

**Auswirkungen des Milchproteins Laktoferrin auf  
enteropathogene *Bacillus-cereus*-Stämme**

von Clara-Sophie Jugert

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

**Auswirkungen des Milchproteins Laktoferrin auf  
enteropathogene *Bacillus-cereus*-Stämme**

von Clara-Sophie Jugert

aus München

München 2024

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:

Priv.-Doz. Dr. Nadja Jeßberger

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

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

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Nadja Jeßberger

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Sebastian-Uwe Ulrich

Tag der Promotion: 06. Juli 2024



Für meine Familie

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b><i>Bacillus cereus</i>.....</b>	<b>3</b>
1.1.	Taxonomie.....	3
1.2.	Entdeckung und Bedeutung .....	4
1.3.	Pathogene Eigenschaften.....	5
1.3.1.	Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen .....	5
1.3.2.	Extraintestinale Erkrankungen .....	7
1.3.3.	Häufigkeit der durch <i>B. cereus</i> induzierten Erkrankungen.....	8
1.4.	Virulenzfaktoren.....	9
1.4.1.	Nicht-hämolytisches Enterotoxin (Nhe).....	11
1.4.2.	Hämolysin BL (Hbl).....	11
1.4.3.	Zytotoxin K (CytK).....	13
1.4.4.	Toxingentranskription und Toxinsekretion.....	14
<b>2.</b>	<b>Laktoferrin.....</b>	<b>15</b>
2.1.	Hintergründe und molekulare Charakteristika .....	15
2.2.	Antibakterielle und wachstumsfördernde Eigenschaften.....	18
2.3.	Laktoferrin als Nahrungsergänzungsmittel .....	22
<b>III.</b>	<b>ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>24</b>
<b>IV.</b>	<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>25</b>
<b>1.</b>	<b>Publikation I: Strain-specific Antimicrobial Activity of Lactoferrin-based Food Supplements .....</b>	<b>25</b>
<b>2.</b>	<b>Publikation II: Lactoferrin-based food supplements trigger toxin production of enteropathogenic <i>Bacillus cereus</i> .....</b>	<b>36</b>
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>59</b>
<b>1.</b>	<b>Auswirkungen von Laktoferrin auf bakterielles Wachstum .....</b>	<b>59</b>
<b>2.</b>	<b>Auswirkungen von Laktoferrin auf Toxinproduktivität.....</b>	<b>64</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>72</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>73</b>

---

<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>74</b>
<b>IX.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>104</b>
<b>X.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>105</b>
<b>XI.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>106</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AFLP	Amplified fragment length polymorphism
AMP	Antimicrobial peptides
apo-Lf	Apo-Laktoferrin (eisenfrei)
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
ATPase SecA	Adenosintriphosphatase Sekretionsprotein A: Peripheres Membranprotein des Sec-Translokations-Weges
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
<i>B.c.s.l.</i>	<i>B. cereus (sensu lato)</i>
<i>B.c.s.s.</i>	<i>B. cereus (sensu stricto)</i>
BELA	Bundeseinheitliches System zur Erfassung von Daten zu Lebensmitteln, die bei Krankheitsausbrüchen beteiligt sind
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bLf	Bovines Laktoferrin
BoNT	Botulinum-Neurotoxine
CaCo-2-Zellen	<i>Cancer coli-2-Zellen</i> , Humane Colonadenokarzinomzellen
CcpA	Catabolite control protein A
Cer	Cereulid
(CHO)-K1 Zellen	Chinese Hamster Ovary Cells, Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Zwerghamsters
ClyA	Cytolysin A
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
CRISP-CAS9	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats und CRISPR-associated protein
CT	Cholera-Toxin
CytK	Cytotoxin K/ Zytotoxin K

---

DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribokukleinsäure
EFSA	European Food Safety Authority/ Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EIA	Enzymimmunoassay
ETEC	Enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
Fnr	Fumarat/Nitrat-Reduktions-Regulator
GRAS	Generally recognized as safe, “allgemein als sicher anerkannt“
Hbl	Hämolysin BL
Hbl B	Komponente B des Hämolysin BL
Hbl L1	Komponente L1 des Hämolysin BL
Hbl L2	Komponente L2 des Hämolysin BL
hLf	Humanes Laktoferrin
holo-Lf	Holo-Laktoferrin (eisengesättigt)
IEC-6 Zellen	Intestinale epitheloide Zelllinie Nr. 6, Darmepithelzellen von Ratten
IfSG	Infektionsschutzgesetz
kbE/g LM	Koloniebildende Einheiten pro Gramm Lebensmittel
kDa	Kilo Dalton
lat	Latein
Lf	Laktoferrin
Lfampin	Laktoferrampin
Lfc	Laktoferricin
LITAF	LPS-induced TNF- $\alpha$ factor (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ )
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Hitzelabiles Enterotoxin aus <i>Escherichia coli</i>

---

MIC	Minimum inhibitory concentration/ Minimal inhibitory concentration
MilchErzV	Milcherzeugnisverordnung
MLST	Multi-locus sequence typing
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
Nhe	Nicht-hämolytisches Enterotoxin
Nhe A	Komponente A des Nhe
Nhe B	Komponente B des Nhe
Nhe C	Komponente C des Nhe
Nutrazeutikum	auch Nutraceuticals: Lebensmittel mit definierter gesundheitsfördernder Wirkung
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PapR	Peptide activating PlcR: Gruppen-spezifisches Signalpeptid PapR
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PGM	Porcine gastric mucin
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PlcR	Pleiotroper Phospholipase C Regulator
pLf	Porcines Laktoferrin
ResDE	Redox-Sensitives Signaltransduktionssystem
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species, Reaktive Sauerstoffspezies
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
SE	Staphylokokken-Enterotoxin
SecDF	Sekretionsprotein D (SecD), Sekretionsprotein F (SecF): Membranproteine des Sec-Translokations-Weges

---

SecYEG	Sekretionsprotein (SecY), Sekretionsprotein (SecE), Sekretionsprotein (SecG): Proteine (Integralkomplex) des Sec-Translokations-Weges
Spo0A	Sporulationsregulator Spo0A: Transkriptionsregulator
Vero-Zellen	<i>Verda reno</i> -Zellen, Nierenzellen der Grünen Meerkatze
WST	Water-soluble tetrazolium salt, wasserlösliches Tetrazoliumsalz
ZNS	Zentrales Nervensystem

## I. EINLEITUNG

*Bacillus cereus* ist ein Gram-positives, sporenbildendes, fakultativ anaerobes Bakterium und stellt für die Lebensmittelindustrie immer wieder eine Herausforderung dar. Als ubiquitärer Keim aus Boden und Umwelt kann er leicht über Nutztiere und -pflanzen auf verschiedenen Wegen in die Lebensmittelkette eingetragen werden. Seine extrem Hitze- und Trocknungs-stabilen Sporen ermöglichen es, diverse Hürden der Produktionskette zu überwinden sowie die technologische Verarbeitung von Lebensmitteln zu überstehen. Die Sporen sowie seine Fähigkeit zur Ausbildung von Biofilmen sorgen des Weiteren für eine hohe Widerstandsfähigkeit gegen Reinigungs- und Desinfektionsmittel (Ehling-Schulz et al., 2004; Ryu & Beuchat, 2005; Stenfors Arnesen et al., 2008). Aufgrund des Verderbs von Lebensmittelchargen oder aber rufschädigenden Rückrufaktionen kann es in betroffenen Betrieben zu hohen wirtschaftlichen Schäden kommen.

Nicht nur für Lebensmittelunternehmer, sondern auch für die Verbraucher spielt *B. cereus* eine wichtige Rolle. In den Jahren 2018 bis 2022 wurden insgesamt 717 lebensmittelbedingte Krankheitsausbrüche, die mit *B. cereus* assoziiert waren, an die EFSA übermittelt (EFSA & ECDC, 2019, 2021a, 2021b, 2022, 2023). Bakterielle Toxine sind nach wie vor eine der führenden Ursachen für gastrointestinale Krankheitsbilder. Nach *Campylobacter*, *Salmonella* und Norovirus Infektionen zählt *B. cereus* zu den wichtigsten Erregern von Magen-Darm-Erkrankungen (Dietrich et al., 2021). Man unterscheidet hierbei zwischen dem emetischen Syndrom und der Diarrhö-Form, die beide durch dieses Bakterium hervorgerufen werden können.

Das emetische Toxin Cereulid sorgt für eine klassische Lebensmittelintoxikation mit den Leitsymptomen Nausea, Vomitus und Malaise. Das Toxin liegt bei diesem Erkrankungsweg präformiert im Lebensmittel vor und gelangt durch Verzehr des entsprechenden Nahrungsmittels in den Organismus. Die Aufnahme eines vitalen Bakteriums ist als Auslöser für dieses Krankheitsbild nicht notwendig. Die Toxine können nach dem Verzehr direkt ihre Wirkung entfalten, weswegen die Inkubationszeit bei Lebensmittelintoxikationen nur etwa 30 Minuten bis wenige Stunden beträgt. Anders verhält es sich bei Lebensmittelinfektionen. Hierbei werden Sporen und vegetative Zellen des Erregers über das Lebensmittel



aufgenommen. Nach Überdauern der Magenpassage und Auskeimung der Sporen kommt es zur Vermehrung der Bakterien sowie vorrangig im Dünndarm zur Toxinproduktion. Diese sogenannten enteropathogenen Stämme sorgen im Darm für eine „Toxiko-Infektion“, das Leitsymptom hier ist wässrige Diarrhö.

Laktoferrin (Lf) ist ein eisenbindendes Glykoprotein, das in Säugetieren vorkommt. Es findet sich vor allem in Milch und Kolostrum, aber auch in vielen anderen Körperflüssigkeiten wie Tränen und Speichel (Bruni et al., 2016; Rosa et al., 2017). Neben seinen Aufgaben im Eisenstoffwechsel zeigt Lf viele weitere Eigenschaften. So sind enzymatische, antivirale und antibakterielle Aktivitäten beschrieben (Berlutti et al., 2011; Embleton et al., 2013). Auch immunmodulatorische, antioxidative, antimykotische und antikanzerogene Wirkungen wurden untersucht (Leboffe et al., 2009; Brock, 2012; Vogel, 2012; Siqueiros-Cendón et al., 2014; Kanwar et al., 2015). Lf spielt eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem und gilt als wichtiges Abwehrmolekül des Wirts (Bruni et al., 2016). Während seine hemmende Wirkung auf bakterielle Krankheitserreger schon seit geraumer Zeit bekannt ist, ist der Zusammenhang zwischen Lf und der Produktion und Wirkungsweise von Toxinen noch wenig erforscht. Eben diese Fragestellung wurde in der vorliegenden Arbeit mit den darin enthaltenen Publikationen detailliert untersucht, sowie auch die Stamm-spezifische antibakterielle Wirkung von Lf.

Diese Arbeit wurde durch die Brigitte und Wolfram Gedek Stiftung zur Förderung von Wissenschaft und Forschung auf den Fachgebieten der Mikroökologie und Mykotoxikologie, Riedgastr. 11, 81673 München, unterstützt.

## II. LITERATURÜBERSICHT

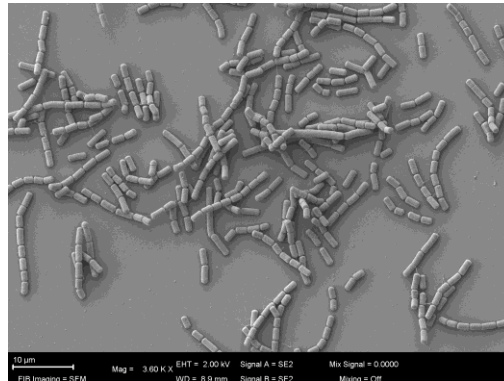
### 1. *Bacillus cereus*

#### 1.1. Taxonomie

Bei *Bacillus cereus* (*Bacillus cereus sensu stricto*, *B. cereus s. s.*) handelt es sich um ein Gram-positives, fakultativ anaerobes, Endosporenbildendes und bewegliches Bakterium des Genus *Bacillus* (siehe Abb. 1). Dieses ubiquitäre Stäbchen gehört zusammen mit *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides*, *B. cytotoxicus*, *B. wiedmannii* und *B. toyonensis* zur *Bacillus cereus* Gruppe (*Bacillus cereus sensu lato*, *B. cereus s. l.*). Manche Autoren zählen auch *B. tropicus*, *B. paranthracis*, *B. paramycooides*, *B. albus*, *B. proteolyticus*, *B. luti*, *B. nitratireducens*, *B. pacificus*, *B. mobilis* und den erst kürzlich publizierten *B. fungorum* zur dieser Gruppe (Makuwa et al., 2023). Seit 2018 betrachtet man die Spezies *B. weihenstephanensis* als Synonym für *B. mycooides* und führt sie nicht mehr separat auf (Liu et al., 2017; Parte et al., 2020). *B. cereus* ist namensgebend für diese Gruppe, die sich durch enge Verwandtschaft und genetische Ähnlichkeit auszeichnet (Ash et al., 1991; Helgason et al., 2000a; Helgason et al., 2000b). Immer wieder wurde die Zusammenfassung zu einer Spezies bzw. die Neustrukturierung der Gruppe angestrebt (Carroll et al., 2020, 2022). Allerdings gibt es schwerwiegende Unterschiede, vor allem im Bereich der Toxine, die eine Neugliederung erschweren. Einige Toxine sind Plasmid-codiert und ihre Produktion und Sekretion unterscheidet sich von Spezies zu Spezies (Stenfors Arnesen et al., 2008; Okinaka & Keim, 2016). Immer neuere, phylogenetische Verfahren wie *whole genome sequencing*, MLST (*multi-locus sequence typing*) und AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) eröffnen immer weitere Möglichkeiten der Differenzierung (Didelot et al., 2009; Guinebretière et al., 2008; Kovac et al., 2016), jedoch bleibt die Einteilung nach wie vor schwierig. Weitere Studien legen nahe, dass die Einschätzung des toxischen Potentials bei einer Risikobewertung neuer *B. cereus s. l.* Isolate eher auf der Einteilung in phylogenetische Gruppen als auf Speziesdefinition und phänotypischen Merkmalen beruhen sollte (Guinebretière et al., 2008, 2010).

In der Literatur werden die Begriffe „*B. cereus* Gruppe“, „*B. cereus (s.l.)*“ und „präsumtive *B. cereus*“ oft als Synonyme benutzt. Letzterer wird auch in

einschlägigen DIN EN ISO-Normen<sup>1</sup> verwendet, mit denen keine eindeutige Unterscheidung zwischen den einzelnen Vertretern der *B. cereus* Gruppe möglich ist (BfR, 2020).



**Abbildung 1:** *B. cereus*, Kolonie, vegetative Bakterien (vorwiegend in Ketten). Raster-Elektronenmikroskopie. Maßstab = 10 µm. Quelle: Nadja Jeßberger

## 1.2. Entdeckung und Bedeutung

Erstmals beschrieben wurde *B. cereus* 1887 von Frankland & Frankland, die diesen Keim aus der Luft eines Kuhstalls isolieren konnten (Frankland et al., 1887; Frankland & Frankland, 1887). Die Kolonien fielen bereits damals durch recht großes, glänzendes Wachstum auf. Durch seine wächsern (lat. *cereus*) erscheinende Morphologie auf Blutplatten gelangte der Keim zu seinem Namen. Die erste Erwähnung als potentieller Erreger gastrointestinaler Erkrankungen findet sich 1906 in einer Studie von Lubenau (Lubenau, 1906). Hierbei werden etwa 300 Krankheitsfälle beschrieben, die nach dem Verzehr von Königsberger Klopsen in einem Sanatorium aufgetreten waren. Lubenau wies einen Keim nach, den er als „*Bacillus peptonificans*“ bezeichnete. In den Folgejahren wurden immer wieder aerobe Sporenbildner als Lebensmittelinfektionserreger beschrieben, der erste wissenschaftlich abgesicherte und epidemiologisch aufgearbeitete Bericht eines durch *B. cereus* ausgelösten Krankheitsgeschehen wurde jedoch erst 1950 bzw. 1955 von Hauge veröffentlicht (Hauge, 1950, 1955). In einem norwegischen Krankenhaus infizierten sich 61 Menschen mit schwerem Durchfall, nachdem sie

---

<sup>1</sup> DIN EN ISO 7932:2004, Untersuchung von Lebensmitteln - Horizontales Verfahren zur Zählung von präsumtiven *Bacillus cereus* - Koloniezählverfahren bei 30 Grad Celsius (°C);  
DIN EN ISO 10198:2010, Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung präsumtiver *Bacillus cereus* in Milch und Milchprodukten - Koloniezählverfahren bei 37 °C;  
DIN EN ISO 21871:2006, Untersuchung von Lebensmitteln - Horizontales Verfahren zur Bestimmung niedriger Zahlen von präsumtiven *Bacillus cereus* in Lebensmitteln - Verfahren der wahrscheinlichsten Keimzahl (MPN) und Nachweisverfahren

ein Dessert mit Vanillesauce verzehrt hatten. Die hierbei beschriebenen Symptome sind typisch für die später als Diarrhö-Form bezeichnete Ausprägung der durch *B. cereus* hervorgerufenen gastrointestinalen Probleme. Nach eingehender Untersuchung der Rohstoffe konnte Getreidestärke mit einer hohen Sporenbelastung (bis zu  $10^4$  Sporen/g) als Auslöser des Krankheitsgeschehens identifiziert werden. Hauge wagte sogar einen Selbstversuch mit dem aus dem Dessert isolierten Stamm und konnte die Symptomatik des Ausbruchs reproduzieren (Hauge, 1955).

Das zweite Krankheitsbild, das *B. cereus* im Zusammenhang mit Lebensmitteln auslösen kann, wurde Anfang der 1970er Jahre in England bekannt. Damals wurden insgesamt 18 Ausbrüche mit 57 Fällen verzeichnet (Public Health Laboratory Service, 1972, 1973), alle im Zusammenhang mit dem Verzehr von gekochtem oder anschließend gebratenem Reis. Die Leitsymptome, Nausea und Vomitus, unterschieden sich erheblich von den bis dahin beschriebenen Ausbrüchen (Melling et al., 1976). Diese Erkrankung wurde deshalb als emetische oder Erbrechen-Form bezeichnet.

### **1.3. Pathogene Eigenschaften**

#### **1.3.1. Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen**

Bei bakteriell bedingten und durch Lebensmittel übertragbaren Krankheiten wird grundsätzlich zwischen Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen unterschieden (Märtlbauer & Becker, 2016; EFSA & ECDC, 2021a; Krämer & Prange, 2022; BVL, 2024). *B. cereus* ist einer der wenigen Keime, durch den, abhängig vom jeweiligen Isolat, beide Krankheitsgeschehen ausgelöst werden können.

Für die Entstehung einer Lebensmittelinfektion sind vermehrungsfähige Erreger notwendig. Bei den meisten bakteriell bedingten Infektionen ist der Hauptmanifestationsort der Darm, vorrangig der Dünndarm, wohin die Keime mit dem aufgenommenen Lebensmittel gelangen. Vegetative Formen von *B. cereus* überdauern die Magenpassage im Gegensatz zu Sporen meist nicht. Die Sporen keimen aus und vermehren sich anschließend. Sie bilden Toxine, ohne selbst direkt mit Darmzellen zu interagieren (Jessberger et al., 2020). Diese Toxine wiederum können an Darmschleimhaut und Epithelzellen binden und eine Erkrankung

auslösen. Das Anheften an Darmzellen erfolgt je nach Toxintyp auf unterschiedlichen Wegen. Diesen Mechanismus findet man bei der Diarrhö-Form von *B. cereus* (vgl. Kapitel 1.4) und bei *Clostridium perfringens*-Enterotoxinen (CPE) (Dietrich et al., 2021). In der Literatur wird daher auch häufig von einer „Toxiko-Infektion“ gesprochen, um dem Umstand Rechnung zu tragen, dass die eigentliche Schädigung durch Toxine und weniger durch die vegetativen Zellen des Erregers zustande kommt (Stenfors Arnesen et al., 2008; Logan, 2012; Krämer & Prange, 2022). Aufgrund dieses Prozesses ist die Inkubationszeit mit 8-16 Stunden relativ lang (Jessberger et al., 2020).

Bei Lebensmittelintoxikationen ist der Entstehungsweg der Erkrankung ein anderer. Hier ist nicht zwingend ein vitaler Erreger notwendig, die Aufnahme von präformiert im Lebensmittel vorliegenden Toxinen steht im Vordergrund. Die Keime vermehren sich bereits im Lebensmittel und beginnen dort mit der Toxinproduktion. Diese mikrobiellen Toxine sind häufig sehr stabil und wenig anfällig für Prozessfaktoren. Sie überstehen z. B. bei der Lebensmittelherstellung und -verarbeitung eingesetzte Verfahren wie Wärmebehandlung, Trocknung oder Säuerung und können sich dadurch gut im Nahrungsmittel halten. Wird nun ein solch kontaminiertes Lebensmittel verzehrt, gelangen die Toxine in den Organismus und können, sobald die notwendige infektiöse Dosis erreicht ist, ihre schädliche Wirkung entfalten (Märtlbauer & Becker, 2016). Die relevantesten bakteriellen Toxine in diesem Zusammenhang sind Staphylokokken-Enterotoxine (SE; *Staphylococcus* spp.), Botulinum-Neurotoxine (BoNt; *Clostridium botulinum*) und das emetische Toxin von *B. cereus* (Cereulid/Cer) (Dietrich et al., 2021). Die Inkubationszeit bei diesem Krankheitsbild ist verhältnismäßig kurz und kann je nach aufgenommener Toxinmenge von einigen Minuten bis zu wenigen Stunden dauern. Die Toxine müssen anders als bei der Lebensmittelinfektion nicht erst nach Magen-Passage und Erregerwachstum im Darm produziert werden, sondern können beinahe direkt nach (oralen) Aufnahme an ihrem jeweiligen Wirkungsort oder Zielorgan ansetzen (Märtlbauer & Becker, 2016). Ein Vergleich der klinischen Symptomatik der beiden durch *B. cereus* ausgelösten Krankheitsformen findet sich in Tabelle 1.

**Tabelle 1:** Klinische Symptomatik von *B. cereus*-Intoxikationen und -Infektionen (nach Märtlbauer & Becker, 2016)

	<b>Emetisches Syndrom</b>	<b>Diarrhö-Syndrom</b>
<b>Inkubationszeit</b>	0,5 - 6 h	8 - 16 h
<b>Krankheitsdauer</b>	6 - 24 h	12 - 24 h
<b>Primäre Symptome</b>	Erbrechen	Durchfall (meist wässrig)
<b>Sonstige Symptome</b>	Übelkeit, Leberschädigung, (Durchfall)	Schmerzen (abdominal), (Erbrechen)
<b>Auslösende Toxine</b>	Cereulid	Hbl, Nhe, CytK

### 1.3.2. Extraintestinale Erkrankungen

Neben seiner Fähigkeit, durch die Produktion verschiedener Toxine gastrointestinale Probleme (v.a. lebensmittel-assoziiert) zu verursachen, ist *B. cereus* auch für einige weitere, extraintestinale Krankheitsbilder bekannt. In der Humanmedizin sind dabei Neugeborene sowie ältere, immunsupprimierte oder schwangere Personen besonders gefährdet, da die Abwehrfunktion des Darmepithels unausgereift, geschwächt oder gestört sein kann (Girisch et al., 2003; Bottone, 2010). Aber auch immunkompetente Personen können betroffen sein (Messelhäuser & Ehling-Schulz, 2018). Zu den extraintestinalen Krankheitsformen zählen lokale Erkrankungen wie Wund- oder Hautinfektionen (häufig postoperativ), Harnwegsinfektionen, Osteomyelitiden oder Arthritiden. Auch teilweise fulminant und schnell verlaufende Endophthalmitiden sind bei Mensch und Tier beschrieben. Infektionen mit systemischen Auswirkungen wie Atemwegserkrankungen, Endokarditiden, Infektionen des ZNS oder Septikämien werden ebenfalls verzeichnet (Craig et al., 1974; Turnbull & Kramer, 1983; Barrie et al., 1992; Beecher et al., 2000; Kotiranta et al., 2000; Callegan et al., 2002; Hilliard et al., 2003; Avashia et al., 2007; Callegan et al., 2007; Lebessi et al., 2009;

Senesi & Ghelardi, 2010; Ramarao & Sanchis, 2013; Märtlbauer & Becker, 2016; Callegan et al., 2017). Schwerwiegend verlaufendes Leberversagen mit z. T. letalem Ausgang wurde ebenfalls beobachtet. Dieses wird jedoch nicht durch den Keim selbst hervorgerufen, sondern ist ätiologisch auf eine Cereulid-Intoxikation zurückzuführen (Mahler et al., 1997; Kotiranta et al., 2000; Dierick et al., 2005).

### 1.3.3. Häufigkeit der durch *B. cereus* induzierten Erkrankungen

Weltweit wurde *B. cereus* in den letzten Jahrzehnten zunehmend als Erreger gastrointestinaler Krankheitsfälle registriert. Innerhalb der EU stieg die Zahl der durch das Bakterium induzierten Lebensmittelvergiftungen im Jahr 2011 im Vergleich zum Vorjahr um 122 % an. Die USA verzeichneten sogar eine Verdopplung der durch *B. cereus* induzierten Krankheitsausbrüche im Vergleich zu 1999 (Märtlbauer & Becker, 2016). Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass *B. cereus* weltweit für 1,4 – 12 % aller Lebensmittelvergiftungsfälle ursächlich ist (Grutsch et al., 2018).

Auch in aktuellen Studien werden *B. cereus* bzw. seine Toxine regelmäßig zu den häufigsten lebensmittelbedingten Erkrankungsursachen gezählt. Tabelle 2 gibt, ausgehend von den aktuellsten Ausgaben des EFSA Zoonose Reports, einen Überblick über die Zahlen im Verlauf der letzten Jahre. 2022 war ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen, sowohl im Gesamtbereich „bakterielle Toxine“ (*Bacillus*, *Staphylococcus* und *Clostridium*), als auch für *B. cereus* Toxine innerhalb dieser Gruppe. Durch fünf große Ausbruchsgeschehen in Frankreich und Spanien rangierten die *B. cereus* Toxine im Jahr 2022 auf Platz Eins. Auch zwei Todesfälle wurden für das Jahr verzeichnet (EFSA & ECDC, 2023).

**Tabelle 2:** Beteiligung bakterieller Toxine an lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen im Verlauf der letzten fünf Jahre (nach EFSA Zoonose Reports; EFSA & ECDC, 2019, 2021a, 2021b, 2022, 2023). (A) Anteil aller bakteriellen Toxine (*B. cereus*, *C. perfringens*, *C. botulinum*, *S. aureus*, unspezifizierte bakterielle Toxine) in %. (B) Davon durch *B. cereus* induzierte Fälle in %.

<b>Jahr</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>	<b>2020</b>	<b>2021</b>	<b>2022</b>
<b>(A)</b>	18,5	19,3	17,2	17,0	19,8
<b>(B)</b>	1,9	3,0	2,3	2,2	5,3

Zur Häufigkeit der durch *B. cereus* verursachten Erkrankungen in Deutschland liegen keine verlässlichen Daten vor. Entsprechend zuständige Behörden der Länder und der Bundeswehr meldeten zwischen 2009 und 2015 über BELA<sup>2</sup> jährlich zwei bis sechs lebensmittelassoziierte Ausbrüche durch *B. cereus* (BfR, 2020). In den Jahren von 2015 bis 2018 wurden von Deutschland jährlich drei bis zehn Ausbrüche an die EFSA übermittelt (Rosner & Schewe, 2017; BVL, 2017, 2018, 2019). Im europäischen Vergleich wurden im Zeitraum von 2007 bis 2014 insgesamt 1127 *B. cereus*-bedingte Ausbrüche von europäischen Staaten an die EFSA gemeldet. Da schwere Verlaufsformen sehr selten sind, dürfte die Dunkelziffer und somit die tatsächliche Anzahl von Ausbruchsfällen sowohl in Deutschland als auch in Europa deutlich höher sein (BfR, 2020). Nicht selten kommt es zu Fehldiagnosen, da sich z. B. die Erbrechenform ähnlich darstellt wie eine Lebensmittelintoxikation mit *Staphylococcus aureus* Enterotoxinen oder eine virale Gastroenteritis, oder aber die Symptome der Diarrhö-Form denen einer *C. perfringens* Typ A Infektion gleichen. Da auch eher milde und selbstlimitierende Verläufe vorkommen, gehen Betroffene selten zum Arzt, der entsprechende Krankheitsausbruch wird also nicht erfasst. Für die Berichterstattung kommt erschwerend hinzu, dass es sich bei *B. cereus* nicht um einen nach §7 Infektionsschutzgesetz (IfSG, 2023) meldepflichtigen bakteriellen Erreger handelt.

#### 1.4. Virulenzfaktoren

*B. cereus* verfügt über ein vielfältiges Arsenal an Virulenzfaktoren und Pathogenitätsmechanismen. Mittels Proteomanalysen konnten bei diesem Keim bislang 377 Exoproteine nachgewiesen werden, 65 von ihnen wurden als mutmaßliche Virulenzfaktoren identifiziert (Duport et al., 2016). Einen Überblick über die vier wichtigsten Toxine und Toxinkomplexe mit humanpathogener Relevanz gibt Tabelle 3. Hauptverantwortlich für die emetische Form ist das zyklische Dodekadepeptid Cereulid. Das Peptid besteht aus der Aminosäuresequenz [D-O-Leu D-Ala L-O-Val D-Val]<sub>3</sub> und ist extrem stabil gegenüber Hitze, Säuren und Verdauungsenzymen. Ist ein Lebensmittel damit kontaminiert, lässt es sich sehr schwer bis gar nicht entfernen oder deaktivieren

---

<sup>2</sup> Bundeseinheitliches System zur Erfassung von Daten zu Lebensmitteln, die bei Krankheitsausbrüchen beteiligt sind



(Ehling-Schulz et al., 2004, 2005; Rajkovic et al., 2008).

Der Schwerpunkt dieser Dissertationsarbeit liegt auf enteropathogenen *B. cereus*, die für Lebensmittelinfektionen mit dem Leitsymptom Diarrhö verantwortlich sind (siehe oben). Daher werden die für die Pathogenese verantwortlichen, hitzelabilen Enterotoxine, das Einzelprotein Zytotoxin K (CytK) sowie die beiden Drei-Komponenten-Toxine Hämolyysin BL (Hbl) und nicht-hämolytisches Enterotoxin (Nhe) (Dietrich et al., 2021), im Folgenden näher beschrieben.

**Tabelle 3:** Gegenüberstellung wichtiger Eigenschaften relevanter *B. cereus* Toxine (nach Agata et al., 1995; Stenfors Arnesen et al., 2008; Märtilbauer & Becker, 2016; Jessberger et al., 2020)

	<b>Emetisches Toxin</b>	<b>Diarrhö-Toxine</b>
<b>Struktur</b>	Zyklisches Peptid (1,19 kDa) Dodekadepsi-peptid	Hbl: 3 Proteine (38-43 kDa) Nhe: 3 Proteine (36-41 kDa) CytK: 1 Protein (34 kDa)
<b>Stabilität</b>	Thermostabil, stabil gegenüber Verdauungsenzymen	Thermolabil (Inaktivierung bei 60 °C), Abbau durch Verdauungsenzyme, z. B. Trypsin
<b>Biologische Eigenschaften</b>	Zytotoxin, Ionophor, vermutlich Aktivierung von Rezeptoren des vegetativen Nervensystems	Zytotoxine, porenbildende Toxine
<b>Toxinbildung</b>	Im Lebensmittel (v.a. Reis, Nudeln, stärkehaltige Lebensmittel)	Vorrangig im Dünndarm (Toxinbildung im Lebensmittel für Erkrankung von untergeordneter Rolle, da Enterotoxine im Magen inaktiviert werden)
<b>Effektive Dosis</b>	ca. 8 µg/kg Körpergewicht oder ca. 10 <sup>3</sup> -10 <sup>5</sup> KbE/g Lebensmittel	ca. 10 <sup>5</sup> -10 <sup>8</sup> KbE/g Lebensmittel

#### 1.4.1. Nicht-hämolytisches Enterotoxin (Nhe)

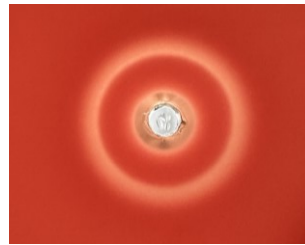
Das nicht-hämolytische Enterotoxin (Nhe) wurde erstmals bei einer 1995 in Norwegen aufgetretenen Lebensmittelinfektion aus dem Hbl-negativen *B. cereus* Stamm NVH 0075/95 isoliert (Lund & Granum, 1996). Für diesen Keim konnte im Gegensatz zu anderen Stämmen keine Hämolyse auf Schafblutagar nachgewiesen werden, weshalb hier fälschlicherweise die Bezeichnung „nicht-hämolytisch“ als Charakteristikum eingeführt wurde. Nhe weist jedoch neben zytolytischer durchaus auch hämolytische Aktivität bei verschiedenen Säugetierspezies auf (Fagerlund et al., 2008). Der zytotoxische Effekt gegenüber Epithelzellen beruht auf dessen porenbildenden Eigenschaften. Nach Toxinkontakt kommt es zu einem Austritt der Laktatdehydrogenase und zu Verlust von zellulärem ATP (Haug et al., 2010). Nhe ist ein Toxinkomplex aus drei verschiedenen Protein-Komponenten. Alle drei Komponenten sind chromosomal im *nheABC* Operon codiert (Granum et al., 1999). Eine Studie zeigte jedoch auch die Möglichkeit von Plasmid-codierten, „Nhe-ähnlichen“ Toxinen auf (Lapidus et al., 2008). Besagtes Operon findet sich bei 99 % der bisher untersuchten *B. cereus* sowie *B. thuringiensis* Stämme, jedoch sekretieren nur ca. 93 % alle drei Protein-Komponenten (Hansen & Hendriksen, 2001; Moravek et al., 2006).

Die drei Proteine NheA (41 kDa), NheB (39 kDa) und NheC (40 kDa) ähneln sich von Größe und Struktur und sind nur gemeinsam in spezifischem Konzentrationsverhältnis und in spezifischer Bindungsreihenfolge wirksam (Granum et al., 1999). Nhe ist ein porenbildendes Toxin mit struktureller und funktioneller Ähnlichkeit zu Cytolysin A (Cly A) aus *Escherichia coli*. Die Nhe Poren besitzen eine große Leitfähigkeit, was zu osmotischen Effekten wie z. B. Anschwellen und letztendlich zu Lyse der Epithelzellen führt (Fagerlund et al., 2008).

#### 1.4.2. Hämolysin BL (Hbl)

Das zweite Drei-Komponenten-Toxin, das von enteropathogenen *B. cereus* gebildet wird, ist Hämolysin BL (Hbl). Es wurde erstmals 1976 aus dem *B. cereus* Stamm F837/76, der aus einer postoperativen Wunde stammte, isoliert (Turnbull et al., 1979). Anfangs wurde davon ausgegangen, dass dieses Toxin nur aus einer bindenden (B) und einer lytischen (L) Komponente bestehe. Erst später wurde diese

Annahme auf drei beteiligte Komponenten korrigiert, nachdem weitere Untersuchungen das Vorhandensein von drei Proteinen (Hbl B; Hbl L1; Hbl L2) zeigten (Beecher & Macmillan, 1991). Deren Molekulargewichte bewegen sich im ähnlichen Größenrahmen wie die Proteine des Nhe: Hbl B (37,8 kDa), Hbl L1 (38,5 kDa) und Hbl L2 (43,2 kDa) (Beecher & Macmillan, 1991). Seinen Namen erhielt das Toxin durch seine Fähigkeit zur Lyse von Schafserythrozyten; es zeigen sich charakteristische, ringförmige Hämolysezonen auf Schafblutagar mit deutlichem Abstand zur Kolonie (Beecher et al., 1995a und Abb. 2).



**Abbildung 2:** Durch Hbl verursachtes, diskontinuierliches Hämolysemuster

Quelle: Nele Maxseiner, Clara-Sophie Jugert

In verschiedenen Tier- und Zellkulturversuchen konnten neben der namensgebenden hämolytischen Eigenschaft weitere Schädwirkungen festgestellt werden: Hbl ist zytotoxisch gegenüber Vero-Zellen, durch Erhöhung der Gefäßpermeabilität dermonekrotisch, sowie fähig zur Bildung okularer Nekrosen und Flüssigkeitsansammlungen im Darmschlingentest (Beecher & Wong, 1994; Beecher et al., 1995a, 1995b). Wichtig ist, dass nur die Kombination der drei einzelnen Komponenten biologische Aktivität zeigt. Wie auch bei Nhe sind die Proteine einzeln atoxisch und müssen in geeigneter Bindungsreihenfolge sowie in geeignetem Konzentrationsverhältnis vorliegen. Fagerlund und Kollegen verglichen außerdem hypothetisch erstellte Strukturmodelle von NheC und NheB mit denen von Hbl B und ClyA und postulierten aufgrund großer Übereinstimmungen, dass Hbl, Nhe und ClyA einer neuen Familie porenbildender Toxine angehören (Fagerlund et al., 2008).

Wie auch die Gene für Nhe, liegen alle *hbl*-codierenden Gene auf einem Operon (Heinrichs et al., 1993; Ryan et al., 1997; Lindbäck et al., 1999). Das Operon besteht aus den Genen *hbIC*, *D*, *A* und *B*, die die Proteine Hbl L2, L1, B und B' codieren (Ryan et al., 1997; Auger et al., 2012). Nicht alle Stämme besitzen das vollständige *hbICDAB* Operon, 40 - 70% weisen nur *hbICDA* auf (Dietrich et al.,

2021). Beecher und Kollegen postulierten außerdem, dass bei manchen Stämmen zwei unterschiedliche homologe *hbl* Operons existieren. (Beecher & Wong, 2000). In der häufiger vorkommenden Variante ist zusätzlich noch *hblB* enthalten (Ryan et al., 1997). Lange galt es als Pseudogen, weil keine Aktivität bewiesen werden konnte (Agaisse et al., 1999; Lindbäck et al., 1999). Schließlich konnten jedoch Clair und Kollegen 2010 dessen Transkription, Translation und die Sekretion des entsprechenden Proteins (Hbl B') im *B. cereus* Stamm ATCC 14579 nachweisen (Clair et al., 2010). Die deutlich seltenere, zweite Variante des Operons, die nur *hblCDA* enthält, trägt den Namen *hbl<sub>a</sub>* (Beecher & Wong, 2000).

### 1.4.3. Zytotoxin K (CytK)

Im Gegensatz zu Nhe und Hbl handelt es sich bei Zytotoxin K (CytK) um ein Ein-Komponenten Enterotoxin. Mit einem Molekulargewicht von 33,8 kDa liegt es in der Größenordnung der Einzelkomponenten von Nhe und Hbl (Lund et al., 2000, Hardy et al., 2001). Erstmals isoliert wurde das Toxin aus dem thermotoleranten *B. cereus* Stamm NVH 391/98, der 1998 für eine tödlich verlaufende Lebensmittelinfektion in Frankreich verantwortlich war (Lund et al., 2000). Stenfors und Kollegen konnten in späteren Untersuchungen noch fünf weitere *B. cereus* Stämme ausmachen, die Nhe produzierten und bei denen zusätzlich mittels PCR ein „CytK-ähnliches“ Toxin nachgewiesen werden konnte (Stenfors & Granum, 2001; Stenfors et al., 2002).

