

I probiotici: aspetti generali e valutazioni sulla sicurezza d'impiego

Riassunto

Studi e sperimentazioni di campo dimostrano che alcuni microorganismi appartenenti al genere *Bacillus* possono essere utilizzati efficacemente come probiotici per la sanificazione delle superfici nosocomiali, a causa della loro azione antibatterica e antifungina, essendo peraltro sicuri per la salute umana e l'ambiente. Oltre a trovare impiego in agricoltura, nella alimentazione umana e animale, nella produzione di biopolimeri e come agenti immunostimolanti per aiutare il trattamento delle malattie del tratto gastrointestinale e urinario, in generale i probiotici sono in grado di contrastare efficacemente e nel tempo la proliferazione di altre specie batteriche potenzialmente patogene. A sostegno della sicurezza nell'impiego dei *Bacillus*, vengono inoltre descritte alcuni tipi di indagini (antibiogrammi e analisi molecolari) che, oltre ad constatare l'efficacia, nei confronti di queste specie microbiche, della maggior parte degli antibiotici, in grado di verificare e monitorare il livello di sicurezza dei prodotti probiotici usati.

A. Vandini*, E. Caselli*, A. Branchini**, M.T. Camerada*, L. Lanzoni*, D. Platano***, P.G. Balboni*, S. Mazzacane*

* CIAS, Centro studi Inquinamento Ambienti elevata Sterilità, Centro di ricerca interdipartimentale Dipartimento di Architettura e Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Ferrara

** Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie, Università di Ferrara

*** Dipartimento di Biomedicina e Scienze motorie, Università di Bologna

PAROLE CHIAVE:

Probiotico, bacilli sporigeni *Bacillus*, sicurezza microbica, Generally regarded as safe, antibiogramma, *real time* PCR.

INTRODUZIONE

Un numero sempre maggiore di microorganismi, considerati probiotici, sono riportati nella Banca dati biologica derivata dalla "Collezione Nazionale di Microorganismi di interesse Agrario ed Agroindustriale" (COL.MIA), alla quale partecipa anche il Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA), ente nazionale di ricerca e sperimentazione con

particolari competenze scientifiche nel settore agricolo, agroindustriale, ittico e forestale.

I probiotici sono stati definiti dall'*International Life Science Institute* (ILSI) "complementi alimentari sotto forma di microorganismi viventi" (ad esempio *Lattobacilli*, *Bifidobatteri*), che hanno benefici effetti sull'equilibrio della flora intestinale umana e quindi sulla salute umana.

I probiotici sono attivi nel soste-

neri i meccanismi di difesa indeboliti dai trattamenti antibiotici ed associati a varie infezioni del tratto gastrointestinale.

Il problema maggiore nella loro applicazione è dovuto al fatto che non sempre sono stabili; ad esempio i *Lactobacilli* presentano una shelf life molto breve, venendo influenzati dalle condizioni ambientali in loco, che, se sfavorevoli, possono comprometterne la sopravvivenza e renderne inefficace l'utilizzo.

Tale problema è stato superato scegliendo opportune specie di probiotici, appartenenti al genere *Bacillus*, essendo questi caratterizzati dal processo di *sporulazione*.

In questo modo, per questi batteri è possibile la sopravvivenza anche in condizioni difficili, poiché formano una spora all'interno della quale restano quiescenti, fino alla loro rivitalizzazione (germinazione) che avviene quando i parametri ambientali migliorano.

Di recente è stata introdotta sul mercato una nuova gamma di prodotti sviluppati per la pulizia degli ambienti, basata per l'appunto sull'uso di una miscela di questi batteri probiotici del genere *Bacillus species* (spp.). (1, 2, 3)

Questo documento riassume quanto è riportato in bibliografia per ciò che attiene ai batteri *Bacillus spp.*

Le informazioni inerenti alla non patogenicità del ceppo *Bacillus spp.*, esposte qui di seguito, sono desunte dalla letteratura scientifica disponibile sull'argomento e riportata in appendice.

Il genere *Bacillus* comprende batteri gram-positivi, che si presentano in natura sotto la forma vegetativa e di spora (per questo motivo



Figura 1: Forma di spora (endospora) di *Bacillus spp. subtilis* al SEM (D.to SveB Università di Ferrara)

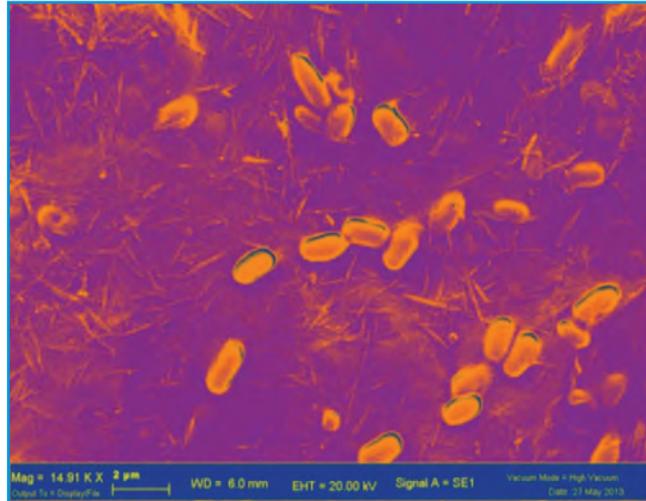


Figura 2: immagine di Spore di *B. subtilis* al SEM (D.to SveB Università di Ferrara)

vengono definiti bacilli sporigeni); sono saprofiti, ampiamente diffusi in natura (ubiquitari) e sono comunemente isolati da ambienti, quali acqua, suolo (4), aria, e residui vegetali in decomposizione.

Tra i batteri probiotici del genere *Bacillus*, la specie più studiata, che si può anche trovare in alcuni integratori probiotici, è quella del *Bacillus subtilis* (3).

Già una decina di anni fa il suo genoma è stato completamente sequenziato e sono stati pubblicati diversi studi di ricerca a favore della sua sicurezza come probiotico (5, 6, 7, 8).

La forma vegetativa, con metabolismo aerobio/anaerobio facoltativo e con poche esigenze nutrizionali, è in grado di moltiplicarsi e di colonizzare l'ambiente competendo con altri batteri potenzialmente patogeni.

La spora (Figura 1, 2 e 3) permette invece la permanenza del microorganismo nell'ambiente in condizioni avverse, mantenendo la capacità di germinare non appena si rinnovano condizioni favorevoli per la forma vegetativa (Figura 4).

Gli effetti benefici di spore di *B. subtilis*, come preparazione probiotica, sono relativi all'equilibrio

della microflora intestinale per il trattamento o per la prevenzione di disturbi intestinali (9).

I dati su infezioni sostenute da *B. subtilis* sono limitati, mentre, per quanto riguarda le cause di morte, nella statistica dell'Organizzazione Mondiale della Sanità non ne esistono affatto.

Nel genoma del *Bacillus subtilis* non sono stati riscontrati geni responsabili di produzione di tossine o altre sostanze nocive, quali emolisina e lecitinasi.

Il fenomeno delle resistenze microbiche agli antibiotici deriva soprattutto dal potenziale trasferimento

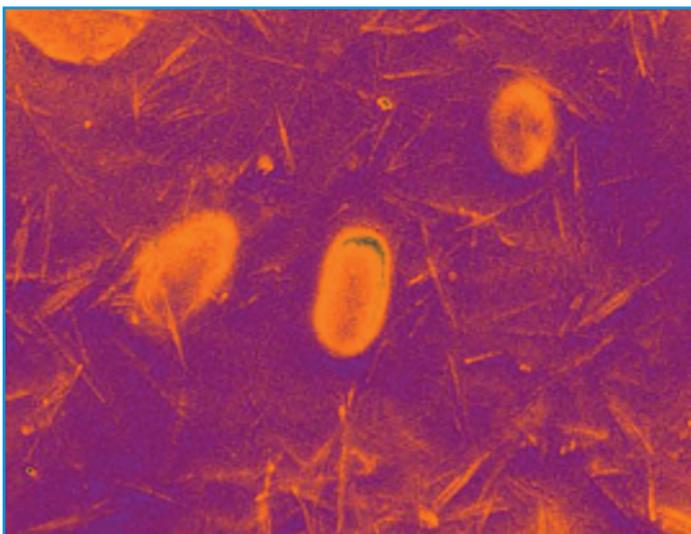


Figura 3: immagine di Spore di *B. subtilis* al SEM (D.to SveB Università di Ferrara)



Figura 4: Piastra Petri con colonie di *B. subtilis*.

genico da alcuni batteri, che possiedono questi geni di resistenza, ai batteri patogeni, che a loro volta sono in grado di acquisire resistenza o di sviluppare delle multiple antibiotico-resistenze.

