

## Potencial toxigénico de *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* em estirpes isoladas em larvas de mosca soldado negro alimentadas com resíduos alimentares

*Toxicogenic potential of Bacillus cereus and Escherichia coli in strains isolated from black soldier fly larvae fed with food waste*

Joana Oliveira<sup>1</sup>, Ana Margarida Pires<sup>2</sup>, Daniel Murta<sup>1,3,4</sup>, Ricardo Assunção<sup>1,5</sup>

ricardo.assuncao@insa.min-saude.pt

(1) Egas Moniz Center for Interdisciplinary Research, Egas Moniz School of Health & Science, Almada, Portugal

(2) Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, Campus de Caparica, Almada, Portugal

(3) Thunder Foods, SA – Santarém, Portugal

(4) Ingredient Odyssey, SA – Entogreen, Santarém, Portugal

(5) Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

### \_Resumo

A urgente transição para sistemas agroalimentares mais sustentáveis exige, a diferentes níveis, soluções inovadoras para enfrentar desafios como o desperdício alimentar. As larvas de mosca soldado negro (BSFL) têm emergido como uma estratégia para a valorização de resíduos alimentares, convertendo-os em proteína para a alimentação humana e animal. No entanto, a utilização destes substratos pode identificar preocupações de segurança microbiológica, nomeadamente associadas a bactérias toxigénicas.

Neste estudo foi utilizada a técnica de PCR para avaliar a presença de genes codificadores de toxinas de *Escherichia coli* (*stx1* e *stx2*) e *Bacillus cereus* (*cytK*, *nheA*, *hblD*) isoladas de matrizes associadas ao processo de bioconversão por BSFL, em contexto industrial. As larvas foram criadas em dois substratos: resíduos alimentares (teste) e dieta Gainesville (controlo). *E. coli* foi isolada em substrato e larvas, mas não na farinha de BSFL; *stx1* foi detetado apenas num isolado de larvas teste e *stx2* não foi detetado. *B. cereus* foi isolado em substrato e farinha de BSFL, apresentando todos os isolados pelo menos um gene de enterotoxina, sendo *cytK* o mais prevalente.

Apesar da deteção destes genes, os resultados evidenciam o potencial das BSFL como abordagem segura e sustentável para valorização de resíduos alimentares, numa perspetiva *One Health*.

### \_Abstract

The transition towards more sustainable agrifood systems requires innovative solutions to address challenges such as food waste. Black soldier fly larvae (BSFL) have emerged as a promising strategy for the valorisation of food waste, converting them into protein for human and animal food. However, the use of such substrates raises microbiological safety concerns, particularly related to toxigenic bacteria.

This study used PCR to evaluate the presence of toxin-encoding genes of *Escherichia coli* (*stx1* and *stx2*) and *Bacillus cereus* (*cytK*, *nheA*, *hblD*), isolated from matrices associated with the BSFL bioconversion process under industrial conditions. Larvae were reared on two substrates: food waste (test group) and Gainesville diet (control group). *E. coli* was isolated from substrate and larvae but not from the meal; *stx1* was detected in only one isolate from test larvae, while *stx2* was not detected. *B. cereus* was isolated from substrate and meal,

with all isolates harbouring at least one enterotoxin gene, with *cytK* being the most prevalent.

Despite the detection of these genes, the results support the potential of BSFL for the safe and sustainable valorisation of food waste, in a *One Health* perspective.

### \_Introdução

Os sistemas agroalimentares atuais enfrentam múltiplos desafios globais, incluindo a persistência da insegurança alimentar, a malnutrição, as elevadas emissões de gases com efeito de estufa, a pressão sobre os recursos naturais e os elevados níveis de perda e desperdício alimentar ao longo da cadeia alimentar (1). Estes desafios evidenciam a necessidade de promover a transição para sistemas alimentares mais sustentáveis, resilientes e eficientes na utilização de recursos. A redução da perda e do desperdício alimentar e a valorização de resíduos orgânicos assumem um papel central, dado que uma parte significativa dos alimentos produzidos globalmente é perdida ou desperdiçada ao longo da cadeia alimentar (2). Adicionalmente, os resíduos alimentares são um problema global de saúde pública, com implicações para a saúde humana e animal, devido à emissão de gases com efeito de estufa, à promoção da disseminação de agentes patogénicos e ao seu contributo para a insegurança alimentar (3,4). Assim, a valorização destes resíduos surge como uma estratégia promissora para sistemas agroalimentares mais sustentáveis e para a mitigação dos riscos associados à saúde pública.

