



**Raccomandazioni dell'Associazione Tecnico Scientifica – S.I.T.La.B.
*Gruppo di lavoro Microbiologia e Virologia***

N.004/23

**VALUTAZIONE CAPACITÀ INIBENTE DI PAENIBACILLUS ALVEI
VERSO ALCUNI BATTERI MULTIRESISTENTI
PRESENTI IN AMBITO OSPEDALIERO**

A. Danchielli (Vicenza), G. Saccardo (Vicenza), E. Cenzato (Vicenza), L. Fallico (Vicenza), M. Rassu (Vicenza)

Rev. 1.0
SITLaB news
Publicato: 28 Aprile 2023
Copyright: © SITLaB

Abstract

Introduzione: Nel reparto di Ematologia dell'Ospedale San Bortolo AULSS8 Berica di Vicenza è stato ritrovato un germe sconosciuto, identificato dallo strumento MALDI TOF Bruker Biotyper come *Paenibacillus alvei*. L'identificazione è stata confermata anche mediante la tecnica *Next Generation Sequencing* performata dalla ditta BMR Genomics.

Obiettivo: L'obiettivo della ricerca è stato quello di valutare l'effetto inibitorio di *Paenibacillus alvei* sulle più comuni specie batteriche multiresistenti presenti in ambito ospedaliero in diverse condizioni di stress e non.

Materiali e metodi: Negli esperimenti sono stati misurati i diametri degli aloni di inibizione originatisi per azione di *Paenibacillus alvei* su 11 specie di ceppi multiresistenti selezionati da campioni clinici. La proprietà antibatterica del ceppo indagato è stata confrontata con uno dei disinfettanti maggiormente impiegati nell'Ospedale di Vicenza, ovvero il GIONEB prodotto dalla ditta GIOCHEMICA. È stata osservata l'attività inibitoria di *Paenibacillus alvei* anche a seguito di bollitura, sonicazione e filtrazione.

Risultati: Il *Paenibacillus alvei* è risultato più efficace in termini di azione antibatterica nei confronti di alcune delle specie considerate e indistintamente verso batteri Gram positivi e negativi. L'inibizione è risultata maggiore a seguito di bollitura e sonicazione del ceppo testato. Con questo studio abbiamo dimostrato la termoresistenza della sostanza prodotta da *Paenibacillus alvei* e la sua natura intra ed extracellulare.

Conclusioni: Studi più dettagliati sono necessari al fine di comprendere l'ecologia molecolare di questo ceppo e di individuare i geni responsabili della produzione di questa/e sostanza/e antibatterica/e, al fine di definirne le potenzialità e l'applicabilità reali in campo agroalimentare e biomedico. Ulteriori esperimenti dovrebbero essere implementati al fine di testare la reale efficacia e modalità d'azione di questo batterio ambientale come disinfettante naturale su superfici ospedaliere che albergano ceppi MDR patogeni di più frequente riscontro in ambito ospedaliero.

Parole chiave: Microbiologia, *Paenibacillus spp.*, antibatterico, multiresistente.

Introduzione

La specie *Paenibacillus alvei*, appartenente al genere *Paenibacillus* spp., è un batterio Gram positivo, produttore di endospore ovalari centrali o subterminali prevalentemente in risposta a condizioni ambientali inospitali. Queste endospore sono termoresistenti e pH stabili, come riportato in letteratura (3), consentendo a *P. alvei* di sopravvivere a condizioni di stress e di diffondersi a livello ubiquitario.

Nel novembre del 2021, durante i controlli routinari eseguiti periodicamente nel reparto di Ematologia dell'Ospedale San Bortolo AULSS8 Berica di Vicenza, è stato ritrovato un germe sconosciuto. L'esame di controllo era stato eseguito su un carrello dove solitamente venivano preparati gli antibiotici che dovevano poi essere somministrati ai pazienti del reparto. La specie di questo microrganismo è stata indagata presso il nostro laboratorio mediante esecuzione di un trapianto dello stesso su terreno Chromagar e successiva incubazione in termostato a 37°C al fine di ottenere una crescita colturale che ne consentisse l'identificazione mediante spettrometria di massa. Il giorno seguente, all'identificazione eseguita con lo strumento MALDI TOF Bruker Biotyper, il microrganismo è risultato appartenente al genere *Paenibacillus* e alla specie *alvei*, anche se con score molto bassi. Al fine di chiarire in modo certo la natura della specie indagata si è proceduto, quindi, al sequenziamento della stessa. Il DNA è stato isolato da una coltura overnight del batterio di interesse. Il sequenziamento è stato performato dalla ditta BMR Genomics mediante tecnica di *Next Generation Sequencing* o NGS. Questa analisi ha consentito di catalogare il nostro ceppo come nuovo, ovvero non presente tra i genomi dei ceppi di riferimento di *Paenibacillus alvei* registrati.

