ausgewählten Stämme durch diesen pflanzlichen Extrakt im Wachstum gehemmt wurde. Dies verdeutlicht wiederum die großen spezies- und vor allem stammspezifischen Unterschiede, die bereits in den anderen Tests ersichtlich wurden. Anhand der MIC und MTC Werte, die in dieser Arbeit ermittelt wurden, kann darauf geschlossen werden, dass trotz stammspezifischer Unterschiede das

Öl des Cassia-Zimtes die stärkste antimikrobielle Wirkung gegenüber der getesteten *B. thuringiensis* Isolate aufweist, gefolgt von Zitrusöl (pure Zitralform; isoliert aus Zitronengras), Oregano und zuletzt Winterbohlenkraut. Für die untersuchten *B. thuringiensis* Isolate ergab sich eine ähnliche Effektivitätsskala bezüglich der MIC Werte wie für *B. cereus* Stämme (Dussault et al., 2014).

Doch inwiefern könnten pflanzliche Extrakte Anwendung in der Lebensmittelindustrie finden? Neben der Prüfung der Empfindlichkeit der verschiedenen *B. thuringiensis* Stämme gegenüber alternativen antimikrobiellen Stoffen wurde im Rahmen dieser Arbeit auch ihr Einsatz bezüglich der Risikoprävention im Lebensmittel evaluiert (Daten nicht publiziert). Zur Einschätzung des Risikos für den Verbraucher bei der Anwendung von Biopestiziden wurden zunächst Salatproben mit vegetativen *B. thuringiensis* Zellen (ca. 10^7 KBE/ml) und Sporen (ca. 10^6 KBE/ml) beimpft. MHI 2873, ein Isolat tierischen Ursprungs, MHI 3163, ein Lebensmittelisolat, und MHI 3240 und MHI 3369, zwei Biopestizidstämme, wurden zur Testung herangezogen. Im Fokus stand die Untersuchung der Adhäsionsfähigkeit der Zellen und der Effekt von Waschschritten, welche zusätzlich durch die Anwendung von Zitrusöl optimiert wurden. Der pflanzliche Extrakt wurde mit einer Konzentration von 0,053 % eingesetzt, da diese Konzentration im Mikrodilutionsversuch eine Wachstumshemmung hervorrief (diese Arbeit, Publikation II). Ohne Zugabe des Öls konnte im Schnitt eine Reduktion der vegetativen Zellen um 71 % und der Sporen um 85 % erzielt werden, verglichen mit den Proben, welche keinem Waschschriff unterzogen wurden (Inokulum). Der Einsatz von 0,053 % Zitrusöl im Waschwasser führte zu einer Reduktion um 88 %, sowohl für vegetative Zellen als auch für Sporen. Jedoch muss an dieser Stelle auf stammspezifische Unterschiede hingewiesen werden. Die KBE konnte (bezogen auf vegetative Zellen) durch den Zusatz des Pflanzenextrakts um weitere 26 % (MHI 2873), 16 % (MHI 3240), 23 % (MHI 3369) und 2 % (MHI 3163) reduziert werden. Bezogen auf die Inokulation mit Sporen konnte durch die Anwendung des Öls eine zusätzliche Reduktion um 4 % (MHI 3163), 8 % (MHI 3240) und 10 % (MHI 3369) erreicht werden. Die KBE der Sporen von MHI 2873 konnte nicht weiter reduziert werden.

Es wird vermutet, dass pflanzliche Extrakte mit Oberflächenproteinen der Bakterien interagieren und somit deren Adhäsionsfähigkeit beeinflussen und herabsetzen (Nostro et al., 2007, Soni et al., 2013). Diese Hypothese stellt eine

mögliche Erklärung für die Verbesserung des Waschschriffs durch den Einsatz eines pflanzlichen Extrakts dar. Genauso konnten Millan-Sango et al. (2016) eine Reduktion der Keimbelastung (*Salmonella enterica*) auf Salat bei einer Erhöhung der Konzentrationen der Pflanzenextrakte (Oregano und Thymian) feststellen (Millan-Sango et al., 2016). Außerdem gaben sie in einer anderen Studie an, dass sich große Mengen der Bakterien (*Escherichia coli* 0157:H7 NCTC 12900) im Waschwasser befanden (Millan-Sango et al., 2015).

Es konnte in dieser orientierenden Studie gezeigt werden, dass pflanzliche Extrakte eine präventive Maßnahme gegen *B. thuringiensis* darstellen und das Ausmaß der Kontamination verringern können. Zwar konnte die Zahl an KBEs nur um circa 0,5-1 *log* Stufen reduziert werden, dennoch muss darauf hingewiesen werden, dass nur die minimale Hemmkonzentration des Extrakts eingesetzt wurde und andererseits verhältnismäßig hohe Bakterien- bzw. Sporenkonzentrationen. Weitere Untersuchungen, welche die Auswirkungen höherer Konzentrationen der Pflanzenextrakte betrachten, sowie Extrakt-Kombinationen und eine Optimierung des Waschprozesses könnten vielversprechende Resultate liefern. Zudem sollten mehr Stämme beprobt werden, um vergleichende Aussagen treffen zu können. Interessant wären weiterführende Untersuchungen zur Ursache der Reduktion, ob es sich beispielsweise tatsächlich um eine Inaktivierung der Bakterien handelt, oder ob die Zellen vermehrt im Waschwasser zu finden sind. Zudem sollte der Einfluss von Lebensmittelinhaltsstoffen und extrinsischen Faktoren und ihre Interaktion mit den Pflanzenextrakten separat betrachtet werden.

4. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte, durch die Implementierung des Auskeimungsassays, das Risikobewertungsschema für enteropathogene *B. cereus* vervollständigt werden, welches größtenteils auch auf den nahen Verwandten *B. thuringiensis* anwendbar ist.

Diese Ausweitung der detaillierten Risikoanalyse auf weitere Vertreter der *B. cereus* Gruppe ist extrem wichtig, da in dieser Arbeit deutlich gezeigt werden konnte, dass ein nicht unerhebliches Gesundheitsrisiko von *B. thuringiensis* Isolaten ausgehen kann. Aus diesem Grund ist die Anwendung von Biopestiziden

als kritisch zu betrachten. Der Verzehr von Lebensmitteln, welche mit *B. thuringiensis* behandelt wurden, könnte durchaus ein erhöhtes Gesundheitsrisiko mit sich bringen.

Dennoch scheint ein Verbot der Präparate keine Option zu sein, angesichts der großen Vorteile, welche diese bieten. Um mit der stets wachsenden Weltbevölkerungszahl Schritt zu halten, muss die landwirtschaftliche Produktion bis 2050 um nahezu das Doppelte ansteigen (Tilman et al., 2011, Pawlak und Kołodziejczak, 2020). Zur Gewährleistung dieses Ziels spielen unter anderem nachhaltige und umweltfreundliche Insektizide eine entscheidende Rolle, um Verluste zu minimieren. Durch den vermehrten Einsatz von *B. thuringiensis* Präparaten konnte der Gebrauch chemischer Mittel erheblich reduziert werden.

Eine Möglichkeit zur Minimierung der Sporenlast auf Lebensmitteln wäre die Einführung von Applikationsintervallen, damit der Einsatz der Pestizide nicht bis unmittelbar vor Beginn der Ernte möglich ist. Dies könnte zur Unterschreitung einer potentiell schädlichen Konzentration von 10^5 KBE/g Lebensmittel führen. Prozesshygienekriterien für *B. cereus s. l.* wurden auf EU-Ebene ausschließlich für getrocknete Säuglingsanfangsnahrung und getrocknete diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge unter 6 Monaten bestimmt sind, festgelegt ($n = 5$, $c = 1$, $m = 50$ KBE/g, $M = 500$ KBE/g) (Europäische Kommission, 2007). Denkbar wäre auch eine Anpassung der Lebensmittel- und Prozesshygienekriterien für *B. cereus s. l.* für weitere Lebensmittelgruppen. Eine Konzentration festzulegen, welche sicher mit einem Risiko für den Verbraucher einhergeht, stellt sich allerdings als problematisch dar, da das enteropathogene Potential stammspezifisch stark variiert (EFSA, 2016b).

Eine Kennzeichnung von Lebensmitteln, welche mit *B. thuringiensis* Präparaten behandelt wurden, könnte den Verbraucher sensibilisieren und die Einhaltung von Hygienekonzepten und Lagerungsbedingungen zur Prävention von *B. cereus s. l.* Infektionen fördern. Diese Informationen sind besonders für immunsupprimierte Gruppen und Einrichtungen, welche Gerichte für diese bereitstellen (Pflegeeinrichtungen, Krankenhäuser), von Bedeutung.