As larvas da mosca soldado negro (*Hermetia illucens*; BSFL) têm emergido como uma solução promissora para a valorização de resíduos orgânicos, convertendo substratos ricos em matéria orgânica em biomassa larval rica em proteína e lípidos, com potencial aplicação na alimentação humana e animal, contribuindo para o desenvolvimento de novos sistemas agroalimentares mais sustentáveis (5,6). No entanto, a utilização de resíduos alimentares como substrato de insetos levanta também desafios relacionados com a segurança microbiológica (7).

Entre os microrganismos potencialmente relevantes neste contexto destacam-se *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*, bactérias frequentemente associadas a doenças de origem alimentar, capazes de produzir toxinas (8,9). Estas bactérias podem estar presentes nos resíduos alimentares utilizados como substrato e, conseqüentemente, ser transferidas para as larvas durante o processo de bioconversão (7). Vários estudos têm investigado a sua presença em sistemas de criação de BSFL, sendo das espécies mais frequentemente estudadas em diferentes matrizes (10-12).

Algumas estirpes de *B. cereus* produzem enterotoxinas implicadas na síndrome diarreica decorrente de intoxicações alimentares, nomeadamente os complexos não hemolítico (*non-hemolytic enterotoxin*, NHE) e hemolítico (*hemolysin BL*, HBL), bem como a citotoxina K (CytK), codificados pelos genes *nhe*, *hbl* e *cytK*, respetivamente (8,13). Estas enterotoxinas são produzidas no intestino após ingestão de alimentos contaminados e podem causar danos nas células epiteliais intestinais, resultando em sintomas gastrointestinais como diarreia, dor abdominal e náuseas (8). A presença de estirpes de *B. cereus* portadoras destes genes, codificadores de enterotoxinas, em cadeias de produção alimentar pode representar um potencial risco para a segurança dos alimentos. De acordo com a combinação de genes de toxinas detetados, os isolados de *B. cereus* podem ser agrupados em diferentes perfis toxigénicos. De forma geral, sete perfis principais têm sido descritos na literatura: A (*nhe+*, *hbl+*, *cytK+*), B (*nhe+*, *cytK+*, *ces+*), C (*nhe+*, *hbl+*), D (*nhe+*, *cytK+*), E (*nhe+*, *ces+*),

F (*nhe+*), e G (*cytK+*). A caracterização destes perfis toxigénicos constitui uma abordagem relevante para avaliar o potencial de virulência das estirpes de *B. cereus* presentes em diferentes matrizes alimentares (14).

*Escherichia coli* é uma bactéria amplamente distribuída no trato gastrointestinal de humanos e animais, sendo frequentemente utilizada como indicador de contaminação fecal em alimentos e ambientes de produção alimentar (15). Algumas estirpes patogénicas de *E. coli*, designadas como *Shiga toxin-producing Escherichia coli* (STEC), são capazes de produzir toxinas Shiga, codificadas pelos genes *stx1* e *stx2* (9). Estas toxinas podem originar sintomas como diarreia, dor abdominal e, em casos mais graves, a síndrome hemolítica-urémica (9,16).

Neste contexto, a presença de estirpes portadoras destes genes pode representar um potencial risco para a saúde pública, tornando relevante a sua monitorização em novos sistemas agroalimentares baseados na valorização de resíduos, particularmente devido às elevadas cargas microbianas destes substratos, o que reforça a necessidade de avaliar a ocorrência de bactérias toxigénicas e dos respetivos genes de virulência ao longo do processo de produção (17,18). Apesar de estudos prévios abordarem a redução da carga microbiana pelas BSFL e a ocorrência destes microrganismos ao longo do processo de bioconversão, a informação sobre o potencial toxigénico das estirpes permanece limitada.

Assim, torna-se essencial aprofundar o conhecimento sobre a ocorrência de microrganismos potencialmente toxigénicos e dos respetivos genes codificadores de toxinas em insetos criados a partir de resíduos alimentares, de forma a garantir a segurança microbiológica dos produtos obtidos e apoiar o desenvolvimento sustentável destes novos sistemas agroalimentares. Até à data, o conhecimento sobre estes genes em BSFL permanece limitada, sendo este estudo, tanto quanto é do nosso conhecimento, o primeiro a investigá-los em diferentes matrizes do processo de bioconversão.