Nel 2008 è stato condotto uno studio sulla resistenza di una serie di antibiotici del genere *Bacillus* dimostrando che i ceppi *Bacillus* sono sensibili agli antibiotici presi in esame, utilizzati frequentemente anche nel campo medico [European Food Safety Authority - EFSA - (11)].

Al genere *Bacillus* appartengono due specie patogene, *B. anthracis* e *B. cereus*, ma la sicurezza delle altre specie di *Bacillus* è ampiamente documentata (2).

Sono stati effettuati numerosi test di tossicità acuta e subcronica sugli animali; studi "in vitro" sono stati eseguiti su un certo numero di specie, tra cui *B. subtilis var. natto* (5), *B. indicus* (5), *B. coagulans* (19) e *B. subtilis 2335* (6), senza rilevare nessun effetto indesiderato.

Il *Bacillus subtilis* è utilizzato con sicurezza nella produzione di enzimi di tipo alimentare e, negli ultimi dieci anni, ceppi ricombinanti di *Bacillus subtilis* sono stati utilizzati con sicurezza nella fabbricazione di una varietà di prodotti edibili bio-industriali, quali enzimi, vitamine, antibiotici, biopolimeri, additivi e per la produzione di determinati alimenti, come miso (derivato dalla lavorazione della soia) in Giappone (da *B. subtilis var. natto*).

Gli enzimi derivati da *B. subtilis* sono alfa-acetolattato decarbossilasi, alfa-amilasi, betaglucanasi, glutaminasi, maltogenici amilasi, pullulanasi, proteasi e xilanasi.

Il *B. subtilis* è classificato come Classe 1 (rischio nessuno) dal National Institute of Health (NIH - US) (12,13).

Come specie tipo, il *Bacillus subtilis* non è considerato un patogeno ed è generalmente rappresentato come esempio di microrganismo

non patogeno (5, 9, 13); non è tossigeno (non produce tossine) in base ai criteri della US Environmental Protection Agency (EPA) ed è uno dei 10 organismi ospiti a beneficiare di un'esenzione Tier I nell'ambito della normativa EPA, riguardante la classificazione del rischio (14).

Inoltre il *B. subtilis* è utilizzato come inoculante nel suolo in orticoltura e agricoltura.

B. globigii, una specie simile, ma filogeneticamente distinta, è stato usato come simulatore di diffusione batterica tracciabile (innocua) in una simulazione di guerra biologica durante il progetto SHAD (detto Progetto 112) (15).

Enzimi prodotti da *B. subtilis* sono ampiamente utilizzati come additivi ad attività biologica pulente in ammollo nei detersivi per bucato. Nella piscicoltura è stata provata sia in vitro che in vivo l'attività enzimatica del *B. cereus* e del *B. subtilis* nei confronti dei rotiferi in allevamenti ittici; inoltre, è stata dimostrata la forte inibizione nei confronti dei batteri patogeni *Aeromonas hydrophyla* e *Vibrio alginolyticus*, causa di infezioni nei pesci (16,17).

Una notevole gamma di cibi fermentati si ritengono ottenuti anche per l'attività proteolitica ed enzimatica del *Bacillus subtilis*.

Il *B. subtilis* ceppo QST 713 (commercializzato come QST 713 o *Serenade*) ha un'attività fungicida naturale, ed è impiegato come agente di controllo biologico (18).

I prodotti a base di *Bacillus* spp. sono popolari in tutto il mondo prima dell'introduzione degli antibiotici come vaccini subtilici, ovvero come agenti immunostimolanti per aiutare il trattamento delle malattie del tratto gastrointestinale e urinario.

Sono ancora ampiamente utilizzati in Europa occidentale ed in Medio Oriente come una medicina alternativa (19).

In conclusione è possibile affermare che i batteri del genere *Bacillus*, in quanto considerati sicuri, sono utilizzati in agricoltura, (18, 19) orticoltura, nella alimentazione umana (20) e in veterinaria (21, 22, 23,24).

Diverse specie di *Bacillus* sono state classificate GRAS (*Generally regarded as safe*), poiché usate in processi alimentari o in preparazioni farmaceutiche, e quindi riconosciute dalla FDA (*Food and Drug Administration*) come trattamenti per scopi umani senza effetti collaterali (25, 26, 27,28).

Non inducono la formazione di batteri patogeni, sono biodegradabili e sicuri per l'ambiente.

ANALISI BIBLIOGRAFICA

La coniazione della parola "probiotico" ha una lunga storia che vede il primo suggerimento riguardo all'uso dei batteri in senso probiotico risalente ai primi del '900 (29, 30), termine che in realtà non venne coniato fino al 1960 quando venne utilizzato per indicare sostanze prodotte da microorganismi che promuovono la crescita di altri microorganismi (31). Successivamente, seguirono altre definizioni di "probiotico", inteso come "un microorganismo vitale di tipo alimentare che ha un effetto benefico grazie al miglioramento del bilancio intestinale dell'organismo ospite" (32). Questa definizione venne poi estesa come "una monocoltura o coltura mista vitale di batteri che, quando applicati ad animali o uomini, hanno impatto benefico sull'ospite grazie al miglioramento delle proprietà della flora endogena" (33). Una più recente definizione, invece, descrive i probiotici come "microorganismi vitali che, quando consumati in quantità adeguata, conferiscono un effetto salutare all'ospite" (34). Tuttora la definizione maggiormente diffusa, riconosciuta ed accettata descrive

i probiotici come una preparazione di microrganismi vitali in grado di apportare un beneficio per la salute dell'ospite una volta assunti (35), e per questo motivo sono stati ampiamente utilizzati come supplementi a seguito di alterazioni sia qualitative che quantitative della flora intestinale. In aggiunta, il processo di "interferenza batterica", secondo la quale batteri commensali vengono impiegati per prevenire la colonizzazione dell'ospite da parte di organismi patogeni, è stato mostrato una modalità utile per la prevenzione e il trattamento delle infezioni sia *in vitro* che in modelli animali (36, 37, 38).

Numerosi studi sugli organismi probiotici, infatti, ne hanno rivelato il potenziale utilizzo per il trattamento di diverse malattie, come ad esempio quelle che coinvolgono il tratto gastrointestinale (39, 40, 41). In questo senso, è stata recentemente documentata l'efficacia dei probiotici per il trattamento delle gastroenteriti acute nei bambini e per la prevenzione degli stati diarroici legati all'uso di antibiotici sia in adulti che in bambini (42). Trial clinici sull'uomo e studi su modelli animali hanno mostrato che i probiotici hanno un ampio potenziale di utilizzo per prevenire, trattare o alleviare i sintomi in alcuni stati patologici legati a carie, periodontiti e vari altri stati patologici tra cui anche otiti e stati allergici come la rinite allergica (43, 44, 45, 46, 47). Nel caso della salute orale, in anni recenti si è sviluppato un crescente interesse rivolto all'uso dei probiotici per il mantenimento dello stato di salute a livello orale e per il trattamento di infezioni orali (48), tra le quali emerge anche uno studio recentissimo inerente al trattamento di stomatiti dovute a candidosi (49). Questi aspetti di trattamento e di uso medico/clinico dei probiotici sono stati riportati ed analizzati in un recente resoconto della Agency for Healthcare

Research and Quality (AHRQ) (50), una delle agenzie che fanno parte dello United States Department of Health and Human Services.

Allo stesso modo, la promettente strategia, che prevede un passaggio "concettuale" dell'utilizzo di batteri probiotici da un'applicazione legata all'alimentazione ad una relativa a procedure di pulizia, si basa sull'ipotesi che essi possano colonizzare le superfici inanimate sulle quali vengono applicati e contrastare di conseguenza la proliferazione di altre specie batteriche (51), incluse quelle normalmente riconosciute come patogene per gli esseri umani. Scopo e applicazione di probiotici in questo senso sono racchiusi nel concetto di "biostabilizzazione", strettamente connesso al principio di esclusione competitiva (52, 53).