Die genaue Charakterisierung der eingesetzten Biopestizidstämme und eine Bewertung des Gefährdungspotentials der Präparate, wie es von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit gefordert und bereits im Rahmen dieser Arbeit

primär umgesetzt wurde, ist dringend notwendig und scheint schlussendlich der beste Weg zur Überwachung der Biopestizidstämme.

Als alternative, natürliche Agenzien gegen *B. thuringiensis* und *B. cereus* Kontaminationen könnten Pflanzenextrakte in vielen Ebenen der Lebensmittelkette Einzug finden und lebensmittelbedingte Infektionen einschränken.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

B. thuringiensis ist der am häufigsten zur biologischen Schädlingsbekämpfung eingesetzte Mikroorganismus weltweit. Jedoch warfen seine nahe genetische Verwandtschaft zu *B. cereus* s. s., seine Fähigkeit zur Enterotoxinproduktion und lebensmittelbedingte Ausbrüche die Frage nach der Sicherheit der Präparate auf. Außerdem ist die Dunkelziffer der durch *B. thuringiensis* ausgelösten Erkrankungen durch einen Mangel an Differenzierung der Spezies in der Routinediagnostik vermutlich verhältnismäßig hoch.

In der vorliegenden Arbeit wurden 24 *B. thuringiensis* Stämme unterschiedlichen Ursprungs auf ihr enteropathogenes Potential untersucht. Die Stämme wiesen nicht nur die genetischen Voraussetzungen (Toxingene: *hbl*, *nhe* und *cytK2*) zur Auslösung einer lebensmittelassoziierten Diarrhö auf, sie zeigten zudem Wachstum und Enterotoxinproduktion unter simulierten intestinalen Bedingungen. Zudem konnten mittels Zytotoxizitätsassay 14 Stämme als hochtoxisch gegenüber CaCo-2 Zellen, acht als mittelgradig toxisch und nur zwei als kaum toxisch eingestuft werden. Des Weiteren wurden das Auskeimungsvermögen und die Fähigkeit zur Fortbewegung als zusätzliche Pathogenitätsfaktoren des multifaktoriellen Infektionsprozesses betrachtet. Interessanterweise waren auch Biopestizidstämme zur Auskeimung unter simulierten Darmbedingungen fähig und zeigten ein hohes Motilitätsvermögen. Als präventive Maßnahme zur Einschränkung des Risikos einer *B. cereus*-ähnlichen Infektion wurden pflanzliche Extrakte auf ihre antimikrobiellen Eigenschaften gegenüber *B. thuringiensis* untersucht. Im Mikrodilutionsversuch wies das Öl des Cassia-Zimtes die stärkste antimikrobielle Wirkung auf, gefolgt von Zitrusöl, Oregano und zuletzt Winterbohlenkraut.

Diese Arbeit verdeutlicht, dass durchaus von einem enteropathogenen Potential von *B. thuringiensis* auszugehen ist, wobei Biopestizidstämme nicht eindeutig von anderen Isolaten abgegrenzt werden konnten. Daher ist die eindeutige Identifizierung dieser Stämme durch genetische Marker erforderlich, ebenso wie eine umfangreiche Analyse zur Risikoermittlung. Das dargestellte und im Rahmen dieser Arbeit vervollständigte Risikobewertungsschema für *B. cereus* kann hierbei größtenteils für *B. thuringiensis* Anwendung finden. Außerdem ist eine Speziesdifferenzierung in der Lebensmitteldiagnostik unbedingt notwendig.

VIII. SUMMARY

Assessing the enteropathogenic potential of *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis is the most commonly used microorganism for biological control worldwide. However, its close genetic relationship to *B. cereus* s. s., its ability to produce enterotoxins, as well as food-borne outbreaks raised the question about the safety of the preparations. Especially since routine diagnostics do not differentiate between the species, the number of unreported cases by *B. thuringiensis* is probably relatively high.

In the present study 24 *B. thuringiensis* strains of different origin were examined for their enteropathogenic potential. The isolates not only had the genetic prerequisites (toxin genes: *hbl*, *nhe* and *cytK2*) to cause food-associated diarrhea, they also showed growth as well as enterotoxin production under simulated intestinal conditions. In addition, cytotoxicity assays classified 14 strains as highly toxic towards CaCo-2 cells, eight as medium and only two as low toxic. Furthermore, the germination capacity and the ability to actively move were tested as additional pathogenicity factors of the multifactorial infection process. Interestingly, even biopesticide strains were capable of germination under simulated intestinal conditions and showed high motility. As a preventive measure to reduce the risk of infections similar to *B. cereus*, essential oils were tested for their antimicrobial properties against *B. thuringiensis*. The antimicrobial broth dilution assay showed that Cinnamon Chinese cassia was the essential oil with the highest antimicrobial activity, followed by citral, oregano and winter savory.

The present work indicates that there is a certain enteropathogenic potential of *B. thuringiensis*, whereby biopesticide strains can not be clearly distinguished from other isolates. Therefore, the unambiguous identification of these strains by genetic markers is necessary, as well as an extensive analysis for risk assessment. The established risk assessment scheme for *B. cereus* can largely be applied to *B. thuringiensis*. In addition, species differentiation is absolutely necessary in food diagnostics.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

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, 1043-53.

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.

ALVARENGA, V. O., CAMPAGNOLLO, F. B., PIA, A. K. R., CONCEIÇÃO, D. A., ABUD, Y., SANT'ANNA, C., HUBINGER, M. D. & SANT'ANA, A. S. 2018. Quantifying the responses of three *Bacillus cereus* strains in isothermal conditions and during spray drying of different carrier agents. *Front Microbiol*, 9, 1113.

ANASTASSIADOU, M., ARENA, M., AUTERI, D., BRANCATO, A., BURA, L., CARRASCO CABRERA, L., CHAIDEFTOU, E., CHIUSOLO, A., CRIVELLENTI, F., DE LENTDECKER, C., et al. 2020a. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Bacillus thuringiensis* ssp. *aizawai* strain ABTS-1857. *EFSA J*, 18, e06294.

ANASTASSIADOU, M., ARENA, M., AUTERI, D., BRANCATO, A., BURA, L., CARRASCO CABRERA, L., CHAIDEFTOU, E., CHIUSOLO, A., CRIVELLENTI, F., DE LENTDECKER, C., et al. 2020b. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Bacillus thuringiensis* ssp. *aizawai* strain GC-91. *EFSA J*, 18, e06293.

ANASTASSIADOU, M., ARENA, M., AUTERI, D., BRANCATO, A., BURA, L., CARRASCO CABRERA, L., CHAIDEFTOU, E., CHIUSOLO, A., CRIVELLENTI, F., DE LENTDECKER, C., et al. 2020c. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* (serotype H-14) strain AM65-52. *EFSA J*, 18, e06317.

ANASTASSIADOU, M., ARENA, M., AUTERI, D., BRANCATO, A., BURA, L., CARRASCO CABRERA, L., CHAIDEFTOU, E., CHIUSOLO, A., CRIVELLENTI, F., DE LENTDECKER, C., et al. 2020d. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain SA-11. *EFSA J*, 18, e06261.

ANASTASSIADOU, M., ARENA, M., AUTERI, D., BRANCATO, A., BURA, L., CARRASCO CABRERA, L., CHAIDEFTOU, E., CHIUSOLO, A., CRIVELLENTI, F., DE LENTDECKER, C., et al. 2020e. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain SA-12. *EFSA J*, 18, e06262.

ANDRÉ, S., VALLAEYS, T. & PLANCHON, S. 2017. Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. *Res Microbiol*, 168, 379-387.

ANDREEVA, Z. I., NESTERENKO, V. F., YURKOV, I. S., BUDARINA, Z. I., SINEVA, E. V. & SOLONIN, A. S. 2006. Purification and cytotoxic properties of *Bacillus cereus* hemolysin II. *Protein Expr Purif*, 47, 186-93.

ANKOLEKAR, C., RAHMATI, T. & LABBÉ, R. G. 2009. Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice. *Int J Food Microbiol*, 128, 460-6.

ASH, C., FARROW, J. A. E., DORSCH, M., STACKEBRANDT, E. & COLLINS, M. D. 1991. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol*, 41, 343-6.

ATLURI, S., RAGKOUSI, K., CORTEZZO, D. E. & SETLOW, P. 2006. Cooperativity between different nutrient receptors in germination of spores of *Bacillus subtilis* and reduction of this cooperativity by alterations in the GerB receptor. *J Bacteriol*, 188, 28-36.