CytK wird zu den  $\beta$ -porenbildenden Toxinen ( *$\beta$ -barrel pore forming toxins*) gezählt (Stenfors Arnesen et al., 2008). In diese Gruppe wird es aufgrund von Sequenzhomologien zu Toxinen von *S. aureus* (Leukozidin,  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Hämolyisin; Lund et al., 2000; Menestrina et al., 2001; Stenfors Arnesen et al., 2008), *C. perfringens* ( $\beta$ -Toxin; Lund et al., 2000; Popoff, 2014) und *B. cereus* (Hämolyisin II; Baida et al., 1999; Ramarao & Sanchis, 2013) eingeordnet. Für CytK sind hämolytische, zytotoxische (gegenüber Vero-Zellen) und dermonekrotische Eigenschaften nachgewiesen (Lund et al., 2000). Neben seinen porenbildenden Eigenschaften in Lipiddoppelmembranen zeigt es sich außerdem hoch toxisch gegenüber humanen intestinalen Epithelzellen (Hardy et al., 2001; Fagerlund et al., 2004).

2004 wurde nach DNA-Analysen eine zweite Variante des *cytK*-Gens beschrieben

(Fagerlund et al., 2004). Das Gen *cytK-2* weist eine Sequenzhomologie von 89 % zum originären *cytK* (*cytK-1*) auf und das entsprechende Protein (CytK-2) zeigt sich ebenfalls hämolytisch, zytotoxisch und porenbildend. Allerdings ist diese Variante bis zu 80 % weniger toxisch als CytK-1 aus dem Typstamm NVH 391/98 (Fagerlund et al., 2004). Wie relevant CytK-2 wirklich für die Pathogenität und Pathogenese der Diarrhö-Form ist, ist nach wie vor nicht vollständig geklärt (Castiaux et al., 2015). CytK-2 kann in vielen, auch Nhe und/oder Hbl produzierenden Stämmen gefunden werden, CytK-1 hingegen ist deutlich seltener (Guinebretiere et al., 2006). Es wird nur von einem bestimmten Cluster innerhalb der *B. cereus* Gruppe produziert (Fagerlund et al., 2007; Guinebretière et al., 2013). Dieses wurde als neue Spezies, *B. cytotoxicus*, definiert (Guinebretière et al., 2013).

#### 1.4.4. Toxingentranskription und Toxinsekretion

Der Prozess der Enterotoxinproduktion durch *B. cereus* ist hoch komplex, vielschichtig untersucht, und dennoch bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. Bereits die Expression der für Nhe, Hbl und CytK codierenden Gene wird durch mehrere, Umweltreiz-abhängige Regulatoren gesteuert. Zu den relevanten Umgebungsfaktoren zählen unter anderem pH-Wert, Nährstoffangebot, Umgebungstemperatur, Sauerstoffgehalt und Redoxpotential. Auch die Wachstumsphase sowie allgemein der Energiestatus der Zellen können eine Rolle spielen (Dietrich et al., 2021). Für die Genexpression maßgeblich verantwortlich ist der pleiotrope Phospholipase C Regulator (PlcR; Agaisse et al., 1999; Gohar et al., 2008; Grenha et al., 2013). PlcR ist Teil eines *Quorum sensing* Systems, durch das es *B. cereus* möglich ist, eine große Bandbreite an Virulenzgenen, z. B. *nhe*, *hbl*, *cytK*, *smase*, *plcA*, *plcB* und *inhA2*, in Abhängigkeit der Zelldichte zu regulieren (Dietrich et al., 2021; Prince & Kovac, 2022). PlcR wird zu Beginn der stationären Wachstumsphase durch das *B. cereus* Gruppen-spezifische Peptid PapR aktiviert. Dieses wird zunächst aus der Zelle ausgeschleust, *via* neutraler Protease NprB modifiziert und anschließend als Heptapeptid PapR7 durch die Permease OppABCDF in die Zelle reimportiert (Gominet et al., 2001; Grenha et al., 2013; Dietrich et al., 2021). Es vermittelt die Bindung von PlcR an sogenannte PlcR-Boxen (konservierte, palindrome DNA-Sequenzen), die im Promotorbereich der Zielgene liegen, was deren Transkription aktiviert. Die Expression von PlcR ist positiv autoinduziert und wird bei Nährstoffmangel durch den

Transkriptionsregulator Spo0A reprimiert (Agaisse et al., 1999; Lereclus et al., 2000; Gohar et al., 2008; Grenha et al., 2013).

Zusätzlich beeinflussen die Redoxregulatoren Fumarat/Nitrat-Reduktions-Regulator (Fnr; Zigha et al., 2007; Esbelin et al., 2008, 2012) und ResDE, ein Zwei-Komponenten-System (Esbelin et al., 2009), die Toxinexpression bei niedrigem Redoxpotential bzw. Sauerstoffgehalt. Auch auf sich ändernde Nährstoffbedingungen folgen regulatorische Anpassungen: So hemmt z. B. das Katabolit-Kontrollprotein A (CcpA) die Enterotoxin-Genexpression je nach Verfügbarkeit von Kohlenhydraten, vor allem Glukose (van der Voort et al., 2008).

Darüber hinaus ist auch der Mechanismus der Toxinsekretion noch nicht vollständig geklärt sowie Stamm-spezifisch variabel. Die Aminosäuresequenzen der Nhe, Hbl und CytK Proteine beinhalten N-terminale Signalpeptide, was eine Sekretion über den sogenannten Sec-Translokations-Weg vermuten lässt (Fagerlund et al., 2010). Dieser besteht aus den Komponenten SecYEG (Pore), SecDF und der ATPase SecA. Die Signalpeptide werden von SecA erkannt und die Proteine dadurch an den SecYEG-Komplex angelagert und anschließend ausgeschleust (van Wely et al., 2001). Fagerlund und Kollegen konnten außerdem am Beispiel von Hbl B zeigen, dass es zum Verlust bzw. zur Reduktion der Sekretion kommt, wenn die Signalpeptidsequenz modifiziert wird. Auch die Zugabe von Natriumazid, welches SecA hemmt, hatte einen ähnlichen Effekt (Fagerlund et al., 2010). Im Gegensatz dazu zeigten Ghelardi und Kollegen, dass auch der Flagellen-Export-Komplex essentiell für die erfolgreiche Ausschleusung von Virulenzfaktoren, unter anderem Hbl, ist (Ghelardi et al., 2007; Salvetti et al., 2007; Senesi & Ghelardi, 2010).

## **2. Laktoferrin**

### **2.1. Hintergründe und molekulare Charakteristika**

Laktotferrin (Lf) ist ein eisenbindendes Glykoprotein und wird zur Gruppe der Transferrine gezählt (Drago-Serrano et al., 2017). Es kommt in Säugetieren vor und wird häufig als multifunktionelles Abwehrmolekül bezeichnet (Bruni et al., 2016; Rosa et al., 2017). Lf wird exokrin von Drüsenepithelzellen abgesondert (v. a. Milchdrüsenepithel) oder aber von neutrophilen Granulozyten nach

entsprechendem Anreiz freigesetzt. Es findet sich vorrangig in der Milch und im Kolostrum, kann aber auch in vielen anderen Körperflüssigkeiten wie Tränen, Speichel, Flüssigkeiten des Urogenital- und Gastrointestinaltrakts, Nasen- und Bronchialschleimhaut sowie Plasma nachgewiesen werden. Die Konzentrationen schwanken im Speziesvergleich, die höchsten Werte sind in menschlichem Kolostrum zu finden. Bovines Kolostrum und humane Milch enthalten etwa 1-2 mg/ml und bovine Milch in Abhängigkeit der Laktationsperiode 0,02-0,35 mg/ml Lf (vgl. Tabelle 4 und Bruni et al., 2016; Giansanti et al., 2016; Rosa et al., 2017; Hao et al., 2019). Während Infektionen oder Entzündungen kann die Konzentration von Lf in verschiedenen Flüssigkeiten aufgrund der Rekrutierung von Neutrophilen ansteigen. Bemerkenswerterweise synthetisieren  $10^6$  Neutrophile bis zu 15  $\mu$ g Lf. Gespeichert wird es unter anderem in den sekundären Granula polymorphkerniger Leukozyten (Masson & Heremans, 1968; Bennett & Kokocinski, 1978, 1979; Rosa et al., 2017).

**Tabelle 4:** Laktoferrinkonzentrationen (hLf) in verschiedenen Flüssigkeiten und Sekreten (nach Masson et al., 1966; Masson & Heremans, 1968; Rosa et al., 2017).

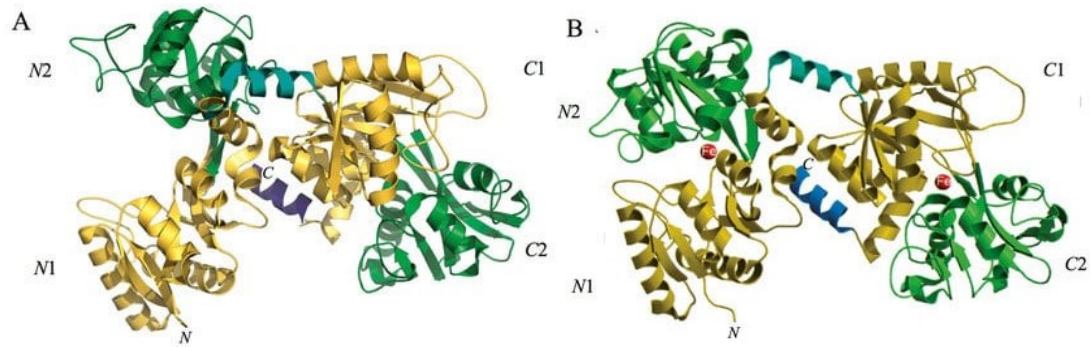
<b>Vorkommen</b>	<b>Konzentration (mg/ml)</b>
<b>Kolostrum</b>	8
<b>Milch</b>	1,5-4
<b>Tränen</b>	2
<b>Speichel</b>	0,008
<b>Vaginalsekret</b>	0,008
<b>Samenflüssigkeit</b>	0,112
<b>Zerebrospinalflüssigkeit</b>	Nicht nachweisbar
<b>Plasma</b>	0,0004
<b>Gelenksflüssigkeit</b>	0,001

Als Protein ist Lf hitzelabil und beginnt ab einer Temperatur von über 70 °C zu denaturieren. Außerdem unterliegt es nach oraler Aufnahme verschiedenen enzymatischen und biochemischen Hürden, was Einfluss auf die Bioverfügbarkeit hat. Die absolute orale Verfügbarkeit von nativem Lf liegt bei unter 1% (Yao et al., 2013). Trypsin und andere proteolytisch wirksame Enzyme sorgen dafür, dass Lf in verschieden große Fragmente mit unterschiedlich starker biologischer Aktivität gespalten wird, die sogenannten „antimikrobiell wirksamen Peptide“

(*antimicrobial peptides*, AMP; Jenssen et al., 2006; Wang et al., 2008; Bruni et al., 2016). Bei Lf sind drei dieser Peptide besonders hervorzuheben. Es handelt sich dabei um Lf(1-11), das Oligopeptid aus den ersten elf verbleibenden Aminosäuren, Lactoferricin (Lfc) und Lactoferrampin (LFampin) (Brouwer et al., 2011; Sinha et al., 2013; Bruni et al., 2016). Die Entstehung verschiedener Derivate aus Lf nach oraler Aufnahme muss besonders bei der Formulierung von Lebensmittelzusätzen und Nahrungsergänzungsmitteln berücksichtigt werden. Die Entwicklung pharmazeutischer Strategien zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit und zur Maximierung der Absorption von Lf ist nach wie vor Gegenstand der Forschung (Yao et al., 2013).

Das gesamte Protein hat ein Molekulargewicht von etwa 80 kDa und bildet zwei ähnliche globuläre Domänen (C- und N-Lappen) aus (Drago-Serrano et al., 2017). Es ist positiv geladen mit einem isoelektrischen Punkt von 8,0-8,5 (Levay & Viljoen, 1995; van der Strate et al., 2001; González-Chávez et al., 2009). Die Primärstruktur ähnelt sich unter den verschiedenen Säugetierspezies sehr (Moore et al., 1997; Baker & Baker, 2009; Lambert, 2012; Drago-Serrano et al., 2017; The UniProt Consortium, 2022; UniProt Knowledgebase, 2024). Die Sekundärstruktur ist hauptsächlich auf das Vorhandensein von Disulfidbrücken zwischen einzelnen Cysteinresten zurückzuführen (Moore et al., 1997; Steijns & van Hooijdonk, 2000). Die Tertiärstruktur zeigt, dass die Polypeptidkette in homologe N- und C-terminale Lappen gefaltet ist, die in N1:N2- und C1:C2-Domänen organisiert sind und kovalent durch eine dreigängige  $\alpha$ -Helix verbunden werden (Moguilevsky et al., 1985; Steijns & van Hooijdonk, 2000; Baker & Baker, 2009). Jeder Spalt zwischen den Domänen N1:N2 und C1:C2 kann ein Eisenion ( $\text{Fe}^{3+}$ ) binden. Ein Molekül Lf kann also mit insgesamt zwei Eisenionen beladen werden (Masson et al., 1966; Masson & Heremans, 1968, 1971; Testa, 2001, Baker & Baker, 2009). Die Tertiärstruktur von bovinem Lf (bLf) ist in Abb. 3 dargestellt. Die Eigenschaft, Eisen reversibel zu binden, bedingt drei verschiedene Ausprägungsformen des Moleküls: eisenfreies Lf (apo-Lf), mit nur einem Eisenion beladenes (*monoferric*) Lf und eisengesättigtes (*diferric*) Lf (holo-Lf) (Baker & Baker, 2009). Natürlich synthetisiertes Lf ist in den meisten Fällen nicht eisengesättigt und hat deswegen eine hohe Bindungsaffinität für Eisen (Redwan et al., 2014).





**Abbildung 3:** Tertiärstruktur von bovinem apo-Lf (eisenfrei) (A) und bovinem holo-Lf (eisengesättigt) (B), nach Rosa et al. (2017). Die N-Lappen (links) sowie die C-Lappen (rechts) sind jeweils in zwei Untereinheiten unterteilt (N1 und N2; C1 und C2). Rot: Eisenionen an ihren jeweiligen Bindungsstellen.

## 2.2. Antibakterielle und wachstumsfördernde Eigenschaften

Lf ist ein Molekül mit einer großen Bandbreite an Eigenschaften, welche in Abb. 4 zusammengefasst sind. Eine seiner Hauptaufgaben liegt in der Regulation des Eisenstoffwechsels. Da sowohl Eisenmangel als auch Eisenüberschuss schädlich für den Organismus sein können, wird die Eisenaufnahme streng kontrolliert (Ajello et al., 2002; Bruni et al., 2016; Sessa et al., 2017). In einem fein abgestimmten System aus Resorption, Verteilung und Elimination kommt Lf die Aufgabe zu, freies Eisen zu binden, Eisen zu transportieren und Eisen für späteren Bedarf zeitweise zu speichern (Kawakami et al., 1988; Andrews, 1999, 2000.; Rosa et al., 2017; Hao et al., 2019). Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich ausführlich mit den weiteren Funktionen von Lf. Für die antiviralen, antiparasitären, antimykotischen und antikanzerogenen Eigenschaften sei auf entsprechende Autoren verwiesen (Adlerova et al., 2008; Leboffe et al., 2009; Vogel, 2012; Ammons & Copié, 2013; Bruni et al., 2016; Drago-Serrano et al., 2017; Rosa et al., 2017; Hao et al., 2019; Vega-Bautista et al., 2019; Zarzosa-Moreno et al., 2020). Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf den antibakteriellen Eigenschaften liegt, werden im Folgenden diejenigen Funktionen, die eine Bedeutung im Zusammenhang vor allem mit pathogenen Keimen wie *B. cereus* haben können, genauer erläutert.



**Abbildung 4:** Überblick über einige der Hauptfunktionen von Laktoferrin

Die Fähigkeit Eisen zu binden verleiht Lf neben seinen physiologischen Funktionen eine seiner antimikrobiellen Eigenschaften. Eisen ist nicht nur in eukaryotischen Zellen wichtig, auch (pathogene) Mikroorganismen benötigen ein gewisses Maß an Eisen (v.a. für verschiedene Wachstumsprozesse) (Sato et al., 1998; Harvie et al., 2005; Ma et al., 2012; Chandransu et al., 2017). Lf kann durch die bereits oben beschriebenen Wirkungsweisen Eisen entziehen oder freies Eisen binden und somit sowohl Gram-positive Bakterien wie z. B. *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Listeria monocytogenes*, aber auch Gram-negative Bakterien wie *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Helicobacter pylori*, *Salmonella* spp. und *Shigella* spp. durch eine Eisenmangelsituation in ihrem Wachstum hemmen (Arnold et al., 1980; Sánchez et al., 1992; Sato et al., 1999b; Valenti & Antonini, 2005; Yen et al., 2011). Lf kann also bakteriostatisch wirken.

Andererseits hat es auch bakterizide Eigenschaften: Durch Bindung seiner positiv geladenen N-terminalen Regionen an negativ geladenen Bereiche von Bakterien [v.a. Lipopolysaccharide (LPS, Gram-negative Keime) oder Teichon- bzw. Lipoteichonsäuren (Gram-positive Keime)] sorgt es für Membranschäden oder sogar -zerstörung. Diese Interaktion ist auch für verschiedene Viren oder Pilz- und Parasitenzelloberflächen beschrieben. Ursache für die bakterizide Wirkung ist die Störung der Lipiddoppelschicht der mikrobiellen Zellmembran, was sich wiederum in der daraus resultierenden erhöhten Permeabilität und veränderten osmotischen Druckverhältnissen äußert. Der Austritt von Zytoplasma-Bestandteilen führt meist zum Zelltod (Arnold et al., 1980, 1982; Appelmelk et al., 1994; Ulvatne et al., 2001;

Ammons & Copié, 2013; Liu et al., 2011; Dierick et al., 2020). Die erhöhte Dichte positiver Ladung an der Oberfläche von Lf sorgt außerdem für eine unspezifische Bindung von Biomolekülen oder für Zusammenlagerung von Proteinen, was ebenfalls zu einer Störung in der Zellmembran führen kann (Rahman et al., 2009; Ochoa & Sizonenko, 2017). Qiu und Kollegen konnten außerdem eine Protease-ähnliche Aktivität der N-terminalen Bereiche von Lf nachweisen (Qiu et al., 1998). Lf spaltete in einer Studie bei *Haemophilus influenzae* Proteinen Arginin-reiche Regionen ab und schwächte dadurch Virulenz und Kolonisationsvermögen des Keims (Hendrixson et al., 2003).

Des Weiteren kann Lf die Adhäsion bestimmter Bakterien (u. a. *Streptococcus mutans*, *E. coli*, *Shigella* spp., *Helicobacter felix*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *Chlamydomphila psittaci*) an die Wirtszelle unterbinden (Visca et al., 1989; Kawasaki et al., 2000; de Araújo & Giugliano, 2001; de Oliveira et al., 2001; Dial & Lichtenberger, 2002; Di Biase et al., 2004; Willer et al., 2004; Beeckman et al., 2007; Berlutti et al., 2008; Rosa et al., 2017). Es wird vermutet, dass Lf mikrobielle Adhäsine bindet und dadurch deren Interaktion mit der Zielzelle, insbesondere mit Rezeptoren an der Oberfläche, verhindert (Roseanu et al., 2010; Wakabayashi et al., 2010). Auch die These einer kompetitiven Bindung von Lf an Wirtszellen und/oder Komponenten mikrobieller Oberflächen und dadurch Blockade der Anheftung des jeweiligen Keims wird von manchen Autoren vertreten (Valenti & Antonini, 2005; Sessa et al., 2017).

Bei der Bildung von Biofilmen wird Lf ebenfalls eine inhibierende Wirkung zugeschrieben. Hierbei spielen das Abspalten bzw. die Bindung von Eisen sowie das Erschweren bzw. sogar Verhindern der Adhäsion der Zellen meist eine wichtige Rolle. Einige Bakterien benötigen große Mengen an Eisen, um Biofilme ausbilden zu können. Wird ihnen dieses entzogen, erschwert dies einerseits das Wachstum der Bakterien (siehe oben) und andererseits auch die Formierung eines Biofilms (Yen et al., 2011). Weniger Bakterien und fehlende Grundbausteine verhindern somit ein Ansetzen und Ausbreiten des Biofilms (Leitch & Willcox, 1999; Weinberg, 2004; Singh et al., 2002). *In vitro* Studien konnten z. B. für *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* und *E. coli* zeigen, dass Lf in der Lage ist, bereits bestehende Biofilme zu zerstören bzw. die weitere Ausbildung zu hemmen (Singh et al., 2002; Zarzosa-Moreno et al., 2020). Dies geschieht entweder durch

die Blockade der Lektin-vermittelten Adhäsion der Mikroorganismen oder aber durch Erhöhung der Motilität (Singh et al., 2002; Lesman-Movshovich et al., 2003).

Außerdem spielt Lf sowohl im angeborenen als auch erworbenen Immunsystem eine Rolle (Legrand et al., 2004; Latorre et al., 2010; Legrand, 2012, 2016). Es hat dabei z. B. Einfluss auf die Ausbildung von Antikörpern, auf die Reifung von B- und T-Zellen und auf die Erhöhung der Anzahl von natürlichen Killer-Zellen (Actor et al., 2009; Hao et al., 2019). Lf kann darüber hinaus Endotoxine bzw. LPS (Bestandteile der äußeren Bakterienmembran) binden (Appelmeik et al., 1994; Ellass-Rochard et al., 1995, 1998). Diese triggern im Regelfall nach Invasion (und evtl. Zerfall) Gram-negativer Bakterien das Immunsystem des Wirts. Vor allem Toll-Like-Rezeptoren 4 erkennen die Pathogen-assoziierten molekularen Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), zu denen neben LPS z. B. auch Flagellin, verschiedene Toxine und Peptidoglykane gehören (Rosa et al., 2017) und lösen eine Reaktion bei Leukozyten und Thrombozyten aus (Beutler, 2002; Clark et al., 2007; Beutler & Moresco, 2008). Werden nun Endotoxine bereits durch Lf gebunden, können insgesamt weniger Bakterienbestandteile die Immunzellen triggern und das Ausmaß der Immunreaktion reduziert sich (Vogel, 2012).

Neben den zahlreichen antibakteriellen Eigenschaften von Lf sind aber auch wachstumsfördernde Effekte beschrieben, vor allem für probiotische Mikroorganismen aus den Spezies *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* und *Bifidobacterium* (Fuller, 1989; Gibson, 1999; Latif et al., 2023). Hierbei spielt die Unterscheidung zwischen apo-Lf und holo-Lf eine wichtige Rolle. In den meisten Fällen sorgt apo-Lf für eine hemmende Wirkung oder nimmt keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten getesteter Probiotika (Petschow et al., 1999; Tian et al., 2010; Chen et al., 2013b; Vega-Bautista et al., 2019). In vergleichenden Untersuchungen wurde bereits ein hemmender Effekt auf pathogene Keime wie *S. Typhimurium*, *Enterococcus faecalis* oder Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) ermittelt, während Lactobazillen nicht beeinträchtigt wurden (Tian et al., 2010; Chen et al., 2013a). Auch die eisengesättigte Form kann (positive) Auswirkungen auf ausgewählte Mikroorganismen haben. So zeigte eine Studie auf, dass holo-Lf z. B. das Wachstum von *Lactobacillus acidophilus* anregt. Bei *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve* und *Bifidobacterium infantis* waren sowohl holo-Lf als auch apo-Lf wachstumsfördernd wirksam. *Bifidobacterium longum* hingegen zeigte auf keine der Lf-Formen eine Reaktion (Kim et al., 2004).

### 2.3. Laktoferrin als Nahrungsergänzungsmittel

Bovines Lf wird bereits seit Jahrzehnten als gesundheitsfördernd beworben. Vor allem in Japan ist es als Zusatz sowohl in diversen lebensmittelassoziierten Produkten als auch in der Pharma- und Kosmetikbranche bekannt (Wakabayashi et al., 2006; Tomita et al., 2009). Aber auch in Europa wurde Lf mittlerweile von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (*European Food Safety Authority*) als Inhaltsstoff von Lebensmitteln zugelassen (EFSA Panel on Dietetic Products & Allergies, 2012). Von der US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel (*U.S. Food and Drug Administration*, FDA) ist bLf als Nahrungsergänzungsmittel allgemein als sicher anerkannt (*generally recognized as safe*, GRAS) (FDA, 2001; Wakabayashi et al., 2006; FDA, 2013a, 2013b, 2016; Krolitzki et al., 2022). Die weltweite Produktion von bLf lag 2021 bei mehr als 300 t (Krolitzki et al., 2022). Der Marktwert wird für 2027 auf über 265 Millionen Euro geschätzt (Hancocks, 2021).

Viele Branchen haben den Wert von Lf erkannt und versuchen die positiven Eigenschaften für ihre Produkte zu nutzen. Dadurch findet sich (bovines) Lf in zahlreichen verschiedenen Produktkategorien: in Lebensmitteln (z. B. Säuglingsnahrung, Magermilchprodukten, Sportlernahrung und -drinks und Joghurt), Kosmetikprodukten (vor allem Hautpflegeprodukte), Produkten zur Mundhygiene (Mundspüllösungen und Zahnpasta), Nahrungsergänzungsmitteln und Nutraceuticals (Wang et al., 2019). Sogar Tierfutter kann Lf als Zusatz enthalten (Wakabayashi et al., 2006). Auch als Nahrungsergänzungsmittel ist es beliebt, von der Apotheke bis hin zu diversen Onlineshops ist es frei verkäuflich erhältlich. Als Nahrungsergänzungsmittel werden vor allem die positiven Auswirkungen auf den Eisenstoffwechsel, die immunfördernden und abwehrsystemsteigernden Eigenschaften sowie die antioxidativen und antimikrobiellen Effekte beworben.

Vorrangig findet bLf Anwendung, da es relativ einfach und günstig herzustellen ist (Cao et al., 2023). Das Ausgangsprodukt Kuhmilch ist in großer Menge verfügbar und somit für die Gewinnung von Lf im großen Stil geeignet (Krolitzki et al., 2022). Gewonnen wird bLf hauptsächlich aus Magermilch und Molke (süß und sauer), die als Nebenprodukte in Molkerei und Käserei anfallen. Nach verschiedenen Aufreinigungsschritten wird das Lf durch Ultrafiltration aufkonzentriert, einer (geringen) Wärmebehandlung unterzogen und dann gefriergetrocknet, um ein

Pulver herzustellen. Verschiedene (Hitze-) Stabilitätsversuche mit unterschiedlichen pH-Werten und verschiedenen, oftmals mehrschrittigen Erhitzungsstufen wurden durchgeführt, um einen Kompromiss zwischen Sicherheit des Endprodukts und Erhalt der biologischen Aktivität zu finden (Wakabayashi et al., 2006, 2018). So ist die Ausbeute von ausreichend wirksamem Lf trotz seiner Hitzelabilität noch gegeben (FDA, 2016; Krolitzki et al., 2022). Molke wird normalerweise direkt zu rentablen Produkten weiterverarbeitet (z. B. Molkenpulver in humaner Ernährung oder als Zusatz in Tierfutter und Dünger). Nicht wärmebehandelte, vor allem saure Molke wurde früher häufig entsorgt (Smithers, 2008, 2015). Die Laktoferringewinnung ist hier mittlerweile ein sehr beliebter Weiterverarbeitungsschritt (Mawson, 1994; Smithers, 2015; Domingos et al., 2018). Dabei sind immer die jeweiligen nationalen Gesetzesgrundlagen zu beachten. In Deutschland ist dies z. B. die Milcherzeugnisverordnung (MilchErzV, 2023).

Mittlerweile ist es außerdem möglich, Lf in transgenen Tieren (v.a. Rind und Ziege), in Reis oder in *Aspergillus niger* herzustellen. Letzteres macht man sich z. B. bei der Produktion von rekombinantem humanem Lf zu Nutze (Wakabayashi et al., 2006).

Erneut vermehrt in den Fokus gerückt ist Lf während der COVID-19-Pandemie. Forschergruppen weltweit untersuchen seine potentiell nützlichen Eigenschaften bei einer Infektion mit SARS-CoV-2. Die immunmodulatorische Wirkung von Lf konnte in einigen Fällen den Cytokinsturm, der eine häufige Folge des akuten Atemnotsyndroms (*acute respiratory distress syndrome*, ARDS) mit begleitenden Organschäden ist, abmildern (Kell & Pretorius, 2018; Mehta et al., 2020). Außerdem scheint Lf um dieselben Rezeptoren konkurrieren zu können, die auch SARS-CoV-2 belegt. Die Verdrängungsreaktionen bzw. vorzeitige Belegung der Rezeptoren könnte die Virusbindung und damit die Infektion behindern (Kell et al., 2020). Auf diesem Gebiet ist jedoch weitere Forschung nötig, diverse Untersuchungen zu diesem Thema laufen. Auch die Reduktion von frei verfügbarem Eisen sowie die antiinflammatorischen und antiviralen Eigenschaften von Lf können sich positiv auf den Zustand eines an SARS-CoV-2 erkrankten Patienten auswirken (Kell et al., 2020).

### III. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Es ist ein regelmäßig beobachtetes, aber bislang ungeklärtes Phänomen, dass *B. cereus* zwar sehr häufig in Milch und Milchprodukten nachgewiesen wird, es jedoch verhältnismäßig selten zu Krankheitsausbrüchen bedingt durch diese Lebensmittel kommt. Im Rahmen eines vorangegangenen Projekts wurden erstmals verschiedene Lebensmittel- und vor allem Milchkomponenten identifiziert, die sich hemmend auf die Aktivität der Enterotoxine im Zellkulturtest auswirken. Hierbei fiel vor allem Lf auf (Da Riolo et al., 2018).

Ziel dieser Arbeit war die umfassende Untersuchung des Einflusses von Lf auf enteropathogene *B. cereus* sowie der Reaktion der Bakterien auf Lf-Exposition. Hierbei standen das Wachstumsverhalten der Bakterien in Minimalmedium, ihre Enterotoxinproduktion sowie ihre zytotoxische Aktivität im Vordergrund. Durch die Untersuchung verschiedener enteropathogener *B. cereus* Isolate sollten in diesen Tests auch Stamm-spezifische Unterschiede ermittelt werden. Außerdem wurden verschiedene Lf-basierte Produkte und Lf verschiedener Spezies getestet. In Agardiffusionstest wurde eine potentielle Wachstumshemmung durch Lf untersucht. In Mikrodilutionsverfahren wurde die jeweilige minimale Hemmkonzentration (*minimal inhibitory concentration*, MIC) ermittelt. Überstände aus Wachstumstests wurden in EIAs hinsichtlich der Toxinproduktion und in WST-1 Zytotoxizitätsassays hinsichtlich der toxischen Aktivität gegenüber Vero-Zellen untersucht. Eine Transkriptomanalyse mittels RNA Sequenzierung sollte Aufschlüsse hinsichtlich der Genexpression unter Lf-Einfluss liefern.

Die Untersuchungen sollten neue Einblicke in die Interaktion zwischen Lf und Lebensmittel-relevanten, pathogenen Keimen am Beispiel von *B. cereus* ermöglichen.

## IV. PUBLIKATIONEN

### 1. Publikation I

#### Titel

Strain-specific Antimicrobial Activity of Lactoferrin-based Food Supplements

#### Autoren

Clara-Sophie Jugert<sup>1</sup>, Andrea Didier<sup>1</sup>, Madeleine Plötz<sup>2</sup>, and Nadja Jessberger<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Schönleutnerstr. 8, 85764 Oberschleißheim, Germany.

<sup>2</sup>Institute for Food Quality and Food Safety, University of Veterinary Medicine Hannover, Bischofsholer Damm 15, 30173, Hannover, Germany.

\*Corresponding author: N. Jessberger, Institute for Food Quality and Food Safety, University of Veterinary Medicine Hannover, Bischofsholer Damm 15, 30173, Hannover, Germany, Tel.: 0049 511 856 7547. E-mail address: [Nadja.Jessberger@tiho-hannover.de](mailto:Nadja.Jessberger@tiho-hannover.de).

#### Journal

Journal of Food Protection

(IF 2023: 2,0)

#### Status

Eingereicht am 15.06.2023

Akzeptiert am 23.08.2023

Online publiziert am 26.08.2023

Journal of Food Protection 86 (2023) 100153

doi: 10.1016/j.jfp.2023.100153

(Jugert et al., 2023b)





Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Food Protection

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jfp](http://www.elsevier.com/locate/jfp)

## Research Note

## Strain-specific Antimicrobial Activity of Lactoferrin-based Food Supplements

Clara-Sophie Jugert<sup>1</sup>, Andrea Didier<sup>1</sup>, Madeleine Plötz<sup>2</sup>, Nadja Jessberger<sup>2,\*</sup><sup>1</sup>Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Schönleutnerstr. 8, 85764 Oberschleißheim, Germany<sup>2</sup>Institute for Food Quality and Food Safety, University of Veterinary Medicine Hannover, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover, Germany

## ARTICLE INFO

## Keywords:

*Bacillus cereus*  
*Bacillus thuringiensis*  
 Disk diffusion  
 Food supplement  
 Lactoferrin  
 Minimum inhibitory concentration

## ABSTRACT

The iron-binding glycoprotein lactoferrin is well known for its wide range of antibacterial effects. However, the aim of this study was to show that its antibacterial activity is not generally applicable to a bacterial species as a whole.

In disk diffusion assays performed with 112 isolates from 13 bacterial species (including the foodborne pathogens *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*), a lactoferrin-based food supplement showed no inhibition of growth on 24%, moderate inhibition on 31%, and strong inhibition on 45% of all tested isolates. Minimal inhibitory concentrations against *B. cereus* and *Bacillus thuringiensis* strain-specifically ranged from 0.31 mg/mL to no impairment at all. Further 11 commercially available lactoferrin-based food supplements and purified bovine lactoferrin showed strain- as well as product-specific growth inhibition. In comparison to bovine lactoferrin, human lactoferrin showed no inhibitory effects.

In summary, purified lactoferrin and lactoferrin-based food supplements inhibit bacterial growth in a dose-, strain-, and product-dependent manner. Thus, a general antimicrobial effect of lactoferrin against a specific bacterial species cannot be assumed.

Lactoferrin, a member of the transferrin family, is an 80 kDa iron-binding glycoprotein. It mainly occurs in colostrum and milk, but also in other body fluids such as tears, saliva, and plasma, as well as in the gastrointestinal, respiratory, and reproductive tracts (Berkhout et al., 2003). Lactoferrin, and especially lactoferricins, antimicrobial peptides derived from the N-terminal region of the molecule, are of special interest because of their antibacterial, antiviral, antifungal, antiparasitic, antiinflammatory, antianemic, and anticarcinogenic properties (Orsi, 2004; Wu et al., 2023). Moreover, they are involved in cell proliferation and differentiation, iron absorption, neural development and cognition, bone growth, protection from oxidative stress, and immunomodulation (Avalos-Gómez et al., 2020). Lactoferricins are further used as preservatives for different foods (Wu et al., 2023).

Initially, bacteriostatic effects on various Gram-negative and Gram-positive bacteria such as *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, or *Bacillus subtilis* were discovered. Due to its iron sequestration, apo-lactoferrin limits the availability of free iron and thus, inhibits bacterial growth (Berkhout et al., 2003). Bacterial pathogens counteract this firstly by producing siderophores, which can bind ferric ion with high affinity and transport it into the cells via specific membrane receptors; and secondly by expressing specific outer membrane receptors, which can bind and remove iron directly from lacto-

ferrin or transferrin (Orsi, 2004). Additionally, many bacteria can in turn use holo-lactoferrin as an iron source for growth. Lactoferrin also shows direct bactericidal effects by binding either to the outer membrane of Gram-negative bacteria, which subsequently releases lipopolysaccharides and increases membrane permeability; or to lipoteichoic acids of Gram-positive bacteria, which also results in destabilization of the bacterial membrane (Berkhout et al., 2003; Orsi, 2004).

Further mechanisms against (bacterial) pathogens are proteolysis of microbial virulence factors due to serine protease activity, inhibition of microbial biofilm formation by stimulating twitching motility, inhibition of adhesion to or intracellular invasion into host cells and support of a probiotic microflora in the intestine (Superti, 2020). Finally, lactoferrin also promotes apoptotic signals in infected cells and contributes to bactericidal activity in polymorphonuclear neutrophils after phagocytosis (Orsi, 2004). Because of its various positive effects, lactoferrin (mainly derived from bovine milk) is intensively used in human medicine and as a popular food supplement (Superti, 2020).

Several studies have already been conducted on bacterial growth inhibition by lactoferrin and its derivatives (Almaas et al., 2006; Bruni et al., 2016; Custer & Hansen, 1983; Sato et al., 1999). The

\* Corresponding author.

E-mail address: [Nadja.Jessberger@tiho-hannover.de](mailto:Nadja.Jessberger@tiho-hannover.de) (N. Jessberger).<https://doi.org/10.1016/j.jfp.2023.100153>

Received 15 June 2023; Accepted 23 August 2023

Available online 26 August 2023

0362-028X/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of International Association for Food Protection.

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

C.-S. Jugert et al.

Journal of Food Protection 86 (2023) 100153

aim of the present study was to test whether this inhibitory effect of lactoferrin-based food supplements applies to one species in general. As expected, we show that growth inhibition and especially minimal inhibitory concentrations are subject to great strain-specific differences. Exemplary we use *Bacillus cereus*, a Gram-positive, facultative anaerobic, spore-forming, ubiquitous soil bacterium, which can be responsible for two types of food-associated gastrointestinal diseases, the emetic and the diarrheal syndrome (Dietrich et al., 2021), as well as further *Bacillus* spp., *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus uberis* for comparison.

## Materials and Methods

**Bacterial strains and lactoferrin-based food supplements.** A total of 112 strains were used in this study, consisting mainly of *B. cereus* ( $n = 46$ ) and *Bacillus thuringiensis* ( $n = 23$ ) as well as further *Bacillus* ( $n = 13$ ), *E. coli* ( $n = 10$ ), *S. aureus* ( $n = 10$ ), and *S. uberis* ( $n = 10$ ) isolates for comparison. Bacterial isolates from our own diagnostics laboratories as well as previously published strains (Jessberger et al., 2015; Schwenk et al., 2020; Tausch et al., 2017) were used (for details, refer to Supplementary Table S1). Three representative strains were investigated in detail: 162/F837/76\_1 (hemolysin BL reference strain according to Beecher & Macmillan, 1991), 3053/NVH 0075-95 (non-hemolytic enterotoxin reference strain according to Lund & Granum, 1996), and 1502/INRA C3 (in-house reference strain). From  $-80^{\circ}\text{C}$  permanent cultures, all bacterial strains were passaged twice on Colombia sheep blood agar (Oxoid) before use. For disk diffusion assays, overnight cultures were prepared by inoculating 10 mL LB medium (10 g/L tryptone, 10 g/L sodium chloride, 5 g/L yeast extract) with one bacterial colony, respectively. Overnight cultures were incubated for 17 h at  $37^{\circ}\text{C}$  and 200 rpm. For antimicrobial broth dilution assays, 20 mL modified, defined medium which supports good growth and moderate enterotoxin production (mMOD medium; Glatz & Goepfert, 1977; Jessberger, Dietrich, et al., 2019; Rosenfeld et al., 2005) were inoculated with one colony of *B. cereus* strain 162, 3053, and 1502, respectively, and incubated for 17 h at  $37^{\circ}\text{C}$  at 200 rpm.