## \_Objetivos

O principal objetivo deste estudo foi aprofundar o conhecimento sobre a segurança da utilização de resíduos alimentares como substrato para a produção de larvas da mosca soldado negro (BSFL), em contexto industrial, através da deteção da presença de *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* nos produtos derivados do processo de bioconversão, e da pesquisa de genes produtores de toxinas nas estirpes isoladas (*cytK*, *nheA*, *hblD* em *B. cereus* e *stx1*, *stx2* em *E. coli*).

Foi também objetivo deste trabalho propor potenciais estratégias de mitigação para reduzir os riscos associados a estas toxinas nestes novos sistemas alimentares.

## \_Materiais e métodos

### Desenho experimental e amostragem

As larvas de mosca soldado negro foram criadas com dois substratos num ensaio de bioconversão realizado nas instalações de I&D da EntoGreen (Ingredient Odyssey SA, Santarém, Portugal): uma dieta estandardizada para insetos (Gainesville; 67% água, 17% farelo de trigo, 6,6% farinha de milho e 9,9% alfafa), utilizada como controlo, e uma mistura heterogénea de resíduos alimentares (vegetais e frutas, cereais, carne e peixe crus e cozinhados, ovos, cascas de ovo e produtos de padaria). Foram recolhidos 1847,5kg de resíduos alimentares de restaurantes de Santarém, com apoio da Câmara Municipal, posteriormente triturados e processados para obtenção do substrato de teste. Foram estabelecidas 114 unidades experimentais e 144 unidades de controlo, em caixas de PVC (60 x 40 x 11cm) desenvolvidas pela EntoGreen. Para a aná-

lise microbiológica, foram colhidas aleatoriamente amostras independentes de substrato (dia 1, antes da inoculação) e de larvas (dia 14, após separação do frass), sendo cada amostra obtida a partir de uma mistura homogeneizada de diferentes caixas por grupo (n=3 para teste e n=3 para controlo). As amostras de farinha de BSFL foram igualmente recolhidas aleatoriamente, a partir de diferentes lotes, imediatamente após o processamento das larvas (-90°C), correspondendo a n=3 para o grupo teste e n=3 para o grupo controlo.

### Isolamento de *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*

As bactérias foram isoladas a partir de três tipos de amostras dos grupos teste e controlo: (a) substrato das larvas; (b) larvas; e (c) farinha produzida a partir das BSFL destinada à utilização como fonte proteica para alimentação humana e animal. O isolamento foi realizado utilizando técnicas de microbiologia alimentar de acordo com as normas ISO 7932:2004/Amd 1:2020 e ISO 16649-2:2001/Amd 2:2023, para *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*, respetivamente.

### Extração de ADN e Primers

As colónias isoladas das amostras foram inoculadas, individualmente, num tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo LB (VWR BDH® Chemicals, Leuven, Bélgica) e incubadas a 37°C durante 18 h, sob agitação a 225 rpm. As células bacterianas foram recolhidas por centrifugação, seguindo-se a extração de ADN com o kit DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN, Valencia, CA, USA), de acordo com o protocolo do fabricante para bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Os primers utilizados neste estudo para amplificação de *cytK*, *nheA*, *hblD*, *stx 1* e *stx 2* encontram-se na [tabela 1](#).

Tabela 1: ↓ Lista de primers utilizados neste estudo.

Toxina	Sequência	Tamanho do amplificação	Referência
<i>cytK</i>	F: ATCGGTCAAATGCAAAAACAC R: ACCCAGTTACCAGTTCCGAATG	800 bp	
<i>nheA</i>	F: AGGTAAATGCGATGAGTAG R: TTGTTGAATGCGAAGAG	617 bp	(19)
<i>hblD</i>	F: GTTAGATACAGCGAAGCCAC R: CCGCCAGTTACAACAATA	465 bp	
<i>stx1</i>	F: TGT CGC ATAGTGAACCTCA R: TGCGCACTGAGAAGAAGAGA	655 bp	(20)
<i>stx2</i>	F: CCATGACAACGGACAGCAGTT R: TGTCGCCAGTTATCTGACATTC	477 bp	(21)

## Resultados e discussão

A **tabela 2** compila os resultados obtidos no presente estudo.

O isolamento de *Escherichia coli* em amostras de substrato e de larvas em ambos os grupos (teste e controlo), mas não nas amostras de farinha de BSFL pode ser explicada pela sua inativação a temperaturas na ordem dos 70 °C, valores que são atingidos durante o processamento das larvas para obtenção de farinha (22,23).