AYARI, S., SHANKAR, S., FOLLETT, P., HOSSAIN, F. & LACROIX, M. 2020. Potential synergistic antimicrobial efficiency of binary combinations of essential oils against *Bacillus cereus* and *Paenibacillus amylolyticus*-Part A. *Microb Pathog*, 141, 104008.

BAELUM, J., LARSEN, P., DOEKES, G. & SIGSGAARD, T. 2012. Health effects of selected microbiological control agents. A 3-year follow-up study. *Ann Agric Environ Med*, 19, 631-6.

BARFOD, K. K., POULSEN, S. S., HAMMER, M. & LARSEN, S. T. 2010. Sub-chronic lung inflammation after airway exposures to *Bacillus thuringiensis* biopesticides in mice. *BMC Microbiol*, 10, 233.

BEECHER, D. J. & MACMILLAN, J. D. 1991. Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect Immun*, 59, 1778-84.

BEECHER, D. J., OLSEN, T. W., SOMERS, E. B. & WONG, A. C. L. 2000. Evidence for contribution of tripartite hemolysin BL, phosphatidylcholine-preferring phospholipase C, and collagenase to virulence of *Bacillus cereus* endophthalmitis. *Infect Immun*, 68, 5269-76.

BEECHER, D. J., PULIDO, J. S., BARNEY, N. P. & WONG, A. C. L. 1995a. Extracellular virulence factors in *Bacillus cereus* endophthalmitis: methods and implication of involvement of hemolysin BL. *Infect Immun*, 63, 632-9.

BEECHER, D. J., SCHOENI, J. L. & WONG, A. C. L. 1995b. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect Immun*, 63, 4423-8.

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, 980-6.

BEECHER, D. J. & WONG, A. C. L. 1997. Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Hemolytic analysis of component interactions and a model for its characteristic paradoxical zone phenomenon. *J Biol Chem*, 272, 233-9.

BEECHER, D. J. & WONG, A. C. L. 2000. Cooperative, synergistic and antagonistic haemolytic interactions between haemolysin BL, phosphatidylcholine phospholipase C and sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. *Microbiology*, 146 Pt 12, 3033-3039.

BERLINER, E. 1915. Über die Schlauffsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kühniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp. *Z. Angew. Entomol.*, 2, 29-56.

BERNSTEIN, I. L., BERNSTEIN, J. A., MILLER, M., TIERZIEVA, S., BERNSTEIN, D. I., LUMMUS, Z., SELGRADE, M. K., DOERFLER, D. L. & SELIGY, V. L. 1999. Immune responses in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* pesticides. *Environ Health Perspect*, 107, 575-82.

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.

BERTHOLD-PLUTA, A., PLUTA, A., GARBOWSKA, M. & STEFAŃSKA, I. 2019. Prevalence and toxicity characterization of *Bacillus cereus* in food products from Poland. *Foods*, 8, 269.

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.

BRAVO, A., GILL, S. S. & SOBERÓN, M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49, 423-35.

BRÉZILLON, C., HAUSTANT, M., DUPKE, S., CORRE, J. P., LANDER, A., FRANZ, T., MONOT, M., COUTURE-TOSI, E., JOUVION, G., LEENDERTZ, F. H., et al. 2015. Capsules, toxins and AtxA as virulence factors of emerging *Bacillus cereus* biovar *anthracis*. *PLoS Negl Trop Dis*, 9, e0003455.

BROUSSOLLE, V., GAUILLARD, F., NGUYEN-THE, C. & CARLIN, F. 2008. Diversity of spore germination in response to inosine and L-alanine and its interaction with NaCl and pH in the *Bacillus cereus* group. *J Appl Microbiol*, 105, 1081-90.

BUTKO, P. 2003. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Appl Environ Microbiol*, 69, 2415-22.

BVL- BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT. 2020. Informationen über zugelassene Pflanzenschutzmittel. www.bvl.bund.de/infopsm [zuletzt zugegriffen am 09/12/2020].

CADOT, C., TRAN, S. L., VIGNAUD, M. L., DE BUYSER, M. L., KOLSTØ, A. B., BRISABOIS, A., NGUYEN-THE, 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, 1358-65.

CALLEGAN, M. C., COCHRAN, D. C., KANE, S. T., RAMADAN, R. T., CHODOSH, J., MCLEAN, C. & STROMAN, D. W. 2006. Virulence factor profiles and antimicrobial susceptibilities of ocular *bacillus* isolates. *Curr Eye Res*, 31, 693-702.

CALLEGAN, M. C., KANE, S. T., COCHRAN, D. C., GILMORE, M. S., GOMINET, M. & LERECLUS, D. 2003. Relationship of *plcR*-regulated factors to *Bacillus endophthalmitis* virulence. *Infect Immun*, 71, 3116-24.

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, 3233-8.

CALO, J. R., CRANDALL, P. G., O'BRYAN, C. A. & RICKE, S. C. 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. *Food Control*, 54, 111-119.

CARLIN, F., ALBAGNAC, C., RIDA, A., GUINEBRETIERE, M. H., COUVERT, O. & NGUYEN-THE, C. 2013. Variation of cardinal growth parameters and growth limits according to phylogenetic affiliation in the *Bacillus cereus* group. Consequences for risk assessment. *Food Microbiol*, 33, 69-76.

CARROLL, L. M., WIEDMANN, M. & KOVAC, J. 2020. Proposal of a taxonomic nomenclature for the *Bacillus cereus* group which reconciles genomic definitions of bacterial species with clinical and industrial phenotypes. *mBio*, 11, e00034-20.

CASTELLA, C., PAURON, D., HILLIOU, F., TRANG, V. T., ZUCCHINI-PASCAL, N., GALLET, A. & BARBERO, P. 2019. Transcriptomic analysis of *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells resistant to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin reveals that extracellular Ca(2+), Mg(2+) and production of cAMP are involved in toxicity. *Biol Open*, 8, bio037085.

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.

CATTANEO, M. G., YAFUSO, C., SCHMIDT, C., HUANG, C. Y., RAHMAN, M., OLSON, C., ELLERS-KIRK, C., ORR, B. J., MARSH, S. E., ANTILLA, L., et al. 2006. Farm-scale evaluation of the impacts of transgenic cotton on biodiversity, pesticide use, and yield. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 7571-6.

CEUPPENS, S., VAN DE WIELE, T., RAJKOVIC, A., FERRER-CABACERAN, T., HEYNDRICKX, M., BOON, N. & UYTENDAELE, M. 2012. Impact of intestinal microbiota and gastrointestinal conditions on the *in vitro* survival and growth of *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol*, 155, 241-6.

CHAKROUN, M., BANYULS, N., BEL, Y., ESCRICHE, B. & FERRÉ, J. 2016. Bacterial vegetative insecticidal proteins (Vip) from entomopathogenic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 80, 329-50.

CHANG, C., YU, Y. M., DAI, S. M., LAW, S. K. & GILL, S. S. 1993. High-level *cryIVD* and *cytA* gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. *Appl Environ Microbiol*, 59, 815-21.

CHATTOPADHYAY, P. & BANERJEE, G. 2018. Recent advancement on chemical arsenal of Bt toxin and its application in pest management system in agricultural field. *3 Biotech*, 8, 201.

CHO, S. H., KANG, S. H., LEE, Y. E., KIM, S. J., YOO, Y. B., BAK, Y. S. & KIM, J. B. 2015. Distribution of toxin genes and enterotoxins in *Bacillus thuringiensis* isolated from microbial insecticide products. *J Microbiol Biotechnol*, 25, 2043-8.

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, 31408-18.

CLAIR, G., ROUSSI, S., ARMENGAUD, 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 Proteom*, 9, 1486-98.

COHEN, S., ALBECK, S., BEN-DOV, E., CAHAN, R., FIRER, M., ZARITSKY, A. & DYM, O. 2011. Cyt1Aa toxin: crystal structure reveals implications for its membrane-perforating function. *J Mol Biol*, 413, 804-14.

COHEN, S., DYM, O., ALBECK, S., BEN-DOV, E., CAHAN, R., FIRER, M. & ZARITSKY, A. 2008. High-resolution crystal structure of activated Cyt2Ba monomer from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J Mol Biol*, 380, 820-7.

CONSMÜLLER, N., BECKMANN, V. & PETRICK, M. 2010. An econometric analysis of regional adoption patterns of Bt maize in Germany. *Agric Econ*, 41, 275-284.

CONTZEN, M., HAILER, M. & RAU, J. 2014. Isolation of *Bacillus cytotoxicus* from various commercial potato products. *Int J Food Microbiol*, 174, 19-22.

CRICKMORE, N., BERRY, C., PANNEERSELVAM, S., MISHRA, R., CONNOR, T. R. & BONNING, B. C. 2020. A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. *J Invertebr Pathol*, 107438.