Studi sperimentali e clinici hanno mostrato che l'arricchimento della dieta con alcuni tipi di probiotici, porta a benefici quali l'attivazione del sistema immunitario e delle vie metaboliche, che ripristinano l'omeostasi tissutale e promuovono un generale stato di salute (54). Inoltre, attuali studi e ricerche sono volti a valutare la possibilità di impiego dei probiotici come potenziale strategia per la prevenzione e il controllo delle infezioni veicolate dal cibo (55). Per questo motivo, con il tempo, si è fatta avanti la possibilità di impiegare le spore come supplementi di tipo probiotico in una serie di prodotti alimentari, che si traduce quindi nell'utilizzo di batteri sporigeni come probiotici (56).

I batteri appartenenti al genere *Bacillus spp.* sono stati impiegati come probiotici in differenti applicazioni, quali supplementi per la dieta nell'alimentazione sia umana che animale, data la loro capacità di stimolare il sistema immunitario (57). In particolare, il *Bacillus subtilis* è stato indicato come sicu-

ro per il consumo per l'uomo (58, 59), nelle forme, sia vitale sia di spora (60), e attualmente si stanno facendo largo crescenti evidenze a favore dell'uso di questi microrganismi non patogeni nella preparazione del cibo (61, 62), dato che la loro natura non patogena e patogena per l'uomo è ben conosciuta da tempo (63).

Uno degli aspetti cruciali è dato dalla sicurezza applicativa di questi batteri appartenenti al genere *Bacillus*, tra i quali, in particolar modo, il *Bacillus subtilis*, così come il *Bacillus pumilus* e il *Bacillus megaterium*, risultano non pericolosi per l'uomo e di grande interesse dal punto di vista biotecnologico e biofarmaceutico (64, 65).

È importante notare come diversi ceppi di batteri probiotici siano stati indicati come sicuri per uso umano da numerosi studi (66, 67, 68), e classificati come microrganismi GRAS (*Generally Recognized As Safe*) dalla *Food and Drug Administration* (FDA). In particolare, il *Bacillus subtilis* è stato inserito nell'elenco degli organismi QPS (*Qualified Presumption of Safety*) dalla Autorità Europea per la Salute Alimentare (EFSA, *European Food Safety Authority*) già nel 2007 (69, 70).

Numerosi studi di rilievo scientifico, hanno dimostrato come il genere *Bacillus*, e in particolare il *Bacillus subtilis*, proprio per la sua grande versatilità e assenza di patogenicità possa essere impiegato come agente di biocontrollo per applicazioni di acquacoltura (71, 72, 73), agricoltura (74, 75) e come adiuvante nei vaccini (76, 77).

Un esempio importante dell'aspetto legato ai vaccini, descritto sia *in vitro* che in modelli animali, è dato dall'applicazione di spore batteriche come nuovi sistemi di veicolazione (78), e in particolare di quelle di *B. subtilis* per lo sviluppo di vaccini di grande rilevanza come quello per il tetano (79, 80, 81).

Classificazione	Bersaglio nella cellula batterica	Antibiotico:	Sigla e concentrazione
β -lattamico	Sintesi parete cellulare	PENICILLINA	P 10U
Cefalosporine β -lattamico	Sintesi parete cellulare	CEFALOTINA	CF 30 μ g
Cefalosporine β -lattamico	Sintesi parete cellulare	CEFOPERAZONE	CFP 30 μ g
Amminoglicosidi	Sintesi proteica	NETILMICINA	NET 10 μ g
Amminoglicosidi	Sintesi proteica	GENTAMICINA	G 10 μ g
Lincosamidi	Sintesi proteica	CLINDAMICINA	CC 2 μ g
Macrolidi	Sintesi proteica	ERITROMICINA	E 15 μ g
Chinoloni	Sintesi del DNA	ACIDO NALIDIXICO	NA 30 μ g
Cloramfenicolo	Sintesi proteica	CLORAMFENICOLO	C 30 μ g

ANTIBIOGRAMMA

Nello studio preliminare per ricercare l'antibiotico - resistenza dei ceppi di *Bacillus* è stato utilizzato l'antibiogramma (ABG), test *in vitro* di sensibilità dei microorganismi nei confronti di agenti antibatterici (*Antimicrobial Susceptibility Testing o AST*) effettuando il metodo di Kirby - Bauer (agar-diffusione).

L'AST è sottoposto a determinate regole definite a livello internazionale dal NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) e definisce la resistenza (R) o la sensibilità (S) o, nel caso si parli di sensibilità intermedia, (I) del microorganismo di prova nei confronti dell'antibiotico testato.

MATERIALI E METODI

Reagenti e terreno di coltura

I dischetti di nitrocellulosa imbibiti di antibiotici a concentrazione nota (Oxoid) sono riportati nella tabella sopra.

Si è inoltre fatto uso di Piastre di agar Mueller - Hinton agar (Oxoid): Mueller- Hinton agar (82), la cui semplice composizione non interferisce con i risultati del test di sensibilità microbica, della scala di McFarland standard utilizzata per la preparazione della sospensione batterica di prova (Biomerieux), di un misuratore per misurare le dimensioni della zona di inibizione (diametro espresso in mm) e del ceppo di controllo standard (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) (WVR: Pbi International).

Procedimento AST (83, 84)

Dopo incubazione di piastre di Triptic Soy Agar, corrispondenti al conteggio della conta totale provenienti dal campionamento *in campo*, soprattutto provenienti da due superfici, lavello e pavimento, delle strutture ospedaliere trattate con il protocollo di sanificazione a base di *Bacillus*, diverse colonie singole di batteri *Bacillus* (figura 5), di tipologia diversa, sono state singolarmente prelevate con un'ansa sterile e diluite in 4 ml di Tryptic Soy Broth.

Dopo incubazione in termostato a 35 ° C per 2 ore, viene regolata la torbidità della sospensione batterica di *Bacillus* con soluzione salina sterile, per ottenere una torbidità pari allo standard di 0,5 McFarland [equivalente di concentrazione batterica di 10⁸ UCF (unità formanti colonia)/ml].



Figura 5: Colonie di *Bacillus* species (spp.) cresciute sul terreno di coltura TSA (dopo 4 giorni di termostato a 37°C): si evidenziano colonie diverse a seconda della forma, della consistenza, dell'aspetto (colonia liscia o rugosa).

In parallelo sono state analizzate anche alcune colonie isolate dai prodotti detergenti, prodotto probiotico per pavimento (Floor Cleaner), prodotto probiotico per la linea mano (Interior Cleaner) e prodotto probiotici per i sanitari (Sanitary Cleaner), utilizzati nel protocollo di sanificazione in campo di strutture ospedaliere e un ceppo di Bacillus wild type, isolato dall'ambiente ospedaliero non trattato con probiotici. Mediante la tecnica della semina in

Interpretazione alone (diametro in mm)		Resistente	Intermedio	Sensibile
PENICILLINA	P 10U	≤28		≥19
CEFALOTINA	CF 30µg	≤14	15÷17	≥18
CEFOPERAZIONE	CFP 30µg	≤15	16÷20	≥21
NETILMICINA	NET 10µg	≤12	13÷14	≥15
GENTAMICINA	G 10µg	≤12	13÷14	≥15
CLINDAMICINA	CC 2µg	≤14	15÷20	≥21
ERITROMICINA	E 15µg	≤13	14÷22	≥23
ACIDO NALIDIXICO	NA 30µg	≤13	14÷18	≥19
CLORAMFENICOLO	C 30µg	≤12	13÷17	≥18

references: from document M100-S20 (M02-A10) Clinical and laboratory Standard Institute

Tabella 1 - Tabella di interpretazione degli aloni di inibizione degli antibiotici testati in base al documento "Document M100-S20 (M02-A10) Clinical and laboratory Standard Institute

ANTIBIOTICI DI PROVA	Antibiotico Beta- lattamico	Bersaglio: parete batterica
	PENICILLINA (conc. 10 U)	Interpretazione del Risultato
Diametro alone di inibizione (mm)		
Bacillus subtilis ATCC 6633 (ceppo di riferimento standard)	7	R
Bacillus wild type (ceppo selvatico)	12	R
Bacillus colonia tipologia 1 proveniente da confezione Floor Cleaner	10	R
Bacillus colonia tipologia 2 proveniente da confezione Interior Cleaner	14	R
Bacillus colonia tipologia 3 proveniente da confezione Sanitary Cleaner	20	S
Bacillus colonia tipologia 1 provenienza in campo (superficie lavello) Δt= 2 anni	15	S
Bacillus colonia tipologia 2 provenienza in campo (superficie lavello) Δt= 2 anni	0 (nessu alone)	R
Bacillus colonia tipologia 1 provenienza in campo (superficie lavello) Δt= 2 anni	0 (nessu alone)	R
Bacillus colonia tipologia 1 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 2 anni	0 (nessu alone)	R
Bacillus colonia tipologia 2 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 1 anno	0 (nessu alone)	R
Bacillus colonia tipologia 2 provenienza in campo (superficie lavello) Δt= 6 mesi	9	R
Bacillus colonia tipologia 1 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 6 mesi	0 (nessu alone)	R
Bacillus colonia tipologia 2 provenienza in campo (superficie lavello) Δt= 6 mesi	0 (nessu alone)	R
Bacillus colonia tipologia 3 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 18 mesi	15	R
Bacillus colonia tipologia 3 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 3 mesi	10	R
Bacillus colonia tipologia 1 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 3 mesi	0 (nessu alone)	R
Bacillus colonie miste (tipologia 1+ 2) provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 3 mesi	8	R

Tabella 2 - Risultati dell'antibiogramma nei confronti dell'antibiotico Penicillina (antibiotico β-lattamico); il suo meccanismo di azione consiste nella inibizione della formazione della parete batterica, bloccando la trans-peptidasi del peptidoglicano, costituente fondamentale della parete medesima.