Relativamente à pesquisa de *B. cereus*, a sua deteção na farinha, apesar da ausência nas amostras de larvas analisadas (tabela 2), poderá estar associada à capacidade de *B. cereus* formar esporos altamente resistentes a condições ambientais adversas e a etapas de processamento necessários para a obtenção de farinha (8,23). Assim, embora as células vegetativas possam ser reduzidas durante as diferentes etapas do processo, incluindo pela atividade das larvas (hidrólise enzi-

mática e produção de péptidos antimicrobianos) e pelas temperaturas aplicadas, os esporos podem persistir e germinar posteriormente, permitindo a sua deteção (8,24).

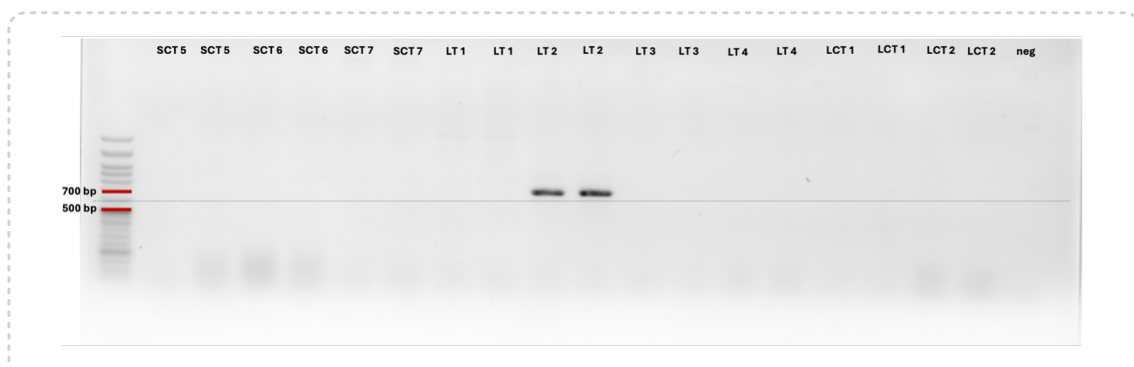
A deteção do gene *stx1* numa estirpe de *E. coli* isolada a partir de larvas do grupo teste (tabela 2) sugere a existência de estirpes potencialmente patogénicas, devendo, no entanto, ser interpretada com cautela por corresponder a um único isolado. A sequenciação desta estirpe poderá permitir a caracterização detalhada do seu perfil genético, a confirmação da presença e integridade do gene de virulência, enquanto que a sequenciação do microbioma das BSFL poderá esclarecer a sua origem (microbiota ou introdução via substrato). A figura 1 ilustra o resultado da eletroforese em gel de agarose, na qual se observa a amplificação do gene *stx1*. As amostras de substrato do grupo teste e algumas do grupo controlo não estão incluídas na imagem por não apresentarem qualquer amplificação. O gene *stx2* não foi detetado em nenhum dos isolados analisados.

Tabela 2: Número de estirpes de *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* isoladas em cada uma das amostras testadas e respetivos genes/ perfis de virulência detetados.

	Grupo controlo (n=3)			Grupo teste (n=3)			Total
	Substrato	Larvas	Farinha	Substrato	Larvas	Farinha	
<i>E. coli</i>	6	2	0	6	4 ( <i>stx1</i> (n=1))	0	18
<i>B. cereus</i>	5 (perfil D (n=1); perfil G (n=4))	0	4 (perfil F (n=1); perfil G (n=3))	1 (perfil A)	0	6 (perfil G (n=1); perfil F (n=5))	16 (perfil A(n=1); perfil D (n=1); perfil F (n=6); perfil G (n=8))

Perfis de virulência de *B. cereus*: A (*nhe+*, *hbl+*, *cytK+*), B (*nhe+*, *cytK+*, *ces+*), C (*nhe+*, *hbl+*), D (*nhe+*, *cytK+*), E (*nhe+*, *ces+*), F (*nhe+*), G (*cytK+*)

Figura 1: Resultado da eletroforese em gel de agarose para deteção do gene *stx1* por PCR.