CRICKMORE, N., ZEIGLER, D. R., FEITELSON, J., SCHNEPF, E., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J. & DEAN, D. H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, 807-13.

DA RIOL, C., DIETRICH, R., MÄRTLBAUER, E. & JESSBERGER, N. 2018. Consumed foodstuffs have a crucial impact on the toxic activity of enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Front Microbiol*, 9, 1946.

DAFFONCHIO, D., CHERIF, A. & BORIN, S. 2000. Homoduplex and heteroduplex polymorphisms of the amplified ribosomal 16S-23S internal transcribed spacers describe genetic relationships in the "*Bacillus cereus* group". *Appl Environ Microbiol*, 66, 5460-8.

DAMBACH, P., WINKLER, V., BÄRNIGHAUSEN, T., TRAORÉ, I., OUEDRAOGO, S., SIÉ, A., SAUERBORN, R., BECKER, N. & LOUIS, V. R. 2020. Biological larviciding against malaria vector mosquitoes with *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) - Long term observations and assessment of repeatability during an additional intervention year of a large-scale field trial in rural Burkina Faso. *Glob Health Action*, 13, 1829828.

DAMGAARD, P. H. 1995. Diarrhoeal enterotoxin production by strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from commercial *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 12, 245-50.

DAMGAARD, P. H., GRANUM, P. E., BRESCIANI, J., TORREGROSSA, M. V., EILENBERG, J. & VALENTINO, L. 1997. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from infections in burn wounds. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 18, 47-53.

DE BARJAC, H. & BONNEFOI, A. 1968. A classification of strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner with a key to their differentiation. *J Invertebr Pathol*, 11, 335-47.

DE MAAGD, R. A., BRAVO, A., BERRY, C., CRICKMORE, N. & SCHNEPF, H. E. 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu Rev Genet*, 37, 409-33.

DE MAAGD, R. A., BRAVO, A. & CRICKMORE, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet*, 17, 193-9.

DEMENTIEV, A., BOARD, J., SITARAM, A., HEY, T., KELKER, M. S., XU, X., HU, Y., VIDAL-QUIST, C., CHIKWANA, V., GRIFFIN, S., et al. 2016. The pesticidal Cry6Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* is structurally similar to HlyE-family alpha pore-forming toxins. *BMC Biol*, 14, 71.

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

DIDIER, A., DIETRICH, R. & MÄRTLBAUER, E. 2016. Antibody binding studies reveal conformational flexibility of the *Bacillus cereus* non-hemolytic enterotoxin (Nhe) A-component. *PLoS One*, 11, e0165135.

DIERICK, K., VAN COILLIE, E., SWIECICKA, I., MEYFROIDT, G., DEVLIEGER, H., MEULEMANS, A., HOEDEMAEKERS, G., FOURIE, L., HEYNDRICKX, M. & MAHILLON, J. 2005. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *J Clin Microbiol*, 43, 4277-9.

DIETRICH, R., JESSBERGER, N., EHLING-SCHULZ, M., MÄRTLBAUER, E. & GRANUM, P. E. 2021. The food poisoning toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins*, 13, 98.

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.

DOMÍNGUEZ-ARRIZABALAGA, M., VILLANUEVA, M., ESCRICHE, B., ANCÍN-AZPILICUETA, C. & CABALLERO, P. 2020. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* proteins against coleopteran pests. *Toxins*, 12, 430.

DONOVAN, W. P., ENGLEMAN, J. T., DONOVAN, J. C., BAUM, J. A., BUNKERS, G. J., CHI, D. J., CLINTON, W. P., ENGLISH, L., HECK, G. R., ILAGAN, O. M., et al. 2006. Discovery and characterization of Sip1A: A novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. *Appl Microbiol Biotechnol*, 72, 713-9.

DUPORT, C., ZIGHA, A., ROSENFELD, E. & SCHMITT, P. 2006. Control of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus* F4430/73 involves the redox-sensitive ResDE signal transduction system. *J Bacteriol*, 188, 6640-51.

DUSSAULT, D., VU, K. D. & LACROIX, M. 2014. *In vitro* evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. *Meat Sci*, 96, 514-20.

EFSA- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY 2016a. Annex A – Information received from the International Biocontrol Manufacturers Association (IBMA) on 18 January 2016 (Prepared by Valent BioSciences, Certis USA and CBC (Europe)). *EFSA J*, 14, 1-14.

EFSA- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY 2016b. Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA J*, 14, 1-93.

EHLING-SCHULZ, M., FRENZEL, E. & GOHAR, M. 2015. Food-bacteria interplay: pathometabolism of emetic *Bacillus cereus*. *Front Microbiol*, 6, 704.

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, 479-87.

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

EHLING-SCHULZ, M., VUKOV, N., SCHULZ, A., SHAHEEN, R., ANDERSSON, M., MÄRTLBAUER, E. & SCHERER, S. 2005. Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*, 71, 105-13.

ERRINGTON, J. 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol*, 1, 117-26.

ESBELIN, J., ARMENGAUD, J., ZIGHA, A. & DUPORT, C. 2009. ResDE-dependent regulation of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus*: evidence for multiple modes of binding for ResD and interaction with Fnr. *J Bacteriol*, 191, 4419-26.

ESBELIN, J., JOUANNEAU, Y., ARMENGAUD, J. & DUPORT, C. 2008. ApoFnr binds as a monomer to promoters regulating the expression of enterotoxin genes of *Bacillus cereus*. *J Bacteriol*, 190, 4242-51.

EUROPÄISCHE KOMMISSION. 2007. VERORDNUNG (EG) Nr. 1441/2007 DER KOMMISSION vom 5. Dezember 2007 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel, Amtsblatt der Europäischen Union, L 322, 24.

EUROPÄISCHES PARLAMENT UND RAT DER EUROPÄISCHEN UNION. 2005. VERORDNUNG (EG) Nr. 396/2005 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 23. Februar 2005 über Höchstgehalte an Pestizidrückständen in oder auf Lebens- und Futtermitteln pflanzlichen und tierischen Ursprungs und zur Änderung der Richtlinie 91/414/EWG des Rates, Amtsblatt der Europäischen Union, L 70.

FAGERLUND, A., DUBOIS, T., ØKSTAD, O. A., VERPLAETSE, E., GILOIS, N., BENNACEUR, I., PERCHAT, S., GOMINET, M., AYMERICH, S., KOLSTØ, A. B., et al. 2014. SinR controls enterotoxin expression in *Bacillus thuringiensis* biofilms. *PLoS One*, 9, e87532.

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.

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.

FASSOLD, E., SLADE, A. M., LIN, J. Y. & NAYLER, W. G. 1976. An effect of the cardiotoxic protein volvatoxin A on the function and structure of heart muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*, 8, 501-19.

FAYAD, N., KALLASSY AWAD, M. & MAHILLON, J. 2019. Diversity of *Bacillus cereus sensu lato* mobilome. *BMC Genomics*, 20, 436.

FOX, D., MATHUR, A., XUE, Y., LIU, Y., TAN, W. H., FENG, S., PANDEY, A., NGO, C., HAYWARD, J. A., ATMOSUKARTO, I. I., et al. 2020. *Bacillus cereus* non-haemolytic enterotoxin activates the NLRP3 inflammasome. *Nat Commun*, 11, 760.

FRENTZEL, H., JURASCHEK, K., PAULY, N., KELNER-BURGOS, Y. & WICHMANN-SCHAUER, H. 2020. Indications of biopesticidal *Bacillus thuringiensis* strains in bell pepper and tomato. *Int J Food Microbiol*, 321, 108542.

GAO, S., NI, C., HUANG, W., HAO, H., JIANG, H., LV, Q., ZHENG, Y., LIU, P., KONG, D. & JIANG, Y. 2020. The interaction between flagellin and the glycosphingolipid Gb3 on host cells contributes to *Bacillus cereus* acute infection. *Virulence*, 11, 769-780.

GAVIRIA RIVERA, A. M., GRANUM, P. E. & PRIEST, F. G. 2000. Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett*, 190, 151-5.

GENG, J., JIANG, J., SHU, C., WANG, Z., SONG, F., GENG, L., DUAN, J. & ZHANG, J. 2019. *Bacillus thuringiensis* Vip1 functions as a receptor of Vip2 Toxin for binary insecticidal activity against *Holotrichia parallela*. *Toxins*, 11, 440.

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, 4089-93.

GILLIS, A., FAYAD, N., MAKART, L., BOLOTIN, A., SOROKIN, A., KALLASSY, M. & MAHILLON, J. 2018. Role of plasmid plasticity and mobile genetic elements in the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*. *FEMS Microbiol Rev*, 42, 829-856.