Il ceppo isolato nel settore di Ematologia (1156087), indicato in azzurro in *Figura 1*, presentava una similarità con un altro ceppo (GCA_000442535), anch'esso sporigeno, la cui intera sequenza genomica è riportata in GenBank sotto il nome di *P. alvei A6-6i* (7). Quest'ultimo era stato isolato da materiale prelevato da piante e suolo. Ad una prima ricerca bibliografica è risultato che alcune specie di *Paenibacillus alvei* sono in grado di inibire la crescita di patogeni multiresistenti grazie alla produzione di sostanze antibatteriche. In particolare, la *Food and Drug Administration*- FDA statunitense aveva pubblicato uno studio che dimostrava l'azione inibitoria di questo batterio (specie TS-15) contro un ceppo di *Salmonella* (MDR) patogeno per le piante (16). La comparazione di tutti i genomi noti di *Paenibacillus alvei* presenti in NCBI/EBI con il ceppo sequenziato e l'esecuzione dell'analisi filogenetica hanno confermato l'originalità dello stesso. Il ceppo indagato, infatti, si discosta dalle altre sequenze depositate e nessuno degli altri ceppi conosciuti presenta una percentuale di similarità ad esso superiore al 99.3%.

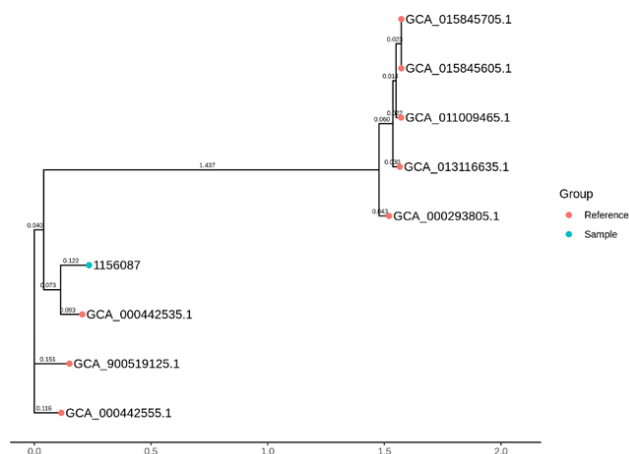


Figura 1: Analisi filogenetica

Obiettivi

L'obiettivo della ricerca era quello di valutare l'effetto inibitorio di *Paenibacillus alvei* sulle più comuni specie batteriche presenti in ambito ospedaliero - compresi i principali batteri multiresistenti - e considerare un suo possibile impiego come disinfettante naturale. Al fine di caratterizzare il ceppo ritrovato sono state eseguite, poi, alcune prove ulteriori in modo da cominciare a comprendere la natura del suo effetto inibitorio.

Materiali e metodi

Per questo studio sono state testate 11 specie totali di ceppi multiresistenti selezionate tra quelle maggiormente diffuse in ambito ospedaliero. Tutti i ceppi sono stati ottenuti da campioni clinici pervenuti all'Ospedale San Bortolo AULSS8 Berica di Vicenza. In particolare, le specie testate sono le seguenti:

- *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente (MDR);
- *Klebsiella pneumoniae* beta-lattamasi a spettro esteso (ESBLs);
- *Escherichia coli* beta-lattamasi a spettro esteso (ESBLs);
- *Acinetobacter baumannii* multiresistente (MDR);
- *Candida albicans* (MDR);
- *Burkholderia cepacia* (MDR);
- *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasi-produttrice (KPC);
- *Salmonella* D (MDR);
- *Streptococcus pneumoniae* penicillino-resistente;
- *Enterococcus faecium* vancomicina resistente (VRE);
- *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA).

Tali ceppi sono stati seminati in terreno Chromagar ed incubati in termostato a 37°C -tutti ad eccezione dell'*Enterococcus faecium* (VRE) che è stato seminato in agar cioccolato ed incubato in termostato a CO₂. Tutte le piastre di coltura utilizzate per questo studio sono prodotte dalla Becton Dickinson.