ANTIBIOTICI DI PROVA	Antibiotico Beta- lattamico	Bersaglio: parete batterica	Antibiotico Beta- lattamico	Bersaglio: parete batterica
	CEFALOTINA (conc. 30µg)	Interpretazione del Risultato	CEFOPERAZIONE (conc. 30µg)	Interpretazione del Risultato
Diametro alone di inibizione (mm)				
Bacillus subtilis ATCC 6633 (ceppo di riferimento standard)	30	S	20	I
Bacillus wild type (ceppo selvatico)	20	S	19	I
Bacillus colonia tipologia 1 proveniente da confezione Floor Cleaner	10	R	14	R
Bacillus colonia tipologia 2 proveniente da confezione Interior Cleaner	24	S	19	I
Bacillus colonia tipologia 3 proveniente da confezione Sanitary Cleaner	23	S	20	I
Bacillus colonia tipologia 1 provenienza in campo (superficie lavello) Δt= 2 anni	30	S	30	S
Bacillus colonia tipologia 2 provenienza in campo (superficie lavello) Δt= 2 anni	33	S	25	S
Bacillus colonia tipologia 1 provenienza in campo (superficie lavello) Δt= 2 anni	0 (nessu alone)	R	12	R
Bacillus colonia tipologia 1 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 2 anni	30	S	23	S
Bacillus colonia tipologia 2 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 1 anno	32	S	30	S
Bacillus colonia tipologia 2 provenienza in campo (superficie lavello) Δt= 6 mesi	35	S	32	S
Bacillus colonia tipologia 1 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 6 mesi	7	R	15	R
Bacillus colonia tipologia 2 provenienza in campo (superficie lavello) Δt= 6 mesi	30	S	25	S
Bacillus colonia tipologia 3 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 18 mesi	30	S	20	I
Bacillus colonia tipologia 3 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 3 mesi	35	S	30	S
Bacillus colonia tipologia 1 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 3 mesi	35	S	26	I
Bacillus colonie miste (tipologia 1+ 2) provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 3 mesi	25	S	18	I

Tabella 3: Risultati dell'antibiogramma nei confronti degli antibiotici β-lattamici CEFALOSPORINE, il cui meccanismo di azione è (come per la Penicillina) l'inibizione della formazione della parete batterica:

ANTIBIOTICI DI PROVA	Antibiotico AMMINOGLICOSIDI	Bersaglio: sintesi proteica	Antibiotico NETILMICINA (conc. 10µg)	
	GENTAMICINA (conc. 10µg)	Interpretazione del Risultato	Diametro alone di inibizione (mm)	Interpretazione del Risultato
Bacillus subtilis ATCC 6633 (ceppo di riferimento standard)	25	S	28	S
Bacillus wild type (ceppo selvatico)	25	S	30	S
Bacillus colonia tipologia 1 proveniente da confezione Floor Cleaner	19	S	19	S
Bacillus colonia tipologia 2 proveniente da confezione Interior Cleaner	24	S	30	S
Bacillus colonia tipologia 3 proveniente da confezione Sanitary Cleaner	28	S	30	S
Bacillus colonia tipologia 1 provenienza in campo (superficie lavello) Δt= 2 anni	20	S	28	S
Bacillus colonia tipologia 2 provenienza in campo (superficie lavello) Δt= 2 anni	10	R	23	S
Bacillus colonia tipologia 1 provenienza in campo (superficie lavello) Δt= 2 anni	23	S	25	S
Bacillus colonia tipologia 1 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 2 anni	22	S	25	S
Bacillus colonia tipologia 2 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 1 anno	25	S	29	S
Bacillus colonia tipologia 2 provenienza in campo (superficie lavello) Δt= 6 mesi	20	S	25	S
Bacillus colonia tipologia 1 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 6 mesi	25	S	25	S
Bacillus colonia tipologia 2 provenienza in campo (superficie lavello) Δt= 6 mesi	25	S	35	S
Bacillus colonia tipologia 3 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 18 mesi	25	S	32	S
Bacillus colonia tipologia 3 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 3 mesi	30	S	35	S
Bacillus colonia tipologia 1 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 3 mesi	26	S	30	S
Bacillus colonie miste (tipologia 1+ 2) provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 3 mesi	27	S	32	S

Tabella 4: Risultati dell'antibiogramma nei confronti degli antibiotici AMMINOGLICOSIDI, il cui meccanismo di azione è l'inibizione della sintesi proteica:

ANTIBIOTICI DI PROVA	Antibiotico LINCOSAMIDI	Bersaglio: sintesi proteica	Antibiotico MACROLIDI	Bersaglio: sintesi proteica
	CLINDAMICINA (conc. 2µg)	Interpretazione del Risultato	ERITROMICINA (conc. 15µg)	Interpretazione del Risultato
Bacillus subtilis ATCC 6633 (ceppo di riferimento standard)	25	S	non eseguito	/
Bacillus wild type (ceppo selvatico)	20	I	non eseguito	/
Bacillus colonia tipologia 1 proveniente da confezione Floor Cleaner	15	I	23	S
Bacillus colonia tipologia 2 proveniente da confezione Interior Cleaner	18	I	35	S
Bacillus colonia tipologia 3 proveniente da confezione Sanitary Cleaner	25	S	non eseguito	/
Bacillus colonia tipologia 1 provenienza in campo (superficie lavello) Δt= 2 anni	20	I	25	S
Bacillus colonia tipologia 2 provenienza in campo (superficie lavello) Δt= 2 anni	19	I	27	S
Bacillus colonia tipologia 1 provenienza in campo (superficie lavello) Δt= 2 anni	19	I	15	I
Bacillus colonia tipologia 1 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 2 anni	13	R	18	I
Bacillus colonia tipologia 2 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 1 anno	12	R	30	S
Bacillus colonia tipologia 2 provenienza in campo (superficie lavello) Δt= 6 mesi	10	R	25	S
Bacillus colonia tipologia 1 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 6 mesi	22	S	11	R
Bacillus colonia tipologia 2 provenienza in campo (superficie lavello) Δt= 6 mesi	15	S	non eseguito	/
Bacillus colonia tipologia 3 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 18 mesi	16	I	non eseguito	/
Bacillus colonia tipologia 3 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 3 mesi	25	S	non eseguito	/
Bacillus colonia tipologia 1 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 3 mesi	23	S	non eseguito	/
Bacillus colonie miste (tipologia 1+ 2) provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 3 mesi	0 (nessu alone)	R	non eseguito	/

Tabella 5: Risultati dell'antibiogramma nei confronti di altri antibiotici con strutture chimiche, LINCOSAMIDI e MACROLIDI, il cui meccanismo di azione è sempre diretto all'inibizione della sintesi proteica:

superficie, ogni sospensione batterica di *Bacillus* ottenuta è stata distribuita, in modo omogeneo, su tutta la superficie della piastra di Mueller- Hinton con un movimento circolare .

I dischetti antibiotati sono stati applicati sulla piastra dopo circa 15

minuti dalla semina batterica, adeguatamente distanziati. Dopo incubazione a 37 ° C per 24 - 48 ore, si è proceduto alla lettura dei risultati, ovvero alla misura dei diametri degli aloni di inibizione (mm).