GLASSET, B., HERBIN, S., GUILLIER, L., CADEL-SIX, S., VIGNAUD, M. L., GROUT, J., PAIRAUD, S., MICHEL, V., HENNEKINNE, J. A., RAMARAO, N., et al. 2016. *Bacillus cereus*-induced food-borne outbreaks in France, 2007 to 2014: epidemiology and genetic characterisation. *Euro Surveill*, 21, 30413.

GOHAR, M., FAEGRI, K., PERCHAT, S., RAVNUM, S., ØKSTAD, O. A., GOMINET, M., KOLSTØ, A. B. & LERECLUS, D. 2008. The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS One*, 3, e2793.

GÓMEZ, I., SÁNCHEZ, J., MIRANDA, R., BRAVO, A. & SOBERÓN, M. 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett*, 513, 242-6.

GONZÁLEZ, J. M., JR. & CARLTON, B. C. 1984. A large transmissible plasmid is required for crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*. *Plasmid*, 11, 28-38.

GRANUM, P. E. & LUND, T. 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Lett*, 157, 223-8.

GRANUM, P. E., O'SULLIVAN, K. & LUND, T. 1999. The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett*, 177, 225-9.

GREEN, M., HEUMANN, M., SOKOLOW, R., FOSTER, L. R., BRYANT, R. & SKEELS, M. 1990. Public health implications of the microbial pesticide *Bacillus thuringiensis*: an epidemiological study, Oregon, 1985-86. *Am J Public Health*, 80, 848-52.

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., et al. 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.

GUINEBRETIERE, M. H., BROUSSOLLE, V. & NGUYEN-THE, C. 2002. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J Clin Microbiol*, 40, 3053-6.

GUINEBRETIERE, M. H., THOMPSON, F. L., SOROKIN, A., NORMAND, P., DAWYNDT, P., EHLING-SCHULZ, M., SVENSSON, B., SANCHIS, V., NGUYEN-THE, C., HEYNDRICKX, M., et al. 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environ Microbiol*, 10, 851-65.

GUINEBRETIERE, M. H., VELGE, P., COUVERT, O., CARLIN, F., DEBUYSER, M. L. & NGUYEN-THE, 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, 3388-91.

HAYDAR, A., TRAN, S. L., GUILLEMET, E., DARRIGO, C., PERCHAT, S., LERECLUS, D., COQUET, L., JOUENNE, T. & RAMARAO, N. 2018. InhA1-mediated cleavage of the metalloprotease NprA allows *Bacillus cereus* to escape from macrophages. *Front Microbiol*, 9, 1063.

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.

HEINI, N., STEPHAN, R., EHLING-SCHULZ, M. & JOHLER, S. 2018. Characterization of *Bacillus cereus* group isolates from powdered food products. *Int J Food Microbiol*, 283, 59-64.

HELGASON, E., CAUGANT, D. A., OLSEN, I. & KOLSTØ, A. B. 2000a. Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections. *J Clin Microbiol*, 38, 1615-22.

HELGASON, E., ØKSTAD, O. A., CAUGANT, D. A., JOHANSEN, H. A., FOUET, A., MOCK, M., HEGNA, I. & KOLSTØ, A. B. 2000b. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*--one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol*, 66, 2627-30.

HÖFTE, H. & WHITELEY, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev*, 53, 242-55.

HORNSTRA, L. M., DE VRIES, Y. P., DE VOS, W. M. & ABEE, T. 2006. Influence of sporulation medium composition on transcription of ger operons and the germination response of spores of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Appl Environ Microbiol*, 72, 3746-9.

HORNSTRA, L. M., VAN DER VOORT, M., WIJNANDS, L. M., ROUBOS-VAN DEN HIL, P. J. & ABEE, T. 2009. Role of germinant receptors in Caco-2 cell-initiated germination of *Bacillus cereus* ATCC 14579 endospores. *Appl Environ Microbiol*, 75, 1201-3.

HU, X., VAN DER AUWERA, G., TIMMERY, S., ZHU, L. & MAHILLON, J. 2009. Distribution, diversity, and potential mobility of extrachromosomal elements related to the *Bacillus anthracis* pXO1 and pXO2 virulence plasmids. *Appl Environ Microbiol*, 75, 3016-28.

HUANG, J., HU, R., ROZELLE, S. & PRAY, C. 2005. Insect-resistant GM rice in farmers' fields: assessing productivity and health effects in China. *Science*, 308, 688-90.

HUANG, Y., FLINT, S. H. & PALMER, J. S. 2020. *Bacillus cereus* spores and toxins - The potential role of biofilms. *Food Microbiol*, 90, 103493.

IL KIM, M., LEE, C., PARK, J., JEON, B. Y. & HONG, M. 2018. Crystal structure of *Bacillus cereus* flagellin and structure-guided fusion-protein designs. *Sci Rep*, 8, 5814.

INTERNATIONAL ORGANISATION FOR STANDARDIZATION (ISO). 2004. ISO 7932:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus*- Colony-count technique at 30 degrees C. <https://www.iso.org/standard/38219.html> [zuletzt zugegriffen am 12/01/2021].

ISHIDA, R., UEDA, K., KITANO, T., YAMAMOTO, T., MIZUTANI, Y., TSUTSUMI, Y., IMOTO, K. & YAMAMORI, Y. 2019. Fatal community-acquired *Bacillus cereus* pneumonia in an immunocompetent adult man: a case report. *BMC Infect Dis*, 19, 197.

JENSEN, G. B., LARSEN, P., JACOBSEN, B. L., MADSEN, B., WILCKES, A., SMIDT, L. & ANDRUP, L. 2002. Isolation and characterization of *Bacillus cereus*-like bacteria from faecal samples from greenhouse workers who are using *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *Int Arch Occup Environ Health*, 75, 191-6.

JESSBERGER, N., DIETRICH, R., GRANUM, P. E. & MÄRTLBAUER, E. 2020. The *Bacillus cereus* food infection as multifactorial process. *Toxins*, 12, 701.

JESSBERGER, N., DIETRICH, R., SCHWEMMER, S., TAUSCH, F., SCHWENK, V., DIDIER, A. & MÄRTLBAUER, E. 2019. Binding to the target cell surface is the crucial step in pore formation of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Toxins*, 11, 281.

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.

JESSBERGER, N., RADEMACHER, C., KREY, V. M., DIETRICH, R., MOHR, A. K., BÖHM, M. E., SCHERER, S., EHLING-SCHULZ, M. & MÄRTLBAUER, E. 2017. Simulating intestinal growth conditions enhances toxin production of enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Front Microbiol*, 8, 627.

JOHLER, S., KALBHENN, E. M., HEINI, N., BRODMANN, P., GAUTSCH, S., BAGCIOGLU, M., CONTZEN, M., STEPHAN, R. & EHLING-SCHULZ, M. 2018. Enterotoxin production of *Bacillus thuringiensis* isolates from biopesticides, foods, and outbreaks. *Front Microbiol*, 9, 1915.

JOUZANI, G. S., VALIJANIAN, E. & SHARAFI, R. 2017. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Appl Microbiol Biotechnol*, 101, 2691-2711.

JUCOVIC, M., WALTERS, F. S., WARREN, G. W., PALEKAR, N. V. & CHEN, J. S. 2008. From enzyme to zymogen: engineering Vip2, an ADP-ribosyltransferase from *Bacillus cereus*, for conditional toxicity. *Protein Eng Des Sel*, 21, 631-8.

JUNG, M. Y., KIM, J. S., PAEK, W. K., LIM, J., LEE, H., KIM, P. I., MA, J. Y., KIM, W. & CHANG, Y. H. 2011. *Bacillus manliponensis* sp. nov., a new member of the *Bacillus cereus* group isolated from foreshore tidal flat sediment. *J Microbiol*, 49, 1027-32.

JUNG, M. Y., PAEK, W. K., PARK, I. S., HAN, J. R., SIN, Y., PAEK, J., RHEE, M. S., KIM, H., SONG, H. S. & CHANG, Y. H. 2010. *Bacillus gaemokensis* sp. nov., isolated from foreshore tidal flat sediment from the Yellow Sea. *J Microbiol*, 48, 867-71.

JURAT-FUENTES, J. L. & ADANG, M. J. 2004. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur J Biochem*, 271, 3127-35.

KELKER, M. S., BERRY, C., EVANS, S. L., PAI, R., MCCASKILL, D. G., WANG, N. X., RUSSELL, J. C., BAKER, M. D., YANG, C., PFLUGRATH, J. W., et al. 2014. Structural and biophysical characterization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins Cry34Ab1 and Cry35Ab1. *PLoS One*, 9, e112555.