The lactoferrin-containing products investigated in this study are summarized in Supplementary Table S2. Of all products, stock solutions were prepared by opening the capsules and/or solving the content in sterile, double-distilled  $\text{H}_2\text{O}$  to a concentration of 100 mg/mL. The solutions were subsequently filtered through 0.2- $\mu\text{m}$  pore-size filters (Merck Millipore).

**Disk diffusion assay.** Disk diffusion assays were performed following previous studies (Dussault et al., 2014; Schwenk et al., 2020). Briefly, 100  $\mu\text{L}$  bacterial culture ( $\text{OD}_{600}$  set to 0.5 = approx.  $10^7$ – $10^8$  cfu/mL) were plated onto LB agar. Sterile Whatmann paper disks (5 mm diameter) were placed evenly on the plate, and 5  $\mu\text{L}$  of the lactoferrin stock solutions (100 mg/mL; for details refer to Supplementary Table S2) was dropped on them. After 24 h of incubation at  $37^{\circ}\text{C}$ , growth inhibition zones were measured. A total of 112 bacterial strains were tested in the disk diffusion assay, for detailed information, see Supplementary Table S1. At least three replicates per strain were prepared and examined.

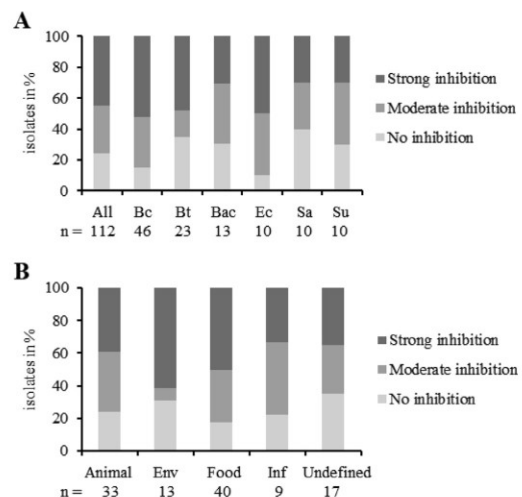
**Antimicrobial broth dilution assay.** Antimicrobial broth dilution assays were performed based on Dussault et al. (2014). Due to poor bacterial growth in 96-well plates, growth was assessed in test tubes containing 2 mL mMOD medium (Glatz & Goepfert, 1977; Jessberger, Dietrich, et al., 2019; Rosenfeld et al., 2005). Serial dilutions of lactoferrin were prepared resulting in concentrations from 20 to 0.02 mg/mL. The test tubes were inoculated with *B. cereus*/*B. thuringiensis* overnight cultures (see above) to  $\text{OD}_{600} = 0.1$ . After 0, 8, and 24 h of incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  and 200 rpm,  $\text{OD}_{600}$  was determined in a Tecan sunrise photometer. Tests of different *B. cereus* ( $n = 19$ )/*B. thuringiensis* ( $n = 2$ ) strains were carried out in duplicates with three technical replicates each. Tests of the different lactoferrin products

(Supplementary Table S2) were carried out in triplicates against each of three representative *B. cereus* strains (162, 3053, and 1502; see above).

**Statistical analyses.** Results from disk diffusion assays comprising 112 bacterial strains were further statistically analyzed using the IBM® SPSS® statistics program, version 28.0.1.1 (15). A univariate analysis of variance including Bonferroni test as posthoc method was performed. In order to prepare the results for the analyses, numerical data obtained from the disk diffusion were assorted into three categories (1 = no inhibition; 2 = moderate inhibition; 3 = strong inhibition). Growth inhibition was defined as dependent variable, origin, and species as fixed factors. No significant differences ( $p$  values  $> 0.05$ ) in growth inhibition were found either when comparing the origin of the isolates or when comparing the species. Analogously, the species was examined as a dependent variable of growth inhibition. Significant differences were calculated between no and strong inhibition ( $p$  value = 0.007), which can be interpreted as additional statistical confirmation that the original classification based on the diameter of the inhibition zones into no (5 mm diameter), moderate ( $> 5$ –8 mm diameter), and strong inhibition ( $> 8$  mm diameter) was appropriate.

## Results

**Strain-specific growth inhibition by lactoferrin.** The general antimicrobial effect of lactoferrin-based food supplements was tested comparatively for 112 isolates using product no. 1 (ingredient: 400 mg bovine lactoferrin per capsule; compare Supplementary Table S2). Results were categorized according to inhibition zone diameters in disk diffusion assays. Figure 1A depicts these results in percentage for all tested isolates as well as divided by species. Overall, lactoferrin showed no inhibitory effect (5 mm diameter) on 24% of all isolates tested, moderate inhibition ( $> 5$ –8 mm diameter) on 31%, and strong inhibition ( $> 8$  mm diameter) on 45%. The distribu-



**Figure 1. Antimicrobial activity of lactoferrin-based food supplement no. 1 toward 112 bacterial isolates.** Categorization according to inhibition zone diameters in disk diffusion assays: no inhibition (5 mm diameter), moderate inhibition ( $> 5$ –8 mm diameter), strong inhibition ( $> 8$  mm diameter). A. Percentage distribution among all tested isolates as well as divided by species (Bc = *B. cereus*, Bt = *B. thuringiensis*, Bac = other *Bacillus* strains, Ec = *E. coli*, Sa = *S. aureus*, Su = *S. uberis*). B. Percentage distribution divided by origin of the isolates (Env = environment, Inf = infection).



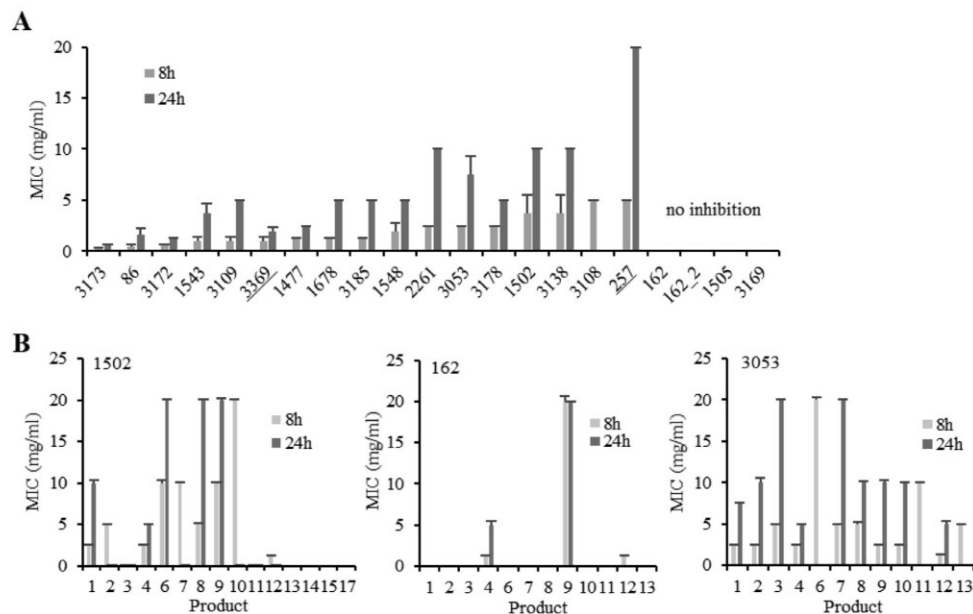
tion varied between the different species tested. Furthermore, large strain-specific differences were revealed within one species (compare [Supplementary Table S1](#)). A slight tendency could be observed toward stronger growth inhibition of *B. cereus* and *E. coli* isolates than other species. Comparing the strains under study according to their origin, environmental isolates (swab samples, soil, biopesticides) tended to be more strongly inhibited than isolates from other origins. Furthermore, comparatively few food isolates with no inhibition were detected ([Fig. 1B](#)). However, these tendencies were not significant ( $p$  values > 0.05).

**Growth inhibition in dose-dependent manner.** To investigate the strain-specific inhibitory potential in more detail, 21 isolates (19 *B. cereus*, two *B. thuringiensis*) were subjected to antimicrobial broth dilution assays using product no. 1 (ingredient: 400 mg bovine lactoferrin per capsule; compare [Supplementary Table S2](#)). The mean values of the lowest lactoferrin concentrations inhibiting bacterial growth were used for calculating minimal inhibitory concentrations (MICs). These MICs, again strain specifically, showed a wide range from 0.31 mg/mL to no impairment at all ([Fig. 2A](#)).

Moreover, the inhibitory potential of further 11 commercially available lactoferrin-based food supplements as well as purified lactoferrin from bovine milk, colostrum, and human milk was tested against three *B. cereus* reference strains. Results of comparative disk diffusion assays are summarized in [Supplementary Table S2](#). MICs determined in subsequent antimicrobial broth dilution assays ([Fig. 2B](#)) depended on the one hand on the tested reference strain (impairment by lactoferrin: 162 < 1502 < 3053) and on the other hand on the tested product. Products no. 4 (additional ingredients: cornstarch, DL-alpha-tocopherol, zinc citrate, magnesium salts of fatty acids) and 12 (only lactoferrin) showed the lowest MICs against the tested reference strains. Interestingly, human lactoferrin showed no inhibitory effects.

## Discussion

Due to its multifaceted benefits, bovine lactoferrin is intensively used in human medicine as well as in the food industry ([Superti, 2020](#)). Generally, its antibacterial effects are well elucidated. On the one hand, as a bacteriostatic effect, its iron-binding ability restricts the availability of this essential element for bacterial growth ([Berkhout et al., 2003; Orsi, 2004](#)). Iron sequestration by lactoferrin also prevents biofilm formation known to be important in the development and persistence of infections ([Singh et al., 2002](#)). On the other hand, lactoferrin can interact directly with the infectious agent (bactericidal effect). Specific interactions take place both with lipoteichoic acids of Gram-positive and lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria disrupting their membrane integrity ([Berkhout et al., 2003; Orsi, 2004; Superti et al., 2008](#)). Antibacterial activity has been shown against *B. subtilis*, *B. cereus*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium diphtheriae*, (Shiga-toxin producing) *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *Mannheimia haemolytica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, - *Shigella flexneri*, *S. aureus*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, and many others ([Bruni et al., 2016; Sato et al., 1999; Zarzosa-Moreno et al., 2020](#)). MICs show great variations depending on the lactoferrin form/product/derivative and the bacterial strain used. For example, for bovine lactoferrin, MICs range from 1.6 to 50 µg/mL for *E. coli*, from 6 to 30 µg/mL for *S. aureus*, from 1.6 to 18 µg/mL for *Salmonella* spp., and from 9 to 15.6 µg/mL for *B. cereus* ([Bruni et al., 2016](#)). In the present study, commercially available lactoferrin-based food supplements were deliberately chosen for the investigations. After 8 h of incubation, MICs of lactoferrin product no. 1 ranged from 0.31 to 10 mg/mL depending on the tested *B. cereus* isolate. In this test, four out of 21 strains were not inhibited at all. Similar variations were observed when different products or purified



**Figure 2. Minimal inhibitory concentrations (MICs) of lactoferrin.** A. MICs of lactoferrin-based food supplement no. 1 toward different *B. cereus* and *B. thuringiensis* (underlined) strains in ascending order, as determined in antimicrobial broth dilution assays. Bars represent means and standard deviations of duplicates with three technical replicates each. B. MICs of selected lactoferrins and lactoferrin-based food supplements toward three *B. cereus* reference strains determined in antimicrobial broth dilution assays. Bars represent means and standard deviations of triplicates. No bar: no inhibition of growth.

C.-S. Jugert et al.

Journal of Food Protection 86 (2023) 100153

lactoferrins were comparatively tested against three *B. cereus* reference strains. With the exception of two products, strain 162 was completely insensitive, while strain 3053 was inhibited by the majority of products tested (MICs varied from 1.25 to 20 mg/mL). These, as well as the intermediately inhibited strain 1502, are enteropathogenic strains with high toxin production and cytotoxic activity (Jessberger et al., 2015). Major strain-specific differences thus occur in further steps of the food infection process, e.g. the survival of the gastric passage, germination of spores, adhesion to the intestinal epithelium, etc. (Jessberger, Kranzler, et al., 2019). It has further been shown that lactoferrin interacts with the protein components of hemolysin BL resulting in reduced pore-forming and cytotoxic activity (da Riolo et al., 2018) and that lactoferrin is involved in the inhibition of *B. cereus* spore outgrowth (Custer & Hansen, 1983). Further studies are needed to clarify the basis of the strain-specific sensitivity to lactoferrin. It is also so far unknown whether lactoferrin exposure influences the toxin-forming capacity of the bacteria.

The results of this study underline that it is not possible to assume that lactoferrin has a general antimicrobial effect against a specific bacterial species. Very much on the contrary, there are large strain-specific differences. Similarly, different lactoferrin-based food supplements show diverging antimicrobial activity depending on their ingredients and composition.

#### Funding statement

This work was funded by the Brigitte and Wolfram Gedek Foundation, Bergstr. 8, 85737 Ismaning, Germany. This Open Access publication was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) - 491094227 "Open Access Publication Funding" and the University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation.

#### CRedit authorship contribution statement

**Clara-Sophie Jugert:** Investigation, Methodology, Writing – original draft. **Andrea Didier:** Conceptualization, Writing – review & editing. **Madeleine Plötz:** Conceptualization, Writing – review & editing. **Nadja Jessberger:** Conceptualization, Funding acquisition, Writing – review & editing.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgment

The authors thank Nele Maxseiner and Julia Schmidt for their excellent technical assistance.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2023.100153>.

#### References

- Almaas, H., Holm, H., Langsrud, T., Flengsrud, R., & Vegarud, G. E. (2006). *In vitro* studies of the digestion of caprine whey proteins by human gastric and duodenal

juice and the effects on selected microorganisms. *British Journal of Nutrition*, 96(3), 562–569.

Avalos-Gómez, C., Reyes-López, M., Ramírez-Rico, G., Díaz-Aparicio, E., Zenteno, E., González-Ruiz, C., & de la Garza, M. (2020). Effect of apo-lactoferrin on leukotoxin and outer membrane vesicles of *Mannheimia haemolytica* A2. *Veterinary Research*, 51(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00759-z>.

Beecher, D. J., & Macmillan, J. D. (1991). Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity*, 59(5), 1778–1784.

Berkhout, B., Floris, R., Recio, I., & Visser, S. (2003). Antibacterial effects of the milk protein lactoferrin. *Agro Food Industry HI-TECH*, 14(3), 32–33.

Bruni, N., Capucchio, M. T., Biasibetti, E., Pessione, E., Cirrincione, S., Giraud, L., Corona, A., & Dosio, F. (2016). Antimicrobial activity of lactoferrin-related peptides and applications in human and veterinary medicine. *Molecules*, 21(6), 752. <https://doi.org/10.3390/molecules21060752>.

Custer, M. C., & Hansen, J. N. (1983). Lactoferrin and transferrin fragments react with nitrite to form an inhibitor of *Bacillus cereus* spore outgrowth. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(3), 942–949. <https://doi.org/10.1128/aem.45.3.942-949.1983>.

da Riolo, C., Dietrich, R., Märtilbauer, E., & Jessberger, N. (2018). Consumed foodstuffs have a crucial impact on the toxic activity of enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1946. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01946>.

Dietrich, R., Jessberger, N., Ehling-Schulz, M., Märtilbauer, E., & Granum, P. E. (2021). The food poisoning toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins*, 13(2), 98. <https://doi.org/10.3390/toxins13020098>.

Dussault, D., Vu, K. D., & Lacroix, M. (2014). *In vitro* evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresins and pure compounds against food pathogens and application in ham. *Meat Science*, 96(1), 514–520. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.08.015>.

Glatz, B. A., & Goepfert, J. M. (1977). Production of *Bacillus cereus* enterotoxin in defined media in fermenter-grown cultures. *Journal of Food Protection*, 40(7), 472–474. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-40.7.472>.

Jessberger, N., Krey, V. M., Rademacher, C., Böhm, M. E., Mohr, A. K., Ehling-Schulz, M., Scherer, S., & Märtilbauer, E. (2015). From genome to toxicity: A combinatory approach highlights the complexity of enterotoxin production in *Bacillus cereus*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 560. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00560>.

Jessberger, N., Dietrich, R., Mohr, A. K., da Riolo, C., & Märtilbauer, E. (2019). Porcine gastric mucin triggers toxin production of enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity*, 87(4), e00765–e818. <https://doi.org/10.1128/iai.00765-18>.

Jessberger, N., Kranzler, M., da Riolo, C., Schwenk, V., Buchacher, T., Dietrich, R., Ehling-Schulz, M., & Märtilbauer, E. (2019). Assessing the toxic potential of enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Food Microbiology*, 84. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103276>.

Lund, T., & Granum, P. E. (1996). Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiology Letters*, 141(2–3), 151–156. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08377.x>.

Orsi, N. (2004). The antimicrobial activity of lactoferrin: Current status and perspectives. *Biometals*, 17(3), 189–196. <https://doi.org/10.1023/B:BIOM.0000027691.86757.e2>.

Rosenfeld, E., Dupont, C., Zigha, A., & Schmitt, P. (2005). Characterization of aerobic and anaerobic vegetative growth of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* F4430/73 strain. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(2), 149–158. <https://doi.org/10.1139/w04-132>.

Sato, N., Kurotaki, H., Ikeda, S., Daio, R., Nishinome, N., Mikami, T., & Matsumoto, T. (1999). Lactoferrin inhibits *Bacillus cereus* growth and heme analogs recover its growth. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 22(2), 197–199. <https://doi.org/10.1248/bpb.22.197>.

Schwenk, V., Riegg, J., Lacroix, M., Märtilbauer, E., & Jessberger, N. (2020). Enteropathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* isolates from soil, animals, food and biopesticides. *Foods*, 9(10), 1484. <https://doi.org/10.3390/foods9101484>.

Singh, P. K., Parsek, M. R., Greenberg, E. P., & Welsh, M. J. (2002). A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, 417(6888), 552–555. <https://doi.org/10.1038/417552a>.

Superti, F., Berlutti, F., Paesano, R., & Valenti, P. (2008). Structure and activity of lactoferrin – A multi functional protective agent for human health. *Iron Metabolism and Disease*, 8, 1–32.

Superti, F. (2020). Lactoferrin from bovine milk: A protective companion for life. *Nutrients*, 12(9), 2562. <https://doi.org/10.3390/nu12092562>.

Tausch, F., Dietrich, R., Schauer, K., Janowski, R., Niessing, D., Märtilbauer, E., & Jessberger, N. (2017). Evidence for complex formation of the *Bacillus cereus* hemolysin BL components in solution. *Toxins*, 9(9), 288. <https://doi.org/10.3390/toxins9090288>.

Wu, J., Zang, M., Wang, S., Qiao, X., Zhao, B., Bai, J., Zhao, Y., & Shi, Y. (2023). Lactoferrin, an antimicrobial motif derived from lactoferrin with food preservation potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–13. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2207650>.

Zarzosa-Moreno, D., Avalos-Gómez, C., Ramírez-Textcalco, L. S., Torres-López, E., Ramírez-Mondragón, R., Hernández-Ramírez, J. O., Serrano-Luna, J., & de la Garza, M. (2020). Lactoferrin and its derived peptides: An alternative for combating virulence mechanisms developed by pathogens. *Molecules*, 25(24), 5763. <https://doi.org/10.3390/molecules25245763>.

**Table S1** Overview of the bacterial species and strains used in this study, their origin and their growth inhibition by lactoferrin-based food supplement no. 1. Bacteria are first sorted alphabetically by species and within species in ascending order of the inhibition zone diameters in the disk diffusion assay.

Isolate number	Original name	Origin	Inhibition zone diameter (mm) <sup>f</sup>
<i>Bacillus cereus</i>			
162 <sup>a, c</sup>	F837/76_1	Postoperative infection	5.0 ± 0.0
1505 <sup>a</sup>	F837/76_2	Postoperative infection	5.0 ± 0.0
1678 <sup>a</sup>	RIVM BC 934	Salad	5.0 ± 0.0
1885 <sup>a</sup>	IP5832	Bactisubtil® (probiotic)	5.0 ± 0.0
3104 <sup>a</sup>	F528/94	Rice dish, food poisoning	5.0 ± 0.0
3108 <sup>a</sup>	RIVM BC 964	Kebab	5.0 ± 0.0
162_2 <sup>b</sup>	F837/76 $\Delta$ nheABC	-	5.0 ± 0.0
3169 <sup>a</sup>	F3175/03 (D7)	Human feces	6.3 ± 1.0
3137	-	Rice with vegetables, emetic toxin	7.0 ± 0.8
2856	-	Spice mixture	7.3 ± 2.1
3146	-	Bean salad, emetic toxin	7.3 ± 0.5
3173 <sup>a</sup>	F3162/04 (D8)	Human feces	7.3 ± 1.5
1513 <sup>a</sup>	SDA KA96	Raw milk	7.5 ± 1.7
2857	-	Cream sauce	7.5 ± 1.3
3053 <sup>a, d</sup>	NVH 0075-95	Vegetable stew, food poisoning	7.5 ± 1.0
3172 <sup>a</sup>	6/27/S	Human feces	7.5 ± 1.7
3306	-	Crickets	7.5 ± 2.4
1471	-	Rigatoni	7.8 ± 1.0
1532	WSBC 10593	Noodle dish	7.8 ± 1.5
2331	4281/1 N	Kebab	7.8 ± 1.0
3178 <sup>a</sup>	RIVM BC 90	Human feces	7.8 ± 1.0
3033	-	Cream cake	8.0 ± 1.4
1500 <sup>a</sup>	INRA A3	Starch	8.3 ± 3.3
3185 <sup>a</sup>	7/27/S	Human feces	8.5 ± 1.3
1543 <sup>a</sup>	F4429/71	Vanilla pudding	8.8 ± 1.5
1349	BW 9398/2001	Milk	9.0 ± 1.2
2849	ATCC 14579 <sup>g</sup>	-	9.3 ± 1.0
3348	-	Sampler	9.3 ± 1.0
1305	-	Indian rice dish, emetic toxin	9.3 ± 1.0
1477 <sup>a</sup>	WSBC 10035	Pasteurized milk	9.5 ± 0.6
1699	-	Pasta	9.5 ± 0.6
1502 <sup>a, e</sup>	INRA C3	Pasteurized carrots	9.8 ± 1.3
3225	-	Whipped cream, emetic toxin	9.8 ± 2.1
3341	-	Paprika	10.0 ± 0.8
2261	-	Belgium, vomit, emetic	10.3 ± 1.3
2866	-	Duck with rice	10.3 ± 3.4
3138	-	Fried noodles, emetic toxin	10.5 ± 1.3
1548	WSBC 10609	Vomit	11.0 ± 0.0
2387	-	Vitamin paste	11.3 ± 1.0
1680	-	Chicken	11.5 ± 2.9

3452	-	Tofu	12.0 ± 2.2
3163	-	Ready-to-eat salad	12.3 ± 1.9
3164	-	Ready-to-eat salad	12.3 ± 1.0
3109	-	Kebab, food poisoning with vomiting	13.0 ± 0.8
3231	-	Hazelnut ice cream	13.5 ± 0.6
86 <sup>a</sup>	MHI 86	Infant food	14.8 ± 1.3
<b><i>Bacillus coagulans</i></b>			
248	ATCC 7050 <sup>e</sup>	-	5.0 ± 0.0
<b><i>Bacillus cytotoxicus</i></b>			
1307	-	Norway	5.0 ± 0.0
<b><i>Bacillus licheniformis</i></b>			
3248	-	Liquefied thermised yoghurt peach/passion fruit	5.3 ± 0.5
3247	-	Liquefied thermised yoghurt pineapple	10.0 ± 1.6
<b><i>Bacillus pumilus</i></b>			
3354	DSM 27 <sup>f</sup>	-	11.0 ± 2.4
3349	-	Swab	12.5 ± 3.1
<b><i>Bacillus spizizenii</i></b>			
260	ATCC 6633_2 <sup>g</sup>	-	6.5 ± 0.6
256	ATCC 6633_1 <sup>g</sup>	-	7.5 ± 0.6
<b><i>Bacillus subtilis</i></b>			
3192	DSM 3256 <sup>f</sup>	-	7.5 ± 1.0
255	DSM 2109 <sup>f</sup>	-	7.8 ± 0.5
3193	DSM 10 <sup>f</sup>	-	10.8 ± 1.0
<b><i>Bacillus thuringiensis</i></b>			
3186	ssp. <i>aizawai</i>	Biopesticide granulate	5.0 ± 0.0
3187	ssp. <i>aizawai</i>	Biopesticide granulate	5.0 ± 0.0
3188	-	Biopesticide	5.0 ± 0.0
3189	-	Ready-to-eat salad	5.0 ± 0.0
3190	-	Ready-to-eat salad	5.0 ± 0.0
3191	-	Ready-to-eat salad	5.0 ± 0.0
2870	ssp. <i>entomocidus</i> bv. <i>subtoxicus</i> , IEBC-T06A001	Canada	5.0 ± 0.0
3241	ssp. <i>tenebrionis</i>	Biopesticide	5.0 ± 0.0
257	ATCC 10792 <sup>g</sup>	-	5.5 ± 0.6
3369	ssp. <i>aizawai</i>	Biopesticide	6.0 ± 1.8
2882	ssp. <i>israelensis</i> , BGSC 4Q2 (HD500)	Culicidae larva	6.3 ± 1.0
2880	WSBC 28025	Vegetables for infant food	7.5 ± 0.6
2875	ssp. <i>kurstaki</i> , PO6	Soil	8.3 ± 2.9
2876	ssp. <i>kurstaki</i> , PO10	Soil	9.3 ± 0.5
2878	ssp. <i>tenebrionis</i>	Undefined biopesticide	10.8 ± 1.0
3370	Bt 407	<i>Ephestia kuehniella</i> larva; Cry-	10.8 ± 1.9
2874	ssp. <i>kurstaki</i> , PO1	Soil	11.5 ± 1.7
2877	ssp. <i>kurstaki</i> , PO14	Soil	11.5 ± 1.3
2873	ATCC 10792 <sup>g</sup>	Mediterranean flour moth	11.9 ± 2.6
2872	HER 1404	-	12.3 ± 1.0
271	DSM 6029 <sup>f</sup>	-	12.8 ± 2.2
2871	-	-	14.8 ± 1.9
3240	ssp. <i>kurstaki</i>	Biopesticide	15.3 ± 1.7
<b><i>Lysinibacillus sphaericus</i></b>			
253	ATCC 245 <sup>g</sup>	-	5.0 ± 0.0

<b><i>Paenibacillus polymyxa</i></b>			
258	ATCC 10401 <sup>g</sup>	-	5.0 ± 0.0
<b><i>Escherichia coli</i><sup>h</sup></b>			
65	-	Bovine milk sample	5.0 ± 0.0
64	-	Bovine milk sample	5.3 ± 0.6
71	-	Bovine milk sample	6.3 ± 0.6
66	-	Bovine milk sample	7.0 ± 1.0
67	-	Bovine milk sample	7.3 ± 0.6
72	-	Bovine milk sample	8.7 ± 0.6
73	-	Bovine milk sample	8.7 ± 0.6
68	-	Bovine milk sample	9.0 ± 1.0
70	-	Bovine milk sample	9.0 ± 1.0
69	-	Bovine milk sample	9.7 ± 1.2
<b><i>Staphylococcus aureus</i><sup>i</sup></b>			
171	-	Bovine milk sample	5.0 ± 0.0
173	-	Bovine milk sample	5.0 ± 0.0
174	-	Bovine milk sample	5.0 ± 0.0
176	-	Bovine milk sample	5.0 ± 0.0
175	-	Bovine milk sample	5.7 ± 0.6
179	-	Bovine milk sample	5.7 ± 0.6
170	-	Bovine milk sample	7.0 ± 2.6
178	-	Bovine milk sample	8.3 ± 0.6
177	-	Bovine milk sample	10.3 ± 1.5
172	-	Bovine milk sample	11.3 ± 0.6
<b><i>Streptococcus uberis</i><sup>j</sup></b>			
199	-	Bovine milk sample	5.0 ± 0.0
200	-	Bovine milk sample	5.0 ± 0.0
208	-	Bovine milk sample	5.0 ± 0.0
204	-	Bovine milk sample	5.3 ± 0.6
201	-	Bovine milk sample	6.3 ± 0.6
205	-	Bovine milk sample	6.7 ± 0.6
203	-	Bovine milk sample	7.0 ± 0.0
206	-	Bovine milk sample	8.7 ± 0.6
207	-	Bovine milk sample	9.3 ± 1.2
202	-	Bovine milk sample	11.0 ± 1.4

<sup>a</sup> Previously published strains according to Jeßberger et al. (2015)

<sup>b</sup> Previously published strain according to Tausch et al. (2017)

<sup>c</sup> Hbl reference strain according to Beecher & Macmillan (1991)

<sup>d</sup> Nhe reference strain according to Lund & Granum (1996)

<sup>e</sup> In-house reference strain

<sup>f</sup> Purchased from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (DSMZ)

<sup>g</sup> Purchased from the American Type Culture Collection

<sup>h</sup> All *E. coli*, *S. aureus* and *S. uberis* strains were isolated from milk samples  
Remaining strains: In-house strains, isolated from food samples

<sup>i</sup> No inhibition of growth is shown as 5.0 mm, the diameter of the paper disk



**References:**

Beecher, D. J. & Macmillan, J. D. (1991). Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity*, 59(5), 1778-1784.

Jeßberger, N., Krey, V. M., Rademacher, C., Böhm, M. E., Mohr, A. K., Ehling-Schulz, M., Scherer, S. & Märklbauer, E. (2015). From genome to toxicity: a combinatory approach highlights the complexity of enterotoxin production in *Bacillus cereus*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 560. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00560>.

Lund, T. & Granum, P.E. (1996). Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiology Letters*, 141, 151–156. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08377.x>.

Tausch, F., Dietrich, R., Schauer, K., Janowski, R., Niessing, D., Märklbauer, E. & Jessberger, N. (2017). Evidence for Complex Formation of the *Bacillus cereus* Haemolysin BL Components in Solution. *Toxins*, 9(9), 288. <https://doi.org/10.3390/toxins9090288>.



Table S2 Overview of the lactoferrin products used in this study.

Product	Ingredients	Lactoferrin origin	Lactoferrin per capsule	Inhibition zone diameter (mm) <sup>z</sup>		
				3053	1502	162
1 <sup>a,c</sup>	Lactoferrin, capsule: hydroxypropylmethylcellulose, gellan	Bovine	400 mg	7.75 ± 0.35	9.63 ± 0.88	5.0 ± 0.0
2 <sup>a</sup>	Lactoferrin, capsule: hydroxypropylmethylcellulose	Bovine	250 mg	6.25 ± 0.5	6.75 ± 0.96	5.0 ± 0.0
3 <sup>a</sup>	Lactoferrin, starch, microcrystalline cellulose, magnesium salts of fatty acids, capsule: hydroxypropylmethylcellulose, calcium carbonate	Bovine	100 mg	6.25 ± 0.96	5.75 ± 0.96	5.0 ± 0.0
4 <sup>a</sup>	Lactoferrin, cornstarch, DL- $\alpha$ -tocopherole, zinc citrate, magnesium salts of fatty acids, capsule: hydroxypropylmethylcellulose	Bovine	200 mg	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0
5 <sup>a</sup>	Lactoferrin, cranberry extract, microcrystalline cellulose, dicalcium phosphate, fatty acids, gummi arabicum, <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , silticium dioxide, goldenrod powder ( <i>Solidago virgaurea</i> L.), vegetable oil (coconut, palm), iron oxides and iron hydroxides, indigotine, capsule: hydroxypropylmethylcellulose, polydextrose, calcium carbonate	Bovine	100 mg	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0
6 <sup>a</sup>	Lactoferrin, glycin, capsule: hydroxypropylmethylcellulose	Bovine	250 mg	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0
7 <sup>a</sup>	Lactoferrin, capsule: hydroxypropylmethylcellulose	Bovine	250 mg	6.75 ± 0.5	6.75 ± 0.5	5.0 ± 0.0
8 <sup>a</sup>	Lactoferrin, microcrystalline cellulose, L-leucin, calcium salts of orthophosphoric acid, capsule: hydroxypropylmethylcellulose, gellan	Bovine	120 mg	6.25 ± 0.96	6.5 ± 0.58	5.0 ± 0.0
9 <sup>a</sup>	Lactoferrin, glycine, micronized bamboo fibers	Bovine	Powder	10.0 ± 1.37	6.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0
10 <sup>a</sup>	Lactoferrin, capsule: hydroxypropylmethylcellulose	Bovine	200 mg	5.0 ± 0.0	5.58 ± 0.9	5.0 ± 0.0
11 <sup>a</sup>	Lactoferrin, microcrystalline cellulose, silica, stearic acid, capsule: hydroxypropylmethylcellulose	Bovine	300 mg	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0
12 <sup>a</sup>	Lactoferrin, capsule: hydroxypropylmethylcellulose	Bovine	250 mg	6.5 ± 0.58	7.75 ± 0.5	5.0 ± 0.0
13 <sup>b</sup>	Lactoferrin from bovine milk (L19507, Sigma-Aldrich, Merck)	Bovine	Powder	5.15 ± 0.14	7.1 ± 1.47	5.0 ± 0.0
14 <sup>b</sup>	Lactoferrin from bovine colostrum (L4765, Sigma-Aldrich, Merck)	Bovine	Powder	7.25 ± 1.16	8.6 ± 1.75	5.55 ± 0.84
15 <sup>b</sup>	Lactoferrin, human, iron saturated (L1294, Sigma-Aldrich, Merck)	Human	Powder	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0
16 <sup>b</sup>	Lactoferrin, human, partially iron saturated (L4040, Sigma-Aldrich, Merck)	Human	Powder	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0
17 <sup>b</sup>	Lactoferrin from human milk (61326, Sigma-Aldrich, Merck)	Human	Powder	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0

- <sup>a</sup> Commercially available dietary supplements. Due to data privacy guidelines, product names, brands and manufacturers are not published.
- <sup>b</sup> Purified lactoferrin for research purposes
- <sup>c</sup> Product no. 1 was used in disk diffusion assays to compare growth inhibition of 112 bacterial strains including *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, further bacilli, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* (for detailed information see Supplementary Table S1). Furthermore, 21 isolates (19 *B. cereus*, two *B. thuringiensis*) were subjected to antimicrobial broth dilution assays using product no. 1
- <sup>d</sup> Products 1-17 were tested in disk diffusion assays with three representative *B. cereus* strains: 162 / F837/76. 1 (haemolysin BL reference strain according to Beecher & Macmillan, 1991), 3053 / NVH 0075-95 (non-haemolytic enterotoxin reference strain according to Lund & Granum, 1996), and 1502 / INRA C3 (in-house reference strain). No inhibition of growth in disc diffusion assays is shown in this table as 5.0 mm, the diameter of the paper disc. Finally, selected products were tested in antimicrobial broth dilution assays with the three reference strains

#### References:

- Beecher, D. J. & Macmillan, J. D. (1991) Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity*, 59(5), 1778-1784.
- Lund, T. & Granum, P.E. (1996) Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiology Letters*, 141(2-3), 151–156. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08377.x>.

## 2. Publikation II

### Titel

Lactoferrin-based food supplements trigger toxin production of enteropathogenic  
*Bacillus cereus*

### Autoren

Clara-Sophie Jugert<sup>1</sup>, Andrea Didier<sup>1</sup> and Nadja Jessberger<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Schönleutnerstr. 8, 85764 Oberschleißheim, Germany.

<sup>2</sup>Institute for Food Quality and Food Safety, University of Veterinary Medicine Hannover, Bischofsholer Damm 15, 30173, Hannover, Germany.

\*Corresponding author: N. Jessberger, Institute for Food Quality and Food Safety, University of Veterinary Medicine Hannover, Bischofsholer Damm 15, 30173, Hannover, Germany, Tel.: 0049 511 856 7547. E-mail address: Nadja.Jessberger@tiho-hannover.de.

### Journal

Frontiers in Microbiology

(IF 2023: 5,2)

### Status

Eingereicht am 28.08.2023

Akzeptiert am 06.10.2023

Online Publiziert am 01.11.2023

Frontiers in Microbiology 14 (2023) 1284473

doi: 10.3389/fmicb.2023.1284473

(Jugert et al., 2023a)



## OPEN ACCESS

EDITED BY  
 Pablo Fernando Pérez,  
 National Scientific and Technical Research  
 Council (CONICET), Argentina

REVIEWED BY  
 Arunachalam Muthaiyan,  
 University of New Mexico Gallup, United States  
 Nancy Fayad,  
 Saint Joseph University, Lebanon

\*CORRESPONDENCE  
 Nadja Jessberger  
 ✉ Nadja.Jessberger@tiho-hannover.de

RECEIVED 28 August 2023  
 ACCEPTED 06 October 2023  
 PUBLISHED 01 November 2023

CITATION  
 Jugert C-S, Didier A and Jessberger N (2023)  
 Lactoferrin-based food supplements trigger  
 toxin production of enteropathogenic *Bacillus*  
*cereus*.  
*Front. Microbiol.* 14:1284473.  
 doi: 10.3389/fmicb.2023.1284473

COPYRIGHT  
 © 2023 Jugert, Didier and Jessberger. This is  
 an open-access article distributed under the  
 terms of the [Creative Commons Attribution  
 License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or  
 reproduction in other forums is permitted,  
 provided the original author(s) and the  
 copyright owner(s) are credited and that the  
 original publication in this journal is cited, in  
 accordance with accepted academic practice.  
 No use, distribution or reproduction is  
 permitted which does not comply with these  
 terms.