Questa misura è stata confrontata con i valori di riferimento di ogni an-

tibiotico contenuti nel database del Document M100-S20 (M02-A10) del *Clinical an Laboratory Standard Institute*, in modo da poter definire la sensibilità (S), la sensibilità intermedia (I) o la resistenza batterica (R).

I valori che si possono avere ad esempio per le penicilline sono 3:

ANTIBIOTICI DI PROVA	Antibiotico CHINOLONI	Bersaglio: sintesi del DNA	Antibiotico	Bersaglio: sintesi proteica
	ACIDO NAUDIXICO (conc. 30µg)	Interpretazione del Risultato	CLORAMFENICOLO (conc. 30µg)	Interpretazione del Risultato
	Diametro alone di inibizione (mm)		Diametro alone di inibizione (mm)	
Bacillus subtilis ATCC 6633 (ceppo di riferimento standard)	non eseguito	/	23	S
Bacillus wild type (ceppo selvatico)	non eseguito	/	non eseguito	/
Bacillus colonia tipologia 1 proveniente da confezione Floor Cleaner	20	S	20	S
Bacillus colonia tipologia 2 proveniente da confezione Interior Cleaner	11	R	8	R
Bacillus colonia tipologia 3 proveniente da confezione Sanitary Cleaner	non eseguito	/	non eseguito	/
Bacillus colonia tipologia 1 provenienza in campo (superficie lavello) Δt= 2 anni	20	S	23	S
Bacillus colonia tipologia 2 provenienza in campo (superficie lavello) Δt= 2 anni	20	S	30	S
Bacillus colonia tipologia 1 provenienza in campo (superficie lavello) Δt= 2 anni	20	S	25	S
Bacillus colonia tipologia 1 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 2 anni	non eseguito	/	19	S
Bacillus colonia tipologia 2 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 1 anno	26	S	25	S
Bacillus colonia tipologia 2 provenienza in campo (superficie lavello) Δt= 6 mesi	28	S	22	S
Bacillus colonia tipologia 1 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 6 mesi	18	I	20	S
Bacillus colonia tipologia 2 provenienza in campo (superficie lavello) Δt= 6 mesi	non eseguito	/	non eseguito	/
Bacillus colonia tipologia 3 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 18 mesi	non eseguito	/	non eseguito	/
Bacillus colonia tipologia 3 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 3 mesi	non eseguito	/	non eseguito	/
Bacillus colonia tipologia 1 provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 3 mesi	non eseguito	/	non eseguito	/
Bacillus colonie miste (tipologia 1+ 2) provenienza in campo (superficie pavimento) Δt= 3 mesi	non eseguito	/	non eseguito	/

Tabella 6: Risultati dell'antibiogramma nei confronti di altri antibiotici con strutture chimiche diverse, quali il Cloramfenicolo, il cui meccanismo di azione è sempre diretto all'inibizione della sintesi proteica e i CHINOLONI, che inibiscono la sintesi del DNA:

1. Alone di 1 - 13 millimetri (mm): batterio resistente (R).
2. Alone di 14 - 16 millimetri (mm): batterio con resistenza intermedia (I).
3. Alone di 17 - 30 millimetri (mm): batterio sensibile (S).

RISULTATI

I risultati ottenuti sono riportati di seguito nelle tabelle (Tabella 1, 2, 3, 4, 5 e 6), indicando gli intervalli di tempo in Δt, corrispondenti ai periodi di trattamento con probiotico. Nella prima tabella (Tabella 1) è stato riportato l'elenco degli antibiotici utilizzati e rispettivamente i valori di interpretazione degli aloni di inibizione di riferimento.

DISCUSSIONE

Gli antibiogrammi sono stati eseguiti su 12 diverse colonie caratteristiche di *Bacillus spp.*, provenienti dai punti di prelievo (pavimento, lavello) dei campionamenti *in campo* effettuati in diverse strutture ospedaliere, sottoposte a periodi differenti di trattamento con protocollo PCHS.

Le colonie di *Bacillus* sono state isolate dall'ospedale Del Delta (Ferrara), in cui viene effettuata questa sanificazione da circa 2 anni, e da altre strutture, quali gli Ospedali di Oderzo (TV), di Carate Brianza e Monza, di Argenta e Cento, trattati rispettivamente da 18 mesi, 6 mesi

e da 3 mesi.

I risultati ottenuti evidenziano che la maggior parte dei *Bacillus spp.* isolati sono sensibili agli antibiotici testati (Figura 6 e 7), eccetto che per la Penicillina.

La resistenza nei confronti dell'antibiotico Penicillina, come eviden-



Figura 6 - Colonia Bacillus spp. proveniente dal campionamento eseguito presso Degenza ospedaliera dopo 3 mesi di protocollo probiotico. Sensibilità nei confronti dell'antibiotico.



Figura 7 - Colonia *Bacillus* spp. proveniente dal campionamento in campo eseguito presso Degenza ospedaliera dopo 3 mesi di protocollo probiotico - Sensibilità nei confronti dell' antibiotico.

ziato anche per il ceppo standard ATCC, è una resistenza naturale caratteristica del genere *Bacillus* e non è una resistenza acquisita.

Tra il genere *Bacillus* la sensibilità all'antibiotico Penicillina è una prova per distinguere il ceppo patogeno *Bacillus anthracis*, che è sensibile alla Penicillina, dalle altre specie di *Bacillus* non patogene, che presentano geneticamente la resistenza alla Penicillina.

Osservando i risultati si evidenzia che le diverse specie di *Bacillus* provenienti dal campionamento *in campo*, sono sensibili agli antibiotici Amminoglicosidi (16 sensibili eccetto 1 resistente alla gentamicina).

Sono state rilevate diverse sensibilità anche nei confronti delle altre classi di antibiotici, anche se si sono evidenziati 7 resistenti e 6 intermedi alle cefalosporine, 3 resistenti e 7 intermedi alla Clindamicina, 1 resistente e 2 intermedi all'Eritromicina (eseguiti 9 su 17 campioni totali), 1 resistente e 1 intermedio ai Chinoloni.

Dai risultati ottenuti è possibile osservare che tutte le diverse tipo-

logie di colonie di *Bacillus* spp., che hanno colonizzato le superfici ospedaliere e che sono state raccolte dall'ambiente, mediante campionamento con piastre a contatto TSA, vengono inibite dalla maggior parte degli antibiotici presi in esame.

I risultati di sensibilità ottenuti dai ceppi di *Bacillus* in campo sono paragonabili a quelli ottenuti esaminando il ceppo di controllo *Bacillus subtilis* standard ATCC 6633, anche se non è stato testato nei confronti del Macrolidi e Chinoloni.

I ceppi *Bacillus* isolati dalla confezione chiusa dei prodotti a base di probiotici (utilizzati *in campo* nel sistema PCHS) presentano in generale lo stesso profilo di sensibilità nei confronti degli antibiotici utilizzati, confrontabile peraltro con i risultati ottenuti dal ceppo di controllo *Bacillus subtilis* standard ATCC 6633, eccetto che per il prodotto Interior Cleaner, che risulta resistente alla Penicillina, Chinoloni e Cloramfenicolo e ha una sensibilità intermedia alle Cefoperazone e alla Clindamicina (Lincosidi).

LE INDAGINI MOLECOLARI NELLA VALUTAZIONE DELLA SICUREZZA ED EFFICACIA DI PRODOTTI A BASE DI BACILLUS SPP.

Negli ultimi anni si sono sviluppati e affermati prodotti detergenti a base di spore di *Bacillus subtilis*, in grado di esercitare una azione antibatterica e antifungina, grazie a meccanismi che comprendono la competizione per il substrato tra specie microbiche e la produzione da parte di *Bacillus* di una serie di sostanze ad azione antibatterica (85).

Utilizzati con successo come antifungino in agricoltura, questi prodotti sono attualmente usati anche per la detersione/disinfezione delle superfici in molti centri ospedalieri, perciò si è ipotizzato un loro possibile uso anche in altri campi, quali la sanitizzazione delle acque e la manipolazione e produzione di prodotti alimentari per uso umano.

Per quanto riguarda il monitoraggio ambientale, i dati raccolti finora attraverso la ricerca in campo etuttora in corso presso varie strutture ospedaliere, stanno dimostrando che i prodotti a base di spore di *Bacillus* ATCC (*American Type Collection Control*), costituite da *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus megaterium*, possiedono un'ottima efficacia nel competere con i microrganismi patogeni e nell'abbassarne il carico sulle superfici trattate. Avendo dimostrato che, dopo periodi di trattamento differenti (dopo tre mesi, dopo un anno e dopo due anni di utilizzo dei prodotti a base di *Bacillus*) sulle superfici la presenza dei *Bacillus* è costante e a livelli di carica controllata, la ricerca è stata implementata, per dimostrarne la sicurezza per l'impiego umano, secondo i criteri definiti dalla *European Food Safety*

Authority (EFSA) relativi allo status QPS (Presunzione Qualificata di Sicurezza).