KIM, B., BANG, J., KIM, H., KIM, Y., KIM, B. S., BEUCHAT, L. R. & RYU, J. H. 2014. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in Korean rice: prevalence and toxin production as affected by production area and degree of milling. *Food Microbiol*, 42, 89-94.

KIM, H., MOON, M. J., KIM, C. Y. & RYU, K. 2019. Efficacy of chemical sanitizers against *Bacillus cereus* on food contact surfaces with scratch and biofilm. *Food Sci Biotechnol*, 28, 581-590.

KIM, J. B., CHOI, O. K., KWON, S. M., CHO, S. H., PARK, B. J., JIN, N. Y., YU, Y. M. & OH, D. H. 2017a. Prevalence and toxin characteristics of *Bacillus thuringiensis* isolated from organic vegetables. *J Microbiol Biotechnol*, 27, 1449-1456.

KIM, K. H., KABIR, E. & JAHAN, S. A. 2017b. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci Total Environ*, 575, 525-535.

KNIGHT, P. J., CRICKMORE, N. & ELLAR, D. J. 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol Microbiol*, 11, 429-36.

KOIZUMI, Y., OKUNO, T., MINAMIGUCHI, H., HODOHARA, K., MIKAMO, H. & ANDOH, A. 2020. Survival of a case of *Bacillus cereus* meningitis with brain abscess presenting as immune reconstitution syndrome after febrile neutropenia – a case report and literature review. *BMC Infect Dis*, 20, 15.

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.

KUROKI, R., KAWAKAMI, K., QIN, L., KAJI, C., WATANABE, K., KIMURA, Y., ISHIGURO, C., TANIMURA, S., TSUCHIYA, Y., HAMAGUCHI, I., et al. 2009. Nosocomial bacteremia caused by biofilm-forming *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Intern Med*, 48, 791-6.

KYEI-POKU, G., GAUTHIER, D., PANG, A. & VAN FRANKENHUYZEN, K. 2007. Detection of *Bacillus cereus* virulence factors in commercial products of *Bacillus thuringiensis* and expression of diarrheal enterotoxins in a target insect. *Can J Microbiol*, 53, 1283-90.

LACEY, L. A., GRZYWACZ, D., SHAPIRO-ILAN, D. I., FRUTOS, R., BROWNBRIDGE, M. & GOETTEL, M. S. 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *J Invertebr Pathol*, 132, 1-41.

LECADET, M. M. & MARTOURET, D. 1967. Enzymatic hydrolysis of the crystals of *Bacillus thuringiensis* by the proteases of *Pieris brassicae* II. Toxicity of the different fractions of the hydrolysate for larvae of *Pieris brassicae*. *J Invertebr Pathol*, 9, 322-330.

LEE, M. K., WALTERS, F. S., HART, H., PALEKAR, N. & CHEN, J. S. 2003. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. *Appl Environ Microbiol*, 69, 4648-57.

LERECLUS, D., AGAÏSSE, H., GOMINET, M., SALAMITOU, S. & SANCHIS, V. 1996. Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. *J Bacteriol*, 178, 2749-56.

LERECLUS, D., AGAISSE, H., GRANDVALET, C., SALAMITOU, S. & GOMINET, M. 2000. Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *Int J Med Microbiol*, 290, 295-9.

LEUBER, M., ORLIK, F., SCHIFFLER, B., SICKMANN, A. & BENZ, R. 2006. Vegetative insecticidal protein (Vip1Ac) of *Bacillus thuringiensis* HD201: evidence for oligomer and channel formation. *Biochemistry*, 45, 283-8.

LI, J., KONI, P. A. & ELLAR, D. J. 1996. Structure of the mosquitocidal delta-endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J Mol Biol*, 257, 129-52.

LI, J. D., CARROLL, J. & ELLAR, D. J. 1991. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*, 353, 815-21.

LIN, J. Y., JENG, T. W., CHEN, C. C., SHI, G. Y. & TUNG, T. C. 1973. Isolation of a new cardiotoxic protein from the edible mushroom, *Volvariella volvacea*. *Nature*, 246, 524-5.

LINDBÄCK, T., FAGERLUND, A., RØDLAND, M. S. & GRANUM, P. E. 2004. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology*, 150, 3959-67.

LINDBÄCK, T., MOLS, M., BASSET, C., GRANUM, P. E., KUIPERS, O. P. & KOVÁCS Á, T. 2012. CodY, a pleiotropic regulator, influences multicellular behaviour and efficient production of virulence factors in *Bacillus cereus*. *Environ Microbiol*, 14, 2233-46.

LIU, B., LIU, G. H., HU, G. P., S., C., LIN, N. Q., TANG, J. Y., TANG, W. Q. & LIN, Y. Z. 2014. *Bacillus bingmayongensis* sp. nov., isolated from the pit soil of Emperor Qin's Terra-cotta warriors in China. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 105, 501-10.

LIU, J., ZUO, Z., SASTALLA, I., LIU, C., JANG, J. Y., SEKINE, Y., LI, Y., PIROOZNA, M., LEPPLA, S. H., FINKEL, T., et al. 2020a. Sequential CRISPR-based screens identify LITAF and CDIP1 as the *Bacillus cereus* Hemolysin BL toxin host receptors. *Cell Host Microbe*, 28, 402-410.e5.

LIU, M. M., COLEMAN, S., WILKINSON, L., SMITH, M. L., HOANG, T., NIYAH, N., MUKHERJEE, M., HUYNH, S., PARKER, C. T., KOVAC, J., et al. 2020b. Unique inducible filamentous motility identified in pathogenic *Bacillus cereus* group species. *ISME J*, 14, 2997–3010.

LIU, Y., LAI, Q., GÖKER, M., MEIER-KOLTHOFF, J. P., WANG, M., SUN, Y., WANG, L. & SHAO, Z. 2015. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Sci Rep*, 5, 14082.

LIU, Y., WANG, Y., SHU, C., LIN, K., SONG, F., BRAVO, A., SOBERÓN, M. & ZHANG, J. 2018. Cry64Ba and Cry64Ca, two ETX/MTX2-type *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins active against Hemipteran pests. *Appl Environ Microbiol*, 84, e01996-17.

LLEWELLYN, D., COUSINS, Y., MATHEWS, A., HARTWECK, L. & LYON, B. 1994. Expression of *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein genes in transgenic crop plants. *Agric Ecosyst Environ*, 49, 85-93.

LUND, T., DE BUYSER, M. L. & GRANUM, P. E. 2000. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol Microbiol*, 38, 254-61.

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, 151-6.

MAIN, A. R., WEBB, E. B., GOYNE, K. W. & MENGEL, D. 2018. Neonicotinoid insecticides negatively affect performance measures of non-target terrestrial arthropods: a meta-analysis. *Ecol Appl*, 28, 1232-1244.

MALOVICHKO, Y. V., NIZHNIKOV, A. A. & ANTONETS, K. S. 2019. Repertoire of the *Bacillus thuringiensis* virulence factors unrelated to major classes of protein toxins and its role in specificity of host-pathogen interactions. *Toxins*, 11, 347.

MARINO, M., BERSANI, C. & COMI, G. 1999. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *J Food Prot*, 62, 1017-23.

MÄRTLBAUER, E. & BECKER, H. 2016. Mikrobiologie, *B. cereus* Nachweisverfahren, in: *Milchkunde und Milchhygiene, Verlag Eugen Ulmer Stuttgart*, 227-228.

MARVIER, M., MCCREEDY, C., REGETZ, J. & KAREIVA, P. 2007. A meta-analysis of effects of Bt cotton and maize on nontarget invertebrates. *Science*, 316, 1475-7.

MATASYOH, J. C., MAIYO, Z. C., NGURE, R. M. & CHEPKORIR, R. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. *J Food Chemistry*, 113, 526-529.

MATSUMOTO, H., OGURA, H., SEKI, M., OHNISHI, M. & SHIMAZU, T. 2015. Fulminant phlegmonitis of the esophagus, stomach, and duodenum due to *Bacillus thuringiensis*. *World J Gastroenterol*, 21, 3741-5.

MATTES, O. 1927. Parasitäre Krankheiten der Mehlmottenlarven und Versuche über ihre Verwendbarkeit als biologisches Bekämpfungsmittel. *Sitzber Ges Beförder Ges Naturw Marburg*, 62, 381-417.

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.

MCINTYRE, L., BERNARD, K., BENIAC, D., ISAAC-RENTON, J. L. & NASEBY, D. C. 2008. Identification of *Bacillus cereus* group species associated with food poisoning outbreaks in British Columbia, Canada. *Appl Environ Microbiol*, 74, 7451-3.