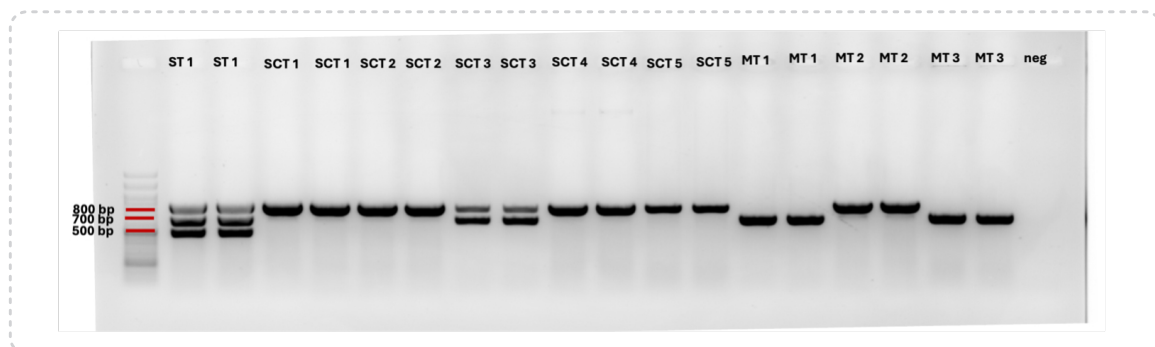


Observa-se a amplificação de um fragmento de tamanho compatível ao gene *stx1* (655 bp) num isolado de larvas do grupo teste. SCT – substrato de controlo; LT – larvas do grupo teste; LCT – larvas do grupo de controlo; neg – controlo negativo

Relativamente aos genes codificadores de enterotoxinas de *B. cereus*, todos os isolados apresentaram amplificação de pelo menos um dos genes analisados (tabela 2). O único isolado de substrato teste apresentou os três genes em estudo (*cytK*, *nheA* e *hbID*). Os genes de enterotoxinas mais prevalentes foram *cytK* e *nheA*. O *cytK* foi detetado em 56,25% (9/16) dos isolados totais, incluindo 100% (5/5) dos isolados do substrato de controlo, em 16,7% (1/6) dos

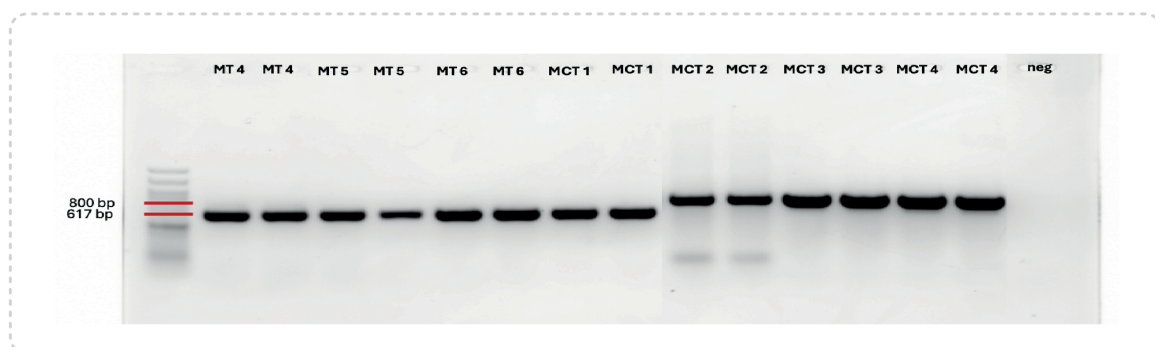
isolados de farinha de teste e em 75% (3/4) dos isolados de farinha de controlo. O *nheA*, foi identificado em 50% (8/16) dos isolados, correspondendo a 83,3% (5/6) dos isolados da farinha de teste e 25% (1/4) dos isolados da farinha de controlo. O gene *hbID* foi detetado apenas em 6,25% (1/16) dos isolados, correspondendo ao isolado de substrato do grupo teste. As figuras 2 e 3 apresentam os resultados da eletroforese em gel de agarose.

Figura 2: Resultado da eletroforese em gel de agarose para deteção dos genes *cytK*, *nheA* e *hbID* por PCR.



Observa-se a amplificação de diferentes fragmentos de tamanho compatível com o gene *cytK* (800 bp), *nheA* (617 bp) e *hbID* (465 bp). ST – substrato de teste; SCT – substrato de controlo; MT – farinha do grupo teste; MCT – farinha do grupo de controlo; neg – controlo negativo

Figura 3: Resultado da eletroforese em gel de agarose para deteção dos genes *cytK*, *nheA* e *hbID* por PCR.