La maggiore quantità di informazioni presenti in letteratura riguarda lo studio della specie *B. subtilis*, che è ampiamente distribuita nell'ambiente, in cui si trova principalmente sotto forma di spore, una forma di resistenza quiescente, non metabolicamente attiva, in grado di germinare nella forma vegetativa, qualora le condizioni ambientali siano idonee alla crescita del batterio. Oltre che nell'ambiente esterno, *B. subtilis* si trova frequentemente anche nel tratto gastrointestinale umano, tanto che recentemente questo batterio viene considerato non più solo come un batterio ambientale, ma residente nell'organismo umano (86, 87).

Il genoma (cromosoma batterico) del *B. subtilis* è stato completamente sequenziato e viene considerato privo di potere patogeno, in quanto sprovvisto di fattori di virulenza idonei a renderlo capace di produrre malattia.

A fronte di questi dati rassicuranti, appare tuttavia importante l'analisi della possibile acquisizione di resistenze ai farmaci antibatterici, in quanto questa possibilità legata alla possibilità di trasferimento genico interspecie, è teoricamente possibile ed è stata osservata in vitro (88, 89, 90, 91, 92).

Attualmente, i dati finora raccolti, attraverso l'analisi dei *Bacillus* isolati sul campo mediante antibiogramma, non hanno evidenziato variazioni del profilo di sensibilità/resistenza agli antibiotici, rispetto alle specie utilizzate nei detergenti.

L'antibiogramma è un classico metodo di indagine tuttora valido; tuttavia, la letteratura scientifica più recente suggerisce che, nella valutazione della sicurezza microbiologica, i metodi classici possano essere efficacemente

implementati da indagini di tipo molecolare, che hanno il vantaggio di utilizzare saggi (microarrays), che permettono di valutare simultaneamente diverse decine di fattori di resistenza differenti in uno stesso campione, inclusi quelli non comunemente presenti negli antibiogrammi classici, usati di routine (93, 94). Un ulteriore vantaggio è rappresentato dalla sensibilità estremamente elevata, che consente di evidenziare anche poche copie del fattore di resistenza in esame.

Le analisi molecolari possono quindi permettere di verificare con precisione il livello di sicurezza nell'impiego del prodotto probiotico, confermando e implementando le analisi batteriologiche classiche.

Le tecniche utilizzate per questo tipo di analisi si basano sui sistemi di amplificazione del materiale genetico mediante *real time* PCR quantitativa (qPCR), una metodologia estremamente sensibile, che consente di evidenziare i fattori di resistenza, anche quando il loro quantitativo è inferiore alla soglia di rilevazione, rispetto alle classiche tecniche di valutazione mediante antibiogramma dopo isolamento colturale.

Tale tipo di analisi fornisce, non solo una risposta negativa/positiva sulla presenza di un certo tipo di resistenza, ma è anche in grado di dare una valutazione quantitativa della singola resistenza, fornendo quindi un utile strumento di monitoraggio sul numero di batteri dotati, effettivamente, della resistenza evidenziata.

L'utilizzo di questa metodica, inoltre, ha il vantaggio di poter essere applicato sia ai ceppi di *Bacillus* ottenuti dopo isolamento colturale che sulla popolazione batterica totale presente sulle superfici prima e dopo il trattamento con *Bacillus*. Questo tipo di monitoraggio può perciò essere utile, non solo

per rilevare eventuali resistenze acquisite da *Bacillus*, ma anche per quantificare l'andamento delle resistenze complessivamente presenti nella popolazione batterica residua al termine del trattamento, confrontandole con quelle presenti prima del trattamento ed evidenziando gli eventuali decrementi significativi delle resistenze nel loro complesso.

In altri termini con queste indagini, attualmente in fase di avviamento, si potrebbe definire:

il numero di microrganismi, residenti su una superficie oggetto di sanificazione, che hanno acquisito una resistenza specifica; e tra questi il numero di *Bacillus spp.*, residenti sulla medesima superficie, che hanno acquisito eventuali resistenze.

Un altro vantaggio di queste metodiche è rappresentato dal fatto che il campionamento sul campo può essere effettuato simultaneamente a quello previsto per le analisi classiche, senza necessità di impiegare ulteriore personale o materiale, e che il campione viene immediatamente refrigerato, non necessitando di una fase di crescita in coltura, evitando possibili crescite/contaminazioni successive del campione dopo la raccolta, e "fotografando" perciò la situazione reale al tempo di raccolta. È possibile quindi confrontare i diversi tempi di raccolta e/o diversi ambienti e superfici in un unico test molecolare, abbassando notevolmente la variabilità intertest e quindi l'errore.

L'analisi molecolare viene effettuata sull'acido nucleico (DNA) totale estratto dal campione, un procedimento che è pertanto totalmente indipendentemente dalle variazioni legate alle metodiche di isolamento colturale.

Nelle attese, l'applicazione di queste metodiche dovrebbe consentire di monitorare, con estrema accuratezza, sia la comparsa di eventua-

li resistenze nei ceppi di *Bacillus* utilizzati nel prodotto a base di probiotici del sistema Probiotic Health Care (PCHS), che l'andamento delle resistenze all'interno della popolazione batterica complessiva, fornendo utili strumenti numerici per la definizione di indicatori di processo (stima reale del rischio) per il sistema PCHS, ma anche per la valutazione della sicurezza e della efficacia di un qualunque protocollo e prodotto di sanificazione.

Ciò in linea anche con la richiesta pervenuta dall'EFSA di controllare costantemente l'elenco dei microrganismi con presunzione qualificata di sicurezza (QPS) e di aggiornare i criteri di resistenza antimicrobica utilizzati per valutare la sicurezza dell'uso dei microrganismi probiotici (95).

CONCLUSIONE

In conclusione è possibile affermare, in base alle conoscenze attuali e in base a quanto riportato in letteratura riguardo alla patogenesi e tossicologia, che i ceppi di batteri sporigeni *Bacillus*, impiegati nei prodotti del sistema *Probiotic Cleaning Hygien System* (PCHS), sono da ritenersi innocui per le persone e per l'ambiente, senza potenziale capacità tossigena (96) e sono sensibili alla maggior parte di antibiotici utilizzati nella medicina clinica.

BIBLIOGRAFIA

1. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: Report of a joint FAO/WHO Working Group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food," London Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.
2. Dong TC, Van Pham H, Cutting S M. *Bacillus* Probiotics. *Nutra foods* 2009; 8(2): 7-14
3. Logan, NA. Safety of Aerobic

Endospore-Forming Bacteria. In *Bacterial Spore Formers: Probiotics and Emerging Application*. Horizon Bioscience, Wymondham, Norfolk, UK. 2004; 93-105

4. Eric GH. Soil organisms: *Bacillus Subtilis*. 2012; dal sito: gutflora.com/?p=379 All disease beings in the gut

5. Hong HA, Huang JM, Khaneja R, Hiep LV, Urdaci MC, Cutting SM. The Safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *Journal of Applied Microbiology* 2008; 105: 510-20.

6. Sorokulova IB, Pinchuk IV, Denayrolles M, Osipova IG, Huang JM, Cutting SM & Urdaci MC. The Safety of Two *Bacillus* Probiotic Strains for Human Use. *Digestive Diseases and Sciences* 2008; 53: 954-63.

7. Tompkins TA, Hagen KE, Wallace TD, Fillion-Forte V. Safety evaluation of two bacterial strains used in asian probiotic products. *Canadian Journal of Microbiology* 2008; 54: 391-400.

8. Cartwright P. *Bacillus subtilis* – Identification & Safety. Issue 2, U.K. 2009

9. The Safety of Two *Bacillus* Probiotic Strains for Human Use. *Digestive Diseases and Sciences*, 2008; 53: 954-63

10. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance 2 EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FE-EDAP) 3,4 European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy.

11. EFSA (2005) Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA Journal* 226: 1-12.

12. Jensen BF, Norman BE. *Bacillus acidopullulyticus pullulanae*: Application and Regulatory

Aspects for Use in the Food Industry. *Process Biochemistry* 1984; 19(4): 129-34.