# Lactoferrin-based food supplements trigger toxin production of enteropathogenic *Bacillus cereus*

Clara-Sophie Jugert<sup>1</sup>, Andrea Didier<sup>1</sup> and Nadja Jessberger<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Oberschleißheim, Germany, <sup>2</sup>Institute for Food Quality and Food Safety, University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany

Lactoferrin is an iron-binding glycoprotein exhibiting antibacterial, antiviral, antifungal, antiparasitic, antiinflammatory, antianaemic and anticarcinogenic properties. While its inhibitory effects against bacterial pathogens are well investigated, little is known about its influence on the production and/or mode of action of bacterial toxins. Thus, the present study aimed to determine the impact of food supplements based on bovine lactoferrin on *Bacillus cereus* enterotoxin production. First, strain-specific growth inhibition of three representative isolates was observed in minimal medium with 1 or 10 mg/mL of a lactoferrin-based food supplement, designated as product no. 1. Growth inhibition did not result from iron deficiency. In contrast to that, all three strains showed increased amounts of enterotoxin component NheB in the supernatant, which corresponded with cytotoxicity. Moreover, lactoferrin product no. 1 enhanced NheB production of further 20 out of 28 *B. cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. These findings again suggested a strain-specific response toward lactoferrin. Product-specific differences also became apparent comparing the influence of further six products on highly responsive strain INRA C3. Highest toxin titres were detected after exposure to products no. 7, 1 and 2, containing no ingredients except pure bovine lactoferrin. INRA C3 was also used to determine the transcriptional response toward lactoferrin exposure via RNA sequencing. As control, iron-free medium was also included, which resulted in down-regulation of eight genes, mainly involved in amino acid metabolism, and in up-regulation of 52 genes, mainly involved in iron transport, uptake and utilization. In contrast to that, 153 genes were down-regulated in the presence of lactoferrin, including genes involved in flagellar assembly, motility, chemotaxis and sporulation as well as genes encoding regulatory proteins, transporters, heat and cold shock proteins and virulence factors. Furthermore, 125 genes were up-regulated in the presence of lactoferrin, comprising genes involved in sporulation and germination, nutrient uptake, iron transport and utilization, and resistance. In summary, lactoferrin exposure of *B. cereus* strain-specifically triggers an extensive transcriptional response that considerably exceeds the response toward iron deficiency and, despite down-regulation of various genes belonging to the PlcR-regulon, ultimately leads to an increased level of secreted enterotoxin by a mechanism, which has yet to be elucidated.

## KEYWORDS

food additive, lactoferrin, *Bacillus cereus*, non-hemolytic enterotoxin, transcriptome, quorum sensing

## 1. Introduction

*Bacillus cereus* is a Gram-positive, facultative anaerobic, spore forming, ubiquitous soil bacterium. It has gained attention due to its ability to cause two types of foodborne illnesses. On the one hand, the emetic syndrome is caused by the heat-stable cyclic dodecadepsipeptide cereulide leading to nausea and vomiting (Dietrich et al., 2021). On the other hand, enteropathogenic strains are responsible for the diarrhoeal form (Jessberger et al., 2020) by producing three different heat-labile, proteinaceous enterotoxins, which are the single protein CytK (cytotoxin K; Lund et al., 2000) and the two three-component enterotoxin complexes Nhe (non-haemolytic enterotoxin; Lund and Granum, 1996) and Hbl (haemolysin BL; Beecher and Macmillan, 1991). The amount of secreted enterotoxin component NheB provides a good indication for the cytotoxic activity of a *B. cereus* isolate (Moravek et al., 2006). Although several studies have been carried out on this subject, it is still not fully understood under which conditions and in which isolate increased enterotoxin production is triggered. This is due to the complex transcriptional regulation of the enterotoxin genes. The promoter regions of especially the *nhe* and *hbl* operons are unusually long and exhibit binding sites for several transcriptional regulators, which, among others, depend on nutrient and oxygen availability as well as the growth status of the cell (Böhm et al., 2016; Dietrich et al., 2021). Moreover, post-transcriptional and post-translational modifications may play an additional role, which have not yet been clarified in detail (Jessberger et al., 2015). Nevertheless, it has been shown that the bacterium responds with enhanced enterotoxin production to certain environmental factors such as nutrient deprivation and cell density (Gohar et al., 2008), artificial intestinal growth medium (Jessberger et al., 2017) or the presence of mucin (Jessberger et al., 2019). Various food components can also have an impact on toxin production as well as on cytotoxic activity. In a previous study, we were able to show that milk, and especially the milk protein lactoferrin, decreases cytotoxic activity (da Riol et al., 2018).

The approximately 80 kDa iron-binding glycoprotein lactoferrin is a member of the transferrin family (Sienkiewicz et al., 2022). It is most abundant in human and bovine colostrum and milk (Cheng et al., 2008), but it can also be found in further body fluids such as tears, saliva, plasma and semen, as well as in the gastrointestinal, respiratory and reproductive tracts (Superti, 2020). Lactoferrin and its derivatives possess immunomodulatory, anti-inflammatory and antioxidant activity, as well as antibacterial, antifungal, antiviral, antiparasitic, antitumour and antianaemic properties (Sienkiewicz et al., 2022; Wu et al., 2023). Furthermore, the molecule can have a positive impact on oral as well as intestinal microbiota (Nakano et al., 2017; Haiwen et al., 2019; Superti, 2020). The antibacterial activity of lactoferrin has already been extensively studied. It exhibits both bacteriostatic and bactericidal effects on various Gram-negative and Gram-positive bacteria. On the one hand, due to its ability to sequester and chelate iron, lactoferrin limits iron availability and thus, bacterial growth (Sienkiewicz et al., 2022). On the other hand, more and more iron-independent mechanisms were discovered such as destabilization of bacterial membranes by binding either to the outer membrane of Gram-negative bacteria and releasing lipopolysaccharides, or to lipoteichoic acids of Gram-positive bacteria (Sienkiewicz et al., 2022). Further, these interactions can enhance the activity of other antibacterials such as lysozyme

(Zelechowska et al., 2016). Additional mechanisms are prevention of bacterial adhesion, invasion and biofilm formation, direct interaction with certain bacterial virulence factors, proteolysis of bacterial virulence factors due to serine protease activity, promotion of apoptosis in infected cells, and enhancing bactericidal activity in polymorphonuclear neutrophils (Singh et al., 2002; Ostan et al., 2017; Superti, 2020; Zarzosa-Moreno et al., 2020). Due to such beneficial effects, it is not surprising that a multitude of food supplements based on purified bovine lactoferrin are commercially available. We recently tested a selection of these products (12 commercially available dietary supplements and five purified lactoferrins for research purposes) for their antibacterial activity. Product no. 1, containing no ingredients except pure bovine lactoferrin, strain-specifically inhibited the growth of 112 bacterial isolates. A minor tendency was noted toward stronger growth inhibition of *B. cereus* and *Escherichia coli* compared with *Bacillus thuringiensis*, other *Bacillus*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* isolates. However, a general antimicrobial effect against a distinct bacterial species was not observed. Growth inhibition rather depended on the applied strain, product and dose (Jugert et al., 2023). Despite growth inhibition, only little is known about the overall response and especially toxin production of bacterial pathogens after lactoferrin exposure. Several pathogens can counteract iron starvation *via* siderophores, which bind ferric ion with high affinity and transport it into the cells *via* specific membrane receptors. Further specific outer membrane receptors are expressed, which bind and remove iron directly from lactoferrin or transferrin. Thus, many bacteria can use holo-lactoferrin as an iron source (Xiao and Kisaalita, 1997; Wandersman and Stojiljkovic, 2000; Zawadzka et al., 2009). The influence of these processes on toxin production remains largely unclear.

For that reason, the present study aimed to explore the potential effect of lactoferrin-based food supplements on growth and enterotoxin production of *B. cereus*. 31 different strains as well as six different products were compared. Furthermore, the overall transcriptional response of a selected reference strain to lactoferrin exposure was investigated in comparison to iron starvation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains and culture conditions

Twenty-eight *B. cereus* and 3 *B. thuringiensis* strains were used in this study (refer to Supplementary Table S1), including isolates from our own diagnostics laboratories as well as previously published strains (Jessberger et al., 2015; Schwenk et al., 2020). Overnight cultures were incubated for 17 h in CGY medium (casein-glucose-yeast; Jessberger et al., 2015), before bacteria were grown in mMOD (modified, defined medium, which supports good growth and moderate enterotoxin production; Glatz and Goepfert, 1977; Rosenfeld et al., 2005) at 37°C under continuous agitation following previous studies (Jessberger et al., 2019). 20 mL mMOD medium were inoculated with the overnight cultures to  $OD_{600} = 0.1$ . Different conditions were compared: mMOD (containing 0.364 µg/mL  $FeCl_2$ ), mMOD-Fe (omitting  $FeCl_2$  as iron source), and mMOD with 1 or 10 mg/mL of different lactoferrin-based food supplements (refer to Table 1). Growth of the three *B. cereus* reference strains F837/76, INRA C3 and NVH 0075–95 depending on lactoferrin-based food



TABLE 1 Overview of the commercially available lactoferrin-based dietary supplements used in this study.

Product	Ingredients	Lactoferrin origin	Lactoferrin per capsule
1	Lactoferrin, capsule: hydroxypropylmethylcellulose, gellan	Bovine	400 mg
2	Lactoferrin, capsule: hydroxypropylmethylcellulose	Bovine	250 mg
6	Lactoferrin, glycin, capsule: hydroxypropylmethylcellulose	Bovine	250 mg
7	Lactoferrin, capsule: hydroxypropylmethylcellulose	Bovine	250 mg
8	Lactoferrin, microcrystalline cellulose, L-leucin, calcium salts of orthophosphoric acid, capsule: hydroxypropylmethylcellulose, gellan	Bovine	120 mg
10	Lactoferrin, capsule: hydroxypropylmethylcellulose	Bovine	200 mg
12	Lactoferrin, capsule: hydroxypropylmethylcellulose	Bovine	250 mg

Product no. 1 was used for growth experiments with three representative *B. cereus* strains: F837/76 (haemolysin BL reference strain according to Beecher and Macmillan, 1991), NVH 0075-95 (non-haemolytic enterotoxin reference strain according to Lund and Granum, 1996), and INRA C3 (in-house reference strain). Further, it was used for comparing enterotoxin production of 31 strains (for detailed information see Supplementary Table S1) as well as for transcriptome analyses of strain INRA C3. Products 2, 6, 7, 8, 10 and 12 were used for comparative analyses of enterotoxin production of strain INRA C3. Products are numbered according to Jugert et al. (2023).

supplement no. 1 was determined by measuring the optical density at 600 nm in a photometer (Eppendorf, Hamburg, Germany) once per hour for 12 hours. In a second experiment, the overnight cultures were washed twice in mMOD-Fe before inoculation. Further strains (refer to Supplementary Table S1) were grown for six hours under the same conditions (comparing mMOD and mMOD with 10 mg/mL lactoferrin-based food supplement no. 1), before 2 mL samples were taken. To obtain cell-free supernatants, they were centrifuged (2 min, 10,000 x g, RT). One mM EDTA was added to the supernatant, which was subsequently filtered through 0.2 µm pore-size filters (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). 2–3 biological replicates were tested per strain.

## 2.2. Cell line and culture conditions

Vero cells were obtained from ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures, Salisbury, UK) and cultured in media recommended by the supplier and as described previously (Jessberger et al., 2014).

## 2.3. Determination of iron concentrations

Iron concentrations in the growth media of strain INRA C3 (mMOD, mMOD-Fe, mMOD with 1 mg/mL and mMOD with 10 mg/mL lactoferrin-based food supplement no. 1) were determined in three replicates using the Iron Assay Kit MAK025 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) as recommended by the supplier.

## 2.4. Enzyme immunoassays (EIAs)

The enterotoxin component NheB was detected in sandwich enzyme immunoassays as described previously (Dietrich et al., 2005; Moravek et al., 2006). Monoclonal antibodies 2B11 (5 µg/mL) and 1E11-HRP (dilution 1:4,000) were used for detection. Tests of different strains were carried out at least in duplicates with three technical replicates each. Microtitre plates were analysed in a Tecan photometer using Magellan 50 software (Tecan, Männedorf, Switzerland). Results

are shown as titres, which are defined as the reciprocal of the highest dilutions resulting in an absorbance value of  $\geq 1.0$ .

## 2.5. Cytotoxicity assays

WST-1 bioassays on Vero cells were performed as previously described (Dietrich et al., 1999, 2005; Jessberger et al., 2014). Supernatants of three *B. cereus* reference strains grown under different conditions (refer to 2.1) were investigated in duplicates with three technical replicates each. Microtitre plates were analysed in a Tecan photometer (Tecan, Männedorf, Switzerland). Dose–response curves as well as 50% inhibitory concentrations were calculated using Magellan 50 software. Data are shown as reciprocal titres.

## 2.6. Transcriptome analyses

One hundred ml mMOD medium were inoculated with strain INRA C3 to  $OD_{600} = 0.1$  and incubated at 37°C for five hours under continuous agitation. The culture was centrifuged (10 min, 4,000 x g, 4°C) and washed twice in cold mMOD-Fe. 50 mL mMOD, mMOD-Fe and mMOD with 10 mg/mL lactoferrin-based food supplement no. 1 were inoculated to  $OD_{600} = 1$  and further incubated for two hours before centrifugation (2 min, 10,000 x g, 4°C). Cell pellets were stored immediately at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Two biological replicates were prepared per growth condition. Total RNA preparation and on-column DNase digestion were performed using the RNeasy minikit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the instructions of the manufacturer. RNA quality was tested *via* spectrophotometer and agarose gel electrophoresis. RNA purity was confirmed *via* PCR for 16S rRNA (Jessberger et al., 2019). RNA was sent to Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Germany) for initial quality control, rRNA depletion, strand specific random primed cDNA library construction, Illumina sequencing (paired end reads,  $2 \times 150\text{bp}$ ), mapping of the samples against a reference genome (CP003187.1 *B. cereus* F837/76), and determination of gene expression. On average, 38 million total reads and 35.5 million mapped reads were achieved for each of the six samples. The data presented in the study are deposited in the NCBI's Gene Expression Omnibus (Edgar et al., 2002) repository, accession

number GSE241250.<sup>1</sup> Data were further processed using Microsoft Excel. Only genes with a false discovery rate (FDR) of  $\leq 0.01$  and a fold change (logFC) of  $\geq 3$  were included in further analyses. Hypothetical proteins were excluded, which accounted for 16.7% (mMOD-Fe vs. mMOD) and 35.8% (mMOD+LF10 vs. mMOD) of all differentially expressed genes. Remaining genes were assigned to functional groups according to the KEGG databases ORTHOLOGY<sup>2</sup> and - if the latter did not provide any information - BRITE.<sup>3</sup>

## 2.7. Statistical analyses

Data were analyzed using GraphPad Prism version 9.3.1 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). Results from iron concentration measurements, EIAs and cytotoxicity assays were compared in relation to the growth conditions "mMOD," "mMOD-Fe," "mMOD+LF1" and "mMOD+LF10." Firstly, data were checked for normal distribution. Secondly, if standard deviations were not significantly different, ordinary one-way ANOVA was performed using Tukey *post hoc* test. If standard deviations were significantly different, Brown-Forsythe and Welch ANOVA tests were performed. When only two conditions were compared, a two-sample t-test was chosen. Significant differences ( $p$  values  $< 0.05$ ) between growth conditions are indicated as lower case letters in the figures.

## 3. Results

### 3.1. Growth in the presence of lactoferrin

Previously, we showed large strain-specific differences in the antimicrobial activity of lactoferrin and lactoferrin-based food supplements toward *B. cereus* (Jugert et al., 2023). To investigate this in more detail, growth of three *B. cereus* reference strains in mMOD medium  $\pm$  iron or lactoferrin-based food supplement no. 1 (compare Table 1) was monitored. Generally, strains F837/76 and INRA C3 grew well in the minimal medium. Growth was clearly reduced under iron deficiency; residual growth might result from traces of iron from the overnight cultures. Addition of 1 mg/mL lactoferrin-based food supplement no. 1 had no influence on strain INRA C3 and only little influence on F837/76. 10 mg/mL clearly inhibited growth of INRA C3, while growth of F837/76 was reinforced (Figures 1A,B). Strain NVH 0075-95, which generally showed the weakest growth, was almost completely inhibited by both 1 and 10 mg/mL (Figure 1C). OD<sub>600</sub> of all strains incubated under iron deficiency was even further reduced when the overnight cultures were washed twice in mMOD-Fe before incubation. In contrast, growth under all other conditions was comparable (data not shown).

Simultaneously, the concentration of freely available iron in the medium was determined representatively for strain INRA C3. The mMOD minimal medium itself contains approx. 0.18  $\mu$ g/mL iron, which was reduced, but not completely used up during bacterial

growth. Addition of the lactoferrin product increased the amount of freely available iron, and traces could also be detected in mMOD-Fe (Figure 2).

### 3.2. Strain-specific enhancement of enterotoxin production after lactoferrin exposure

The amount of the secreted enterotoxin component NheB (shown as reciprocal titres) was determined after six hours of growth. In the presence of lactoferrin-based food supplement no. 1, NheB production was clearly enhanced in the three reference strains. Nevertheless, strain INRA C3 showed comparably high titres and F837/76 and NVH 0075-95 comparably low titres under the applied conditions (Figure 3A). Based on this, a comparable picture emerged regarding the cytotoxicity toward Vero cells. INRA C3 showed considerable cytotoxicity titres, F837/76 exhibited very weak cytotoxicity, and for NVH 0075-95 no toxicity was detected at all (Figure 3B).

To clarify if lactoferrin exposure generally leads to enhanced enterotoxin production in *B. cereus* group strains, additional isolates were investigated ( $n=28$ , refer to Supplementary Table S1). They were incubated for six hours in mMOD medium  $\pm$  10 mg/mL lactoferrin-based food supplement no. 1. Out of 25 *B. cereus* strains, 19 showed enhanced enterotoxin production under addition of lactoferrin. Seven of these strains generally produced very low amounts of NheB (with slight enhancement under addition of lactoferrin) under the applied conditions, while three strains showed no enterotoxin production at all, and further three strains showed higher titres in pure mMOD medium. Out of three tested *B. thuringiensis* strains, one showed enhanced NheB production under addition of lactoferrin (Figure 3C).

### 3.3. Product-(in)dependent increase of enterotoxin production

Reference strain INRA C3, which responded with strong enhancement of enterotoxin production to lactoferrin-based food supplement no. 1, was used to test six further lactoferrin-based dietary supplements (refer to Table 1). Independently of the product, strain INRA C3 showed an increase of enterotoxin production under addition of 1 mg/mL, and a further increase at 10 mg/mL, compared to the mMOD minimal medium. Nevertheless, reciprocal titres for NheB varied depending on the applied product (Figure 4). Highest titres were detected after exposure to products no. 7, no. 1 and no. 2, containing no ingredients except pure bovine lactoferrin.

### 3.4. Transcriptional response of *B. cereus* INRA C3 to lactoferrin exposure

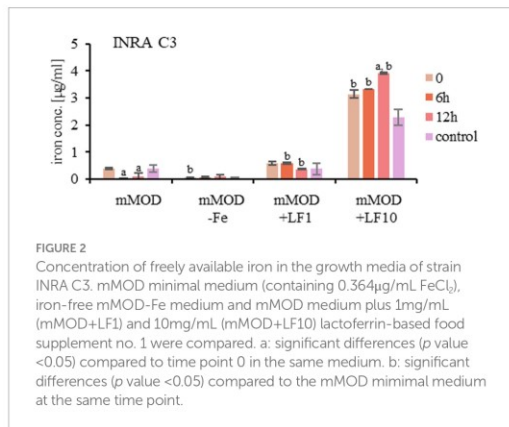
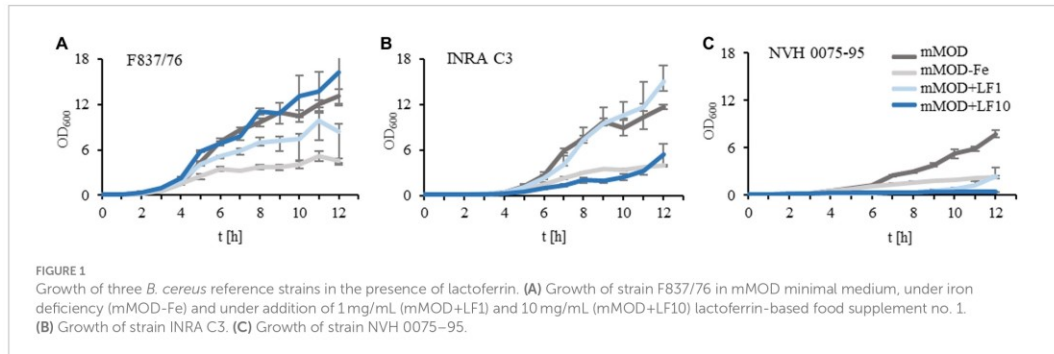
To gain more detailed insights into the response of *B. cereus* to lactoferrin exposure, total transcriptome analyses of strain INRA C3 were performed *via* RNA sequencing. Gene expression after two hours of incubation in mMOD with 10 mg/mL lactoferrin-based food supplement no. 1, which resulted earlier in reduced growth, but enhanced enterotoxin production of this strain, was compared to the pure minimal medium. In addition and as a control, gene expression

1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE241250>

2 <https://www.genome.jp/kegg/ko.html>

3 <https://www.genome.jp/kegg/brite.html>





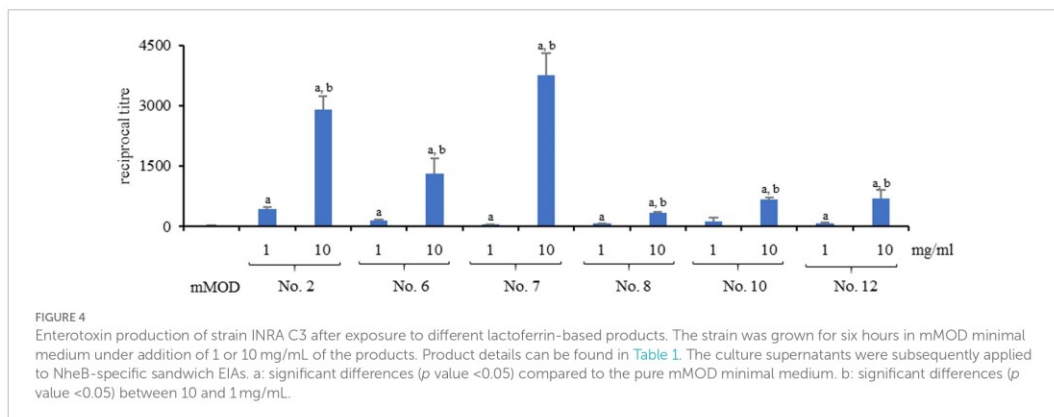
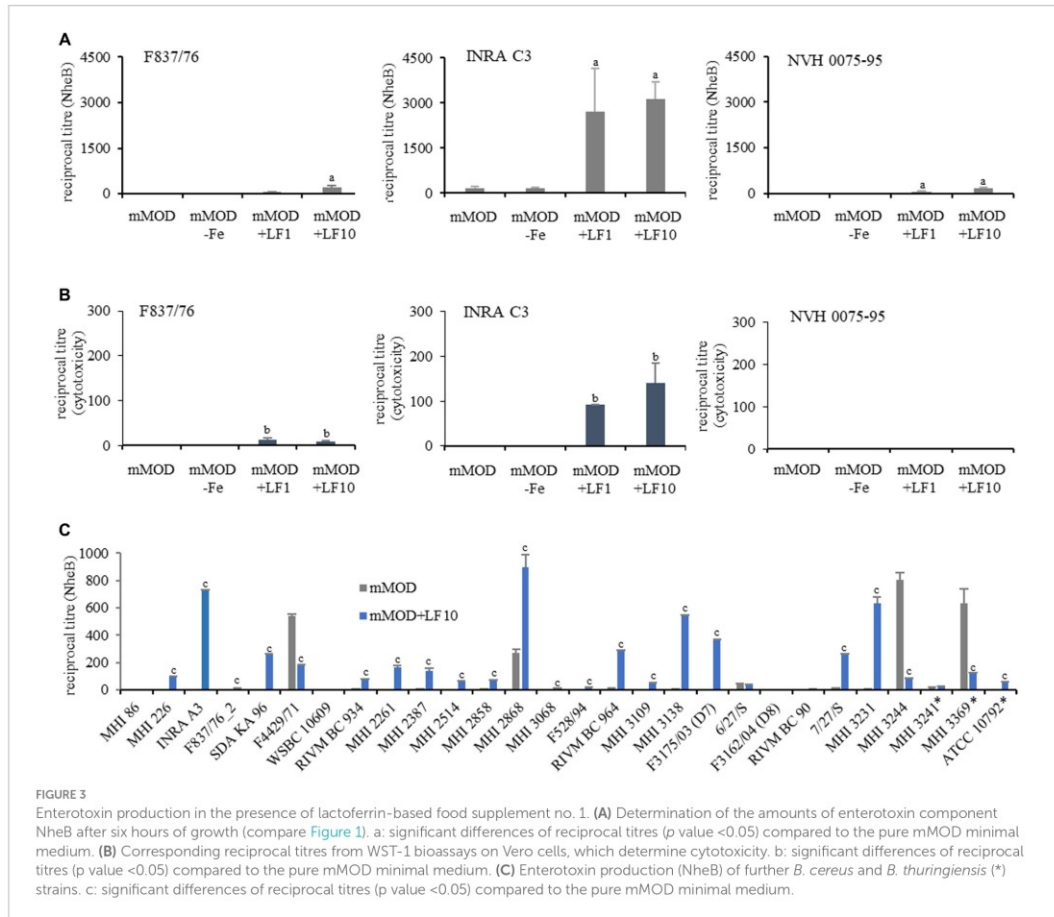
in the iron-free mMOD-Fe medium was also compared to the pure minimal medium. Under the applied conditions, eight genes, mainly involved in amino acid metabolism, were down-regulated under iron starvation (mMOD-Fe), while 52 genes, mainly involved in iron transport, uptake and utilization, were up-regulated. “Transporters” was the most represented functional group (compare Figure 5A and Supplementary Table S2). In comparison to that, a higher number of genes was differentially regulated in the presence of lactoferrin. 153 genes were down-regulated, among others including genes involved in flagellar assembly, motility, chemotaxis and sporulation as well as genes encoding regulatory proteins, transporters, heat and cold shock proteins and - most interestingly - phosphatidylinositol-specific phospholipase C, the PlcR-activating protein PapR, and the *hbl* operon. On the other hand, 125 genes were up-regulated in the presence of lactoferrin, among others again comprising genes involved in sporulation and germination, but also genes generally involved in nutrient uptake, in iron transport and utilization, and resistance toward polymyxin, vancomycin and heavy metals (compare Figure 5B and Supplementary Table S3).

#### 4. Discussion

With the exception of iron acquisition, relatively little focus has been placed on the reaction of bacterial pathogens, especially

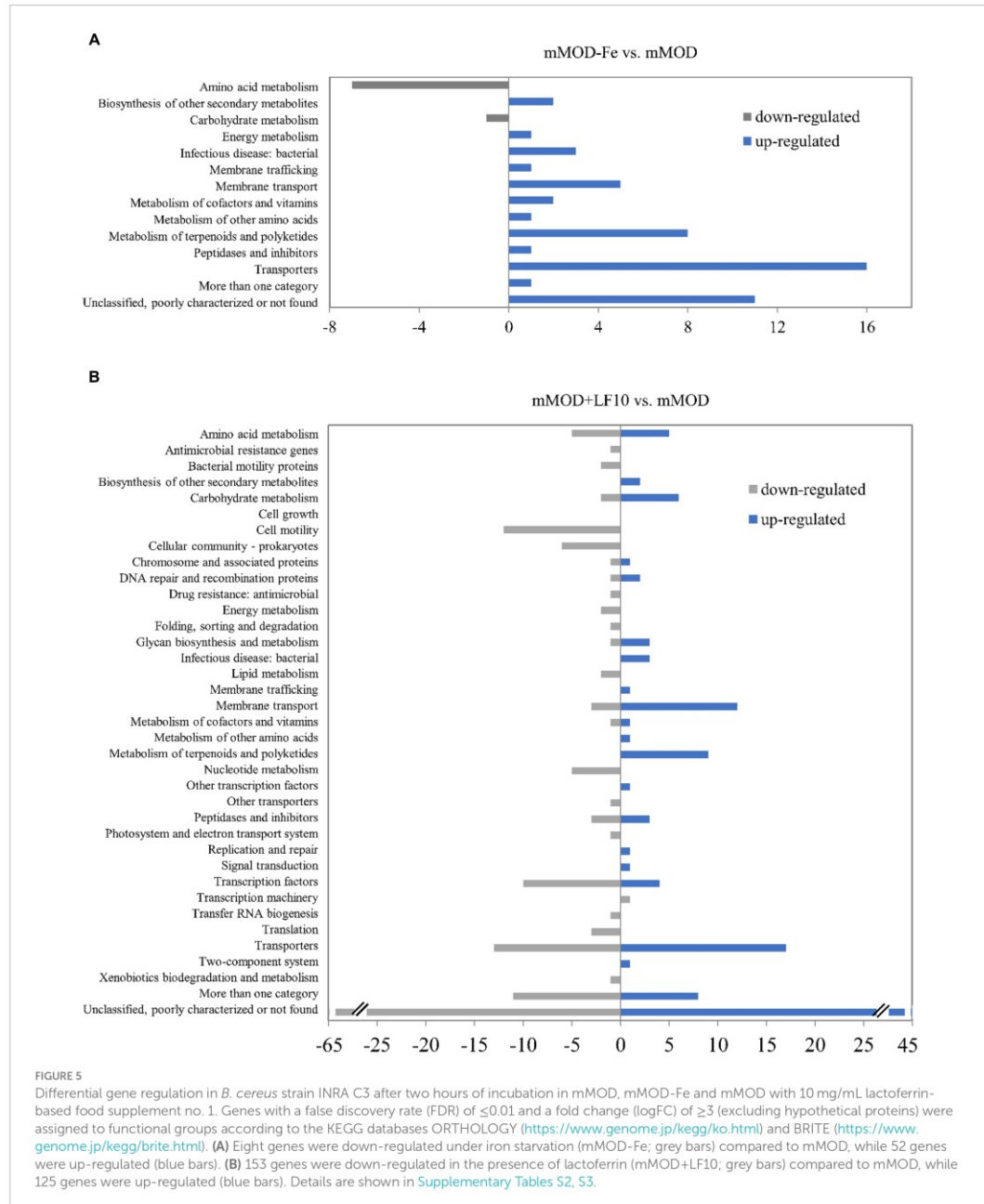
toxin-forming organisms, toward lactoferrin exposure. In an earlier review, it was suggested that the sequestration of iron inhibits bacterial growth, limits the use of this nutrient and down-regulates virulence factor expression (García-Montoya et al., 2012). Indeed, a previous study with a similar methodological approach to the present one revealed a decrease of active, cell-free Stx2, but not Stx1 toxin in EHEC cultures depending on the concentration of applied bovine lactoferrin. The molecule also significantly reduced cytotoxicity of colonizing bacteria toward Vero cells. These effects were partly attributed to degradation of Stx2 by lactoferrin (Kieckens et al., 2017). On the contrary, the present study shows, despite strain-specific growth inhibition by lactoferrin, increased enterotoxin (NheB) production of 23 out of 31 tested *B. cereus* and *B. thuringiensis* strains. Results of three selected reference strains suggest that there is not necessarily a connection between growth inhibition by lactoferrin and increased enterotoxin secretion. Lactoferrin concentrations were selected based on its physiological concentrations, which are described as up to 7 mg/mL in milk and up to 2 mg/mL in mucus and mucosa. However, these concentrations can be highly variable (Ling and Schryvers, 2006). Regarding utilization of lactoferrin by *B. cereus*, there are contradictory findings in the literature. Strain ATCC 14579 has been shown to use hemoglobin, haem and ferritin, but not transferrin and lactoferrin as iron source (Daou et al., 2009). Sato et al. concluded that *B. cereus* is not able to use transferrin or lactoferrin (Sato et al., 1999a,b), while Hayrapetyan et al. (2016) noted utilization of transferrin, ferritin and lactoferrin by six, three and two out of 22 tested strains, respectively. In a recent study, we determined that growth inhibition by lactoferrin varies strain-specifically, not only, but especially within the *B. cereus* species. Here, strain F837/76 showed itself to be particularly resistant to various lactoferrin-based food supplements (Jugert et al., 2023). Due to its increased growth under high lactoferrin concentrations in the present study, it is likely that F837/76 belongs to the rather rare strains that can use lactoferrin as a source of iron and growth. Highly responsive strain INRA C3 showed highest toxin production in the present study when exposed to lactoferrin-based food supplements containing only pure bovine lactoferrin; product no. 8, which resulted in the lowest enhancing effect, additionally consists of microcrystalline cellulose, L-leucine and calcium salts of orthophosphoric acid (compare Table 1). Nevertheless, further studies are needed to investigate the individual and combined effects of each ingredient on enterotoxin production.





The majority of publications focuses on bacterial counteractions of lactoferrin-induced iron starvation and the identification of lactoferrin-binding proteins. These proteins and/or mechanisms

have already been identified in *Neisseria* spp., *Moraxella* spp., *Helicobacter pylori*, *S. aureus*, *S. uberis* and others (Ling and Schryvers, 2006), *Pseudomonas aeruginosa* (Xiao and Kisaalita,



1997) and *B. cereus* (Zawadzka et al., 2009). In contrast to that, the present study demonstrates that growth inhibition as well as enhanced enterotoxin production of the tested *B. cereus* strains does not result from iron sequestration by lactoferrin and thus, iron deficiency in the growth medium. This was also confirmed by the

transcriptional response of strain INRA C3, which was considerably more pronounced under lactoferrin exposure than under iron deficiency. Under both conditions, genes involved in iron transport and metabolism showed increased expression. These results are largely consistent with a previous study in which, following

artificially induced iron deficiency, upregulation of predicted iron transporters was monitored in *B. cereus* strain ATCC 10987 (Hayrapetyan et al., 2016). Under lactoferrin exposure, however, additionally genes involved in sporulation and germination, nutrient uptake, resistance, etc. were up-regulated. Most interestingly, genes encoding parts of the *hbl* operon were down-regulated under lactoferrin exposure. This confirms the results of enzyme immunoassays against the toxin component Hbl L2, where we could not detect a clearly enhanced or attenuated toxin production compared to the mMOD minimal medium, neither under iron starvation nor under addition of lactoferrin (data not shown). Genes encoding further virulence factors, such as bacillolysine/neutral protease (Sidler et al., 1986) or phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) (Kuppe et al., 1989), were also down-regulated. Interestingly, we also detected decreased expression of the gene encoding PlcR-activating protein PapR after lactoferrin exposure. In *B. cereus*, gene expression of the majority of secreted proteins including *nhe*, *hbl*, *cytK*, *smase*, *plcA* (PI-PLC), *plcB* (PC-PLC), and *inhA2* is regulated via the PlcR-PapR quorum-sensing system (Dietrich et al., 2021; Prince and Kovac, 2022). PlcR is a pleiotropic transcriptional regulator, which activates gene transcription at the onset of the stationary growth phase (Gohar et al., 2008). The signaling peptide PapR is exported, processed via neutral protease NprB and re-imported as heptapeptide PapR7 via the oligopeptide permease OppABCDEF. At high cell densities, PapR is accumulated as signaling molecule inside the cell and activates PlcR (Gominet et al., 2001; Grenha et al., 2013; Dietrich et al., 2021). The reduced expression of enterotoxin genes and other virulence factors after lactoferrin exposure could be explained by the downregulation of the PlcR-PapR quorum sensing system. This system is associated with cytotoxicity, responsible for overcoming obstacles in the host gut and suggested to be an excellent target for antivirulence compounds (Prince and Kovac, 2022). Lactoferrin seems to be one of these compounds.

In accordance with that, it has to be noted that no enhanced expression of the *nhe* operon was detected under the applied conditions. On the contrary, if less strict selection criteria were used with respect to logFC (fold change), a slight down-regulation of the *nheB* gene could be observed (data not shown). Nevertheless, we measured increased amounts of secreted enterotoxin in the supernatant (see above). However, these observations are to no extent contradictory. It has already been shown in previous studies that enterotoxin gene transcription and the level of toxin actually secreted by *B. cereus* are not necessarily correlated (Jessberger et al., 2015, 2017). Instead, enterotoxin production is determined by the combination of highly complex, partially interrelated processes of gene transcription, posttranscriptional and posttranslational modification, and protein secretion, which have not yet been fully understood (Dietrich et al., 2021). Lactoferrin may also influence additional unknown activities, such as processing or degradation of the enterotoxins by extracellular bacterial proteases. Furthermore, an intrinsic protease activity of lactoferrin has been described, thus preventing colonization of mucosal surfaces by *Haemophilus influenzae* or inhibiting adhesion and invasion by degrading effector proteins of the type III secretion systems in *E. coli* and *Shigella flexneri* (Ling and Schryvers, 2006). Lactoferrin appears to exhibit serine protease activity, cleaving arginine-rich sequences of target proteins (Hendrixson et al., 2003; Ochoa et al.,

2003). Hendrixson et al. (2003) further postulated that the molecule may cleave arginine-rich sequences in many microbial virulence factors, thus contributing to its long-recognized antimicrobial properties. However, the *B. cereus* enterotoxins are most likely not affected by this, as they contain only a few arginine residues (for example four arginine residues in F837/76 NheB) and rather no arginine-rich sequences at all. Nevertheless, experimental proof of this has not yet been provided. In the concentrations applied in the present study, lactoferrin itself did not interact with the antibodies used in enzyme immunoassays or with Vero cells in cytotoxicity assays, as tested by a number of negative controls.

## 5. Conclusion

In spite of the various beneficial effects of lactoferrin, especially with regard to its antibacterial properties, it is important to remember that pathogens are able to take defensive measures. In the case of enteropathogenic *B. cereus*, these relate not only to the ability of certain isolates to use lactoferrin as an iron source for growth, but also, to a particular extent, to increased enterotoxin production after lactoferrin exposure. Thus, the present study adds a new perspective on the extensive use of lactoferrin in human medicine and as popular food supplement.

## Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, GSE241250.

## Ethics statement

Ethical approval was not required for the studies on animals in accordance with the local legislation and institutional requirements because only commercially available established cell lines were used.

## Author contributions

C-SJ: Data curation, Formal Analysis, Investigation, Methodology, Writing – original draft. AD: Conceptualization, Supervision, Writing – review and editing. NJ: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Supervision, Writing – original draft.

## Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This work was funded by the Brigitte and Wolfram Gedek foundation, Bergstr. 8, 85737 Ismaning, Germany. This Open Access publication was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research



Jugert et al.

10.3389/fmicb.2023.1284473

Foundation) - 491094227 "Open Access Publication Funding" and the University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation.

## Acknowledgments

The authors thank Nele Maxseiner and Julia Schmidt for excellent technical assistance.