Observa-se a amplificação de diferentes fragmentos de tamanho compatível com o gene *cytK* (800 bp) e *nheA* (617 bp). A banda de menor tamanho observada na amostra MCT 2 corresponde a dímeros de primers. MT – farinha do grupo teste; MCT – farinha do grupo de controlo; neg – controlo negativo

Os resultados obtidos estão parcialmente em concordância com a literatura, que descreve os genes do complexo *nhe* como os determinantes de enterotoxinas mais prevalentes em isolados de *B. cereus* (25), embora a sua prevalência possa variar consoante o tipo de alimento ou substrato de origem (26). Com base na combinação de genes detetados, os isolados de *B. cereus* foram classificados consoante os diferentes perfis toxigénicos, já estabelecidos e mencionados em cima. No presente estudo, foi identificado um isolado compatível com o perfil A, oito isolados com o perfil G, um isolado com o perfil D e seis isolados com o perfil F (tabela 2). A predominância do perfil G (*cytK+*) reflete a elevada prevalência deste gene entre os isolados analisados, enquanto a baixa ocorrência do perfil A deve ser interpretada com cautela, podendo estar relacionada com a reduzida representatividade das amostras de substrato do grupo teste analisadas. O perfil toxigénico dos isolados provenientes da farinha de BSFL do grupo controlo foi consistente com o do respetivo substrato, sendo *cytK* o gene mais frequentemente detetado em ambas as matrizes. Estudos futuros poderão incluir a sequenciação das estirpes isoladas e dos genes de toxinas amplificados, permitindo caracterizar com maior detalhe o perfil toxigénico destes isolados e a diversidade genética das estirpes de *B. cereus* associadas às diferentes matrizes analisadas.

Importa ainda salientar que a deteção de genes de toxinas, incluindo enterotoxinas de *B. cereus* e o gene *stx1* de *E. coli*, não implica necessariamente, nas condições analisadas, a sua expressão, produção de toxinas ou capacidade de causar tox infeção alimentar (26,27). A produção efetiva depende de vários processos celulares, incluindo a transcrição dos genes de enterotoxinas, modificações pós-transcricionais e pós-traducionais, bem como a secreção das proteínas (26). Neste contexto, estudos futuros poderão recorrer a técnicas de análise de expressão génica, como a PCR quantitativa (qPCR) ou a PCR quantitativa com transcrição reversa (RT-qPCR), de modo a avaliar a expressão destes genes nas diferentes matrizes, para clarificar o risco microbiológico real, contribuindo para uma avaliação mais robusta da segurança destes sistemas de produção (27,28).

Apesar da deteção de *B. cereus* e *E. coli*, as contagens observadas nos substratos, nas larvas e na farinha encontravam-se dentro dos limites microbiológicos considerados satisfatórios para alimentos e rações (29-31), reforçando o potencial das BSFL na valorização de resíduos alimentares para a produção de ingredientes seguros.

No entanto, devido à capacidade de *B. cereus* formar esporos altamente resistentes, a implementação de estratégias de mitigação durante o processamento da farinha de BSFL poderá contribuir para reduzir ainda mais o risco microbiológico associado a estes produtos. Entre as abordagens possíveis incluem-se a otimização das condições térmicas durante o processamento, nomeadamente através da aplicação de temperaturas mais elevadas do que 100 °C, capazes de promover uma diminuição ou mesmo a inativação de esporos (32,33). A gestão adequada do substrato utilizado na alimentação das larvas poderá igualmente desempenhar um papel importante na redução da introdução de esporos, incluindo a aplicação de pré-tratamentos aos resíduos alimentares (por exemplo, tratamento térmico a altas temperaturas).

## \_Conclusão

Em conjunto, os resultados obtidos sugerem que o processo de bioconversão por larvas de mosca soldado negro apresenta um elevado potencial para a valorização segura de resíduos alimentares, mantendo níveis microbiológicos dentro dos limites considerados aceitáveis e evidenciando um potencial toxigénico controlado entre os isolados analisados.

Estes resultados reforçam a viabilidade da utilização deste sistema na produção sustentável de ingredientes destinados à alimentação humana e animal, contribuindo simultaneamente para estratégias de economia circular e para a redução do desperdício alimentar.