13. Food and Drug Administration. Statement of Policy for Regulating Biotechnology Products. *Federal Register*, 1986; 51: 23301-50.

14. Environmental Protection Agency. Microbial products of biotechnology: final regulation under the Toxic Substances Control Act; final decision document. *Federal Register* 1997; 62: 179 10-1795 8.

15. Ryan KJ, Ray CG. *Bacillus subtilis*. 2004. Dal sito: it.wikipedia.org/wiki/Bacillus_subtilis.

16. *Bacillus subtilis*. Dal sito: en.wikipedia.org/w/index.php?title=Bacillus_subtilis&oldid=516913856.

17. Li WF, Deng B, Cui ZW, Fu LQ, Chen NN, Zhou XX, Shen WY, Yu DY. Several Indicators of Immunity and Antioxidant Activities Improved in Grass Carp Given a Diet Containing *Bacillus* Additive. *Journal of animal and Veterinary Advances* 2012; 11 (14): 2392-97.

18. Murillo I, Villamil L. *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* used as probiotics in rotifer (*Brachionus plicatilis*) cultures. *J Aquac Res Development* 2011; S1:007. doi:10.4172/2155-9546.S1-007.

19. Zongzheng Y, Xin L, Zhong L, Jinzhao P, Jin Q, Wenyan Y. Effect of *Bacillus Subtilis* SY1 on antifungal activity and plant growth. *Int J Agric & Biol Eng*, 2009; Open Access Vol. 2 No.4: 55.

20. Roberti R, Selmi C. Biological control of plant pathogens by *Bacillus subtilis*. *Informatore Fitopatologico*, Jul-Aug 1999.

21. Endres JR, Clewell A, Jade KA, Farber T et al. Safety assessment of a proprietary preparation of a novel Probiotic, *Bacillus coagulans*, as a food ingredient, 2009.

22. *Food Chem Toxicol*.

23. Scientific Opinion on the safety and efficacy of *Bacillus subtilis* PB6 (*Bacillus subtilis*) as a

- feed additive for chickens for fattening- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). *EFSA Journal* 2009; 7(9):1314.
24. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2012. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, 10(3):2597. Dal sito: www.efsa.europa.eu/de/efsa-journal/pub/2597.htm.
25. Suggested citation: EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). *EFSA Journal* 2011;9(11):2445.
26. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) - Panel Members Gabriele Aquilina, Georges Bories, Andrew Chesson, Pier Sandro Cocconcelli, Joop de Knecht, Noël Albert Dierick, Mikolaj Antoni Gralak, Jürgen Gropp, Ingrid Halle, Christer Hogstrand, Reinhard Kroker, Lubomir Leng, Secundino Lopez Puente, Anne-Katrine Lundebye Haldorsen, Alberto Mantovani, Giovanna Martelli, Miklós Mézes, Derek Renshaw, Maria Saarela, Kristen Sejrson and Johannes Westendorf Guidance of the Scientific Committee/Scientific Panel On request from: EFSA Question number: EFSA-Q-2009-00973 Adopted: 15 November 2011 Published: 25 November 2011 Affiliation: European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy.
27. "EFSA JOURNAL " Technical Guidance on the assessment of the toxigenic potential of *Bacillus* species used in animal nutrition *EFSA Journal* 2011; 9(11):2445.
28. Food and Drug Administration. Statement of Policy for Regulating Biotechnology Products. Federal Register, June 26, 1986; 51: 23301-50.
29. Tissier H. Traitement des infections intestinales par la methode de la flore bacterienne de l'intestin. *CR. Soc. Biol.* 1906; 60: 359-61
30. Metchnikoff E. in: Heinemann, W. (Ed.), *The Prolongation of Life: Optimistic Studies*, Springer Publishing Company, London 1907; 61-183.
31. Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*. 1965 Feb 12; 147(3659):747-8.
32. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* 1989 May; 66(5):365-78.
33. Havenaar R, Huis in't Veld JHJ. The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease , Chapman & Hall, New York, NY. in: Wood BJB (Ed.). *The Lactic Acid Bacteria* 1992; 1: 209-24.
34. Guarner F, Schaafsma GJ. Probiotics. *Int J Food Microbiol.* 1998 Feb 17; 39(3):237-8.
35. Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001; 73(2 Suppl):361S-64S.
36. Falagas ME, Rafailidis PI, Markris GC. Bacterial interference for the prevention and treatment of infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2008 Jun; 31(6):518-22.
37. Bruzzese E, Callegari ML, Raia V, Viscovo S, Scotto R, Ferrari S, Morelli L, Buccigrossi V, Lo Vecchio A, Ruberto E, Guarino A. Disrupted intestinal microbiota and intestinal inflammation in children with cystic fibrosis and its restoration with *Lactobacillus GG*: a randomised clinical trial. *PLoS One.* 2014 Feb 19; 9(2):e87796.
38. Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2002 Aug; 82(1-4):279-89.
39. Allen SJ, Martinez EG, Gregorio GV, Dans LF. Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010 Nov 10; (11):CD003048.
40. Girardin M, Seidman EG. Indications for the use of probiotics in gastrointestinal diseases. *Dig Dis.* 2011; 29(6):574-87.
41. Hungin AP, Mulligan C, Pot B, Whorwell P, Agréus L, Fracasso P, Lionis C, Mendive J, Philippart de Foy JM, Rubin G, Winchester C, de Wit N; European Society for Primary Care Gastroenterology. Systematic review: probiotics in the management of lower gastrointestinal symptoms in clinical practice – an evidence-based international guide. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013 Oct; 38(8):864-86.
42. Passariello A, Agricole P, Malfertheiner P. A critical appraisal of probiotics (as drugs or food supplements) in gastrointestinal diseases. *Curr Med Res Opin.* 2014 Mar 13.
43. Stamatova I, Meurman JH. Probiotics: health benefits in the mouth. *Am J Dent.* 2009 Dec; 22(6):329-38.
44. Gupta G. Probiotics and periodontal health. *J Med Life.* 2011 Nov 14; 4(4):387-94.
45. Yu H. Bacteria-mediated disease therapy. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011 Dec; 92(6):1107-13.
46. Yang G, Liu ZQ, Yang PC. Treatment of Allergic Rhinitis with Probiotics: An Alternative Approach. *N Am J Med Sci.* 2013 Aug; 5(8):465-68.
47. Costa DJ, Marteau P, Amouyal M, Poulsen LK, Hamelmann E, Cazaubiel M, Housez B, Leuillet S, Stavnsbjerg M, Molimard P, Courau S, Bousquet J. Efficacy and safety of the probiotic *Lactobacillus paracasei* LP-33 in allergic rhinitis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial (GA2LEN Study). *Eur J Clin Nutr.* 2014 Feb 26.
48. Rao Y, Lingamneni B, Reddy D. Probiotics in oral health--a review. *J N J Dent Assoc.* 2012