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## References

- Beecher, D. J., and Macmillan, J. D. (1991). Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Inf. Immun.* 59, 1778–1784. doi: 10.1128/iai.59.5.1778-1784.1991
- Böhm, M. E., Krey, V. M., Jessberger, N., Frenzel, E., and 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. doi: 10.3389/fmicb.2016.00768
- Cheng, J. B., Wang, J. Q., Bu, D. P., Liu, G. L., Zhang, C. G., Wei, H. Y., et al. (2008). Factors affecting the lactoferrin concentration in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 91, 970–976. doi: 10.3168/jds.2007-0689
- da Riou, C., Dietrich, R., Märklbauer, E., and Jessberger, N. (2018). Consumed foodstuffs have a crucial impact on the toxic activity of enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Front. Microbiol.* 9:1946. doi: 10.3389/fmicb.2018.01946
- Daou, N., Buisson, C., Gohar, M., Vidic, J., Bierne, H., Kallassy, M., et al. (2009). IIsA, a unique surface protein of *Bacillus cereus* required for iron acquisition from heme, hemoglobin and ferritin. *PLoS Pathog.* 5:e1000675. doi: 10.1371/journal.ppat.1000675
- Dietrich, R., Fella, C., Strich, S., and Märklbauer, E. (1999). Production and characterization of monoclonal antibodies against the hemolysin BL enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4470–4474. doi: 10.1128/AEM.65.10.4470-4474.1999
- Dietrich, R., Jessberger, N., Ehling-Schulz, M., Märklbauer, E., and Granum, P. E. (2021). The food poisoning toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins (Basel)* 13:98. doi: 10.3390/toxins13020098
- Dietrich, R., Moravek, M., Bürk, C., Granum, P. E., and Märklbauer, E. (2005). Production and characterization of antibodies against each of the three subunits of the *Bacillus cereus* nonhemolytic enterotoxin complex. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8214–8220. doi: 10.1128/AEM.71.12.8214-8220.2005
- Edgar, R., Domrachev, M., and Lash, A. E. (2002). Gene expression omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* 30, 207–210. doi: 10.1093/nar/30.1.207
- Garcia-Montoya, I. A., Condon, T. S., Arevalo-Gallegos, S., and Rascon-Cruz, Q. (2012). Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 226–236. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.06.018
- Glatz, B. A., and Goepfert, J. M. (1977). Production of *Bacillus cereus* enterotoxin in defined media in fermenter-grown cultures. *J. Food Prot.* 40, 472–474. doi: 10.4315/0362-028X-40.7.472
- Gohar, M., Faegri, K., Perchat, S., Ravnum, S., Økstad, O. A., Gominet, M., et al. (2008). The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS One* 3:e2793. doi: 10.1371/journal.pone.0002793
- Gominet, M., Slamti, L., Gilois, N., Rose, M., and Lereclus, D. (2001). Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis plcR* regulon and for virulence. *Mol. Microbiol.* 40, 963–975. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02440.x
- Grenha, R., Slamti, L., Nicaise, M., Refes, Y., Lereclus, D., and Nessler, S. (2013). Structural basis for the activation mechanism of the PlcR virulence regulator by the quorum-sensing signal peptide PapR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 1047–1052. doi: 10.1073/pnas.1213770110
- Haiwen, Z., Rui, H., Bingxi, Z., Qingfeng, G., Jifeng, Z., Xuemei, W., et al. (2019). Oral administration of bovine lactoferrin-derived lactoferricin (lfcin) B could attenuate enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 induced intestinal disease through improving intestinal barrier function and microbiota. *J. Agric. Food Chem.* 67, 3932–3945. doi: 10.1021/acs.jafc.9b00861
- Hayrapetyan, H., Siezen, R., Abee, T., and Nierop Groot, M. (2016). Comparative genomics of iron-transporting systems in *Bacillus cereus* strains and impact of iron sources on growth and biofilm formation. *Front. Microbiol.* 7:842. doi: 10.3389/fmicb.2016.00842
- Hendrixson, D. R., Qiu, J., Shewry, S. C., Fink, D. L., Petty, S., Baker, E. N., et al. (2003). Human milk lactoferrin is a serine protease that cleaves *Haemophilus* surface proteins at arginine-rich sites. *Mol. Microbiol.* 47, 607–617. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03327.x
- Jessberger, N., Dietrich, R., Bock, S., Didier, A., and Märklbauer, E. (2014). *Bacillus cereus* enterotoxins act as major virulence factors and exhibit distinct cytotoxicity to different human cell lines. *Toxicon* 77, 49–57. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.10.028
- Jessberger, N., Dietrich, R., Granum, P. E., and Märklbauer, E. (2020). The *Bacillus cereus* food infection as multifactorial process. *Toxins (Basel)* 12:E701. doi: 10.3390/toxins12110701
- Jessberger, N., Dietrich, R., Mohr, A. K., da Riou, C., and Märklbauer, E. (2019). Porcine gastric mucin triggers toxin production of enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* 87, e00765–e00718. doi: 10.1128/IAI.00765-18
- Jessberger, N., Krey, V. M., Rademacher, C., Böhm, M. E., Mohr, A. K., Ehling-Schulz, M., et al. (2015). From genome to toxicity: a combinatorial approach highlights the complexity of enterotoxin production in *Bacillus cereus*. *Front. Microbiol.* 6:560. doi: 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. doi: 10.3389/fmicb.2017.00627
- Jugert, C. S., Didier, A., Plötz, M., and Jessberger, N. (2023). Strain-specific antimicrobial activity of lactoferrin-based food supplements. *J. Food Prot.* 86:100153. doi: 10.1016/j.jfp.2023.100153
- Kieckens, E., Rybarczyk, J., Barth, S. A., Menge, C., Cox, E., and Vanrompay, D. (2017). Effect of lactoferrin on release and bioactivity of Shiga toxins from different *Escherichia coli* O157:H7 strains. *Vet. Microbiol.* 202, 29–37. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.03.013
- Kuppe, A., Evans, L. M., McMillen, D. A., and Griffith, O. H. (1989). Phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus cereus*: cloning, sequencing, and relationship to other phospholipases. *J. Bacteriol.* 171, 6077–6083. doi: 10.1128/jb.171.11.6077-6083.1989
- Ling, J. M., and Schryvers, A. B. (2006). Perspectives on interactions between lactoferrin and bacteria. *Biochem. Cell Biol.* 84, 275–281. doi: 10.1139/o06-044
- Lund, T., De Buyser, M. L., and Granum, P. E. (2000). A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol. Microbiol.* 38, 254–261. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.02147.x
- Lund, T., and Granum, P. E. (1996). Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiol. Lett.* 141, 151–156. doi: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08377.x
- Moravek, 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, 293–298. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00185.x
- Nakano, M., Wakabayashi, H., Sugahara, H., Odamak, T., Yamauchi, K., Abe, F., et al. (2017). Effects of lactoferrin and lactoperoxidase-containing food on the oral microbiota of older individuals. *Microbiol. Immunol.* 61, 416–426. doi: 10.1111/1348-0421.12537
- Ochoa, T. J., Noguera-Obenza, M., Ebel, F., Guzman, C. A., Gomez, H. F., and Cleary, T. G. (2003). Lactoferrin impairs type III secretory system function in

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1284473/full#supplementary-material>

Jugert et al.

10.3389/fmicb.2023.1284473

- enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 71, 5149–5155. doi: 10.1128/IAI.71.9.5149-5155.2003
- Ostan, N. K., Yu, R. H., Ng, D., Lai, C. C., Pogoutse, A. K., Sarpe, V., et al. (2017). Lactoferrin binding protein B - a bi-functional bacterial receptor protein. *PLoS Pathog.* 13:e1006244. doi: 10.1371/journal.ppat.1006244
- Prince, C., and Kovac, J. (2022). Regulation of enterotoxins associated with *Bacillus cereus sensu lato* toxicoinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 88:e0040522. doi: 10.1128/aem.00405-22
- Rosenfeld, E., Dupont, C., Zigha, A., and Schmitt, P. (2005). Characterization of aerobic and anaerobic vegetative growth of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* F4430/73 strain. *Can. J. Microbiol.* 51, 149–158. doi: 10.1139/w04-132
- Sato, N., Ikeda, S., Mikami, T., and Matsumoto, T. (1999b). *Bacillus cereus* dissociates hemoglobin and uses released heme as an iron source. *Biol. Pharm. Bull.* 22, 1118–1121. doi: 10.1248/bpb.22.1118
- Sato, N., Kurotaki, H., Ikeda, S., Daio, R., Nishinome, N., Mikami, T., et al. (1999a). Lactoferrin inhibits *Bacillus cereus* growth and heme analogs recover its growth. *Biol. Pharm. Bull.* 22, 197–199. doi: 10.1248/bpb.22.197
- Schwenk, V., Riegg, J., Lacroix, M., Märtlbauer, E., and Jessberger, N. (2020). Enteropathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* isolates from soil, animals, food and biopesticides. *Foods* 9:1484. doi: 10.3390/foods9101484
- Sidler, W., Niederer, E., Suter, F., and Zuber, H. (1986). The primary structure of *Bacillus cereus* neutral proteinase and comparison with thermolysin and *Bacillus subtilis* neutral proteinase. *Biol. Chem.* 367, 643–657. doi: 10.1515/bchm3.1986.367.2.643
- Sienkiewicz, M., Jaskiewicz, A., Tarasiuk, A., and Fichna, J. (2022). Lactoferrin: an overview of its main functions, immunomodulatory and antimicrobial role, and clinical significance. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 62, 6016–6033. doi: 10.1080/10408398.2021.1895063
- Singh, P. K., Parsek, M. R., Greenberg, E. P., and Welsh, M. J. (2002). A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* 417, 552–555. doi: 10.1038/417552a
- Superti, F. (2020). Lactoferrin from bovine milk: a protective companion for life. *Nutrients* 12:9. doi: 10.3390/nu12092562
- Wandersman, C., and Stojilkovic, I. (2000). Bacterial heme sources: The role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 215–220. doi: 10.1016/s1369-5274(00)00078-3
- Wu, J., Zang, M., Wang, S., Qiao, X., Zhao, B., Bai, J., et al. (2023). Lactoferrin, an antimicrobial motif derived from lactoferrin with food preservation potential. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1-13, 1–13. doi: 10.1080/10408398.2023.2207650
- Xiao, R., and Kisaalita, W. S. (1997). Iron acquisition from transferrin and lactoferrin by *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdinin. *Microbiology* 143, 2497–2507. doi: 10.1099/00221287-143-7-2509
- Zarzosa-Moreno, D., Avalos-Gomez, C., Ramirez-Textcalco, L. S., Torres-Lopez, E., Ramirez-Mondragon, R., Hernandez-Ramirez, J. O., et al. (2020). Lactoferrin and its derived peptides: an alternative for combating virulence mechanisms developed by pathogens. *Molecules* 25:24. doi: 10.3390/molecules25245763
- Zawadzka, A. M., Abergel, R. J., Nichiporuk, R., Andersen, U. N., and Raymond, K. N. (2009). Siderophore-mediated iron acquisition systems in *Bacillus cereus*: identification of receptors for anthrax virulence-associated petrobactin. *Biochemistry* 48, 3645–3657. doi: 10.1021/bi8018674
- Zelechowska, P., Agier, J., and Brzezinska-Blaszczyk, E. (2016). Endogenous antimicrobial factors in the treatment of infectious diseases. *Cent.-Eur. J. Immunol.* 4, 419–425. doi: 10.5114/ceji.2016.65141



## *Supplementary Material*

### **Lactoferrin-based food supplements trigger toxin production of enteropathogenic *Bacillus cereus***

Clara-Sophie Jugert, Andrea Didier, Nadja Jessberger

**Table S1. Overview of the bacterial species and strains used in this study.** \*: Previously published strains according to Jeßberger et al. (2015). \*\*: Previously published strains according to Schwenk et al. (2020). \*\*\*: Previously published strains according to Jugert et al. (2023). F837/76: Hbl reference strain according to Beecher & Macmillan (1991). NVH 0075-95: Nhe reference strain according to Lund & Granum (1996). INRA C3: In house reference strain. ATCC: Purchased from the American Type Culture Collection.

<b>Isolate</b>	<b>Origin</b>
<i>Bacillus cereus</i>	
F837/76*	Postoperative infection
INRA C3*	Pasteurized carrots
NVH 0075-95*	Vegetable stew, food poisoning
MHI 86*	Infant food
MHI 226*	Milk product
INRA A3*	Starch
F837/76_2***	Postoperative infection
SDA KA96*	Raw milk
F4429/71*	Vanilla pudding
WSBC 10609	Vomit
RIVM BC 934*	Salad
MHI 2261***	Belgium, vomit, emetic
MHI 2387***	Vitamin paste
MHI 2514	Mushroom cream sauce
MHI 2858	Noodle salad
MHI 2868	Milk sample
MHI 3068	Potato salad
F528/94*	Rice dish, food poisoning
RIVM BC 964*	Kebab
MHI 3109***	Kebab, food poisoning with vomiting
MHI 3138***	Fried noodles, emetic toxin
F3175/03 (D7)*	Human faeces

## Supplementary Material

6/27/S*	Human faeces
F3162/04 (D8)*	Human faeces
RIVM BC 90*	Human faeces
7/27/S*	Human faeces
MHI 3231***	Hazelnut ice cream
MHI 3244	Vegetable casserole
<b><i>Bacillus thuringiensis</i></b>	
MHI 3241**	ssp. <i>tenebrionis</i> , biopesticide
MHI 3369**	ssp. <i>aizawai</i> , biopesticide
ATCC 10792**	-

**Table S2. Differentially expressed genes of *B. cereus* strain INRA C3 after two hours of growth in mMOD-Fe (iron-free) medium compared to mMOD medium.** Only genes with a false discovery rate (FDR) of  $\leq 0.01$  and a fold change (logFC) of  $\geq 3$  were included. Hypothetical proteins were excluded (0 down-regulated, 12 up-regulated under iron starvation). Eight genes were down-regulated under iron starvation (-), while 52 genes were up-regulated (no algebraic sign). Genes were assigned to functional groups according to the KEGG databases ORTHOLOGY (<https://www.genome.jp/kegg/ko.html>) and BRITE (<https://www.genome.jp/kegg/brite.html>).

#Accession	Gene	logFC	Functional group
Bcf_06210	Anthranilate synthase, amidotransferase component	-6.29	Amino acid metabolism
Bcf_06220	Indole-3-glycerol phosphate synthase	-6.20	Amino acid metabolism
Bcf_06215	Anthranilate phosphoribosyltransferase	-6.04	Amino acid metabolism
Bcf_06230	Tryptophan synthase subunit beta	-5.81	Amino acid metabolism
Bcf_06225	Phosphoribosylanthranilate isomerase	-5.74	Amino acid metabolism
Bcf_06235	Tryptophan synthase subunit alpha	-5.16	Amino acid metabolism
Bcf_06205	Anthranilate synthase, aminase component	-4.71	Amino acid metabolism
Bcf_01850	Gamma-aminobutyrate:alpha-ketoglutarate aminotransferase	-3.07	Carbohydrate metabolism
Bcf_25910	ABC transporter ATP-binding protein/permease	3.03	Transporters
Bcf_16190	AraC family transcriptional regulator	3.11	Not found
Bcf_09570	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I	3.16	Energy metabolism
Bcf_02005	Excisionase family DNA binding domain	3.20	Not found
Bcf_01980	Fe3+-siderophore ABC transporter permease 2 component	3.57	Membrane transport
Bcf_17155	Fe3+-siderophore ABC transporter permease 2 component	3.59	Membrane transport
Bcf_21995	Substrate-binding family protein	3.75	Not found
Bcf_17150	Fe-bacillibactin uptake system FeuA	3.88	Transporters
Bcf_01985	Fe3+-siderophore ABC transporter permease	3.94	Transporters

Bcf_22670	Iron compound ABC transporter permease	4.00	Membrane transport
Bcf_02835	Internalin	4.13	Infectious disease: bacterial
Bcf_22665	Ferrichrome-binding periplasmic protein	4.29	Transporters
Bcf_09760	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase	4.37	Metabolism of terpenoids and polyketides
Bcf_01990	Ferrichrome-binding periplasmic protein	4.54	Transporters
Bcf_25550	Petrobactin ABC transporter substrate-binding protein	4.59	Not found
Bcf_05520	S-layer protein	4.76	Unclassified: Structural proteins
Bcf_17160	Fe <sup>3+</sup> -siderophore ABC transporter permease	4.86	Transporters
Bcf_11780	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase	4.89	Metabolism of terpenoids and polyketides
Bcf_04035	Putative nitroreductase family protein	4.90	Metabolism of cofactors and vitamins / Signal transduction
Bcf_09765	Acyl carrier protein associated with anthrachelin biosynthesis	5.02	Metabolism of terpenoids and polyketides
Bcf_09755	Anthrachelin biosynthesis protein AsbB / Siderophore synthetase superfamily, group C / Siderophore synthetase component, ligase	5.03	Metabolism of terpenoids and polyketides
Bcf_01995	Thioredoxin reductase	5.07	Metabolism of other amino acids
Bcf_14575	Antibiotic biosynthesis monooxygenase domain-containing protein	5.16	Biosynthesis of other secondary metabolites
Bcf_09750	Anthrachelin biosynthesis protein AsbA / Siderophore synthetase superfamily, group A / Siderophore synthetase large component, acetyltransferase	5.85	Metabolism of terpenoids and polyketides
Bcf_22745	Heme transporter analogous to IsdDEF, ATP- binding protein	6.51	Transporters
Bcf_22750	Heme transporter IsdDEF, permease component IsdF	6.58	Transporters
Bcf_18510	Trilactone hydrolase (bacillibactin) siderophore	6.70	Not Included in Pathway or Brite
Bcf_22740	NPQTN specific sortase B	6.87	Peptidases and inhibitors
Bcf_18515	Fe-bacillibactin uptake system FeuD	7.01	Transporters
Bcf_22755	Heme transporter IsdDEF, lipoprotein IsdE	7.05	Membrane transport
Bcf_11815	4'-phosphopantetheinyl transferase	7.17	Metabolism of cofactors and vitamins
Bcf_11785	Isochorismate synthase	7.18	Metabolism of cofactors and vitamins
Bcf_11795	Isochorismatase	7.52	Metabolism of terpenoids and polyketides
Bcf_11800	Siderophore biosynthesis non-ribosomal peptide synthetase / Bacillibactin synthetase component F	7.57	Metabolism of terpenoids and polyketides
Bcf_18525	Fe-bacillibactin uptake system FeuB	7.65	Transporters
Bcf_11810	Polymyxin transporter PmxC	7.67	Not found
Bcf_11805	Polymyxin synthetase PmxB	7.74	Biosynthesis of other secondary metabolites
Bcf_18520	Fe-bacillibactin uptake system FeuC	7.82	Transporters



Supplementary Material			
Bcf_11790	2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase	7.95	Metabolism of terpenoids and polyketides
Bcf_21715	Ankyrin repeat domain protein	7.99	Membrane trafficking
Bcf_16240	Internalin	8.33	Infectious disease: bacterial
Bcf_03370	Oligopeptide ABC transporter substrate-binding protein OppA	8.72	Membrane transport
Bcf_21720	Iron compound ABC transporter ATP-binding protein	8.73	Transporters
Bcf_22760	Cell surface protein IsdA	9.09	Transporters
Bcf_18535	Fe-bacillibactin uptake system FeuA	9.15	Transporters
Bcf_05665	S-layer protein	9.61	Unclassified: Structural proteins
Bcf_06735	Internalin	9.87	Infectious disease: bacterial
Bcf_22765	NPQTN cell wall anchored protein IsdC	10.19	Not found
Bcf_21725	Fe <sup>3+</sup> -siderophore ABC transporter permease	10.46	Transporters
Bcf_21730	Heme transporter IsdDEF, lipoprotein IsdE	10.94	Transporters
Bcf_06965	Flavodoxin	11.84	Unclassified: Energy metabolism
Bcf_17445	Flavodoxin	12.27	Unclassified: Energy metabolism / Quorum sensing / Drug resistance

**Table S3. Differentially expressed genes of *B. cereus* strain INRA C3 after two hours of growth in mMOD plus 10 mg/ml lactoferrin-based food supplement no. 1 compared to mMOD medium.** Only genes with a false discovery rate (FDR) of  $\leq 0.01$  and a fold change (logFC) of  $\geq 3$  were included. Hypothetical proteins were excluded (121 down-regulated, 34 up-regulated in the presence of lactoferrin). 153 genes were down-regulated in the presence of lactoferrin (-), while 125 genes were up-regulated (no algebraic sign). Genes were assigned to functional groups according to the KEGG databases ORTHOLOGY (<https://www.genome.jp/kegg/ko.html>) and BRITE (<https://www.genome.jp/kegg/brite.html>).

#Accession	Gene	logFC	Functional group
Bcf_14055	Spore coat protein W	-9.47	Unclassified: Metabolism
Bcf_10600	Exosporium protein G	-9.29	Unclassified: Cell growth
Bcf_22835	Small, acid-soluble spore protein	-8.60	Unclassified: Cell growth
Bcf_08195	Stage 0 sporulation regulatory protein	-7.83	Signal transduction / Cellular community - prokaryotes
Bcf_25295	Methyl-accepting chemotaxis protein	-7.45	Signal transduction / Cell motility
Bcf_25875	DNA-binding protein	-7.38	Transcription factors
Bcf_14050	Spore coat protein X	-7.34	Unclassified: Cell growth
Bcf_04440	Alpha/beta family small acid-soluble spore protein	-6.77	Unclassified: Cell growth

Bcf_08380	Flagellin protein FlaA	-6.69	Signal transduction / Cell motility / Flagellar assembly
Bcf_24755	Stage 0 sporulation regulatory protein	-6.18	Signal transduction / Cellular community - prokaryotes
Bcf_17945	Small, acid-soluble spore protein O	-6.03	Unclassified: Cell growth
Bcf_08440	Flagellar basal-body rod protein FlgG	-5.87	Cell motility
Bcf_11760	ArsR family transcriptional regulator	-5.73	Transcription factors
Bcf_26175	Arsenic efflux pump protein	-5.57	Transporters
Bcf_21595	50S ribosomal protein L33	-5.56	Translation
Bcf_02210	PBSX family transcriptional regulator	-5.45	Transcription factors
Bcf_08415	Flagellar biosynthesis protein FliQ	-5.31	Cell motility
Bcf_11840	Alkaline serine protease, subtilase family	-5.30	Cellular community - prokaryotes
Bcf_04180	ABC transporter permease	-5.23	Membrane transport
Bcf_06025	Adenylate cyclase	-5.22	Not found
Bcf_02200	TetR family transcriptional regulator	-5.21	Transcription factors
Bcf_08710	Transcriptional regulator	-5.20	Not found
Bcf_25480	Endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein	-5.16	Not found
Bcf_07935	Xanthine phosphoribosyltransferase	-5.14	Nucleotide metabolism
Bcf_03040	Cadmium efflux system accessory protein	-5.13	Not found
Bcf_24590	Alpha/beta fold family hydrolase	-5.11	Not found
Bcf_23310	Alpha/beta family small acid-soluble spore protein	-5.10	Unclassified: Cell growth
Bcf_18650	Phosphatidylinositol-specific phospholipase C	-4.99	Carbohydrate metabolism
Bcf_26115	Integral membrane protein	-4.94	Unclassified: Structural proteins
Bcf_12165	Exosporium protein J	-4.93	Not found
Bcf_02565	Gamma-type small acid-soluble spore protein	-4.91	Unclassified: Cell growth
Bcf_07360	Phosphate transport regulator	-4.90	Unclassified: Cell growth
Bcf_09780	Alpha/beta family small acid-soluble spore protein	-4.84	Poorly characterized
Bcf_05450	Transcriptional repressor, Blal/MecI family	-4.79	Drug resistance: antimicrobial
Bcf_26855	PlcR activating protein PapR, quorum-sensing effector	-4.78	Cellular community - prokaryotes
Bcf_08355	Chemotaxis protein CheV	-4.68	Signal transduction / Cell motility
Bcf_15215	Alpha/beta family small acid-soluble spore protein	-4.62	Unclassified: Cell growth
Bcf_22445	Major facilitator family transporter	-4.62	Transporters
Bcf_25405	Sodium/alanine symporter family protein	-4.60	Unclassified: Cell growth
Bcf_10550	Molybdenum cofactor biosynthesis protein MoaD	-4.60	Metabolism of cofactors and vitamins
Bcf_26230	Diguanylate cyclase/phosphodiesterase domain 1	-4.58	Nucleotide metabolism
Bcf_12185	GTP pyrophosphokinase	-4.57	Nucleotide metabolism
Bcf_23765	HAD superfamily hydrolase	-4.55	Poorly characterized
Bcf_26110	Proton/sodium-glutamate symport protein	-4.55	Transporters
Bcf_08070	Cold shock protein CspB	-4.42	Unclassified: Transcription

## Supplementary Material

Bcf_15530	NADH dehydrogenase	-4.38	Energy metabolism
Bcf_08310	Flagellar motor switch protein FliG	-4.33	Cell motility / Flagellar assembly
Bcf_03135	Di-/tripeptide transporter	-4.29	Unclassified: Transport
Bcf_13845	Carboxymuconolactone decarboxylase	-4.26	Xenobiotics biodegradation and metabolism
Bcf_08220	Chemotaxis regulator	-4.26	Signal transduction / Cell motility
Bcf_02475	UDP-glucose/GDP-mannose dehydrogenase family	-4.25	Carbohydrate metabolism
Bcf_25375	Nucleoside permease NupC	-4.22	Membrane transport
Bcf_16075	DNA polymerase IV	-4.19	DNA repair and recombination proteins
Bcf_27135	Integral membrane protein	-4.16	Poorly characterized
Bcf_25400	Sodium/alanine symporter family protein	-4.14	Unclassified: Cell growth
Bcf_26070	Spermidine synthase	-4.12	Amino acid metabolism
Bcf_25380	Nucleoside permease NupC	-4.11	Membrane transport
Bcf_08395	Flagellar motor switch protein FliM	-4.09	Cell motility
Bcf_08300	Flagellar hook-basal body complex protein FliE	-4.07	Cell motility
Bcf_05895	Putative repressor of comG operon	-4.07	Not found
Bcf_15285	HblB protein	-4.06	Cellular community - prokaryotes
Bcf_06640	Alpha/beta family small acid-soluble spore protein	-4.05	Unclassified: Cell growth
Bcf_00620	50S ribosomal protein L10	-4.04	Translation
Bcf_24875	Lipoprotein	-4.04	Not found
Bcf_08050	Queuosine-regulated ECF transporter substrate-specific protein QueT	-4.04	Not found
Bcf_16785	Serine transporter	-4.03	Transporters
Bcf_22585	Flagellar motor rotation protein MotA	-4.02	Signal transduction / Cell motility
Bcf_25260	Protein erfK/srfK like precursor	-4.00	Peptidases and inhibitors
Bcf_14060	Spore coat protein X	-3.99	Unclassified: Cell growth
Bcf_06900	Leucine-responsive regulatory protein	-3.98	Transcription factors
Bcf_09890	Methyl-accepting chemotaxis protein	-3.97	Signal transduction / Cell motility
Bcf_03515	Paramyx_RNA_pol, Paramyxovirus RNA dependent RNA polymerase	-3.96	Not found
Bcf_08410	Flagellar biosynthesis protein FliP	-3.96	Cell motility
Bcf_11340	Heat shock protein, Hsp20 family	-3.95	Folding, sorting and degradation
Bcf_01130	Lipoprotein	-3.94	Not found
Bcf_10025	Exosporium protein B	-3.86	Unclassified: Cell growth
Bcf_02240	LPXTG-motif cell wall anchor domain-containing protein	-3.85	Not found
Bcf_02310	Drug/metabolite transporter permease	-3.84	Other transporters
Bcf_13455	Spore cortex-lytic enzyme, lytic transglycosylase SleB	-3.83	Unclassified: Metabolism
Bcf_08400	Flagellar motor switch protein FliN	-3.83	Cell motility
Bcf_26970	MerR family transcriptional regulator	-3.78	Transcription factors

Bcf_08430	Flagellar biosynthesis protein FlhA	-3.77	Cell motility
Bcf_17315	Response regulator	-3.76	Cellular community - prokaryotes
Bcf_15295	Hemolysin BL lytic component L2	-3.76	Cellular community - prokaryotes
Bcf_00840	tRNA pseudouridine synthase A	-3.76	Transfer RNA biogenesis
Bcf_08405	Flagellar motor switch protein FliN	-3.76	Cell motility
Bcf_08255	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase	-3.75	Poorly characterized
Bcf_02305	Lead, cadmium, zinc and mercury transporting ATPase	-3.71	Unclassified: Metabolism
Bcf_03495	Undecaprenyl-diphosphatase	-3.70	Glycan biosynthesis and metabolism
Bcf_17870	Ribonucleotide reductase of class III (anaerobic), large subunit	-3.68	Nucleotide metabolism
Bcf_08420	Flagellar biosynthesis protein FliR	-3.67	Cell motility
Bcf_02135	Anaerobic C4-dicarboxylate transporter	-3.63	Transporters
Bcf_13370	RNA polymerase sigma factor SigX	-3.62	Transcription machinery
Bcf_21800	Putative O-methyltransferase	-3.59	Not found
Bcf_14080	Drug resistance transporter, EmrB/QacA family	-3.56	Transporters
Bcf_12400	Exosporium protein D	-3.54	Unclassified: Cell growth
Bcf_23930	ATP synthase protein I	-3.54	Photosystem and electron transport system
Bcf_11990	Chloramphenicol acetyltransferase	-3.53	Antimicrobial resistance genes
Bcf_26355	Transmembrane protein	-3.50	Not Included in Pathway or Brite
Bcf_13445	Lipoprotein	-3.50	Not found
Bcf_26075	S-adenosylmethionine decarboxylase	-3.50	Amino acid metabolism
Bcf_08200	RNA-binding protein Hfq	-3.48	Folding, sorting and degradation / Cellular community - prokaryotes
Bcf_08530	LysR family transcriptional regulator	-3.46	Transcription factors
Bcf_25970	Cold shock protein CspC	-3.45	Unclassified: Transcription
Bcf_13430	Integral membrane protein	-3.44	Unclassified: Structural proteins
Bcf_02205	Major facilitator family transporter	-3.43	Transporters
Bcf_26865	Bacillolysin	-3.42	Peptidases and inhibitors
Bcf_03980	PTS system sucrose-specific transporter subunit IIB	-3.41	Carbohydrate metabolism / Environmental Information Processing
Bcf_17965	Spore coat protein M	-3.40	Unclassified: Cell growth
Bcf_17730	Spore germination protein GerSC	-3.40	Not found
Bcf_12785	Exosporium protein K	-3.40	Not found
Bcf_24760	ABC transporter ATP-binding protein	-3.39	Transporters
Bcf_20940	TetR family transcriptional regulator	-3.36	Transcription factors
Bcf_03510	DNA-binding protein	-3.36	Not found
Bcf_06625	Formate efflux transporter	-3.34	Transporters
Bcf_08715	Na <sup>+</sup> driven multidrug efflux pump	-3.34	Transporters

## Supplementary Material

Bcf_03210	Amino acid permease family protein	-3.34	Transporters
Bcf_08390	Flagellar motor switch protein FlhN	-3.33	Cell motility
Bcf_22020	Forespore-specific protein	-3.32	Not found
Bcf_04465	Putative transcriptional regulator	-3.29	Transcription factors
Bcf_20175	Segregation and condensation protein B	-3.27	Chromosome and associated proteins
Bcf_15520	Carbonic anhydrase	-3.26	Energy metabolism
Bcf_08290	Flagellar basal-body rod protein FlgB	-3.24	Cell motility
Bcf_21210	50S ribosomal protein L33	-3.23	Translation
Bcf_19815	Glutaredoxin family protein	-3.22	Not found
Bcf_18400	Flagellar hook-length control protein FlhK	-3.22	Cell motility
Bcf_23805	ABC transporter permease	-3.21	Transporters
Bcf_11575	Thioredoxin	-3.21	Not found
Bcf_08435	Flagellar biosynthesis protein FlhF	-3.19	Bacterial motility proteins
Bcf_02765	ABC transporter ATP-binding protein	-3.19	Transporters
Bcf_07355	Low-affinity inorganic phosphate transporter like protein	-3.17	Unclassified: Transport
Bcf_22225	Membrane Spanning Protein	-3.17	Not found
Bcf_07240	Peptidase, M23/M37 family	-3.16	Peptidases and inhibitors
Bcf_02980	GNAT family acetyltransferase	-3.15	Amino acid metabolism
Bcf_03140	Di-/tripeptide transporter	-3.15	Unclassified: Transport
Bcf_17875	Ribonucleotide reductase of class III (anaerobic), large subunit	-3.13	Nucleotide metabolism
Bcf_03535	Branched-chain amino acid transport system carrier protein	-3.13	Unclassified: Transport
Bcf_02470	Glycosyl transferase, group 2 family protein	-3.12	Lipid metabolism
Bcf_06220	Indole-3-glycerol phosphate synthase	-3.12	Amino acid metabolism
Bcf_25265	Two-component response regulator vanRB	-3.11	Not found
Bcf_23730	Rhodanese-like domain-containing protein	-3.10	Not found
Bcf_05460	TetR family transcriptional regulator	-3.09	Transcription factors
Bcf_06225	Phosphoribosylanthranilate isomerase	-3.07	Amino acid metabolism
Bcf_27240	Methyl-accepting chemotaxis protein	-3.07	Bacterial motility proteins
Bcf_00255	Small, acid-soluble spore protein	-3.07	Unclassified: Cell growth
Bcf_17435	Cold shock protein CspD	-3.06	Unclassified: Transcription
Bcf_06285	NADH oxidase	-3.05	Not found
Bcf_07505	Ferredoxin	-3.04	Unclassified: Metabolism
Bcf_13450	Spore germination protein YpeB	-3.04	Unclassified: Cell growth
Bcf_19690	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase	-3.04	Unclassified: Metabolism
Bcf_11115	Sodium-dependent transporter	-3.04	Unclassified: Transport
Bcf_16330	Thiol-activated cytolysin	-3.04	Cellular community - prokaryotes
Bcf_02485	Glycosyl transferase, group 2 family protein	-3.02	Lipid metabolism
Bcf_02100	Alpha-glucosidase	3.03	Carbohydrate metabolism
Bcf_05610	AraC family transcriptional regulator	3.04	Transcription factors
Bcf_05640	Peptidase, M48 family	3.09	Peptidases and inhibitors

Bcf_00235	Ribonuclease M5	3.10	Unclassified: Metabolism
Bcf_02620	Potassium channel protein	3.11	Not found
Bcf_09840	ABC transporter permease	3.12	Signal transduction
Bcf_25630	Central glycolytic genes regulator	3.12	Transcription factors
Bcf_03300	Glutamate transport membrane-spanning protein	3.13	Membrane transport
Bcf_13265	GNAT family acetyltransferase	3.13	Amino acid metabolism
Bcf_23220	Argininosuccinate synthase	3.14	Amino acid metabolism
Bcf_19450	Cell division protein FtsI like / Peptidoglycan synthetase	3.15	Glycan biosynthesis and metabolism
Bcf_01980	Fe <sup>3+</sup> -siderophore ABC transporter permease 2 component	3.15	Not found
Bcf_03290	Glutamine ABC transporter substrate-binding protein	3.16	Membrane transport
Bcf_20270	Anti-sigma B factor antagonist RsbV	3.17	Unclassified: Cell growth
Bcf_08640	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcD	3.19	Transporters
Bcf_17405	Vancomycin B-type resistance protein VanW	3.19	Signal transduction / Drug resistance: antimicrobial
Bcf_20360	Stage II sporulation protein M (SpoIIM)	3.20	Unclassified: Cell growth
Bcf_20820	Stage III sporulation protein AF	3.21	Unclassified: Cell growth
Bcf_02825	Serine protein kinase (prkA protein), P-loop containing	3.22	Unclassified: Signaling proteins
Bcf_13350	Pullulanase	3.22	Carbohydrate metabolism
Bcf_17790	ECF-type sigma factor negative effector	3.23	Transcription machinery
Bcf_18125	Hut operon positive regulatory protein	3.23	Other transcription factors
Bcf_25610	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	3.24	Carbohydrate metabolism / Energy metabolism
Bcf_20640	Glutamine transport ATP-binding protein GlnQ	3.27	Membrane transport
Bcf_20745	DNA repair protein RecN	3.31	DNA repair and recombination proteins
Bcf_01985	Fe <sup>3+</sup> -siderophore ABC transporter permease	3.34	Not found
Bcf_11305	Iron(III) dicitrate transport system, periplasmic iron-binding protein FecB	3.34	Membrane transport
Bcf_18410	tRNA delta(2)-isopentenylpyrophosphate transferase	3.35	Metabolism of terpenoids and polyketides
Bcf_04165	ABC transporter permease	3.36	Membrane transport
Bcf_10620	SpoVS-related protein, type I	3.37	Unclassified: Cell growth
Bcf_00880	Polysaccharide deacetylase	3.39	Unclassified: Metabolism
Bcf_13645	Glycine betaine ABC transport system, ATP- binding protein OpuAA	3.42	Membrane transport
Bcf_18425	PTS system fructose-specific transporter subunit IIA	3.46	Carbohydrate metabolism
Bcf_20810	Stage III sporulation protein AH	3.47	Unclassified: Cell growth
Bcf_21945	Stage V sporulation protein B	3.50	Unclassified: Cell growth
Bcf_21410	Stage IV sporulation protein	3.53	Unclassified: Cell growth
Bcf_09845	Transcription state regulatory protein abrB	3.55	Transcription factors
Bcf_24170	LPXTG-site transpeptidase family protein	3.56	Peptidases and inhibitors
Bcf_13160	MutT/nudix family protein	3.57	DNA repair and recombination proteins

			Supplementary Material
Bcf_27035	Prespore specific transcriptional activator RsfA	3.58	Transcription factors
Bcf_07740	Uracil-DNA glycosylase	3.58	Replication and repair
Bcf_03030	Alanine dehydrogenase	3.61	Amino acid metabolism
Bcf_17740	Chromosome segregation ATPase	3.62	Chromosome and associated proteins
Bcf_21995	Substrate-binding family protein	3.63	Not found
Bcf_19945	Maltose/maltodextrin ABC transporter permease MalG	3.67	Membrane transport
Bcf_11915	Zinc transporter, ZIP family	3.68	Transporters
Bcf_17155	Fe <sup>3+</sup> -siderophore ABC transporter permease 2 component	3.74	Not found
Bcf_20275	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	3.76	Glycan biosynthesis and metabolism
Bcf_03285	Glutamate transport ATP-binding protein	3.77	Membrane transport
Bcf_26510	Stage II sporulation protein D (SpoIID)	3.77	Unclassified: Cell growth
Bcf_10045	Membrane protein involved in the export of O- antigen, teichoic acid lipoteichoic acids	3.77	Not found
Bcf_20830	Stage III sporulation protein AD	3.78	Unclassified: Cell growth
Bcf_08690	Class II fumarate hydratase	3.78	Carbohydrate metabolism / Energy metabolism
Bcf_01405	Alanine racemase	3.80	Metabolism of other amino acids
Bcf_09575	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II	3.81	Energy metabolism / Signal transduction
Bcf_19970	Maltose/maltodextrin transport ATP-binding protein Malk	3.82	Membrane transport
Bcf_09570	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I	3.84	Energy metabolism / Signal transduction
Bcf_22070	ABC transporter permease	3.87	Transporters
Bcf_07640	Stage IV sporulation protein A	3.97	Unclassified: Cell growth
Bcf_17710	Formate dehydrogenase related protein	3.97	Carbohydrate metabolism / Energy metabolism
Bcf_07435	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	3.97	Glycan biosynthesis and metabolism
Bcf_24165	DNA-binding response regulator	3.99	Two-component system
Bcf_22435	Germination (Cortex hydrolysis) and sporulation protein GerM	4.07	Unclassified: Cell growth
Bcf_09765	Acyl carrier protein associated with anthrachelin biosynthesis	4.07	Metabolism of terpenoids and polyketides
Bcf_14575	Antibiotic biosynthesis monooxygenase domain-containing protein	4.08	Biosynthesis of other secondary metabolites
Bcf_12365	Pyruvate decarboxylase	4.10	Carbohydrate metabolism
Bcf_20815	Stage III sporulation protein AG	4.13	Unclassified: Cell growth
Bcf_07440	Spore maturation protein A	4.17	Unclassified: Cell growth
Bcf_07445	Spore maturation protein B	4.19	Unclassified: Cell growth
Bcf_09760	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase	4.21	Metabolism of terpenoids and polyketides
Bcf_22065	ABC transporter permease	4.22	Transporters
Bcf_20555	Glutamate N-acetyltransferase	4.23	Amino acid metabolism