MELO, A. L., SOCCOL, V. T. & SOCCOL, C. R. 2016. *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. *Crit Rev Biotechnol*, 36, 317-26.

MENDOZA-ALMANZA, G., ESPARZA-IBARRA, E. L., AYALA-LUJÁN, J. L., MERCADO-REYES, M., GODINA-GONZÁLEZ, S., HERNÁNDEZ-BARRALES, M. & OLMOS-SOTO, J. 2020. The cytotoxic spectrum of *Bacillus thuringiensis* toxins: from insects to human cancer cells. *Toxins*, 12, 301.

MICHELOTTI, F. & BODANSKY, H. J. 2015. *Bacillus cereus* causing widespread necrotising skin infection in a diabetic person. *Practical Diabetes*, 32, 169-170a.

MILES, G., BAYLEY, H. & CHELEY, S. 2002. Properties of *Bacillus cereus* hemolysin II: a heptameric transmembrane pore. *Protein Sci*, 11, 1813-24.

MILLAN-SANGO, D., GARRONI, E., FARRUGIA, C., VAN IMPE, J. F. M. & VALDRAMIDIS, V. P. 2016. Determination of the efficacy of ultrasound combined with essential oils on the decontamination of *Salmonella* inoculated lettuce leaves. *LWT-Food Sci Technol*, 73, 80-87.

MILLAN-SANGO, D., MCELHATTON, A. & VALDRAMIDIS, V. P. 2015. Determination of the efficacy of ultrasound in combination with essential oil of oregano for the decontamination of *Escherichia coli* on inoculated lettuce leaves. *Food Res Int*, 67, 145-154.

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., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *Int J Syst Evol Microbiol*, 66, 4744-4753.

MILLER, R. A., JIAN, J., BENO, S. M., WIEDMANN, M. & KOVAC, J. 2018. Intraclade variability in toxin production and cytotoxicity of *Bacillus cereus* group type strains and dairy-associated isolates. *Appl Environ Microbiol*, 84, e02479-17.

MIYOSHI, S. & SHINODA, S. 2000. Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect*, 2, 91-8.

MOGHADDAM, M., MEHDIZADEH, L., MIRZAEI NAJAFGHOLI, H. & GHASEMI PIRBALOUTI, A. 2018. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of seed essential oil of *Ferulago angulata*. *Int J Food Prop*, 21, 158-170.

MORAVEK, M., DIETRICH, R., BUERK, C., BROUSSOLLE, V., GUINEBRETIERE, M. H., GRANUM, P. E., NGUYEN-THE, C. & MÄRTLBAUER, E. 2006. Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses. *FEMS Microbiol Lett*, 257, 293-8.

NOSTRO, A., SUDANO ROCCARO, A., BISIGNANO, G., MARINO, A., CANNATELLI, M. A., PIZZIMENTI, F. C., CIONI, P. L., PROCOPIO, F. & BLANCO, A. R. 2007. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Med Microbiol*, 56, 519-23.

NÚÑEZ-RAMÍREZ, R., HUESA, J., BEL, Y., FERRÉ, J., CASINO, P. & ARIAS-PALOMO, E. 2020. Molecular architecture and activation of the insecticidal protein Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis*. *Nat Commun*, 11, 3974.

PALMA, L., MUÑOZ, D., BERRY, C., MURILLO, J. & CABALLERO, P. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins*, 6, 3296-325.

PAWLAK, K. & KOŁODZIEJCZAK, M. 2020. The role of agriculture in ensuring food security in developing countries: Considerations in the context of the problem of sustainable food production. *Sustainability*, 12, 5488.

PEKER, E., CAGAN, E., DOGAN, M., KILIC, A., CAKSEN, H. & YESILMEN, O. 2010. Periorbital cellulitis caused by *Bacillus thuringiensis*. *Eur J Ophthalmol*, 20, 243-5.

PÉREZ, C., MUÑOZ-GARAY, C., PORTUGAL, L. C., SÁNCHEZ, J., GILL, S. S., SOBERÓN, M. & BRAVO, A. 2007. *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a prepore oligomeric structure. *Cell Microbiol*, 9, 2931-7.

PRADHAN, S., CHAKRABORTY, A., SIKDAR, N., CHAKRABORTY, S., BHATTACHARYYA, J., MITRA, J., MANNA, A., DUTTA GUPTA, S. & SEN, S. K. 2016. Marker-free transgenic rice expressing the vegetative insecticidal protein (Vip) of *Bacillus thuringiensis* shows broad insecticidal properties. *Planta*, 244, 789-804.

PRUSZYNSKI, C. A., HRIBAR, L. J., MICKLE, R. & LEAL, A. L. 2017. A large scale biorational approach using *Bacillus thuringiensis israeliensis* (Strain AM65-52) for managing *Aedes aegypti* populations to prevent Dengue, Chikungunya and Zika transmission. *PLoS One*, 12, e0170079.

RADMEHR, B., ZAFERANLOO, B., TRAN, T., BEALE, D. J. & PALOMBO, E. A. 2020. Prevalence and characteristics of *Bacillus cereus* group isolated from raw and pasteurised milk. *Curr Microbiol*, 77, 3065-3075.

RAJKOVIC, A., UYTENDAELE, M., VERMEULEN, A., ANDJELKOVIC, M., FITZ-JAMES, I., IN 'T VELD, P., DENON, Q., VÉRHE, R. & DEBEVERE, J. 2008. Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Lett Appl Microbiol*, 46, 536-41.

RAMARAO, N. & LERECLUS, D. 2005. The InhA1 metalloprotease allows spores of the *B. cereus* group to escape macrophages. *Cell Microbiol*, 7, 1357-64.

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, 1483-91.

RASKO, D. A., ALTHERR, M. R., HAN, C. S. & RAVEL, J. 2005. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol Rev*, 29, 303-29.

RAYMOND, B. & FEDERICI, B. 2017. In defence of *Bacillus thuringiensis*, the safest and most successful microbial insecticide available to humanity-a response to EFSA. *FEMS Microbiol Ecol*, 93, fix084.

RAYMOND, B. & FEDERICI, B. A. 2018. An appeal for a more evidence based approach to biopesticide safety in the EU. *FEMS Microbiol Ecol*, 94, fix169.

RAYMOND, B., JOHNSTON, P. R., NIELSEN-LEROUX, C., LERECLUS, D. & CRICKMORE, N. 2010. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends Microbiol*, 18, 189-94.

RODRIGUEZ-ALMAZAN, C., RUIZ DE ESCUDERO, I., CANTÓN, P. E., MUÑOZ-GARAY, C., PÉREZ, C., GILL, S. S., SOBERÓN, M. & BRAVO, A. 2011. The amino- and carboxyl-terminal fragments of the *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa toxin have differential roles in toxin oligomerization and pore formation. *Biochemistry*, 50, 388-96.

ROUZEAU-SZYNALSKI, K., STOLLEWERK, K., MESSELHÄUSSER, U. & EHLING-SCHULZ, M. 2020. Why be serious about emetic *Bacillus cereus*: Cereulide production and industrial challenges. *Food Microbiol*, 85, 103279.

RYAN, P. A., MACMILLAN, J. D. & ZILINSKAS, B. A. 1997. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *J Bacteriol*, 179, 2551-6.

RYU, J. H. & BEUCHAT, L. R. 2005. Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. *J Food Prot*, 68, 2614-22.

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.

SANAHUJA, G., BANAKAR, R., TWYMAN, R. M., CAPELL, T. & CHRISTOU, P. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol J*, 9, 283-300.

SÁNCHEZ, B., ARIAS, S., CHAIGNEPAIN, S., DENAYROLLES, M., SCHMITTER, J. M., BRESSOLIER, 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.

SASAHARA, T., HAYASHI, S., MORISAWA, Y., SAKIHAMA, T., YOSHIMURA, A. & HIRAI, Y. 2011. *Bacillus cereus* bacteremia outbreak due to contaminated hospital linens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 30, 219-26.

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.

SCHNEPF, E., CRICKMORE, N., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ZEIGLER, D. R. & DEAN, D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, 775-806.

SCHNEPF, H. E., WONG, H. C. & WHITELEY, H. R. 1985. The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. *J Biol Chem*, 260, 6264-72.

SCHOENI, J. L. & WONG, A. C. 2005. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *J Food Prot*, 68, 636-48.

SENESI, S. & GHELARDI, E. 2010. Production, secretion and biological activity of *Bacillus cereus* enterotoxins. *Toxins*, 2, 1690-703.