- Spring;83(2):28-32.
49. Li D, Li Q, Liu C, Lin M, Li X, Xiao X, Zhu Z, Gong Q, Zhou H. Efficacy and safety of probiotics in the treatment of *Candida*-associated stomatitis. *Mycoses*. 2014 Mar; 57(3):141-6.
50. Hempel S, Newberry S, Ruelaz A, Wang Z, Miles JN, Suttrop MJ, Johnsen B, Shanman R, Slusser W, Fu N, Smith A, Roth B, Polak J, Motala A, Perry T, Shekelle PG. Safety of probiotics used to reduce risk and prevent or treat disease. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)*. 2011 Apr; (200):1-645.
51. Falagas ME, Makris GC. Probiotic bacteria and biosurfactants for nosocomial infection control: a hypothesis. *J. Hosp. Infect.* 2009; 71:301-306.
52. Gause, G. F. Experimental studies on the struggle for existence. *J. Exp. Biol.* 1932; 9:389-402.
53. Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Jan; 8(1):15-25.
54. Floch MH, Walker WA, Madssen K, Sanders ME, Macfarlane GT, Flint HJ, Dieleman LA, Ringel Y, Guandalini S, Kelly CP, Brandt LJ. Recommendations for probiotic use-2011 update. *J Clin Gastroenterol.* 2011 Nov; 45 Suppl:S168-71.
55. Amalaradjou MA, Bhunia AK. Modern approaches in probiotics research to control foodborne pathogens. *Adv Food Nutr Res.* 2012; 67:185-239.
56. Bader J, Albin A, Stahl U. Spore-forming bacteria and their utilisation as probiotics. *Benef Microbes.* 2012 Mar 1; 3(1):67-75.
57. Duc le H, Hong HA, Fairweather N, Ricca E, Cutting SM. Bacterial spores as vaccine vehicles. *Infect. Immun.* 2003; 71:2810-18.
58. Duc le H, Hong HA, Barbosa TM, Henriques AO, Cutting SM. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70:2161-71.
59. Sorokulova IB, Pinchuk IV, Denayrolles M, Osipova IG, Huang JM, Cutting SM, Urdaci MC. The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use. *Dig. Dis. Sci.* 2008; 53:954-63.
60. Hong HA, Duc le H, Cutting SM. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 2005; 29:8138-35.
61. Hong HA, Huang JM, Khaneja R, Hiep LV, Urdaci MC, Cutting SM. The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *J. Appl. Microbiol.* 2008; 105:510-20.
62. Permpoonpattana P, Hong HA, Khaneja R, Cutting SM. Evaluation of *Bacillus subtilis* strains as probiotics and their potential as a food ingredient. *Benef Microbes.* 2012 Jun 1;3(2):127-35.
63. de Boer AS, Diderichsen B. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1991 Oct;36(1):1-4.
64. Porwal S, Lal S, Cheema S, Kalia VC. Phylogeny in aid of the present and novel microbial lineages: diversity in *Bacillus*. *PLoS One.* 2009;4(2):e4438.
65. Vary PS, Biedendieck R, Fuerch T, Meinhardt F, Rohde M, Deckwer WD, Jahn D. *Bacillus megaterium*-from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007 Oct;76(5):957-67.
66. Sorokulova IB, Pinchuk IV, Denayrolles M, Osipova IG, Huang JM, Cutting SM, Urdaci MC. The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use. *Dig. Dis. Sci.* 2008; 53:954-63.
67. Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Jan;8(1):15-25.
68. Floch MH, Walker WA, Madssen K, Sanders ME, Macfarlane GT, Flint HJ, Dieleman LA, Ringel Y, Guandalini S, Kelly CP, Brandt LJ. Recommendations for probiotic use-2011 update. *J Clin Gastroenterol.* 2011 Nov;45 Suppl:S168-71.
69. Scientific Committee of the European Food and Safety Authority. Introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. Opinion of the Scientific Committee. Adopted 19 November 2007. *EFSA J.* 587:1.
70. European Food and Safety Authority. Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2012 update). 2012. *EFSA J.* 10:3020.
71. Gatesoupe FJ. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture.* 180:147-65.
72. Ran C, Carrias A, Williams MA, Capps N, Dan BC, Newton JC, Klopper JW, Ooi EL, Browdy CL, Terhune JS, Liles MR. Identification of *Bacillus* strains for biological control of catfish pathogens. *PLoS One.* 2012;7(9):e45793.
73. Leonel Ochoa-Solano J, Olmos-Soto J. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiol.* 2006 Sep;23(6):519-25.
74. Zhao Y, Selvaraj JN, Xing F, Zhou L, Wang Y, Song H, Tan X, Sun L, Sangare L, Folly YM, Liu Y. Antagonistic Action of *Bacillus subtilis* Strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PLoS One.* 2014 Mar 20; 9(3):e92486.
75. Adam M, Heuer H, Hallmann J. Bacterial antagonists of fungal pathogens also control root-knot nematodes by induced systemic resistance of tomato plants. *PLoS One.* 2014 Feb 28;9(2):e90402.
76. Barnes AG, Cerovic V, Hobson PS, Klavinskis LS. *Bacillus subtilis* spores: a novel microparticle adjuvant which can instruct a balanced Th1 and Th2 immune response to

- specific antigen. *Eur J Immunol*. 2007 Jun; 37(6):1538-47.
77. de Souza RD, Batista MT, Luiz WB, Cavalcante RC, Amorim JH, Bizerra RS, Martins EG, Ferreira LC. *Bacillus subtilis* spores as vaccine adjuvants: further insights into the mechanisms of action. *PLoS One*. 2014 Jan 27; 9(1):e87454.
78. Huang JM, Hong HA, Van Tong H, Hoang TH, Brisson A, Cutting SM. Mucosal delivery of antigens using adsorption to bacterial spores. *Vaccine*. 2010 Jan 22; 28(4):1021-30.
79. Lee S, Belitsky BR, Brown DW, Brinker JP, Kerstein KO, Herrmann JE, Keusch GT, Sonenshein AL, Tzipori S. Efficacy, heat stability and safety of intranasally administered *Bacillus subtilis* spore or vegetative cell vaccines expressing tetanus toxin fragment C. *Vaccine*. 2010 Sep 24; 28(41):6658-65.
80. Amuguni JH, Lee S, Kerstein KO, Brown DW, Belitsky BR, Herrmann JE, Keusch GT, Sonenshein AL, Tzipori S. Sublingually administered *Bacillus subtilis* cells expressing tetanus toxin C fragment induce protective systemic and mucosal antibodies against tetanus toxin in mice. *Vaccine*. 2011 Jun 24; 29(29-30):4778-84.
81. Amuguni H, Lee S, Kerstein K, Brown D, Belitsky B, Herrmann J, Keusch G, Sonenshein A, Tzipori S. Sublingual immunization with an engineered *Bacillus subtilis* strain expressing tetanus toxin fragment C induces systemic and mucosal immune responses in piglets. *Microbes Infect*. 2012 May; 14(5):447-56.
82. Jump up ^ <http://www.sli-deshare.net/doctorrao/antibiotic-sensitivity-testing-presentation>.
83. Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) 2009. M2-A9. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests.
84. Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). M45-A. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of infrequently isolated or fastidious bacteria 2006.
85. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* 2005; 56(4):845-57.
86. Hong HA, Khaneja R, Tam NM, Cazzato A, Tan S, Urdaci M, Brisson A, Gasbarrini A, Barnes I, Cutting SM. 2009a. *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. *Res Microbiol* 160(2):134-43.
87. Hong HA, To E, Fakhry S, Baccigalupi L, Ricca E, Cutting SM. 2009b. Defining the natural habitat of *Bacillus* spore-formers. *Res Microbiol* 160(6):375-79.
88. Lotareva OV, Poluektova EY, Fedorina EA, Nezametdinova VZ, Prozorov AA. [Inter- and intraspecies conjugal transfer of different plasmids in bacilli]. *Genetika* 2003; 39(8):1141-1144.
89. Lotareva OV, Prozorov AA. Conjugation transfer of chromosomal and plasmid genes in *Bacillus subtilis*. *Dokl Biol Sci*. 2006; 408:226-228.
90. Dai M, Lu J, Wang Y, Liu Z, Yuan Z. In vitro development and transfer of resistance to chlortetracycline in *Bacillus subtilis*. *J Microbiol* 2012; 50(5):807-812.
91. Lukin SA, Kosovich PV, Prozorov AA. [Transfer of transformation and conjugation plasmids from *Escherichia coli* to *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense*]. *Mol Gen Mikrobiol Virusol* 1991; (10):28-31.
92. Singh PK, Ramachandran G, Ramos-Ruiz R, Peiro-Pastor R, Abia D, Wu LJ, Meijer WJ. Mobility of the native *Bacillus subtilis* conjugative plasmid pLS20 is regulated by intercellular signaling. *PLoS Genet* 2013; 9(10):e1003892.
93. Perreten V., Vorlet-Fawer L., Slickers P., Ehrlich R., Kuhnert P. & Frey J. Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 2005; 43: 2291-302.
94. Frye JG, Lindsey RL, Rondeau G, Porwollik S, Long G, Mccllelland M, Jackson CR, Englen MD, Meinersmann RJ, Berrang ME, Davis JA, Barrett JB, Turpin JB, Thitaram SN, Fedorka-Cray PJ. Development of a DNA microarray to detect antimicrobial resistance genes identified in the National Center for Biotechnology Information 2010.
95. Link utili http://ec.europa.eu/dgs/health_consumer/index_en.htm (Commissione europea Sanco) - <http://www.efsa.europa.eu/> (EFSA) - [tp://ec.europa.eu/agriculture/index_it.htm](http://ec.europa.eu/agriculture/index_it.htm) (Commissione europea agricoltura) - <http://www.fda.gov/> (FDA) - <http://www.salute.gov.it/> (Ministero Salute).
96. European Food Safety Authority, 2008 The maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards (Question No EFSA-Q-2008-006). *The EFSA Journal* 2008; 923: 1-48.