Bcf_22125	Stage IV sporulation protein FA (SpoIVFA)	4.24	Unclassified: Cell growth
Bcf_20650	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein	4.35	Membrane transport
Bcf_25550	Petrobactin ABC transporter substrate-binding protein	4.45	Not found
Bcf_22740	NPQTN specific sortase B	4.48	Peptidases and inhibitors
Bcf_19515	Membrane protein	4.51	Not found
Bcf_20840	Stage III sporulation protein AB	4.59	Unclassified: Cell growth
Bcf_12450	Pyruvate decarboxylase	4.62	Carbohydrate metabolism
Bcf_22075	ABC transporter ATP-binding protein	4.67	Transporters
Bcf_26490	Stage II sporulation protein related to metaloproteases (SpoIIQ)	4.90	Unclassified: Cell growth
Bcf_20835	Stage III sporulation protein AC	4.98	Unclassified: Cell growth
Bcf_20560	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	5.05	Amino acid metabolism
Bcf_20845	Stage III sporulation protein AA	5.08	Unclassified: Cell growth
Bcf_19950	Maltose/maltodextrin ABC transporter permease MalF	5.12	Membrane transport
Bcf_19240	Cation-transporting ATPase	5.15	Unclassified: Metabolism
Bcf_17160	Fe <sup>3+</sup> -siderophore ABC transporter permease	5.22	Not found
Bcf_26015	UDP-glucose dehydrogenase	5.23	Carbohydrate metabolism / Glycan biosynthesis and metabolism
Bcf_04035	Putative nitroreductase family protein	5.26	Not found
Bcf_11890	ABC transporter permease	5.29	Transporters
Bcf_18510	Trilactone hydrolase (bacillibactin) siderophore	5.39	Poorly characterized
Bcf_09755	Anthrachelin biosynthesis protein AsbB / Siderophore synthetase superfamily, group C / Siderophore synthetase component, ligase	5.56	Metabolism of terpenoids and polyketides
Bcf_12455	Pyruvate decarboxylase	5.62	Carbohydrate metabolism
Bcf_11780	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase	5.64	Metabolism of terpenoids and polyketides
Bcf_20825	Stage III sporulation protein AE	5.66	Unclassified: Cell growth
Bcf_09750	Anthrachelin biosynthesis protein AsbA / Siderophore synthetase superfamily, group A / Siderophore synthetase large component, acetyltransferase	5.99	Metabolism of terpenoids and polyketides
Bcf_11885	ABC transporter ATP-binding protein	6.20	Transporters
Bcf_22745	Heme transporter analogous to IsdDEF, ATP- binding protein	6.35	Not found
Bcf_19955	Maltose/maltodextrinABC transporter substrate-binding protein MalE	6.37	Membrane transport
Bcf_22755	Heme transporter IsdDEF, lipoprotein IsdE	6.49	Transporters
Bcf_18515	Fe-bacillibactin uptake system FeuD	6.68	Transporters
Bcf_18525	Fe-bacillibactin uptake system FeuB	6.71	Transporters
Bcf_03370	Oligopeptide ABC transporter substrate-binding protein OppA	6.87	Membrane transport / Cellular community - prokaryotes
Bcf_22750	Heme transporter IsdDEF, permease component IsdF	7.15	Transporters
Bcf_11815	4'-phosphopantetheinyl transferase	7.31	Metabolism of cofactors and vitamins



			Supplementary Material
Bcf_11795	Isochorismatase	7.40	Metabolism of terpenoids and polyketides
Bcf_16240	Internalin	7.68	Infectious disease: bacterial
Bcf_13340	Bacitracin transport permease protein	7.82	Membrane transport / Signal transduction
Bcf_11810	Polymyxin transporter PmxC	7.94	Not found
Bcf_05665	S-layer protein	7.98	Unclassified: Structural proteins
Bcf_18520	Fe-bacillibactin uptake system FeuC	8.14	Transporters
Bcf_06735	Internalin	8.48	Infectious disease: bacterial
Bcf_11800	Siderophore biosynthesis non-ribosomal peptide synthetase / Bacillibactin synthetase component F	8.52	Metabolism of terpenoids and polyketides
Bcf_11805	Polymyxin synthetase PmxB	8.54	Biosynthesis of other secondary metabolites
Bcf_18535	Fe-bacillibactin uptake system FeuA	8.55	Transporters
Bcf_11785	Isochorismate synthase	8.58	Metabolism of cofactors and vitamins / Metabolism of terpenoids and polyketides
Bcf_21720	Iron compound ABC transporter ATP-binding protein	9.01	Transporters
Bcf_22760	Cell surface protein IsdA	9.31	Infectious disease: bacterial
Bcf_22765	NPQTN cell wall anchored protein IsdC	9.58	Transporters
Bcf_06965	Flavodoxin	10.01	Unclassified: Metabolism
Bcf_11790	2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase	10.31	Metabolism of terpenoids and polyketides
Bcf_21715	Ankyrin repeat domain protein	10.67	Membrane trafficking
Bcf_21730	Heme transporter IsdDEF, lipoprotein IsdE	10.90	Transporters
Bcf_17445	Flavodoxin	12.14	Unclassified: Metabolism
Bcf_21725	Fe <sup>3+</sup> -siderophore ABC transporter permease	12.23	Transporters

## References

- Beecher, D. J. & Macmillan, J. D. (1991). Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* 59(5), 1778-1784
- Jeßberger, N., Krey, V. M., Rademacher, C., Böhm, M. E., Mohr, A. K., Ehling-Schulz, M., Scherer, S. & Märklbauer, E. (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>
- Jugert, C. S., Didier, A., Plötz, M., & Jessberger, N. (2023). Strain-specific antimicrobial activity of lactoferrin-based food supplements. *J. Food Prot.* In press. doi:10.1016/j.jfp.2023.100153
- Lund, T. & Granum, P.E. (1996). Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiol. Lett.* 141, 151–156. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08377.x>
- Schwenk, V., Riegg, J., Lacroix, M., Märklbauer, E., & Jessberger, N. (2020). Enteropathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* isolates from soil, animals, food and biopesticides. *Foods* 9(10), 1484. doi:10.3390/foods9101484

## V. DISKUSSION

Aufgrund seiner zahlreichen positiven Aspekte wird (bovines) Lf intensiv in verschiedenen Bereichen verwendet, vor allem in der Humanmedizin und zu diätetischen Zwecken als beliebtes Nahrungsergänzungsmittel (Superti, 2020). Lf wird eine unterstützende Wirkung auf die Darmmikroflora sowie bestimmte Probiotika zugeschrieben (Vega-Bautista et al., 2019; Superti, 2020). Auch die antimikrobiellen Eigenschaften von Lf sind bereits umfassend charakterisiert. So wirkt es zum einen durch seine Eisen-bindende Funktion bakteriostatisch gegen verschiedenste Gram-positive und Gram-negative Pathogene, und zum anderen bakterizid durch Bindung an Bakterienoberflächen und die Induktion von Membranschäden (vgl. Kapitel 2.2). Auch hinsichtlich steigender Antibiotikaresistenzen rückte Lf daher in das Interesse der Forschung, gerade in Bezug auf neuartige antimikrobielle Medikamente zur Bekämpfung von Virus-, Bakterien- und Pilzkrankheiten und als Nutraceuticalum (Jahani et al., 2015). Doch kann ein genereller antimikrobieller Effekt von Lf gegen eine bestimmte Bakterienspezies tatsächlich postuliert werden? In diesem Zusammenhang stellte sich außerdem die Frage, ob auch pathogene Keime einen Nutzen aus Lf ziehen können. Mit Ausnahme von Aspekten des Eisenstoffwechsels bzw. der Beschaffung von Eisen wurde die Reaktion von pathogenen Bakterien auf Lf bisher wenig untersucht. Ebenso ist der Zusammenhang zwischen Lf-Exposition und der Produktion und Wirkungsweise von Toxinen pathogener Bakterien kaum erforscht.

### 1. Auswirkungen von Laktoferrin auf bakterielles Wachstum

Die antimikrobiellen Eigenschaften von Lf sind besonders in Bezug auf Bakterien seit einiger Zeit bekannt und gut untersucht (siehe Kapitel 2.2.). Antibakterielle Aktivität wurde bereits für *B. subtilis*, *B. cereus*, *C. perfringens*, *Corynebacterium diphtheria*, (Shiga-Toxin produzierende) *E. coli*, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *Mannheimia haemolytica*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *S. aureus*, *Vibrio cholera* und *Y. enterocolitica* beschrieben (Sato et al., 1999b; Bruni et al., 2016; Zarzosa-Moreno et al., 2020). Daher war auch in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zunächst ein hemmender Einfluss auf die getesteten Keime zu erwarten. In Agardiffusionstests zeigten sich allerdings

sowohl für *B. cereus*, als auch für *B. thuringiensis*, weitere *Bacillus* spp., *E. coli*, *S. aureus* und *S. uberis* deutliche Stamm-spezifische Unterschiede innerhalb der getesteten Spezies. Insgesamt konnte für 24 % der Isolate keine Wachstumsinhibition verzeichnet werden, für 31 % eine mäßige, sowie für 45 % eine starke Inhibition. Demzufolge zeigten sich auch die minimalen inhibitorischen Konzentrationen Stamm-spezifisch hoch variabel (vgl. Publikation I).

Verschiedene Autoren beschrieben bereits im Vorfeld eine hemmende Wirkung von Lf auf *B. cereus*, sei es auf das Wachstum oder auf die Sporulation, wobei sowohl die Fähigkeit von Lf, Eisen zu binden, als auch die direkte Interaktion mit der Bakterienoberfläche als ursächliche Faktoren diskutiert werden (Custer & Hansen, 1983; Sato et al., 1999b; Almaas et al., 2006; Jahani et al., 2015; Bruni et al., 2016). Einschränkend ist bei diesen Arbeiten anzumerken, dass oft nur ein oder eine geringe Anzahl an Isolaten für die Untersuchungen verwendet wurde. Basierend auf einem großen Stammset von 46 *B. cereus* Isolaten konnte in den eigenen Untersuchungen der wachstumshemmende Effekt von Lf größtenteils verifiziert werden: Die Mehrzahl der getesteten *B. cereus* Stämme zeigte nach Lf-Zugabe verringertes Wachstum in mMOD Minimalmedium (vgl. Publikation I). Dieses Medium enthält unter anderem FeCl<sub>2</sub>, um den Bakterien das für Wachstum und Überleben notwendige Eisen zur Verfügung zu stellen (Glatz & Goepfert, 1977). In einem eisenfreien Kontrollansatz wurde kein bzw. nur minimales Wachstum verzeichnet, was auf Eisen-Reste aus der Vorkultur zurückgeführt werden konnte (vgl. Publikation II). Dies deckt sich mit der Literatur. Eisen ist ein essentieller Bestandteil für bakterielles Wachstum (Arnold et al., 1980; Sánchez et al., 1992; Sato et al., 1998, 1999a; Harvie et al., 2005; Valenti & Antonini, 2005; Yen et al., 2011; Ma et al., 2012; Chandransu et al., 2017). Dennoch zeigte die detaillierte Untersuchung von drei Referenzstämmen noch einmal die hohe Variabilität dieser Prozesse auf: 1 mg/mL Lf hatte keinen Einfluss auf Stamm INRA C3, sowie nur wenig auf Stamm F837/76 (Referenzstamm für Hämolyse BL nach Beecher & Macmillan, 1991). Der Zusatz von 10 mg/mL Lf inhibierte INRA C3 deutlich, während das Wachstum von F837/76 hier sogar verbessert wurde. Stamm NVH 0075-95 (Referenzstamm für Nhe nach Lund & Granum, 1996) wurde hingegen bei beiden Lf Konzentrationen fast komplett in seinem Wachstum gehemmt (vgl. Publikation II). Die gewählten Lf Konzentrationen orientierten sich an den physiologischen Mengen in Körperflüssigkeiten, die mit 1-

4 mg/ml in Milch und Tränen sowie etwa 8 mg/ml im Kolostrum beschrieben werden (Rosa et al., 2017). Im Vergleich hierzu beobachteten Sato und Kollegen bereits bei 0,01 mg/ml die ersten hemmenden Effekte von Lf auf *B. cereus*, eine vollständige Hemmung konnte ab 1 mg/ml erzielt werden (Sato et al., 1999b).

Die Ergebnisse dieser Arbeit lieferten außerdem erste Hinweise darauf, dass der inhibitorische Effekt von Lf auf das Wachstum von *B. cereus* nicht notwendigerweise durch die Induktion einer Eisenmangelsituation erfolgt. So wurde das Wachstum des Stammes INRA C3 unter 10 mg/ml Lf deutlich gehemmt, während sich im Medium Konzentrationen an frei verfügbarem Eisen von 3-4 µg/ml nachweisen ließen (vgl. Publikation II). Der Anstieg an frei verfügbarem Eisen ist durch die Verwendung von holo-Lf (eisengesättigt) zu erklären. Für die Versuche in dieser Arbeit wurde bewusst auf gereinigtes Lf für Forschungszwecke verzichtet, stattdessen wurden kommerziell verfügbare Lf-basierte Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt, welche meist auf holo-Lf basieren. Im Gegensatz dazu verringert apo-Lf durch seine eisenbindende Fähigkeit die Verfügbarkeit von freiem Eisen und wirkt dadurch bakteriostatisch (Berkhout et al., 2003; Zarzosa-Moreno et al., 2020). Verschiedene Bakterien können sich solchen Mangelsituationen aber durchaus anpassen. So können sie z. B. Siderophore sekretieren, kleine niedermolekulare Verbindungen, welche Eisen mit sehr hoher Affinität binden und anschließend mit Hilfe spezieller Membranrezeptoren in die Zelle transportieren (Orsi, 2004; Hayrapetyan et al., 2016). Grundsätzlich können Siderophore Eisen aus verschiedensten Quellen sequestrieren, z. B. auch aus Transferrinen (Abergel et al., 2008). Für die *B. cereus* Gruppe sind zwei verschiedene Siderophore beschrieben: Bacillibactin und Petrobactin (Wilson et al., 2006). Während Petrobactin vorrangig bei *B. anthracis* vorkommt (Koppisch et al., 2005), scheint bei *B. cereus* Bacillibactin von größerer Bedeutung zu sein (Segond et al., 2014). Für gewöhnlich wird Bacillibactin durch das Protein Siderocalin, ein Teil des angeborenen Immunsystems, erkannt und deaktiviert (Goetz et al., 2002). Bei Petrobactin gelingt dies allerdings nicht. Auch wenn es aufgrund seiner niedrigeren Affinität zu Eisen eine geringere Wirkung zeigt als Bacillibactin (Dertz et al., 2006; Abergel et al., 2008), entzieht es sich dem Immunsystem des Wirts und ist vor allem bei *B. anthracis* für die Auskeimung von Sporen sowie den Infektionsverlauf relevant (Lee et al., 2007). Sobald Siderophore Eisen gebunden haben, werden die entstandenen Komplexe an speziellen Rezeptoren an der

Bakterienoberfläche gebunden und mittels ATP-abhängiger, Membran-assoziiierter Transporter in die Zelle eingeschleust (Köster, 2001). *B. cereus* kann für sein Wachstum verschiedene Eisenquellen nutzen, vorrangig aus Verbindungen, die in roten Blutzellen vorkommen. Hämoglobin, Hämine und andere Hämproteine spielen dabei eine zentrale Rolle (Sato et al., 1998, 1999a, 1999b). Inwieweit *B. cereus* Ferritin bzw. Transferrine zur Eisengewinnung nutzen kann, ist umstritten (Sato et al., 1998; Park et al., 2005; Daou et al., 2009). Daou und Kollegen beschrieben für den *B. cereus* Stamm ATCC 14579 auch Ferritin als Eisenquelle (Daou et al., 2009). Für Lf gingen Sato und Kollegen davon aus, dass *B. cereus* Lf-gebundenes Eisen nicht als Eisenquelle nutzen kann (Sato et al., 1999b). In früheren Arbeiten zeigten sie außerdem, dass *B. cereus* nicht in Medium, das Transferrin enthält, wachsen kann (Sato et al., 1998). Sie schlussfolgerten deshalb, dass *B. cereus* keine Siderophore für Lf und Transferrin ausbilden kann (Sato et al., 1999b). Hayrapetyan und Kollegen konnten jedoch zeigen, dass von insgesamt 22 getesteten Stämmen sechs Transferrin, drei Ferritin und zwei Lf nutzen konnten (Hayrapetyan et al., 2016). Die Autoren postulierten deswegen eine hohe Stamm-Spezifität in Bezug auf den Eisenstoffwechsel (Sato et al., 1998, 1999a; Daou et al., 2009; Hayrapetyan et al., 2016). Die Ergebnisse der eigenen Arbeit zeigen ein ähnliches Bild. Ein Großteil der getesteten Isolate wurde nach entsprechender Zugabe von Lf im Wachstum gehemmt, während einige wenige Stämme sogar verstärktes Wachstum zeigten. Besonders deutlich wurde dies durch die Wachstumssteigerung des Stammes F837/76 unter 10 mg/ml Lf (vgl. Publikation II). Außerdem zeigte sich dieses Isolat als besonders resistent gegenüber mehreren getesteten Lf-Produkten (vgl. Publikation I) und gehört damit zu den eher selteneren Vertretern der Spezies *B. cereus*, die Lf als Eisenquelle und zum Wachstum nutzen können.

Der zweite Mechanismus zur Reaktion auf Eisenmangelsituationen besteht in einer verstärkten Ausprägung bestimmter Rezeptoren an der äußeren Membran, die an Lf binden und diesem Eisen direkt entziehen können. Ein ähnlicher Effekt ist für Transferrin beschrieben (Orsi, 2004). Daran sind z. B. spezifische Transporter vom ABC-Typ beteiligt, die entweder komplex gebundenes oder freies Eisen mit hoher Affinität binden und bewegen können (Brown & Holden, 2002; Daou et al., 2009). Das Genom von *B. cereus* codiert für einige dieser ABC-Transporter, die vor allem an der Nutzung von Eisen aus Eisencitrat und Ferrichrom beteiligt sind (Harvie &

Ellar, 2005; Fukushima et al., 2012). Eisencitrat kann aus Zitronensäure gebildet werden, welche sich z. B. in Milch findet (Fukushima et al., 2012). *B. cereus* kann Eisencitrat für sein Wachstum nutzen (Sato et al., 1999b; Daou et al., 2009).

Ein verstärktes Wachstum unter Lf-Einfluss ist bislang hauptsächlich für probiotische Mikroorganismen beschrieben (Vega-Bautista et al., 2019) und stärkt den Verdacht, dass verschiedene, evtl. sogar pathogene Bakterien Lf (zum Wachstum und/oder im Eisenstoffwechsel) nutzen können. Innerhalb der beschriebenen Bakterienspezies scheint es hierbei aber ebenso starke Stammspezifische Unterschiede zu geben (vgl. Kapitel 2.2). Zusätzlich wurde eine selektive Hemmwirkung von Lf beobachtet: das Wachstum wurde bei vielen Pathogenen gehemmt, vergleichend bei verschiedenen Probiotika wie z. B. *Lactobacillus* Stämmen hingegen nicht. In Untersuchungen mit *Lactobacillus fermentum* und *Lactobacillus reuteri* Kulturen schienen diese die hemmende Aktivität von Lf gegenüber den Pathogenen sogar noch zu verstärken (Tian et al., 2010; Chen et al., 2013a). Die Hypothese, dass Lf gleichzeitig pathogene Keime hemmen kann ohne körpereigene Magen-Darm-Flora zu beeinträchtigen, könnte im Bereich der Antibiotika-Forschung ein interessanter Ansatz sein. In den meisten Fällen haben antimikrobielle Wirkstoffe auch einen negativen Effekt auf die gastrointestinale Balance, was zu unerwünschten Wirkungen beim Anwender führen kann.

Die Frage nach den Mechanismen, die dieser stark unterschiedlichen Auswirkung von Lf auf Vertreter ein und derselben Spezies zugrunde liegen, ist noch nicht abschließend geklärt. Ebenso gibt es viele offene Fragen hinsichtlich der bakteriellen Gegenmaßnahmen als Reaktion auf Lf-Exposition. Zumindest für Probiotika sind zu dieser Fragestellung bereits einige Mechanismen beschrieben (Vega-Bautista et al., 2019). Einige probiotische Stämme können Lf-bindende Proteine an ihrer Membranoberfläche exprimieren und nach verschiedenen Umbauprozessen auch den Transport in die Zelle aktivieren. So konnten mittels Western Blot Analysen bei *B. bifidum* sowohl in der Membran-Fraktion als auch in der Zytosol-Fraktion Proteine nachgewiesen werden, die bLf binden können (Kim et al., 2002). Auch für *L. acidophilus*, *B. breve*, und *B. infantis* konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Hier zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der wachstumsfördernden Aktivität und der Expression Lf-bindender Proteine (Kim et al., 2004). Diese Mechanismen scheinen unabhängig von der Eisensättigung des Lf

zu sein. Das gesteigerte Wachstum mancher Probiotika könnte sogar aus der Interaktion von Lf und den Lf-bindenden Proteinen heraus entstehen, um es mit dem Ziel der Energiegewinnung in die Zelle zu transportieren. Die Nutzung von Lf und die dadurch entstehende Energie könnte zu verstärktem Wachstum mancher Stämme beitragen (Vega-Bautista et al., 2019).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie die Ausführungen in diesem Kapitel unterstreichen noch einmal, dass keinesfalls von einer allgemein gültigen antimikrobiellen oder wachstumsfördernden Aktivität von Lf gegenüber einer bestimmten Bakterienspezies (weder pathogen noch probiotisch) ausgegangen werden kann. Diese Effekte wurden bislang und sollten auch weiterhin auf Stamm-Ebene untersucht werden. Auch wenn der Bereich der gesundheitsbezogenen Werbung für Lebensmittel und Nahrungsergänzungsmittel reglementiert ist, zeigt die Realität häufig ein maximales Dehnen des rechtlichen Rahmens. In Anbetracht der Ergebnisse dieser Arbeit sollte zumindest die generelle Bewerbung Lf-haltiger Produkte als „antimikrobiell“ kritisch gesehen werden. Auch die Aussage „fördernd für Probiotika“ kann nicht mehr als allgemeingültig angesehen werden.

## 2. Auswirkungen von Laktoferrin auf Toxinproduktivität

Während seine hemmende Wirkung auf bakterielle Krankheitserreger schon seit geraumer Zeit untersucht wird, ist der Zusammenhang zwischen Lf und der Produktion und Wirkungsweise von Toxinen weniger erforscht. In Kapitel 1.4.4. werden die Toxintranskription und –sekretion von *B. cereus* genauer erläutert. Im Verlauf dieser Arbeit konnten nicht nur hinsichtlich des Wachstumsverhaltens, sondern auch bezüglich der **Enterotoxinproduktion** interessante neue Beobachtungen gemacht werden. Es zeigten sich auch hier wieder deutliche Stamm-spezifische Unterschiede. Für 23 von 31 getesteten Isolaten (*B. cereus* und *B. thuringiensis*) konnte nach Lf-Exposition eine gesteigerte Menge der Enterotoxin-Komponente NheB nachgewiesen werden. Anhand von ausgewählten Referenzstämmen wurde außerdem ersichtlich, dass nicht zwingend ein Zusammenhang zwischen Wachstumsinhibition durch Lf und gesteigerter Toxinproduktion besteht. Außerdem wirkten sich verschiedene Lf-haltige Nahrungsergänzungsmittel unterschiedlich auf die Enterotoxinbildung aus. Besonders bei Produkten, die außer reinem bLf keine sonstigen Zusatzstoffe

enthielten, wurden die höchsten NheB Titer detektiert (vgl. Publikation II).

Diese Beobachtungen decken sich mit der aktuellen Literatur. Es ist bekannt, dass *B. cereus* auf verschiedene Stresssituationen und Umweltfaktoren mit gesteigerter Toxinproduktion reagiert. Diese können z. B. Nährstoffmangel und Zelldichte sein (Gohar et al., 2008), aber auch die Simulation von Magen-Darm-Bedingungen (Jessberger et al., 2017) und die Gegenwart von Mucin (Jessberger et al., 2019a). Auch verschiedene Lebensmittelkomponenten können einen Einfluss auf die Enterotoxinproduktion haben (Da Rioli et al., 2018). Somit ist es durchaus plausibel, dass die Mehrzahl der getesteten *B. cereus* Stämme auch auf Lf-Exposition mit gesteigerter Enterotoxinproduktion reagierte. Ob dieser Effekt nun aufgrund einer Stresssituation (Eisenmangel konnte in Publikation II ausgeschlossen werden), der direkten Interaktion von Lf mit der Zelloberfläche, oder sogar durch verbesserte Umweltbedingungen (erhöhtes Eisenangebot durch holo-Lf) zustande kommt, muss in Folgearbeiten geklärt werden. Diese Arbeit lieferte erste Hinweise darauf, dass Stamm-spezifisch mehrere dieser Szenarien zutreffen könnten.

Um zunächst auch auf Transkriptomebene einen umfangreichen Überblick über die Reaktion von *B. cereus* auf Lf-Exposition zu erhalten, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit RNA Sequenzierungen am Beispiel des Referenzstammes INRA C3 durchgeführt. Die gesteigerte Menge an differentiell regulierten Genen im Vergleich zu einer eisenfreien Kontrolle verdeutlichte noch einmal, dass die spezifische Reaktion von *B. cereus* auf Lf weit über die Induktion einer Eisenmangelsituation hinausgeht. Hierzu konnten bereits Hayrapetyan und Kollegen anhand des *B. cereus* Stammes ATCC 10987 nach künstlich induziertem Eisenmangel eine verstärkte Expression von Genen verschiedener Eisentransporter beobachten (Hayrapetyan et al., 2016). In der vorliegenden Arbeit wurden nach Lf-Exposition Gene, die an Flagellen, Motilität, Chemotaxis, Sporulation, Genregulation, Hitze- und Kälteschock, Transport sowie Virulenz beteiligt sind, reprimiert. Verstärkt exprimiert wurden hingegen Gene, die an Sporulation und Sporenauskeimung, Nährstoffaufnahme, speziell aber nicht ausschließlich Eisentransport und -verwertung, sowie Resistenz beteiligt sind (vgl. Publikation II). Bereits früher konnte gezeigt werden, dass *B. cereus* auf sich verändernde Umweltbedingungen mit einer massiven Änderung des Transkriptoms reagiert. Nach Kontakt des Stammes F837/76 mit der intestinalen Mucusschicht, repräsentiert durch *porcine gastric mucin* (PGM), kam es beispielsweise zur



differentiellen Regulation von über 1000 Genen, die unter anderem für Enterotoxine und weitere mutmaßliche Virulenzfaktoren sowie für Proteine kodieren, die an der Adhäsion an und dem Abbau von Mucin beteiligt sind (Jessberger et al., 2019a).

Interessanterweise konnte in der eigenen Arbeit beobachtet werden, dass in Anwesenheit von Lf auch Gene, die Teile des *hbl* Operons codieren, reprimiert wurden. Dies deckt sich mit Ergebnissen weiterer eigener Untersuchungen, bei denen in EIAs keine verstärkten Hbl Titer in den dazugehörigen Kulturüberständen detektiert werden konnten. Ebenso stimmt dies mit der verminderten Expression des Gens für das PlcR-aktivierende Protein PapR (siehe oben) überein. Die beobachtete, verstärkte Menge an NheB in Kulturüberständen nach Lf-Exposition ist aber allein mit den Daten der Transkriptomanalyse nicht vollständig zu erklären. Es muss aber angemerkt werden, dass die Enterotoxinproduktion in *B. cereus* nicht ausschließlich transkriptionell beeinflusst wird, sondern auch durch diverse weitere Stamm-spezifische posttranskriptionelle und posttranslationale Mechanismen, welche man gerade erst zu verstehen beginnt (Jessberger et al., 2015; Dietrich et al., 2021).

Auch Gene, die für weitere Virulenzfaktoren codieren, wurden reprimiert (vgl. Publikation II). Hierzu zählen z. B. Bacillolysin und neutrale Proteasen (Sidler et al., 1986) oder die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC; Kuppe et al., 1989; Roberts et al., 2018). PI-PLCs können bei Pflanzen, Säugetieren, Insekten, Bakterien, Protozoen, Hefen und Schimmelpilzen vorkommen. Bei fast allen Organismen handelt es sich um intrazelluläre Enzyme, Bakterien ist es jedoch möglich, diese Enzyme zu sekretieren (Griffith & Ryan, 1999). Bakterielle PI-PLCs sind wasserlösliche Enzyme, die in der Lage sind, Membranlipide (Phosphatidylinositol, Lyso-PI, Glykosyl-PI) aus Membranen zu spalten (Griffith & Ryan, 1999). PI-PLCs spielen unter anderem bei der Interaktion mit der Wirtszelle sowie bei der (Schad)Wirkung eine wichtige Rolle. Dadurch sind sie an der Pathogenität einiger Bakterienspezies beteiligt (Griffith & Ryan, 1999; Roberts et al., 2018).

In einer früheren Arbeit wurde vermutet, dass die Repression von Genen, die für Virulenzfaktoren codieren, möglicherweise eine Folge der Sequestration des Eisens und der dadurch limitierten Verfügbarkeit des Elements für (pathogene) Mikroorganismen ist (García-Montoya et al., 2012). Dies konnte in der

vorliegenden Arbeit (zumindest für *B. cereus* nach holo-Lf-Exposition) widerlegt werden. Während in einem eisenfreien Kontrollansatz im Vergleich zum Minimalmedium lediglich 60 Gene differentiell reguliert wurden, die hauptsächlich in Eisentransport, -aufnahme und -verwertung involviert sind, förderte die Präsenz von Lf die differentielle Regulation von insgesamt 278 Genen, darunter etliche, die für Virulenzfaktoren codieren (siehe oben und Publikation II). Nichtsdestotrotz ist die genregulierende Eigenschaft von Lf bereits bekannt. So konnte gezeigt werden, dass Lf durch Interaktion mit Zellmembranproteinen in das Zytosol aufgenommen wird. Hier dissoziiert es dann in Gegenwart von ATP in die N- und C-Lappen (Semenov et al., 1999). Letztere können mit DNA interagieren und sind an der Modulation von Genen beteiligt, die z. B. in DNA-Replikation und Zellwachstum involviert sind. Dieser Mechanismus ist als ein Teil der wachstumsfördernden Wirkung von Lf auf Probiotika wie *Bifidobacterium* und *Lactobacillus* beschrieben (Vega Bautista et al., 2019).

Auch durch seine enzymatische Aktivität kann Lf einen Einfluss auf Pathogenitätsmechanismen oder Virulenzfaktoren haben (vgl. Abb. 4, Kapitel 2.2). So wurde bereits die Lf-induzierte **Degradation** von Stx2 (Shigatoxin 2) aus EHEC (Kieckens et al., 2017), von Fimbrien und Flagellen aus ETEC (Dierick et al., 2020), sowie von Effektorproteinen aus *E. coli* oder *S. flexneri* (Ling & Schryvers, 2006) gezeigt. Lf weist Protease-Aktivität auf und ist in der Lage, Arginin-reiche Sequenzen von Zielproteinen abzuspalten (Hendrixson et al., 2003; Ochoa et al., 2003). Viele bakterielle Virulenzfaktoren weisen derartige Sequenzen auf und sind dadurch durch Lf degradierbar. Die Fähigkeit, Proteine zu spalten trägt somit auch direkt zur antimikrobiellen Wirkung von Lf bei (vgl. Kapitel 2.2.). Ein proteolytischer Abbau der *B. cereus* Enterotoxine ist allerdings unwahrscheinlich, da diese kaum Arginin-reiche Sequenzen enthalten, welche durch die Serin-Protease-Aktivität des Lf abgespalten werden können (Hendrixson et al., 2003; Ochoa et al., 2003). Das NheB Protein von Referenzstamm F837/76 beispielsweise hat insgesamt nur vier Arginin-Anteile. Außerdem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass mit steigenden NheB Titern im EIA auch die Zytotoxizität im Zellkulturtest zunimmt. Dies deutet also auf das Vorliegen von vollständigem, komplett funktionsfähigem Nhe Toxin hin (vgl. Publikation II). Der experimentelle Beweis hierfür steht allerdings noch aus.

Neben der Toxingenexpression und der Toxinstabilität wurde in einigen Arbeiten

auch bereits ein Einfluss von Lf auf die messbare **zytotoxische Aktivität** der *B. cereus* Enterotoxine beschrieben. Da Riol und Kollegen konnten zeigen, dass die Zugabe verschiedener Milchprodukte die toxische Aktivität von drei *B. cereus* Stämmen gegenüber CaCo-2-Zellen verringert. Bei der Untersuchung der einzelnen Bestandteile zeigte vor allem Lf die stärkste hemmende Wirkung. Die Ergebnisse deuteten außerdem darauf hin, dass Hbl durch die Präsenz von Lf stärker beeinträchtigt wird als Nhe (Da Riol et al., 2018). Dieses Phänomen konnte auch in der vorliegenden Arbeit mittels Transkriptom- und EIA-Analysen bestätigt werden (siehe oben und Publikation II). Interessanterweise konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die hemmende Wirkung von Lf auf die Toxinaktivität weniger auf einer Beeinträchtigung der Zielzellbindung basiert, sondern vielmehr auf einer Blockierung der Interaktion der Toxinkomponenten untereinander. Zusätzliche EIA Daten bestätigten die Fähigkeit von Lf, an die einzelnen Enterotoxin-Komponenten von *B. cereus*, vor allem Hbl B, zu binden und diese zu blockieren (Da Riol et al., 2018). Der Wirkmechanismus der beiden Enterotoxin-Komplexe Nhe und Hbl ist ein diffiziler Prozess, in dem jeweils alle drei Proteinkomponenten exakt aufeinander abgestimmt sein müssen, um die Porenbildung und damit die zytotoxische Wirkung zu induzieren. Diese Komponenten sind einzeln atoxisch und können nur in Kombination eine entsprechende Wirkung entfalten. Maximale zytotoxische Aktivität *in vitro* wird für Nhe bei einem Konzentrationsverhältnis von NheA:B:C = 10:10:1 und für Hbl bei L2:L1:B = 1:1:10 oder 10:1:10 erreicht (Granum et al., 1999; Jessberger et al., 2019b). Auch die Bindungsreihenfolge an die Zielzellen ist essentiell. Sowohl NheB als auch NheC sind eigenständig und unabhängig voneinander in der Lage, an eukaryotische Zielzelloberflächen zu binden (Heilkenbrinker et al., 2013; Lindbäck et al., 2010). Sie können jedoch bereits in Lösung sehr affine und stabile Komplexe bilden, die wiederum selbst in der Lage sind, Transmembrankanäle in der Zielzellmembran, sog. Vorporen, zu generieren. Dieser Zustand ist allerdings reversibel (Zhu et al., 2016). Entscheidend für die Ausbildung der kompletten Pore ist die Anlagerung von NheA an zellgebundene NheB/NheC-Oligomere. Durch die vervollständigte Pore kommt es dann wie bereits oben beschrieben zu osmotischen Dysbalancen in der Membran und schließlich zur Lyse der Zielzelle (Lindbäck et al., 2010; Didier et al., 2012; Heilkenbrinker et al., 2013; Didier et al., 2016). Im Gegensatz dazu ist beim Hbl-Enterotoxin nur Hbl B in der Lage, an die Membran eukaryotischer Zellen zu binden. Nach Anlagerung von L1 an das zellgebundene B kommt es letztlich durch

Interaktion von Hbl L2 mit diesem Komplex wiederum zur Porenbildung (Sastalla et al., 2013; Jessberger et al., 2019b). Die entstehende Pore weist eine Größe von etwa 1-2 nm auf (Jessberger et al., 2020). Neuere Studien untersuchten die Bindungsaktivität mittels CRISP-CAS9 Knockout Screening und konnten LITAF (*LPS-induced TNF- $\alpha$  factor*) als primären Hbl Rezeptor identifizieren (Liu et al., 2020). Es wurde somit erstmals bewiesen, dass für die Ausbildung der vollen Toxizität zelluläre Rezeptoren notwendig sind. Der Nachweis einer direkten Bindung von Lf an diese Rezeptoren wäre Beweis für eine unmittelbare Beeinträchtigung der Zielzellbindung durch die *B. cereus* Enterotoxine.

In diesem Zusammenhang wurden bereits *V. cholerae* und dessen Cholera-Toxin (CT), ETEC und dessen hitzelabiles Toxin (LT), sowie *Clostridium difficile* Toxin B hinsichtlich einer Interaktion mit Lf untersucht. So beeinträchtigte Lf dosisabhängig die Bindung von LT sowie auch der Untereinheit B des CT (CT-B) an Gangliosid G<sub>M1</sub>, einen wichtigen Rezeptor an der Oberfläche von Darmzellen (Kawasaki et al., 1992, 2000; Rivera et al., 2013). Diese Erkenntnisse lassen sich allerdings nicht vollständig mit *B. cereus* vergleichen, denn sowohl LT als auch CT gehören zur Gruppe der AB<sub>5</sub> Toxine (Merritt & Hol, 1995), die sich in ihrer Wirkungsweise fundamental vom porenbildenden Mechanismus der *B. cereus* Enterotoxine unterscheiden. Neben Auswirkungen auf die Bindungsfähigkeit der Toxine konnte *in vitro* beobachtet werden, wie Lf den Zellschaden sowie morphologische Veränderungen durch CT an (CHO)-K1 Zellen (*Chinese Hamster Ovary Cells*) reduziert (Kawasaki et al., 1992). Ebenso wurde eine protektive Wirkung von Lf sowie verringerte Zytotoxizität durch *C. difficile* Toxin B an Darmepithelzellen von Ratten (IEC-6 Zellen) gezeigt (Otake et al., 2018). Kawasaki und Kollegen konnten zusätzlich beweisen, dass Lf sogar selbst an CT bindet. Dabei stellten sie fest, dass eine Deglykolisierung der terminalen Sialinsäure-Reste von Lf durch Sialidase diesen inhibitorischen Effekt aufhob (Kawasaki et al., 1992). Sialidasen katalysieren die Abspaltung von terminalen Sialinsäuren aus komplexen Kohlenhydraten, Glykolipiden und Glykoproteinen (Juge et al., 2016). Sie finden sich sowohl bei prokaryotischen als auch eukaryotischen Spezies und spielen eine wichtige Rolle in der Nährstoffgewinnung und im Verdau (Kim et al., 2011). Vor allem Bakterien im Magen-Darm-Trakt, aber auch verschiedene pathogene Keime können Sialinsäure für ihren Stoffwechsel nutzen (Juge et al., 2016). Der enzymatische Abbau von Sialinsäure-Resten könnte

sich also als nützlicher Abwehrmechanismus gegen Lf erweisen. Für *B. cereus* sind Sialidasen nicht direkt beschrieben. Allerdings besitzt dieser Keim verschiedene andere Enzyme, z. B. Phospholipase-C, Lecithinase oder Sphingomyelinase (Kotiranta et al., 2000; Dietrich et al., 2021). Eventuell eignen sich derartige Enzyme daher als bakterielle Kompensatoren gegenüber Lf. Auch ist Lf nur partiell resistent gegenüber proteolytischen Enzymen (Custer & Hansen, 1983). Diese finden sich im Sekretom von *B. cereus* und könnten der Widerstandsfähigkeit verschiedener Stämme gegenüber Lf zu Gute kommen. Es konnten bereits Proteasen mit Aktivität gegenüber Hämoglobin, Kasein, Insulin und Albumin für *B. cereus* nachgewiesen werden (Fricke et al., 1995; Moriyama et al., 1998; Sierecka, 1998).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten nicht nur eine Stamm-spezifische, antimikrobielle Aktivität von Lf auf, sondern auch mögliche Reaktionen und Gegenmaßnahmen von pathogenen Keimen, vor allem Toxinbildnern. Dies sind neue, bislang wenig beachtete Aspekte in der weit verbreiteten Verwendung von Lf als beliebtes Nahrungsergänzungsmittel und in der Humanmedizin.