## Financiamento:

Joana Oliveira é financiada pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), Lisboa, Portugal, através de uma bolsa de doutoramento (referência 2022.13540.BDANA; <https://doi.org/10.54499/2022.13540.BDANA>). Este trabalho foi financiado pelo projeto "InsectERA" (n.º C644917393-00000032), no âmbito dos WPs *InBioremediation* e *One Health*, com o apoio do Fundo Europeu Next Generation EU e do Plano de Recuperação e Resiliência (PRR) de Portugal, no quadro da linha de incentivo "Agendas para a Inovação Empresarial", através do regime de financiamento C5 – Capitalização e Inovação Empresarial, e por CiiEM Investiga "FlyWaste" através do projeto 10.54499/UIDB/04585/2020, financiado pela FCT.

## Referências bibliográficas:

- (1) Bodirsky BL, Beier F, Humpenöder F, et al. A food system transformation pathway reconciles 1.5 °C global warming with improved health, environment and social inclusion. *Nat Food*. 2025 Dec;6(12):1133-52. <https://doi.org/10.1038/s43016-025-01268-y>
- (2) Food and Agriculture Organization. FAO Tackling Food Loss and Waste: A Triple Win Opportunity [Internet]. 29/09/2022. [consult. 27/2/2023]. <https://www.fao.org/news-room/detail/FAO-UNEP-agriculture-environment-food-loss-waste-day-2022/en>
- (3) Krystosik A, Njoroge G, Odhiambo L, et al. Solid Wastes Provide Breeding Sites, Burrows, and Food for Biological Disease Vectors, and Urban Zoonotic Reservoirs: A Call to Action for Solutions-Based Research. *Front Public Health*. 2020 Jan 17;7:405. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00405>
- (4) Rudziak P, Batung E, Luginah L. The effects of gases from food waste on human health: A systematic review. *PLoS One*. 2024 Mar 27;19(3):e0300801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0300801>
- (5) Siddiqui SA, Harahah IA, Osei-Owusu J, et al. Bioconversion of organic waste by insects – A comprehensive review. *Process Saf Environ Prot*. 2024;187:1-25. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2024.04.122>
- (6) Siddiqui SA, Ristow B, Rahayu T, et al. Black soldier fly larvae (BSFL) and their affinity for organic waste processing. *Waste Manag*. 2022 Mar 1;140:1-13. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.12.044>
- (7) EFSA Scientific Committee. Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. *EFSA J*. 2015;13(10):4257. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4257>
- (8) Granum PE, Lindbäck T. *Bacillus cereus*. In: Doyle MP, Buchanan RL (eds). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 4th ed. Washington, DC: ASM Press, 2013, pp. 491–502. <https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch19>
- (9) Meng J, LeJeune JT, Zhao T, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: Doyle MP, Buchanan RL (eds). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 4th ed. Washington, DC: ASM Press, 2013, pp. 287–309. <https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch12>
- (10) van Kessel K, Castelijin G, van der Voort M, et al. Investigation of *Bacillus cereus* growth and sporulation during *Hermetia illucens* larval rearing. *Heliyon*. 2024 Dec 7;10(24):e40912. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e40912>
- (11) Alagappan S, Dong A, Hoffman L, et al. Microbial safety of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) reared on food waste streams. *Waste Manag*. 2025 Feb 15;194:221-27. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2025.01.019>
- (12) Bessa LW, Pieterse E, Marais J, et al. Food Safety of Consuming Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) Larvae: Microbial, Heavy Metal and Cross-Reactive Allergen Risks. *Foods*. 2021 Aug 20;10(8):1934. <https://doi.org/10.3390/foods10081934>
- (13) McDowell RH, Friedman H. *Bacillus Cereus*. [Updated 2023 Jan 23]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2026 Jan-. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459121/>
- (14) Ehling-Schulz M, Guinebretiere MH, Monthán A, et al. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006 Jul;260(2):232-40. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00320.x>
- (15) Yang X, Wang H. *ESCHERICHIA COLI* | Pathogenic *E. coli* (Introduction). In: Batt CA, Tortorello ML (eds). *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2nd. Academic Press, 2014, pp. 695-701. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00383-9>
- (16) Travert B, Rafat C, Mariani P, et al. Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome: Specificities of Adult Patients and Implications for Critical Care Management. *Toxins (Basel)*. 2021 Apr 26;13(5):306. <https://doi.org/10.3390/toxins13050306>