SENESI, S., SALVETTI, S., CELANDRONI, F. & GHELARDI, E. 2010. Features of *Bacillus cereus* swarm cells. *Res Microbiol*, 161, 743-9.

SETHA, T., CHANTHA, N., BENJAMIN, S. & SOCHEAT, D. 2016. Bacterial larvicide, *Bacillus thuringiensis israelensis* Strain AM 65-52 water dispersible granule formulation impacts both Dengue vector, *Aedes aegypti* (L.) population density and disease transmission in Cambodia. *PLoS Negl Trop Dis*, 10, e0004973.

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

SETLOW, P. 2014. Spore resistance properties. *Microbiol Spectr*, 2, TBS-0003-2012.

SETLOW, P., WANG, S. & LI, Y. Q. 2017. Germination of spores of the orders *Bacillales* and *Clostridiales*. *Annu Rev Microbiol*, 71, 459-477.

SHA, J., ZHANG, J., CHI, B., LIU, R., LI, H. & GAO, J. 2018. Sip1Ab gene from a native *Bacillus thuringiensis* strain QZL38 and its insecticidal activity against *Colaphellus bowringi* Baly. *Biocontrol Sci Technol*, 28, 459-467.

SIEGEL, J. P. 2001. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *J Invertebr Pathol*, 77, 13-21.

SLAMTI, L. & LERECLUS, D. 2002. A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO J*, 21, 4550-9.

SONI, K. A., OLADUNJOYE, A., NANNAPANENI, R., SCHILLING, M. W., SILVA, J. L., MIKEL, B. & BAILEY, R. H. 2013. Inhibition and inactivation of *Salmonella typhimurium* biofilms from polystyrene and stainless steel surfaces by essential oils and phenolic constituent carvacrol. *J Food Prot*, 76, 205-12.

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.

SWICK, M. C., KOEHLER, T. M. & DRIKS, A. 2016. Surviving between hosts: sporulation and transmission. *Microbiol Spectr*, 4, 10.1128.

TATARA, R., NAGAI, T., SUZUKI, M., OH, I., FUJIWARA, S., NORIZUKI, M., MUROI, K. & OZAWA, K. 2013. Sepsis and meningoenophalitis caused by *Bacillus cereus* in a patient with myelodysplastic syndrome. *Intern Med*, 52, 1987-90.

THOMAS, W. E. & ELLAR, D. J. 1983a. *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal delta-endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Sci*, 60, 181-97.

THOMAS, W. E. & ELLAR, D. J. 1983b. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* insecticidal delta-endotoxin. *FEBS Lett*, 154, 362-8.

TILMAN, D., BALZER, C., HILL, J. & BEFORT, B. L. 2011. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 20260-4.

TORRES MANNO, M. A., REPIZO, G. D., MAGNI, C., DUNLAP, C. A. & ESPARIZ, M. 2020. The assessment of leading traits in the taxonomy of the *Bacillus cereus* group. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 113, 2223-2242.

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, 2638-42.

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.

TURNBULL, P. C. B., JØRGENSEN, K., KRAMER, J. M., GILBERT, R. J. & PARRY, J. M. 1979. Severe clinical conditions associated with *Bacillus cereus* and the apparent involvement of exotoxins. *J Clin Pathol*, 32, 289-93.

UNLU, M., ERGENE, E., UNLU, G. V., ZEYTINOGLU, H. S. & VURAL, N. 2010. Composition, antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (*Lauraceae*). *Food Chem Toxicol*, 48, 3274-80.

VADLAMUDI, R. K., WEBER, E., JI, I., JI, T. H. & BULLA, L. A., JR. 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J Biol Chem*, 270, 5490-4.

VAN DER VOORT, M., KUIPERS, O. P., BUIST, G., DE VOS, W. M. & ABEE, T. 2008. Assessment of CcpA-mediated catabolite control of gene expression in *Bacillus cereus* ATCC 14579. *BMC Microbiol*, 8, 62.

VIDIC, J., CHAIX, C., MANZANO, M. & HEYNDRICKX, M. 2020. Food sensing: detection of *Bacillus cereus* spores in dairy products. *Biosensors (Basel)*, 10, 15.

WEI, J. Z., HALE, K., CARTA, L., PLATZER, E., WONG, C., FANG, S. C. & AROIAN, R. V. 2003. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 2760-5.

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, 1481-8.

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, 5052-4.

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, 120-8.

WILCKS, A., HANSEN, B. M., HENDRIKSEN, N. B. & LICHT, T. R. 2006. Persistence of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides in the gut of human-flora-associated rats. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 48, 410-8.

XIAO, Y. & WU, K. 2019. Recent progress on the interaction between insects and *Bacillus thuringiensis* crops. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 374, 20180316.

XU, C., WANG, B. C., YU, Z. & SUN, M. 2014. Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. *Toxins*, 6, 2732-70.

ZHANG, X., CANDAS, M., GRIKO, N. B., ROSE-YOUNG, L. & BULLA, L. A., JR. 2005. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death Differ*, 12, 1407-16.

ZHANG, X., CANDAS, M., GRIKO, N. B., TAUSSIG, R. & BULLA, L. A., JR. 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 9897-902.

ZHU, K., DIDIER, A., DIETRICH, R., HEILKENBRINKER, U., WALTENBERGER, E., JESSBERGER, N., MÄRTLBAUER, E. & BENZ, R. 2016. Formation of small transmembrane pores: An intermediate stage on the way to *Bacillus cereus* non-hemolytic enterotoxin (Nhe) full pores in the absence of NheA. *Biochem Biophys Res Commun*, 469, 613-8.

ZIGHA, A., ROSENFELD, E., SCHMITT, P. & DUPORT, C. 2007. The redox regulator Fnr is required for fermentative growth and enterotoxin synthesis in *Bacillus cereus* F4430/73. *J Bacteriol*, 189, 2813-24.

ZOMMICK, D. 2018. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* strains Abts-351 and Abts-1857 within a simulated gut environment. Poster (P1.88) at 26th International ICFMH Conference (Food Micro), Berlin, 03.-06.09.2018.

X. DANKSAGUNG

Meinen herzlichen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin Märtlbauer aussprechen für die Überlassung dieses interessanten Themas, die freundliche Unterstützung und den Arbeitsplatz, an dem ich mich sehr wohl gefühlt habe.

Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Nadja Jeßberger für die hervorragende Betreuung, ihre Hilfsbereitschaft und ihr Engagement während der letzten Jahre. Danke für die motivierende Einarbeitung im Labor und für die sorgfältige Durchsicht dieses Manuskripts.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. A. Didier, Dr. R. Dietrich und Dr. K. Schauer bedanken für jede Hilfestellung und Anregungen zu meiner Arbeit.

Danke an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Lehrstuhls für die freundliche Zusammenarbeit und das schöne Arbeitsklima. Ich danke besonders Nele und Julia für ihre tatkräftige Unterstützung, ihre Hilfestellung bei so mancher Frage und für jede gemeinsame, erholsame Pause. Danke auch an Gabi und Maria, die mit ihrer freundlichen und fröhlichen Art stets eine große Hilfe waren.

Lieben Dank auch an alle Mitdoktoranden, besonders an Jonas, Steffi, Klement und Katalin, für die schöne gemeinsame Zeit im Büro und im Labor. Ein großer Dank geht vor allem an Marie-Thérèse für deine ehrliche Freundschaft und deine mitreißend positive Art.

Ein besonderer Dank gilt meinen langjährigen Freundinnen Franzi, Eva und Elli, die mich immer ermutigt haben und schon seit der Schulzeit für mich da sind. Ein großes Dankeschön auch an Julia und Simone für eure motivierte und mitreißende Einstellung gegenüber dem tierärztlichen Beruf und der Freundschaft, die seit dem Studium besteht. Ein großes Dankeschön möchte ich an dieser Stelle auch an Jakob richten, der immer großes Interesse an meinen Arbeiten zeigt und ein unverzichtbarer Freund geworden ist. Danke auch an meinen Mitbewohner Marco für die gemeinsame Zeit in München und deine Hilfe bei so manchen technischen Fragen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, vor allem meinen Eltern, Großeltern und meinem großen Bruder Michael, die immer an mich glauben, mich bedingungslos unterstützen und mich motivieren. Besonders danke ich meiner Mutter, weil du mich immer bestärkst und an meiner Seite bist.

Von ganzem Herzen danke ich dir Dani für deine Liebe, deinen Rückhalt, deine Ruhe und Geduld, deinen Humor und, dass du diesen Weg mit mir gegangen bist, gehst und immer gehen wirst. Ebenso gilt mein lieber Dank deiner Familie, die mir immer Zuspruch geben und auf die wir beide uns immer verlassen können.