Wie im Literaturteil dargestellt sind die Auswirkungen von Lf auf (bakterielle) Pathogene und deren Toxine hoch komplex. Neben der durch Eisenmangel induzierten Wachstumshemmung und der bakteriziden Wirkung durch Störung der Zellmembranpermeabilität ist das Molekül auch in der Lage, die Adhäsion an Wirtszellen oder auch die Biofilmbildung zu verhindern. Seine immunmodulatorischen Eigenschaften können bakteriellen (Lebensmittel)Infektionen ebenfalls entgegenwirken. Durch die Protease-Aktivität von Lf werden zudem Toxine und Virulenzfaktoren degradiert und nicht zuletzt zeigt es auch genregulatorische Fähigkeiten. Nicht minder vielfältig sind die bakteriellen Kompensationsmechanismen nach Lf-Exposition. Diese Arbeit zeigt beispielsweise, dass Lf von *B. cereus* Stamm-spezifisch sogar als Wachstumsförderer genutzt werden kann, und dass - trotz verminderter Genexpression von verschiedenen Virulenzfaktoren und Teilen des PlcR Regulons – bei einigen Stämmen die Produktion der Enterotoxinkomponente NheB und damit auch die Zytotoxizität in Abhängigkeit von Lf gesteigert wird.

Welchen Effekt Lf allerdings auf die Lebensmittelinfektion mit enteropathogenen *B. cereus* im Ganzen hat, kann hier noch nicht abschließend beantwortet werden. Diese Toxiko-Infektion wird auch als multifaktorieller Prozess bezeichnet, da von

der Aufnahme des kontaminierten Lebensmittels bis zur tatsächlichen Ausprägung des Diarrhö-Syndroms etliche Schritte erforderlich sind (Jessberger et al., 2020). Offene Fragen sind beispielsweise, ob die Anwesenheit von Lf das Überleben von *B. cereus* Sporen in der Magenpassage sowie die anschließende Sporenauskeimung beeinflusst. Hierzu sind weitere Untersuchungen geplant bzw. teilweise bereits begonnen worden. Dass diverse Milchprodukte hier einen protektiven Effekt auf *B. cereus* Sporen ausüben, konnte bereits in einer vorherigen Arbeit gezeigt werden (Da Riolo et al., 2018). Der Einfluss von Lf auf Flagellen, Motilität sowie Adhäsion an Darmepithelzellen - essentielle Faktoren bei der Produktion von lokal hohen Mengen an Enterotoxinen - muss ebenfalls noch experimentell abgeklärt werden, genauso wie die Stabilität der Enterotoxine nach Lf-Exposition. Wenn diese Aspekte abschließend untersucht sind, können enteropathogene *B. cereus* Vorreiter für die Aufklärung des Einflusses von Lf auf den gesamten Prozess einer bakteriellen Lebensmittel(Toxiko-)Infektion sein.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

*B. cereus* hat in mehreren Bereichen große Bedeutung: Der Keim ist Lebensmittelintoxikationserreger, Lebensmittelinfektionserreger, Erreger lokaler und systemischer Infektionen bei Mensch und Tier und Verderbserreger. Laktoferrin (Lf) hat eine Vielzahl nützlicher Eigenschaften und ist besonders durch seine antimikrobielle Aktivität in das Interesse der Forschung gerückt. In der vorliegenden Arbeit wurden insbesondere die Auswirkungen von Lf auf enteropathogene *B. cereus* genauer betrachtet.

In einer ersten Publikation wurde das Wachstumsverhalten von 112 Isolaten aus 13 verschiedenen Bakterienspezies untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die antibakterielle Aktivität von Lf und Lf-basierten Nahrungsergänzungsmitteln nicht grundsätzlich für eine Bakterienspezies als Ganzes gilt, sondern dass das bakterielle Wachstum auf Dosis-, Produkt-, sowie Stamm-spezifische Weise inhibiert wird. In der zweiten Publikation zeigte sich eine Stamm-spezifische Wirkung von Lf auf drei ausgewählte *B. cereus* Referenzstämme, welche allerdings nicht auf Eisenmangel zurückzuführen war. Auffällig war, dass diese sowie weitere 20 von 28 getesteten *B. cereus* und *B. thuringiensis* Isolaten eine erhöhte Enterotoxinproduktion sowie eine erhöhte zytotoxische Aktivität aufwiesen. Die spezifische Reaktion von *B. cereus* auf Lf-Exposition wurde mittels RNA Sequenzierung im Detail untersucht. Während in einem Eisen-freien Kontrollansatz 60 Gene differentiell reguliert wurden, führte die Präsenz von Lf zu einer differentiellen Regulation von 278 Genen, welche unter anderem in Motilität und Chemotaxis, Sporulation und Auskeimung, Transport, Genregulation, Nährstoffaufnahme, Eisentransport und -verwertung sowie Resistenz involviert sind. Durch Lf wird also Stamm-spezifisch eine umfangreiche transkriptionelle Reaktion in *B. cereus* ausgelöst, die weit über die Reaktion auf Eisenmangel hinausgeht, und über einen bislang nicht vollständig geklärten Mechanismus zu verstärkter Toxinproduktion und -sekretion und damit zu erhöhter zytotoxischer Aktivität führt. Eine allgemeine antimikrobielle Wirkung von Lf gegen eine bestimmte Bakterienspezies kann also nach den Erkenntnissen dieser Arbeit nicht ohne Weiteres angenommen werden. Insbesondere die erstmals beschriebenen, unerwünschten Effekte von Lf auf die Enterotoxinproduktion und Zytotoxizität von *B. cereus* müssen in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden.

## VII. SUMMARY

*B. cereus* is of great importance in several aspects: it can cause food intoxications, food infections, local and systemic infections in humans and animals, as well as spoilage of foods. Lactoferrin (Lf) has a wide range of beneficial properties and has attracted particular interest in research due to its antimicrobial activity. In the present study, especially the effects of Lf on enteropathogenic *B. cereus* were investigated in detail.

In a first publication, the growth behavior of 112 isolates from 13 different bacterial species was examined. It was shown that the antibacterial activity of Lf and Lf-based food supplements does not generally apply to a bacterial species as a whole, but rather that bacterial growth is inhibited in a dose-, product- and strain-specific manner.

The second publication again showed a strain-specific effect of Lf on three selected *B. cereus* reference strains, which, however, was not due to iron deficiency. In addition, these and a further 20 of 28 tested *B. cereus* and *B. thuringiensis* isolates showed increased enterotoxin production and, thus, increased cytotoxic activity. The specific response of *B. cereus* to Lf exposure was investigated in detail by RNA sequencing. While 60 genes were differentially regulated in an iron-free control approach, the presence of Lf led to a differential regulation of up to 278 genes, which are involved in motility and chemotaxis, sporulation and germination, transport, gene regulation, nutrient uptake, iron transport and utilization as well as resistance. Thus, Lf triggers an extensive strain-specific transcriptional response in *B. cereus*, which goes far beyond the response to iron deficiency and leads to an increased content of secreted enterotoxins and thus to increased cytotoxic activity via a mechanism that has not yet been fully elucidated.

Based on the findings of this study, a general antimicrobial effect of Lf against a specific bacterial species cannot be assumed automatically. In particular, the undesirable effects of Lf on enterotoxin production and cytotoxicity of *B. cereus* described for the first time must be clarified in further investigations.



## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- ABERGEL, R. J., A. M. ZAWADZKA & K. N. RAYMOND (2008): Petrobactin-Mediated Iron Transport in Pathogenic Bacteria: Coordination Chemistry of an Unusual 3,4-Catecholate/Citrate Siderophore. *Journal of the American Chemical Society*. 130, 2124-2125.
- ACTOR, J. K., S.-A. HWANG & M. L. KRUZEL (2009): Lactoferrin as a Natural Immune Modulator. *Current Pharmaceutical Design*. 15, 1956-1973.
- ADLEROVA, L., A. BARTOSKOVA & M. FALDYNA (2008): Lactoferrin: a review. *Veterinární medicína*. 53, 457-468.
- AGAISSE, H., M. GOMINET, O. A. ØKSTAD, A.-B. KOLSTØ & D. LERECLUS (1999): PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology*. 32, 1043-1053.
- AGATA, N., M. OHTA, M. MORI & M. ISOBE (1995): A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*. 129, 17-19.
- AJELLO, M., R. GRECO, F. GIANSAANTI, M. T. MASSUCCI, G. ANTONINI & P. VALENTI (2002): Anti-invasive activity of bovine lactoferrin towards group A streptococci. *Biochemistry and Cell Biology*. 80, 119-124.
- ALMAAS, H., H. HOLM, T. LANGSRUD, R. FLENGSRUD & G. E. VEGARUD (2006): In vitro studies of the digestion of caprine whey proteins by human gastric and duodenal juice and the effects on selected microorganisms. *British Journal of Nutrition*. 96, 562-569.
- AMMONS, M. C. & V. COPIÉ (2013): Mini-review: Lactoferrin: a bioinspired, anti-biofilm therapeutic. *Biofouling*. 29, 443-455.
- ANDREWS, N. C. (1999): Disorders of Iron Metabolism. *New England Journal of Medicine*. 341, 1986-1995.
- ANDREWS, N. C. (2000): Iron metabolism: iron deficiency and iron overload. *Annual review of genomics and human genetics*. 1, 75-98.
- APPELMELK, B. J., Y. Q. AN, M. GEERTS, B. G. THIJS, H. A. D. BOER, D. M.

MACLAREN, J. D. GRAAFF & J. H. NUIJENS (1994): Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infection and Immunity*. 62, 2628-2632.

ARNOLD, R. R., M. BREWER & J. J. GAUTHIER (1980): Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infection and Immunity*. 28, 893-898.

ARNOLD, R. R., J. E. RUSSELL, W. J. CHAMPION, M. BREWER & J. J. GAUTHIER (1982): Bactericidal Activity of Human Lactoferrin: Differentiation from the Stasis of Iron Deprivation. *Infection and Immunity*. 35, 792-799.

ASH, C., J. A. E. FARROW, S. WALLBANKS & M. D. COLLINS (1991): Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology*. 13, 202-206.

AUGER, S., N. GALLERON, B. SÉGURENS, C. DOSSAT, A. BOLOTIN, P. WINCKER & A. SOROKIN (2012): Complete Genome Sequence of the Highly Hemolytic Strain *Bacillus cereus* F837/76. *Journal of Bacteriology*. 194, 1630-1630.

AVASHIA, S. B., W. S. RIGGINS, C. LINDLEY, A. HOFFMASTER, R. DRUMGOOLE, T. NEKOMOTO, P. J. JACKSON, K. K. HILL, K. WILLIAMS, L. LEHMAN, M. C. LIBAL, P. P. WILKINS, J. ALEXANDER, A. TVARYANAS & T. BETZ (2007): Fatal Pneumonia among Metalworkers Due to Inhalation Exposure to *Bacillus cereus* Containing *Bacillus anthracis* Toxin Genes. *Clinical Infectious Diseases*. 44, 414-416.

BAIDA, G., Z. I. BUDARINA, N. P. KUZMIN & A. S. SOLONIN (1999): Complete nucleotide sequence and molecular characterization of hemolysin II gene from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*. 180, 7-14.

BAKER, E. N. & H. M. BAKER (2009): A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. *Biochimie*. 91, 3-10.

BARRIE, D., J. A. WILSON, P. N. HOFFMAN & J. M. KRAMER (1992): *Bacillus cereus* meningitis in two neuro surgical patients: An investigation into the source of the organism. *Journal of Infection*. 25, 291-297.

BEECHER, D. J. & J. D. MACMILLAN (1991): Characterization of the

components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity*. 59, 1778-1784.

BEECHER, D. J., T. W. OLSEN, E. B. SOMERS & A. C. L. WONG (2000): Evidence for Contribution of Tripartite Hemolysin BL, Phosphatidylcholine-Preferring Phospholipase C, and Collagenase to Virulence of *Bacillus cereus* Endophthalmitis. *Infection and Immunity*. 68, 5269-5276.

BEECHER, D. J., J. S. PULIDO, N. P. BARNEY & A. C. WONG (1995b): Extracellular virulence factors in *Bacillus cereus* endophthalmitis: methods and implication of involvement of hemolysin BL. *Infection and Immunity*. 63, 632-639.

BEECHER, D. J., J. L. SCHOENI & A. C. WONG (1995a): Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity*. 63, 4423-4428.

BEECHER, D. J. & A. C. WONG (1994): Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor from *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity*. 62, 980-986.

BEECHER, D. J. & A. C. L. WONG (2000): Tripartite haemolysin BL: isolation and characterization of two distinct homologous sets of components from a single *Bacillus cereus* isolate. *Microbiology*. 146, 1371-1380.

BEECKMAN, D. S. A., C. M. A. D. V. DROOGENBROECK, B. J. A. D. COCK, P. V. OOSTVELDT & D. C. G. VANROMPAY (2007): Effect of ovotransferrin and lactoferrins on *Chlamydomytila psittaci* adhesion and invasion in HD11 chicken macrophages. *Vet. Res.* 38, 729-739.

BENNETT, R. M. & T. KOKOCINSKI (1978): Lactoferrin Content of Peripheral Blood Cells. *British Journal of Haematology*. 39, 509-521.

BENNETT, R. M. & T. KOKOCINSKI (1979): Lactoferrin turnover in man. *Clinical science (London, England : 1979)*. 57, 453-460.

BERKHOUT, B., R. FLORIS, I. RECIO & S. VISSER (2003): Antibacterial effects of the milk protein lactoferrin. *Investigative Ophthalmology & Visual Science - INVEST OPHTHALMOL VISUAL SCI*. 14, 32-33.

BERLUTTI, F., F. PANTANELLA, T. NATALIZI, A. FRIONI, R. PAESANO, A. POLIMENI & P. VALENTI (2011): Antiviral Properties of Lactoferrin—A Natural Immunity Molecule. *Molecules*. 16, 6992-7018.

BERLUTTI, F., F. SUPERTI, M. NICOLETTI, C. MOREA, A. FRIONI, M. G. AMMENDOLIA, A. BATTISTONI & P. VALENTI (2008): Bovine Lactoferrin Inhibits the Efficiency of Invasion of Respiratory A549 Cells of Different Iron-Regulated Morphological Forms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 21, 51-59.

BEUTLER, B. (2002): Review paper: LPS in microbial pathogenesis: promise and fulfilment. *Journal of Endotoxin Research*. 8, 329-335.

BEUTLER, B. & E. M. Y. MORESCO (2008): The Forward Genetic Dissection of Afferent Innate Immunity, pp. 3-26 In: BEUTLER, B. (ed.) *Immunology, Phenotype First: How Mutations Have Established New Principles and Pathways in Immunology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung) (2020): *Bacillus cereus*-Bakterien in Lebensmitteln können Magen-Darm-Erkrankungen verursachen: Stellungnahme Nr. 048/2020 des BfR vom 30. Oktober 2020.

BOTTONE, E. J. (2010): *Bacillus cereus* a Volatile Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. 23, 382-398.

BROCK, J. H. (2012): Lactoferrin – 50 years on. *Biochemistry and Cell Biology*. 90, 245-251.

BROUWER, C. P. J. M., M. RAHMAN & M. M. WELLING (2011): Discovery and development of a synthetic peptide derived from lactoferrin for clinical use. *Peptides*. 32, 1953-1963.

BROWN, J. S. & D. W. HOLDEN (2002): Iron acquisition by Gram-positive bacterial pathogens. *Microbes and Infection*. 4, 1149-1156.

BRUNI, N., M. T. CAPUCCHIO, E. BIASIBETTI, E. PESSIONE, S. CIRRINCIONE, L. GIRAUDO, A. CORONA & F. DOSIO (2016): Antimicrobial Activity of Lactoferrin-Related Peptides and Applications in Human and Veterinary Medicine. *Molecules*. 21, 752.

BVL (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit) (2017): Gemeinsamer nationaler Bericht des BVL und RKI zu lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen in Deutschland 2016.

[https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Berichte/10\\_BELA\\_lebensmittelbed\\_Krankheitsausbruechen\\_Dtl/Jahresbericht2016.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=9](https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Berichte/10_BELA_lebensmittelbed_Krankheitsausbruechen_Dtl/Jahresbericht2016.pdf?__blob=publicationFile&v=9),  
zuletzt aufgerufen am 19.03.24.

BVL (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit) (2018):  
Gemeinsamer nationaler Bericht des BVL und RKI zu lebensmittelbedingten  
Krankheitsausbrüchen in Deutschland 2017.  
[https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Berichte/10\\_BELA\\_lebensmittelbed\\_Krankheitsausbru\\_Dtl/Jahresbericht2017.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=10](https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Berichte/10_BELA_lebensmittelbed_Krankheitsausbru_Dtl/Jahresbericht2017.pdf?__blob=publicationFile&v=10),  
zuletzt aufgerufen am 11.03.24.

BVL (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit) (2019):  
Gemeinsamer nationaler Bericht des BVL und RKI zu lebensmittelbedingten  
Krankheitsausbrüchen in Deutschland 2018.  
[https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Berichte/10\\_BELA\\_lebensmittelbed\\_Krankheitsausbruechen\\_Dtl/Jahresbericht2018.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=8](https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Berichte/10_BELA_lebensmittelbed_Krankheitsausbruechen_Dtl/Jahresbericht2018.pdf?__blob=publicationFile&v=8),  
zuletzt aufgerufen am 11.03.24.

BVL (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit) (2024):  
Trendbericht Zoonosen Berichtsjahr 2022.  
[https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Berichte/11\\_TrendberichtZoonosen/TrendberichtZoonosen\\_Berichtsjahr2022.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=5](https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Berichte/11_TrendberichtZoonosen/TrendberichtZoonosen_Berichtsjahr2022.pdf?__blob=publicationFile&v=5),  
zuletzt aufgerufen am 11.03.24.

CALLEGAN, M. C., M. S. GILMORE, M. GREGORY, R. T. RAMADAN, B. J. WISKUR, A. L. MOYER, J. J. HUNT & B. D. NOVOSAD (2007): Bacterial endophthalmitis: Therapeutic challenges and host–pathogen interactions. *Progress in Retinal and Eye Research*. 26, 189-203.

CALLEGAN, M. C., S. T. KANE, D. C. COCHRAN & M. S. GILMORE (2002): Molecular Mechanisms of *Bacillus* Endophthalmitis Pathogenesis. *DNA and Cell Biology*. 21, 367-373.

CALLEGAN, M. C., S. M. PARKUNAN, C. B. RANDALL, P. S. COBURN, F. C. MILLER, A. L. LAGROW, R. A. ASTLEY, C. LAND, S.-Y. OH & O. SCHNEEWIND (2017): The role of pili in *Bacillus cereus* intraocular infection. *Experimental Eye Research*. 159, 69-76.

CAO, X., Y. REN, Q. LU, K. WANG, Y. WU, Y. WANG, Y. ZHANG, X.-S. CUI,

Z. YANG & Z. CHEN (2023): Lactoferrin: A glycoprotein that plays an active role in human health. *Frontiers in Nutrition*. 9.

CARROLL, L. M., R. A. CHENG, M. WIEDMANN & J. KOVAC (2022): Keeping up with the *Bacillus cereus* group: taxonomy through the genomics era and beyond. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 62, 7677-7702.

CARROLL, L. M., M. WIEDMANN & J. KOVAC (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, 10.1128/mbio.00034-00020.

CASTIAUX, V., X. LIU, L. DELBRASSINNE & J. MAHILLON (2015): Is Cytotoxin K from *Bacillus cereus* a bona fide enterotoxin? *International Journal of Food Microbiology*. 211, 79-85.

CHANDRANGSU, P., C. RENSING & J. D. HELMANN (2017): Metal homeostasis and resistance in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 15, 338-350.

CHEN, P.-W., T. T. JHENG, C.-L. SHYU & F. C. MAO (2013a): Synergistic antibacterial efficacies of the combination of bovine lactoferrin or its hydrolysate with probiotic secretion in curbing the growth of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*. 62, 1845-1851.

CHEN, P. W., T. T. JHENG, C. L. SHYU & F. C. MAO (2013b): Antimicrobial potential for the combination of bovine lactoferrin or its hydrolysate with lactoferrin-resistant probiotics against foodborne pathogens. *Journal of Dairy Science*. 96, 1438-1446.

CLAIR, G., S. ROUSSI, J. ARMENGAUD & C. DUPORT (2010): Expanding the Known Repertoire of Virulence Factors Produced by *Bacillus cereus* through Early Secretome Profiling in Three Redox Conditions. *Molecular & Cellular Proteomics*. 9, 1486-1498.

CLARK, S. R., A. C. MA, S. A. TAVENER, B. MCDONALD, Z. GOODARZI, M. M. KELLY, K. D. PATEL, S. CHAKRABARTI, E. MCAVOY, G. D. SINCLAIR, E. M. KEYS, E. ALLEN-VERCOE, R. DEVINNEY, C. J. DOIG, F. H. Y. GREEN & P. KUBES (2007): Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature Medicine*. 13, 463-469.

CRAIG, C. P., W.-S. LEE & M. HO (1974): *Bacillus cereus* Endocarditis in an Addict. *Annals of Internal Medicine*. 80, 418-419.

CUSTER, M. C. & J. N. HANSEN (1983): Lactoferrin and transferrin fragments react with nitrite to form an inhibitor of *Bacillus cereus* spore outgrowth. *Applied and Environmental Microbiology*. 45, 942-949.

DAOU, N., C. BUISSON, M. GOHAR, J. VIDIC, H. BIERNE, M. KALLASSY, D. LERECLUS & C. NIELSEN-LEROUX (2009): IIsA, A Unique Surface Protein of *Bacillus cereus* Required for Iron Acquisition from Heme, Hemoglobin and Ferritin. *PLOS Pathogens*. 5, e1000675.

DA RIOL, C., R. DIETRICH, E. MÄRTLBAUER & N. JESSBERGER (2018): Consumed foodstuffs have a crucial impact on the toxic activity of enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Frontiers in microbiology*. 9, 1946.

DE ARAÚJO, A. N. & L. G. GIUGLIANO (2001): Lactoferrin and free secretory component of human milk inhibit the adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *BMC Microbiology*. 1, 25.

DE OLIVEIRA, I. R., A. N. DE ARAÚJO, S. N. BAO & L. G. GIUGLIANO (2001): Binding of lactoferrin and free secretory component to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*. 203, 29-33.

DE RTZ, E. A., J. XU, A. STINTZI & K. N. RAYMOND (2006): Bacillibactin-Mediated Iron Transport in *Bacillus subtilis*. *Journal of the American Chemical Society*. 128, 22-23.

DI BIASE, A. M., A. TINARI, A. PIETRANTONI, G. ANTONINI, P. VALENTI, M. P. CONTE & F. SUPERTI (2004): Effect of bovine lactoferrin on enteropathogenic *Yersinia* adhesion and invasion in HEp-2 cells. *Journal of Medical Microbiology*. 53, 407-412.

DIAL, E. J. & L. M. LICHTENBERGER (2002): Effect of lactoferrin on *Helicobacter felis* induced gastritis. *Biochemistry and Cell Biology*. 80, 113-117.

DIDLOT, X., M. BARKER, D. FALUSH & F. G. PRIEST (2009): Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. *Systematic and Applied Microbiology*. 32, 81-90.

DIDIER, A., R. DIETRICH, S. GRUBER, S. BOCK, M. MORAVEK, T.

- NAKAMURA, T. LINDBÄCK, P. E. GRANUM & E. MÄRTLBAUER (2012): Monoclonal Antibodies Neutralize *Bacillus cereus* Nhe Enterotoxin by Inhibiting Ordered Binding of Its Three Exoprotein Components. *Infection and Immunity*. 80, 832-838.
- DIDIER, A., R. DIETRICH & E. MÄRTLBAUER (2016): Antibody Binding Studies Reveal Conformational Flexibility of the *Bacillus cereus* Non-Hemolytic Enterotoxin (Nhe) A-Component. *PLOS ONE*. 11, e0165135.
- DIERICK, K., E. V. COILLIE, I. SWIECICKA, G. MEYFROIDT, H. DEVLIEGER, A. MEULEMANS, G. HOEDEMAEKERS, L. FOURIE, M. HEYNDRIKX & J. MAHILLON (2005): Fatal Family Outbreak of *Bacillus cereus*-Associated Food Poisoning. *Journal of Clinical Microbiology*. 43, 4277-4279.
- DIERICK, M., H. V. D. WEKEN, J. RYBARCZYK, D. VANROMPAY, B. DEVRIENDT & E. COX (2020): Porcine and Bovine Forms of Lactoferrin Inhibit Growth of Porcine Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Degrade Its Virulence Factors. *Applied and Environmental Microbiology*. 86, e00524-00520.
- DIETRICH, R., N. JESSBERGER, M. EHLING-SCHULZ, E. MÄRTLBAUER & P. E. GRANUM (2021): The Food Poisoning Toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins*. 13, 98.
- DOMINGOS, J. M. B., S. PUCCIO, G. A. MARTINEZ, N. AMARAL, M. A. M. REIS, S. BANDINI, F. FAVA & L. BERTIN (2018): Cheese whey integrated valorisation: Production, concentration and exploitation of carboxylic acids for the production of polyhydroxyalkanoates by a fed-batch culture. *Chemical Engineering Journal*. 336, 47-53.
- DRAGO-SERRANO, M. E., R. CAMPOS-RODRÍGUEZ, J. C. CARRERO & M. DE LA GARZA (2017): Lactoferrin: Balancing Ups and Downs of Inflammation Due to Microbial Infections. *International Journal of Molecular Sciences*. 18, 501.
- DUPORT, C., M. JOBIN & P. SCHMITT (2016): Adaptation in *Bacillus cereus*: From Stress to Disease. *Frontiers in Microbiology*. 7.
- EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) & ECDC (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL) (2019): The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal*. 17, e05926.



EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) & ECDC (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL) (2021a): The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. EFSA Journal. 19, e06406.

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) & ECDC (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL) (2021b): The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. EFSA Journal. 19, e06971.

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) & ECDC (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL) (2022): The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. EFSA Journal. 20, e07666.

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) & ECDC (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL) (2023): The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. EFSA Journal. 21, e8442.

EFSA PANEL ON DIETETIC PRODUCTS, N. & ALLERGIES (2012): Scientific Opinion on bovine lactoferrin. EFSA Journal. 10, 2811.

EHLING-SCHULZ, M., M. FRICKER & S. SCHERER (2004): Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. FEMS Microbiology Letters. 232, 189-195.

EHLING-SCHULZ, M., N. VUKOV, A. SCHULZ, R. SHAHEEN, M. ANDERSSON, E. MÄRTLBAUER & S. SCHERER (2005): Identification and Partial Characterization of the Nonribosomal Peptide Synthetase Gene Responsible for Cereulide Production in Emetic *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology. 71, 105-113.

ELASS-ROCHARD, E., D. LEGRAND, V. SALMON, A. ROSEANU, M. TRIF, P. S. TOBIAS, J. MAZURIER & G. SPIK (1998): Lactoferrin Inhibits the Endotoxin Interaction with CD14 by Competition with the Lipopolysaccharide-Binding Protein. Infection and Immunity. 66, 486-491.

ELASS-ROCHARD, E., A. ROSEANU, D. LEGRAND, M. TRIF, V. SALMON, C. MOTAS, J. MONTREUIL & G. SPIK (1995): Lactoferrin-lipopolysaccharide interaction: involvement of the 28-34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to *Escherichia coli* 055B5 lipopolysaccharide. Biochemical Journal. 312, 839-845.

EMBLETON, N. D., J. E. BERRINGTON, W. MCGUIRE, C. J. STEWART & S. P. CUMMINGS (2013): Lactoferrin: Antimicrobial activity and therapeutic potential. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 18, 143-149.

ESBELIN, J., J. ARMENGAUD, A. ZIGHA & C. DUPORT (2009): ResDE-Dependent Regulation of Enterotoxin Gene Expression in *Bacillus cereus*: Evidence for Multiple Modes of Binding for ResD and Interaction with Fnr. *Journal of Bacteriology*. 191, 4419-4426.

ESBELIN, J., Y. JOUANNEAU, J. ARMENGAUD & C. DUPORT (2008): ApoFnr Binds as a Monomer to Promoters Regulating the Expression of Enterotoxin Genes of *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*. 190, 4242-4251.

ESBELIN, J., Y. JOUANNEAU & C. DUPORT (2012): *Bacillus cereus* Fnr binds a [4Fe-4S] cluster and forms a ternary complex with ResD and PlcR. *BMC Microbiology*. 12, 125.

FAGERLUND, A., J. BRILLARD, R. FÜRST, M.-H. GUINEBRETIERE & P. E. GRANUM (2007): Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus* group. *BMC Microbiology*. 7, 43.

FAGERLUND, A., T. LINDBÄCK & P. E. GRANUM (2010): *Bacillus cereus* cytotoxins Hbl, Nhe and CytK are secreted via the Sec translocation pathway. *BMC Microbiology*. 10, 304.

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

FDA (U.S. Food and Drug Administration) (2001): GRAS Notice No. 77. Milk-derived lactoferrin. [https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=77&sort=GRN\\_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=Milk%2Dderived%20lactoferrin](https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=77&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=Milk%2Dderived%20lactoferrin). Zuletzt aufgerufen am 11.03.2024.

FDA (U.S. Food and Drug Administration) (2013a): GRAS Notice No. 464.

Generally recognized as safe determination for cow's milk derived lactoferrin as a component of cow's milk products and chewing gum.: [https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=464&sort=GRN\\_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=464](https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=464&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=464). Zuletzt aufgerufen am 11.03.2024.

FDA (U.S. Food and Drug Administration) (2013b): GRAS Notice No. 465. Generally recognized as safe determination for cow's milk derived lactoferrin as a component of term cow's milk based infant formulas. [https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=465&sort=GRN\\_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=465](https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=465&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=465). Zuletzt aufgerufen am 11.03.2024.

FDA (U.S. Food and Drug Administration) (2016): GRAS Notice No. 669. The use of bovine milk-derived lactoferrin in term milk-based infant formulas and toddler formulas. <https://www.fda.gov/media/124472/download>, [https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=669&sort=GRN\\_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=669](https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=669&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=669), Zuletzt aufgerufen am 26.02.2024.

FRANKLAND, G. C., P. F. FRANKLAND & E. R. LANKESTER (1887): XI. Studies on some new micro-organisms obtained from air. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. (B.). 178, 257-287.

FRANKLAND, P. F. & E. FRANKLAND (1887): V. A new method for the quantitative estimation of micro-organisms present the atmosphere. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. (B.). 178, 113-152.

FRICKE, B., T. BUCHMANN & S. FRIEBE (1995): Unusual chromatographic behaviour and one-step purification of a novel membrane proteinase from *Bacillus cereus*. Journal of Chromatography A. 715, 247-258.

FUKUSHIMA, T., A. K. SIA, B. E. ALLRED, R. NICHIPORUK, Z. ZHOU, U. N. ANDERSEN & K. N. RAYMOND (2012): *Bacillus cereus* iron uptake protein fishes out an unstable ferric citrate trimer. Proceedings of the National Academy of Sciences. 109, 16829-16834.

FULLER, R. (1989): Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology. 66, 365-378.

GARCÍA-MONTOYA, I. A., T. S. CENDÓN, S. ARÉVALO-GALLEGOS & Q. RASCÓN-CRUZ (2012): Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1820, 226-236.

GHELARDI, E., F. CELANDRONI, S. SALVETTI, M. CERAGIOLI, D. J. BEECHER, S. SENESI & A. C. L. WONG (2007): Swarming Behavior of and Hemolysin BL Secretion by *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 73, 4089-4093.

GIANSANTI, F., G. PANELLA, L. LEBOFFE & G. ANTONINI (2016): Lactoferrin from Milk: Nutraceutical and Pharmacological Properties. *Pharmaceuticals*. 9, 61.

GIBSON, G. R. (1999): Dietary Modulation of the Human Gut Microflora Using the Prebiotics Oligofructose and Inulin1. *The Journal of Nutrition*. 129, 1438S-1441S.

GIRISCH, M., M. RIES, M. ZENKER, R. CARBON, R. RAUCH & M. HOFBECK (2003): Intestinal Perforations in a Premature Infant Caused by *Bacillus cereus*. *Infection*. 31, 192-193.

GLATZ, B. A. & J. M. GOEPFERT (1977): Production of *Bacillus cereus* Enterotoxin in Defined Media in Fermenter-Grown Cultures. *Journal of Food Protection*. 40, 472-474.

GOETZ, D. H., M. A. HOLMES, N. BORREGAARD, M. E. BLUHM, K. N. RAYMOND & R. K. STRONG (2002): The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Molecular cell*. 10, 1033-1043.

GOHAR, M., K. FAEGRI, S. PERCHAT, S. RAVNUM, O. A. ØKSTAD, M. GOMINET, A.-B. KOLSTØ & D. LERECLUS (2008): The PlcR Virulence Regulon of *Bacillus cereus*. *PLOS ONE*. 3, e2793.

GOMINET, M., L. SLAMTI, N. GILOIS, M. ROSE & D. LERECLUS (2001): Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis* plcR regulon and for virulence. *Molecular Microbiology*. 40, 963-975.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, S. A., S. ARÉVALO-GALLEGOS & Q. RASCÓN-CRUZ (2009): Lactoferrin: structure, function and applications. *International*

Journal of Antimicrobial Agents. 33, 301.e301-301.e308.

GRANUM, P. E., K. O'SULLIVAN & T. LUND (1999): The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. FEMS Microbiology Letters. 177, 225-229.

GRENHA, R., L. SLAMTI, M. NICAISE, Y. REFES, D. LERECLUS & S. NESSLER (2013): Structural basis for the activation mechanism of the PlcR virulence regulator by the quorum-sensing signal peptide PapR. Proceedings of the National Academy of Sciences. 110, 1047-1052.

GRIFFITH, O. H. & M. RYAN (1999): Bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase C: structure, function, and interaction with lipids. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids. 1441, 237-254.

GRUTSCH, A. A., P. S. NIMMER, R. H. PITTSLEY, K. G. KORNILOW & J. L. MCKILLIP (2018): Molecular Pathogenesis of *Bacillus* spp., with Emphasis on the Dairy Industry. Fine Focus. 4, 203-222.

GUINEBRETIERE, M.-H., S. AUGER, N. GALLERON, M. CONTZEN, B. DE SARRAU, M.-L. DE BUYSER, G. LAMBERET, A. FAGERLUND, P. E. GRANUM, D. LERECLUS, P. DE VOS, C. NGUYEN-THE & A. SOROKIN (2013): *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 63, 31-40.

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

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

GUINEBRETIERE, M.-H., P. VELGE, O. COUVERT, F. CARLIN, M.-L. DEBUYSER & C. NGUYEN-THE (2010): The food poisoning power of *Bacillus cereus* Group strains varies according to phylogenetic affiliation (groups I-VII), not to species affiliation. Journal of Clinical Microbiology. 48, 3388-3391.

- HANCOCKS, N. (2021): Lactoferrin market set to surpass €265 million by 2027. [https://www.dairyreporter.com/Article/2021/04/09/Lactoferrin-market-set-to-surpass-265-million-by-2027?utm\\_source=copyright&utm\\_medium=OnSite&utm\\_campaign=copyright](https://www.dairyreporter.com/Article/2021/04/09/Lactoferrin-market-set-to-surpass-265-million-by-2027?utm_source=copyright&utm_medium=OnSite&utm_campaign=copyright), zuletzt aufgerufen am 26.02.2024.
- HANSEN, B. M. & N. B. HENDRIKSEN (2001): Detection of Enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains by PCR Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 185-189.
- HAO, L., Q. SHAN, J. WEI, F. MA & P. SUN (2019): Lactoferrin: Major Physiological Functions and Applications. *Current Protein and Peptide Science*. 20, 139-144.
- HARDY, S. P., T. LUND & P. E. GRANUM (2001): CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. *FEMS Microbiology Letters*. 197, 47-51.
- HARVIE, D. R. & D. J. ELLAR (2005): A Ferric Dicitrate Uptake System Is Required for the Full Virulence of *Bacillus cereus*. *Current Microbiology*. 50, 246-250.
- HARVIE, D. R., S. VÍLCHEZ, J. R. STEGGLES & D. J. ELLAR (2005): *Bacillus cereus* Fur regulates iron metabolism and is required for full virulence. *Microbiology*. 151, 569-577.
- HAUG, T. M., S. L. SAND, O. SAND, D. PHUNG, P. E. GRANUM & S. P. HARDY (2010): Formation of Very Large Conductance Channels by *Bacillus cereus* Nhe in Vero and GH4 Cells Identifies NheA + B as the Inherent Pore-Forming Structure. *The Journal of Membrane Biology*. 237, 1-11.
- HAUGE, S. (1950). Food Poisoning caused by *Bacillus cereus*. A Preliminary Report. *Nordisk Hygienisk Tidskrift*. 189–206.
- HAUGE, S. (1955): Food Poisoning Caused By Aerobic Spore-forming Bacilli. *Journal of Applied Bacteriology*. 18, 591-595.
- HAYRAPETYAN, H., R. SIEZEN, T. ABEE & M. NIEROP GROOT (2016): Comparative Genomics of Iron-Transporting Systems in *Bacillus cereus* Strains and Impact of Iron Sources on Growth and Biofilm Formation. *Frontiers in Microbiology*. 7.