- (17) Gold M, von Allmen F, Zurbrugg C, et al. Identification of Bacteria in Two Food Waste Black Soldier Fly Larvae Rearing Residues. *Front Microbiol*. 2020 Nov 23;11:582867. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582867>
- (18) Wu S, Xu S, Chen X, et al. Bacterial Communities Changes during Food Waste Spoilage. *Sci Rep*. 2018 May 29;8(1):8220. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26494-2>
- (19) Zhang Z, Feng L, Xu H, et al. Detection of viable enterotoxin-producing *Bacillus cereus* and analysis of toxigenicity from ready-to-eat foods and infant formula milk powder by multiplex PCR. *J Dairy Sci*. 2016 Feb;99(2):1047-55. Epub 2015 Dec 10. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10147>
- (20) Bai J, Shi X, Nagaraja TG. A multiplex PCR procedure for the detection of six major virulence genes in *Escherichia coli* O157:H7. *J Microbiol Methods*. 2010 Jul;82(1):85-89. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.05.003>. Epub 2010 May 16
- (21) Fagan PK, Hornitzky MA, Bettelheim KA, et al. Detection of shiga-like toxin (stx1 and stx2), intimin (eaeA), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC hlyA) genes in animal feces by multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol*. 1999 Feb;65(2):868-72. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.2.868-872.1999>
- (22) Hutchison ML, Thomas DJ, Avery SM. Thermal death of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle feeds. *Lett Appl Microbiol*. 2007 Apr;44(4):357-63. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02091.x>
- (23) Costa JM, Murta D, Magalhães T. Manual de Boas Práticas na Produção, Processamento e Utilização de Insetos na Alimentação Animal. Lisboa: Direção-Geral da Alimentação e Veterinária, 2018. <https://www.dgav.pt/wp-content/uploads/2021/08/MANUAL-INSSETOS.pdf>
- (24) Gold M, Tomberlin JK, Diener S, et al. Decomposition of biowaste macronutrients, microbes, and chemicals in black soldier fly larval treatment: A review. *Waste Manag*. 2018 Dec;82:302-18. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.10.022>
- (25) Jovanovic J, Tretiak S, Begyn K, et al. Detection of Enterotoxigenic Psychrotrophic Presumptive *Bacillus cereus* and Cereulide Producers in Food Products and Ingredients. *Toxins (Basel)*. 2022 Apr 16;14(4):289. <https://doi.org/10.3390/toxins14040289>
- (26) Dietrich R, Jessberger N, Ehling-Schulz M, et al. The Food Poisoning Toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins (Basel)*. 2021 Jan 28;13(2):98. <https://doi.org/10.3390/toxins13020098>
- (27) Jeßberger N, Krey VM, Rademacher C, et al. From genome to toxicity: a combinatorial approach highlights the complexity of enterotoxin production in *Bacillus cereus*. *Front Microbiol*. 2015 Jun 10;6:560. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00560>
- (28) Vinje MA, Friedman DA. Exogenous spike-in mouse RNAs for accurate differential gene expression analysis in barley using RT-qPCR. *Biol Methods Protoc*. 2023 Nov 28;8(1):bpad034. <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpad034>
- (29) Commission Regulation (EU) No 142/2011 of 25 February 2011 implementing Regulation (EC) No 1069/2009 of the European Parliament and of the Council laying down health rules as regards animal by-products and derived products not intended for human consumption and implementing Council Directive 97/78/EC as regards certain samples and items exempt from veterinary checks at the border under that Directive. *OJ L 54*, 26.2.2011, pp. 1-254. <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/142/oj>
- (30) Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on Microbiological Criteria for Foodstuffs. *OJ L 338*, 22.12.2005, pp. 1–26. <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj>
- (31) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Interpretação de Resultados de Ensaios Microbiológicos em Alimentos Prontos para Consumo e em Superfícies do Ambiente de Preparação e Distribuição Alimentar: Valores-Guia. Lisboa: INSA, 2019. <http://hdl.handle.net/10400.18/5610>
- (32) Pereira APM, Stelari HA, Carlin F, et al. Inactivation kinetics of *Bacillus cereus* and *Geobacillus stearothermophilus* spores through roasting of cocoa beans and nibs. *LWT*. Aug 2019;111:394-400. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.063>
- (33) Stoeckel M, Westermann AC, Atamer Z, et al. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores in infant formula under shear conditions. *Dairy Sci Technol*. Mar 2013;93(2):163-75. <https://doi.org/10.1007/s13594-012-0101-6>