HEILKENBRINKER, U., R. DIETRICH, A. DIDIER, K. ZHU, T. LINDBÄCK, P. E. GRANUM & E. MÄRTLBAUER (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.

HEINRICHS, J. H., D. J. BEECHER, J. D. MACMILLAN & B. A. ZILINSKAS (1993): Molecular cloning and characterization of the hblA gene encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Journal of Bacteriology. 175, 6760-6766.

HELGASON, E., D. A. CAUGANT, I. OLSEN & A.-B. KOLSTØ (2000a): Genetic Structure of Population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* Isolates Associated with Periodontitis and Other Human Infections. Journal of Clinical Microbiology. 38, 1615-1622.

HELGASON, E., O. A. ØKSTAD, D. A. CAUGANT, H. A. JOHANSEN, A. FOUET, M. MOCK, I. HEGNA & A.-B. KOLSTØ (2000b): *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* 2014; One Species on the Basis of Genetic Evidence. Applied and Environmental Microbiology. 66, 2627-2630.

HENDRIXSON, D. R., J. QIU, S. C. SHEWRY, D. L. FINK, S. PETTY, E. N. BAKER, A. G. PLAUT & J. W. ST. GEME III (2003): Human milk lactoferrin is a serine protease that cleaves *Haemophilus* surface proteins at arginine-rich sites. Molecular Microbiology. 47, 607-617.

HILLIARD, N. J., R. L. SCHELONKA & K. B. WAITES (2003): *Bacillus cereus* Bacteremia in a Preterm Neonate. Journal of Clinical Microbiology. 41, 3441-3444.

IfSG (2023). Infektionsschutzgesetz vom 20. Juli 2000 (BGBl. I S. 1045), das zuletzt durch Artikel 8v des Gesetzes vom 12. Dezember 2023 (BGBl. 2023 I Nr. 359) geändert worden ist, Bundesrepublik Deutschland, vertreten durch den Bundesminister der Justiz, Mohrenstraße 37 10117 Berlin.

JAHANI, S., A. SHAKIBA & L. JAHANI (2015): The Antimicrobial Effect of Lactoferrin on Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. 2, e27954.

JENSSEN, H., P. HAMILL & R. E. W. HANCOCK (2006): Peptide Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews. 19, 491-511.

JESSBERGER, N., R. DIETRICH, A.-K. MOHR, C. DA RIOL & E.

- MÄRTLBAUER (2019a): Porcine Gastric Mucin Triggers Toxin Production of Enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity*. 87, e00765-00718.
- JESSBERGER, N., R. DIETRICH, K. SCHAUER, S. SCHWEMMER, E. MÄRTLBAUER & R. BENZ (2020): Characteristics of the Protein Complexes and Pores Formed by *Bacillus cereus* Hemolysin BL. *Toxins*. 12, 672.
- JESSBERGER, N., R. DIETRICH, S. SCHWEMMER, F. TAUSCH, V. SCHWENK, A. DIDIER & E. MÄRTLBAUER (2019b): Binding to The Target Cell Surface Is The Crucial Step in Pore Formation of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Toxins*. 11, 281.
- JESSBERGER, N., V. M. KREY, C. RADEMACHER, M.-E. BÖHM, A.-K. MOHR, M. EHLING-SCHULZ, S. SCHERER & E. MÄRTLBAUER (2015): From genome to toxicity: a combinatory approach highlights the complexity of enterotoxin production in *Bacillus cereus*. *Frontiers in Microbiology*. 6.
- JESSBERGER, N., C. RADEMACHER, V. M. KREY, R. DIETRICH, A.-K. MOHR, M.-E. BÖHM, S. SCHERER, M. EHLING-SCHULZ & E. MÄRTLBAUER (2017): Simulating intestinal growth conditions enhances toxin production of enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Frontiers in Microbiology*. 8, 627.
- JUGE, N., L. TAILFORD & C D. OWEN (2016): Sialidases from gut bacteria: a mini-review. *Biochemical Society Transactions*. 44, 166-175.
- JUGERT, C.-S., A. DIDIER & N. JESSBERGER (2023a): Lactoferrin-based food supplements trigger toxin production of enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Frontiers in Microbiology*. 14.
- JUGERT, C.-S., A. DIDIER, M. PLÖTZ & N. JESSBERGER (2023b): Strain-specific antimicrobial activity of lactoferrin-based food supplements. *Journal of Food Protection*. 100153.
- KANWAR, J. R., K. ROY, Y. PATEL, S.-F. ZHOU, M. R. SINGH, D. SINGH, M. NASIR, R. SEHGAL, A. SEHGAL, R. S. SINGH, S. GARG & R. K. KANWAR (2015): Multifunctional Iron Bound Lactoferrin and Nanomedicinal Approaches to Enhance Its Bioactive Functions. *Molecules*. 20, 9703-9731.
- KAWAKAMI, H., M. HIRATSUKA & S. I. DOSAKO (1988): Effects of Iron-saturated Lactoferrin on Iron Absorption. *Agricultural and Biological Chemistry*.



52, 903-908.

KAWASAKI, Y., H. ISODA, M. TANIMOTO, S. I. DOSAKO, T. IDOTA & K. AHIKO (1992): Inhibition by Lactoferrin and  $\kappa$ -Casein Glycomacropeptide of Binding of Cholera Toxin to its Receptor. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 56, 195-198.

KAWASAKI, Y., S. TAZUME, K. SHIMIZU, H. MATSUZAWA, S. I. DOSAKO, H. ISODA, M. TSUKIJI, R. FUJIMURA, Y. MURANAKA & H. ISIHIDA (2000): Inhibitory Effects of Bovine Lactoferrin on the Adherence of Enterotoxigenic *Escherichia coli* to Host Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 64, 348-354.

KELL, D. B., E. L. HEYDEN & E. PRETORIUS (2020): The Biology of Lactoferrin, an Iron-Binding Protein That Can Help Defend Against Viruses and Bacteria. *Frontiers in Immunology*. 11.

KELL, D. B. & E. PRETORIUS (2018): To What Extent Are the Terminal Stages of Sepsis, Septic Shock, Systemic Inflammatory Response Syndrome, and Multiple Organ Dysfunction Syndrome Actually Driven by a Prion/Amyloid Form of Fibrin? *Semin Thromb Hemost*. 44, 224-238.

KIECKENS, E., J. RYBARCZYK, S. A. BARTH, C. MENGE, E. COX & D. VANROMPAY (2017): Effect of lactoferrin on release and bioactivity of Shiga toxins from different *Escherichia coli* O157:H7 strains. *Veterinary Microbiology*. 202, 29-37.

KIM, S., D.-B. OH, H. A. KANG & O. KWON (2011): Features and applications of bacterial sialidases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 91, 1-15.

KIM, W.-S., M. OHASHI, T. TANAKA, H. KUMURA, G.-Y. KIM, I.-K. KWON, J.-S. GOH & K.-I. SHIMAZAKI (2004): Growth-promoting effects of lactoferrin on *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Biometals*. 17, 279-283.

KIM, W.-S., T. TANAKA, H. KUMURA & K.-I. SHIMAZAKI (2002): Lactoferrin-binding proteins in *Bifidobacterium bifidum*. *Biochemistry and Cell Biology*. 80, 91-94.

KOPPISCH, A. T., C. C. BROWDER, A. L. MOE, J. T. SHELLEY, B. A. KINKEL, L. E. HERSMAN, S. IYER & C. E. RUGGIERO (2005): Petrobactin is

the Primary Siderophore Synthesized by *Bacillus anthracis* Str. Sterne under Conditions of Iron Starvation. *Biometals*. 18, 577-585.

KÖSTER, W. (2001): ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Research in Microbiology*. 152, 291-301.

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

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

KRÄMER, J. & A. PRANGE (2022). Mikroorganismen in Lebensmitteln; Lebensmittelvergiftungen in: *Lebensmittelmikrobiologie*, 8. Auflage. UTB. 28-35; 77-80

KROLITZKI, E., S. P. SCHWAMINGER, M. PAGEL, F. OSTERTAG, J. HINRICHS & S. BERENSMEIER (2022): Current practices with commercial scale bovine lactoferrin production and alternative approaches. *International Dairy Journal*. 126, 105263.

KUPPE, A., L. M. EVANS, D. A. MCMILLEN & O. H. GRIFFITH (1989): Phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus cereus*: cloning, sequencing, and relationship to other phospholipases. *Journal of Bacteriology*. 171, 6077-6083.

LAMBERT, L. A. (2012): Molecular evolution of the transferrin family and associated receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1820, 244-255.

LAPIDUS, A., E. GOLTSMAN, S. AUGER, N. GALLERON, B. SÉGURENS, C. DOSSAT, M. L. LAND, V. BROUSSOLLE, J. BRILLARD, M.-H. GUINEBRETIERE, V. SANCHIS, C. NGUEN-THE, D. LERECLUS, P. RICHARDSON, P. WINCKER, J. WEISSENBACH, S. D. EHRlich & A. SOROKIN (2008): Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. *Chemico-Biological Interactions*. 171, 236-249.

LATIF, A., A. SHEHZAD, S. NIAZI, A. ZAHID, W. ASHRAF, M. W. IQBAL, A. REHMAN, T. RIAZ, R. M. AADIL, I. M. KHAN, F. ÖZOGUL, J. M. ROCHA, T. ESATBEYOGLU & S. A. KORMA (2023): Probiotics: mechanism of action, health benefits and their application in food industries. *Frontiers in Microbiology*. 14.

LATORRE, D., P. PUDDU, P. VALENTI & S. GESSANI (2010): Reciprocal interactions between lactoferrin and bacterial endotoxins and their role in the regulation of the immune response. *Toxins*. 2, 54-68.

LEBESSI, E., H. D. DELLAGRAMMICAS, G. ANTONAKI, M. FOUSTOUKOU & N. IACOVIDOU (2009): *Bacillus cereus* meningitis in a term neonate. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 22, 458-461.

LEBOFFE, L., F. GIANSAANTI & G. ANTONINI (2009): Antifungal and Antiparasitic Activities of Lactoferrin. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*. 8, 114-127.

LEE, J. Y., B. K. JANES, K. D. PASSALACQUA, B. F. PFLEGER, N. H. BERGMAN, H. LIU, K. HÅKANSSON, R. V. SOMU, C. C. ALDRICH, S. CENDROWSKI, P. C. HANNA & D. H. SHERMAN (2007): Biosynthetic Analysis of the Petrobactin Siderophore Pathway from *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*. 189, 1698-1710.

LEGRAND, D. (2012): Lactoferrin, a key molecule in immune and inflammatory processes; This article is part of Special Issue entitled Lactoferrin and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochemistry and Cell Biology*. 90, 252-268.

LEGRAND, D. (2016): Overview of Lactoferrin as a Natural Immune Modulator. *The Journal of Pediatrics*. 173, S10-S15.

LEGRAND, D., E. ELASS, A. PIERCE & J. MAZURIER (2004): Lactoferrin and host defence: an overview of its immuno-modulating and anti-inflammatory properties. *Biometals*. 17, 225-229.

LEITCH, E. C. & M. D. P. WILLCOX (1999): Elucidation of the antistaphylococcal action of lactoferrin and lysozyme. *Journal of Medical Microbiology*. 48, 867-871.

LERECLUS, D., H. AGAISSE, C. GRANDVALET, S. SALAMITOU & M. GOMINET (2000): Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *International Journal of Medical Microbiology*. 290, 295-299.

LESMAN-MOVSHOVICH, E., B. LERRER & N. GILBOA-GARBER (2003): Blocking of *Pseudomonas aeruginosa* lectins by human milk glycans. *Canadian Journal of Microbiology*. 49, 230-235.

LEVAY, P. F. & M. VILJOEN (1995): Lactoferrin: a general review. *Haematologica*. 80, 252-267.

LINDBÄCK, T., S. P. HARDY, R. DIETRICH, M. SØDRING, A. DIDIER, M. MORAVEK, A. FAGERLUND, S. BOCK, C. NIELSEN, M. CASTEEL, P. E. GRANUM & E. MÄRTLBAUER (2010): Cytotoxicity of the *Bacillus cereus* Nhe Enterotoxin Requires Specific Binding Order of Its Three Exoprotein Components. *Infection and Immunity*. 78, 3813-3821.

LINDBÄCK, T., O. A. ØKSTAD, A.-L. RISHOVD & A.-B. KOLSTØ (1999): Insertional inactivation of hblC encoding the L2 component of *Bacillus cereus* ATCC 14579 haemolysin BL strongly reduces enterotoxigenic activity, but not the haemolytic activity against human erythrocytes. *Microbiology*. 145, 3139-3146.

LING, J. M. & A. B. SCHRYVERS (2006): Perspectives on interactions between lactoferrin and bacteria. *Biochemistry and cell biology*. 84, 275-281.

LIU, J., Z. ZUO, I. SASTALLA, C. LIU, J. Y. JANG, Y. SEKINE, Y. LI, M. PIROOZNA, S. H. LEPPLA & T. FINKEL (2020): Sequential CRISPR-based screens identify LITAF and CDIP1 as the *Bacillus cereus* hemolysin BL toxin host receptors. *Cell host & microbe*. 28, 402-410. e405.

LIU, Y., J. DU, Q. LAI, R. ZENG, D. YE, J. XU & Z. SHAO (2017): Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 67, 2499-2508.

LIU, Y., F. HAN, Y. XIE & Y. WANG (2011): Comparative antimicrobial activity and mechanism of action of bovine lactoferricin-derived synthetic peptides. *BioMetals*. 24, 1069-1078.

LOGAN, N. A. (2012): *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *Journal of Applied Microbiology*. 112, 417-429.

- LUBENAU, C. (1906): *Bacillus peptonificans* als Erreger einer Gastroenteritis-Epidemie. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 40, 433-433.
- LUND, T., M.-L. DE BUYSER & P. E. GRANUM (2000): A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. Molecular Microbiology. 38, 254-261.
- LUND, T. & P. E. GRANUM (1996): Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. FEMS Microbiology Letters. 141, 151-156.
- MA, Z., M. J. FAULKNER & J. D. HELMANN (2012): Origins of specificity and cross-talk in metal ion sensing by *Bacillus subtilis* Fur. Molecular Microbiology. 86, 1144-1155.
- MAHLER, H., A. PASI, J. M. KRAMER, P. SCHULTE, A. C. SCOGING, W. BÄR & S. KRÄHENBÜHL (1997): Fulminant Liver Failure in Association with the Emetic Toxin of *Bacillus cereus*. New England Journal of Medicine. 336, 1142-1148.
- MAKUWA, S. C., L. R. MOTADI, M. CHOENE, Y. LIU & M. H. SEREPADLAMINI (2023): *Bacillus dicomae* sp. nov., a new member of the *Bacillus cereus* group isolated from medicinal plant *Dicoma anomala*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 73.
- MÄRTLBAUER, E. & BECKER, H. (2016). Pathogene Mikroorganismen und Toxine in: *Milchkunde und Milchhygiene*, Stuttgart, utb. Eugen Ulmer KG. 219-228
- MASSON, P. & J. HEREMANS (1971): Lactoferrin in milk from different species. Comparative Biochemistry and Physiology. 119-129.
- MASSON, P. L. & J. F. HEREMANS (1968): Metal-Combining Properties of Human Lactoferrin (Red Milk Protein). European Journal of Biochemistry. 6, 579-584.
- MASSON, P. L., J. F. HEREMANS & C. H. DIVE (1966): An iron-binding protein common to many external secretions. Clinica Chimica Acta. 14, 735-739.
- MAWSON, A. J. (1994): Bioconversions for whey utilization and waste abatement. Bioresource Technology. 47, 195-203.

MEHTA, P., D. F. MCAULEY, M. BROWN, E. SANCHEZ, R. S. TATTERSALL & J. J. MANSON (2020): COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *The Lancet*. 395, 1033-1034.

MELLING, J., B. J. CAPEL, P. C. TURNBULL & R. J. GILBERT (1976): Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with *Bacillus cereus*. *J Clin Pathol*. 29, 938-940.

MENESTRINA, G., M. DALLA SERRA & G. PRÉVOST (2001): Mode of action of  $\beta$ -barrel pore-forming toxins of the staphylococcal  $\alpha$ -hemolysin family. *Toxicon*. 39, 1661-1672.

MERRITT, E. A. & W. G. J. HOL (1995): AB5 toxins. *Current Opinion in Structural Biology*. 5, 165-171.

MESSELHÄÜBER, U. & M. EHLING-SCHULZ (2018): *Bacillus cereus* - a Multifaceted Opportunistic Pathogen. *Current Clinical Microbiology Reports*. 5, 120-125.

MILCHERZV (2023). Milcherzeugnisverordnung vom 15. Juli 1970 (BGBl. I S. 1150), die zuletzt durch Artikel 4 der Verordnung vom 26. April 2023 (BGBl. 2023 I Nr. 115) geändert worden ist, Bundesrepublik Deutschland, vertreten durch den Bundesminister der Justiz, Mohrenstraße 37, 10117 Berlin.

MOGUILEVSKY, N., L. A. RETEGUI & P. L. MASSON (1985): Comparison of human lactoferrins from milk and neutrophilic leucocytes. Relative molecular mass, isoelectric point, iron-binding properties and uptake by the liver. *Biochemical Journal*. 229, 353-359.

MOORE, S. A., B. F. ANDERSON, C. R. GROOM, M. HARIDAS & E. N. BAKER (1997): Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution. Edited by D. Rees. *Journal of Molecular Biology*. 274, 222-236.

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

MORIYAMA, R., K. SUGIMOTO, H. ZHANG, T. INOUE & S. MAKINO (1998): A Cysteine-Dependent Serine Protease Associated with the Dormant Spores of

*Bacillus cereus*: Purification of the Protein and Cloning of the Corresponding Gene. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 62, 268-274.

OCHOA, T. J., M. NOGUERA-OBENZA, F. EBEL, C. A. GUZMAN, H. F. GOMEZ & T. G. CLEARY (2003): Lactoferrin Impairs Type III Secretory System Function in Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 71, 5149-5155.

OCHOA, T. J. & S. V. SIZONENKO (2017): Lactoferrin and prematurity: a promising milk protein? *Biochemistry and Cell Biology*. 95, 22-30.

OKINAKA, R. T. & P. KEIM (2016): The Phylogeny of *Bacillus cereus sensu lato*, pp. 237-251 *The Bacterial Spore*.

ORSI, N. (2004): The antimicrobial activity of lactoferrin: Current status and perspectives. *Biometals*. 17, 189-196.

OTAKE, K., N. SATO, A. KITAGUCHI, T. IRAHARA, S. MURATA, K. SHIRAGA, Y. OGAWA, T. K. FUJIWARA, K. KOIKE & H. YOKOTA (2018): The Effect of Lactoferrin and Pepsin-Treated Lactoferrin on IEC-6 Cell Damage Induced by Clostridium Difficile Toxin B. *Shock*. 50, 119-125.

PARK, R.-Y., M.-H. CHOI, H.-Y. SUN & S.-H. SHIN (2005): Production of Catechol-Siderophore and Utilization of Transferrin-Bound Iron in *Bacillus cereus*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 28, 1132-1135.

PARTE, A. C., J. SARDÀ CARBASSE, J. P. MEIER-KOLTHOFF, L. C. REIMER & M. GÖKER (2020): List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 70, 5607-5612.

PETSCHOW, B. W., R. D. TALBOTT & R. P. BATEMA (1999): Ability of lactoferrin to promote the growth of *Bifidobacterium* spp. in vitro is independent of receptor binding capacity and iron saturation level. *Journal of Medical Microbiology*. 48, 541-549.

POPOFF, M. R. (2014): Clostridial pore-forming toxins: Powerful virulence factors. *Anaerobe*. 30, 220-238.

PRINCE, C. & J. KOVAC (2022): Regulation of Enterotoxins Associated with *Bacillus cereus Sensu Lato* Toxicoinfection. *Applied and Environmental*

Microbiology. 88, e00405-00422.

PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE (1972): Food poisoning associated with *Bacillus cereus*. Br. Med. J. 1.

PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE (1973): *Bacillus cereus* food poisoning. Br. Med. J. 3.

QIU, J., D. R. HENDRIXSON, E. N. BAKER, T. F. MURPHY, J. W. S. GEME & A. G. PLAUT (1998): Human milk lactoferrin inactivates two putative colonization factors expressed by *Haemophilus influenzae*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 95, 12641-12646.

RAHMAN, M. M., W.-S. KIM, T. ITO, H. KUMURA & K.-I. SHIMAZAKI (2009): Growth promotion and cell binding ability of bovine lactoferrin to *Bifidobacterium longum*. Anaerobe. 15, 133-137.

RAJKOVIC, A., M. UYTENDAELE, A. VERMEULEN, M. ANDJELKOVIC, I. FITZ-JAMES, P. IN'T VELD, Q. DENON, R. VÉRHE & J. DEBEVERE (2008): Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. Letters in Applied Microbiology. 46, 536-541.

RAMARAO, N. & V. SANCHIS (2013): The Pore-Forming Haemolysins of *Bacillus Cereus*: A Review. Toxins. 5, 1119-1139.

REDWAN, E. M., V. N. UVERSKY, E. M. EL-FAKHARANY & H. AL-MEHDAR (2014): Potential lactoferrin activity against pathogenic viruses. Comptes Rendus Biologies. 337, 581-595.

RIVERA, F. P., A. M. MEDINA, S. BEZADA, R. VALENCIA, M. BERNAL, R. MEZA, R. C. MAVES & T. J. OCHOA (2013): Bovine Lactoferrin Decreases Cholera-Toxin-Induced Intestinal Fluid Accumulation in Mice by Ganglioside Interaction. PLOS ONE. 8, e59253.

ROBERTS, M. F., H. M. KHAN, R. GOLDSTEIN, N. REUTER & A. GERSHENSON (2018): Search and Subvert: Minimalist Bacterial Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C Enzymes. Chemical Reviews. 118, 8435-8473.

ROSA, L., A. CUTONE, M. S. LEPANTO, R. PAESANO & P. VALENTI (2017): Lactoferrin: A Natural Glycoprotein Involved in Iron and Inflammatory



Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 18, 1985.

ROSEANU, A., P. FLORIAN, M. CONDEI, D. CRISTEA & M. DAMIAN (2010): Antibacterial activity of lactoferrin and lactoferricin against oral streptococci. *Romanian Biotechnological Letters*. 15, 5788-5792.

ROSNER, B. & T. SCHEWE (2017): Gemeinsamer nationaler Bericht des BVL und RKI zu lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen in Deutschland, 2015. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*. 12, 73-83.

RYAN, P. A., J. D. MACMILLAN & B. A. ZILINSKAS (1997): Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*. 179, 2551-2556.

RYU, J.-H. & L. R. BEUCHAT (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. *Journal of Food Protection*. 68, 2614-2622.

SALVETTI, S., E. GHELARDI, F. CELANDRONI, M. CERAGIOLI, F. GIANNESI & S. SENESI (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.

SÁNCHEZ, L., M. CALVO & J. H. BROCK (1992): Biological role of lactoferrin. *Arch Dis Child*. 67, 657-661.

SASTALLA, I., R. FATTAH, N. COPPAGE, P. NANDY, D. CROWN, A. P. POMERANTSEV & S. H. LEPPLA (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.

SATO, N., S. IKEDA, T. MIKAMI & T. MATSUMOTO (1999a): *Bacillus cereus* Dissociates Hemoglobin and Uses Released Heme as an Iron Source. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 22, 1118-1121.

SATO, N., H. KUROTAKE, S. IKEDA, R. DAIO, N. NISHINOME, T. MIKAMI & T. MATSUMOTO (1999b): Lactoferrin Inhibits *Bacillus cereus* Growth and Heme Analogs Recover Its Growth. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 22, 197-199.

- SATO, N., H. KUROTAKI, T. WATANABE, T. MIKAMI & T. MATSUMOTO (1998): Use of Hemoglobin as an Iron Source by *Bacillus cereus*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 21, 311-314.
- SEGOND, D., E. ABI KHALIL, C. BUISSON, N. DAOU, M. KALLASSY, D. LERECLUS, P. AROSIO, F. BOU-ABDALLAH & C. NIELSEN LE ROUX (2014): Iron Acquisition in *Bacillus cereus*: The Roles of IIsA and Bacillibactin in Exogenous Ferritin Iron Mobilization. *PLOS Pathogens*. 10, e1003935.
- SEMENOV, D. V., T. G. KANYSHKOVA, V. N. BUNEVA & G. A. NEVINSKY (1999): Human milk lactoferrin binds ATP and dissociates into monomers. *IUBMB Life*. 47, 177-184.
- SENESE, S. & E. GHELARDI (2010): Production, Secretion and Biological Activity of *Bacillus cereus* Enterotoxins. *Toxins*. 2, 1690-1703.
- SESSA, R., M. D. PIETRO, S. FILARDO, A. BRESSAN, L. ROSA, A. CUTONE, A. FRIONI, F. BERLUTTI, R. PAESANO & P. VALENTI (2017): Effect of bovine lactoferrin on *Chlamydia trachomatis* infection and inflammation. *Biochemistry and Cell Biology*. 95, 34-40.
- SIDLER, W., E. NIEDERER, F. SUTER & H. ZUBER (1986): The Primary Structure of *Bacillus cereus* Neutral Proteinase and Comparison with Thermolysin and *Bacillus subtilis* Neutral Proteinase. *Biological Chemistry*. 367, 643-658.
- SIERECKA, J. K. (1998): Purification and partial characterization of a neutral protease from a virulent strain of *Bacillus cereus*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 30, 579-595.
- SINGH, P. K., M. R. PARSEK, E. P. GREENBERG & M. J. WELSH (2002): A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*. 417, 552-555.
- SINHA, M., S. KAUSHIK, P. KAUR, S. SHARMA & T. P. SINGH (2013): Antimicrobial lactoferrin peptides: the hidden players in the protective function of a multifunctional protein. *International journal of peptides*. 2013.
- SIQUEIROS-CENDÓN, T., S. ARÉVALO-GALLEGOS, B. F. IGLESIAS-FIGUEROA, I. A. GARCÍA-MONTOYA, J. SALAZAR-MARTÍNEZ & Q. RASCÓN-CRUZ (2014): Immunomodulatory effects of lactoferrin. *Acta*

Pharmacologica Sinica. 35, 557-566.

SMITHERS, G. W. (2008): Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’. International Dairy Journal. 18, 695-704.

SMITHERS, G. W. (2015): Whey-ing up the options – Yesterday, today and tomorrow. International Dairy Journal. 48, 2-14.

STEIJNS, J. M. & A. C. M. VAN HOOIJDONK (2000): Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. British Journal of Nutrition. 84, 11-17.

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

STENFORS, L. P. & P. E. GRANUM (2001): Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. FEMS Microbiology Letters. 197, 223-228.

STENFORS, L. P., R. MAYR, S. SCHERER & P. E. GRANUM (2002): Pathogenic potential of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains. FEMS Microbiology Letters. 215, 47-51.

SUPERTI, F. (2020): Lactoferrin from Bovine Milk: A Protective Companion for Life. Nutrients. 12, 2562.

TESTA, U. (2001). Proteins of iron metabolism, 1<sup>st</sup> edition. CRC press.

THE UNIPROT CONSORTIUM (2022): UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. Nucleic Acids Research. 51, 523-531.

TIAN, H., I. S. MADDOX, L. R. FERGUSON & Q. SHU (2010): Evaluation of the cytoprotective effects of bovine lactoferrin against intestinal toxins using cellular model systems. BioMetals. 23, 589-592.

TOMITA, M., H. WAKABAYASHI, K. SHIN, K. YAMAUCHI, T. YAESHIMA & K. IWATSUKI (2009): Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. Biochimie. 91, 52-57.

TURNBULL, P. C., K. JØRGENSEN, J. M. KRAMER, R. J. GILBERT & J. M. PARRY (1979): Severe clinical conditions associated with *Bacillus cereus* and the

- apparent involvement of exotoxins. *Journal of Clinical Pathology*. 32, 289.
- TURNBULL, P. C. & J. M. KRAMER (1983): Non-gastrointestinal *Bacillus cereus* infections: an analysis of exotoxin production by strains isolated over a two-year period. *Journal of Clinical Pathology*. 36, 1091.
- ULVATNE, H., H. H. HAUKLAND, Ø. OLSVIK & L. H. VORLAND (2001): Lactoferricin B causes depolarization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* ATCC 25922 and fusion of negatively charged liposomes. *FEBS Letters*. 492, 62-65.
- UNIPROT KNOWLEDGEBASE (2024): UniProtKB Lactoferrin. <https://www.uniprot.org/uniprotkb?query=lactoferrin>, zuletzt aufgerufen am 26.02.2024.
- VALENTI, P. & G. ANTONINI (2005): Lactoferrin. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 62, 2576.
- VAN DER STRATE, B. W. A., L. BELJAARS, G. MOLEMA, M. C. HARMSSEN & D. K. F. MEIJER (2001): Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Research*. 52, 225-239.
- VAN DER VOORT, M., O. P. KUIPERS, G. BUIST, W. M. DE VOS & T. ABEE (2008): Assessment of CcpA-mediated catabolite control of gene expression in *Bacillus cereus* ATCC 14579. *BMC Microbiology*. 8, 62.
- VAN WELY, K. H. M., J. SWAVING, R. FREUDL & A. J. M. DRIESSEN (2001): Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 25, 437-454.
- VEGA-BAUTISTA, A., M. DE LA GARZA, J. C. CARRERO, R. CAMPOS-RODRÍGUEZ, M. GODÍNEZ-VICTORIA & M. E. DRAGO-SERRANO (2019): The Impact of Lactoferrin on the Growth of Intestinal Inhabitant Bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*. 20, 4707.
- VISCA, P., F. BERLUTTI, P. VITTORIOSO, C. DALMASTRI, M. C. THALLER & P. VALENTI (1989): Growth and adsorption of *Streptococcus mutans* 6715-13 to hydroxyapatite in the presence of lactoferrin. *Medical Microbiology and Immunology*. 178, 69-79.
- VOGEL, H. J. (2012): Lactoferrin, a bird's eye view. *Biochemistry and Cell*

Biology. 90, 233-244.

WAKABAYASHI, H., I. KONDO, T. KOBAYASHI, K. YAMAUCHI, T. TOIDA, K. IWATSUKI & H. YOSHIE (2010): Periodontitis, periodontopathic bacteria and lactoferrin. *BioMetals*. 23, 419-424.

WAKABAYASHI, H., K. YAMAUCHI & F. ABE (2018): Quality control of commercial bovine lactoferrin. *BioMetals*. 31, 313-319.

WAKABAYASHI, H., K. YAMAUCHI & M. TAKASE (2006): Lactoferrin research, technology and applications. *International Dairy Journal*. 16, 1241-1251.

WANG, B., Y. P. TIMILSENA, E. BLANCH & B. ADHIKARI (2019): Lactoferrin: Structure, function, denaturation and digestion. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 59, 580-596.

WANG, G., X. LI & Z. WANG (2008): APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Research*. 37, D933-D937.

WEINBERG, E. D. (2004): Suppression of bacterial biofilm formation by iron limitation. *Medical Hypotheses*. 63, 863-865.

WILLER, E. D. M., R. D. L. LIMA & L. G. GIUGLIANO (2004): In vitro adhesion and invasion inhibition of *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* clinical strains by human milk proteins. *BMC Microbiology*. 4, 18.

WILSON, M. K., R. J. ABERGEL, K. N. RAYMOND, J. E. L. ARCENEUX & B. R. BYERS (2006): Siderophores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 348, 320-325.

YAO, X., C. BUNT, J. CORNISH, S.-Y. QUEK & J. WEN (2013): Oral Delivery of Lactoferrin: A Review. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 19, 125-134.

YEN, C.-C., C.-J. SHEN, W.-H. HSU, Y.-H. CHANG, H.-T. LIN, H.-L. CHEN & C.-M. CHEN (2011): Lactoferrin: an iron-binding antimicrobial protein against *Escherichia coli* infection. *BioMetals*. 24, 585-594.

ZARZOSA-MORENO, D., C. AVALOS-GÓMEZ, L. S. RAMÍREZ-TEXCALCO,

E. TORRES-LÓPEZ, R. RAMÍREZ-MONDRAGÓN, J. O. HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, J. SERRANO-LUNA & M. DE LA GARZA (2020): Lactoferrin and Its Derived Peptides: An Alternative for Combating Virulence Mechanisms Developed by Pathogens. *Molecules*. 25, 5763.

ZHU, K., A. DIDIER, R. DIETRICH, U. HEILKENBRINKER, E. WALTENBERGER, N. JESSBERGER, E. MÄRTLBAUER & R. BENZ (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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 469, 613-618.

ZIGHA, A., E. ROSENFELD, P. SCHMITT & C. DUPORT (2007): The Redox Regulator Fnr Is Required for Fermentative Growth and Enterotoxin Synthesis in *Bacillus cereus* F4430/73. *Journal of Bacteriology*. 189, 2813-2824.

## IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1: *B. cereus*, Kolonie, vegetative Bakterien (vorwiegend in Ketten). Raster-Elektronenmikroskopie. Maßstab = 10 µm  
Quelle: Nadja Jeßberger
- Abbildung 2: Durch Hbl verursachtes, diskontinuierliches Hämolysemuster auf Schafblutagar  
Quelle: Nele Maxseiner, Clara-Sophie Jugert
- Abbildung 3: Tertiärstruktur von bovinem apo-Lf (eisenfrei) (A) und bovinem holo-Lf (eisengesättigt) (B), nach Rosa et al. (2017). Die N-Lappen (links) sowie die C-Lappen (rechts) sind jeweils in zwei Untereinheiten unterteilt (N1 und N2; C1 und C2). Rot: Eisenionen an ihren jeweiligen Bindungsstellen.
- Abbildung 4: Überblick über einige der Hauptfunktionen von Laktoferrin

## X. TABELLENVERZEICHNIS

- Tabelle 1: Klinische Symptomatik von *B. cereus*-Intoxikationen und -Infektionen (Märtlbauer & Becker, 2016)
- Tabelle 2: Beteiligung bakterieller Toxine an lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen im Verlauf der letzten fünf Jahre (nach EFSA Zoonose Reports; EFSA & ECDC, 2019, 2021a, 2021b, 2022, 2023). (A) Anteil aller bakteriellen Toxine (*B. cereus*, *C. perfringens*, *C. botulinum*, *S. aureus*, unspezifizierte bakterielle Toxine) in %. (B) Davon durch *B. cereus* induzierte Fälle in %.
- Tabelle 3: Gegenüberstellung wichtiger Eigenschaften relevanter *B. cereus* Toxine (nach Agata et al., 1995; Stenfors Arnesen et al., 2008; Märtlbauer & Becker, 2016; Jessberger et al., 2020)
- Tabelle 4: Laktoferrinkonzentrationen (hLf) in verschiedenen Flüssigkeiten und Sekreten (nach Masson et al., 1966; Masson & Heremans, 1968; Rosa et al., 2017).



## **XI. DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin Märtlbauer für die Überlassung des interessanten Themas, die allzeit freundliche Unterstützung sowie diesen wunderbaren Arbeitsplatz bedanken! Ich bedanke mich auch ganz besonders für die großzügige und gütige Art als Chef! Ich fühle mich nach wie vor sehr wohl hier am Lehrstuhl.

Ganz besonderer Dank gilt auch meiner Betreuerin Frau PD Dr. Nadja Jeßberger. Danke, dass aus einem VetResearch Studentenprojekt eine Doktorarbeit entstanden ist! Danke für die hervorragende und motivierte Einarbeitung im Labor! Vielen Dank für die vielen Ideen, das Engagement, die Hilfsbereitschaft und für die sorgfältige Durchsicht dieser Arbeit! Danke, dass du mich trotz unserer Fernbeziehung Hannover-München ausgezeichnet betreut und durch das Promotionsstudium begleitet hast.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine lieben Kollegen Frau Dr. Stockmeier-Didier und Herrn Dr. Dietrich! Danke, dass ihr immer ein offenes Ohr für mich hattet und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden habt. Danke für jede Hilfestellung, für das Fachsimpeln über das Milchwissenschaftliche Seminar Teil 2 und jedes nette Gespräch im Türrahmen meines Büros!

Ein großer Dank gilt auch dem gesamten Team der Milchhygiene! Danke Maria, für deine herzensgute Art und deine tollen Ratschläge in jeder Lebenslage! Danke Gabi fürs viele Zuhören, für die Hilfe im Labor und dass du mir immer was von deinen Veros abgegeben hast! Danke Bruni fürs Joghurt-Teilen mit Zenzi und für all die aufmunternden Worte zwischendurch! Danke Steffi fürs Orangen und Krapfen organisieren und auch dir Danke für die vielen aufbauenden Worte! Danke Margit fürs Geschichten erzählen, für die vielen trockenen Kommentare und die jederzeit herzliche und verständnisvolle Art! Danke Franzi für jede gemeinsame Frühstückspause und die Lacher zwischendurch! Danke auch an Elli und Kula, die meine 1000 einzelnen Reagenzgläser der Dilutionsassays gespült haben und durch grandiosen Eiskaffee und Tsoureki unsere sommerlichen Mittagspausen versüßt haben! Danke Maja für deine Unterstützung in jedem Bereich und vor allem bei

allen Dingen, die mit diversen Studentenkursen zu tun hatten! Und Danke liebste Susi, für die stundenlangen Gespräche. Deine Lebenserfahrung und deine Tipps haben mir immer geholfen. Danke, dass du stets zugehört hast und für jede Frage eine Lösungsidee hattest! Danke Marie-Thérèse fürs gemeinsame Summer School und Milchkurs bestreiten und Danke auch Frau Dr. Schauer für fachliche Beratung und liebe Gespräche auf dem Gang. Danke dem gesamten Team für seine freundliche und fröhliche Art! Ihr wart mir immer eine große Hilfe!

Ganz besonderer Dank gilt dem Krocketten-Club: Nele, Katalin und Julia! Danke für die vielen erholsamen Pausen, für das Lachen jeden Tag, fürs Zuhören, für Urlaub und Erlebnisse weit über das Arbeitsverhältnis hinaus.

Danke auch an meine liebsten Studienmädels, denn ohne Euch wäre ich sicher nicht dort wo ich heute bin. Danke Lui, Lindi, Jenny und Joanna! Ihr seid die Besten! Danke für diese ehrliche und mittlerweile jahrelange Freundschaft!

Mein größter Dank gilt meiner Familie, ganz besonders meinen Eltern, meinen Großeltern und meinem Bruder Constantin! Danke, dass ihr immer an mich glaubt, dass ihr mich bedingungslos liebt und unterstützt und mich jeden Tag spüren lasst wie stolz ihr auf mich seid! Danke für den Rückhalt, die Motivation, den Zuspruch und den Glauben, dass ich alles schaffen kann was ich mir vornehme! Danke auch an meine lieben Schwiegereltern, die mich ebenfalls jeden Tag unterstützen und mir helfen wo sie nur können!

Und zu guter Letzt möchte ich noch einer der wichtigsten Personen in meinem Leben danken! Von Herzen Danke an meinen Verlobten Simon, der mich jetzt schon jahrelang begleitet und immer mein Fels in der Brandung ist. Danke für deine Liebe, deinen Rückhalt, für Humor, Gelassenheit, für deine Ruhe und Empathie. Von Herzen Danke!