Dimostrazione attività inibitoria di *Paenibacillus alvei* su ceppi batterici MDR

L'obiettivo di questo primo esperimento era quello di dimostrare l'attività inibitoria del ceppo indagato contro le specie considerate e confrontare questa proprietà antibatterica con quella di uno dei disinfettanti maggiormente impiegati nell'Ospedale di Vicenza, ovvero il GIONEB prodotto dalla ditta GIOCHEMICA. Si tratta di una soluzione idroalcolica (grado alcolico 70°) disinfettante ad ampio spettro d'azione, costituita dall'associazione razionale di differenti agenti biocidi che tra loro manifestano azione sinergica.

Si è dato inizio all'esperimento creando una sospensione contenente una carica microbica pari a 0,5 McF per ciascuna delle 11 specie valutate. Questa sospensione è stata ottenuta mediante l'impiego dello strumento MicroScan Turbidity Meter di Beckman Coulter che utilizza provette contenenti 3 mL di *Inoculum Saline e Water*. Allo stesso modo è stata ottenuta una soluzione da 0,5 McF di *P. alvei*. Tutte le diluizioni nominate in seguito saranno eseguite nel medesimo modo. Ciascuna specie valutata è stata, poi, seminata in una piastra di agar sangue mediante l'impiego di un tampone, creando una patina uniforme. A ogni piastra seminata con la specie di interesse è stata aggiunta subito dopo una goccia da 25 µL della soluzione di 0,5 McF di *P. alvei* e anche un dischetto di carta bibula imbevuto con 25 µL della stessa soluzione di *P. alvei*. Il medesimo esperimento è stato replicato contemporaneamente con una goccia da 25 µL del disinfettante GIONEB e con il dischetto di carta bibula imbevuto del medesimo quantitativo di disinfettante al fine di standardizzare l'esperimento stesso. Tutte le piastre sono state messe ad incubare in termostato a 37°C per 24 ore e osservate il giorno seguente. In tale occasione, sono stati eseguiti anche dei trapianti all'interno di tutti gli aloni di inibizione formati al fine di verificare la natura del ceppo cresciuto nell'alone e confermarne l'eventuale assenza (totale inibizione della crescita). Per ulteriore conferma, sono state eseguite anche delle identificazioni, mediante l'impiego dello strumento MALDI-TOF MS Bruker Biotyper, delle colonie cresciute sulle piastre testate dentro l'alone di inibizione.

Da qui in poi gli esperimenti sono stati eseguiti esclusivamente con i ceppi verso i quali il *P. alvei* aveva dimostrato un reale effetto inibitorio battericida.

Capacità antibatterica di *Paenibacillus alvei* dopo bollitura, sonicazione e centrifugazione

Con questo esperimento è stata testata la capacità antibatterica naturale di *P. alvei* dopo essere stato sottoposto rispettivamente a bollitura, sonicazione e filtrazione attraverso un filtro da 0,22 µm. Queste prove avevano la finalità di comprendere la natura intracellulare o extracellulare dei metaboliti prodotti da *P. alvei* responsabili di questa sua proprietà antibatterica. Sono state preparate quattro provette con una diluizione di 0,5 McF di *P. alvei* in soluzione fisiologica. La prima provetta è stata sottoposta a bollitura per 5 minuti a 100°C; la seconda provetta è stata sottoposta a sonicazione per 5 minuti, mediante l'impiego del sonicatore BRANSON 1200 della ditta EMERSON; la terza provetta è stata sottoposta a filtrazione attraverso un filtro da 0,22 µm; la quarta provetta è stata sottoposta prima a sonicazione per 5 minuti e poi a filtrazione. Nel frattempo, sono state allestite le colture utilizzando gli 11 ceppi MDR oggetto dello studio, ad una diluizione di 0,5 McF, seminate in modo uniforme, mediante tampone. Alla piastra seminata è stata aggiunta una goccia di 25 µL della soluzione di 0,5 McF di *P. alvei* bollito e anche un dischetto imbevuto con 25 µL di una soluzione di 0,5 McF di *P. alvei* bollito. La medesima procedura è stata

seguita per le provette con *P. alvei* sonicato e filtrato. Le piastre così ottenute sono state incubate a 37°C in termostato per 24 ore e gli aloni di inibizione sono stati osservati il giorno seguente. Quest'ultimi sono stati poi misurati mediante calibro a corsoio, trapiantati e interpretati.

Dimostrazione localizzazione intra o extracellulare della tossina antibatterica

Con questo esperimento si è voluto osservare se il diametro dell'alone di inibizione aumentava all'aumentare del tempo di incubazione di *P. alvei* e dimostrare la natura intracellulare o extracellulare della tossina antibatterica prodotta da *P. alvei*. Quest'ultimo aspetto è stato indagato sottoponendo il ceppo di interesse a bollitura per 5 minuti a 100°C o centrifugazione per 5 minuti a 13000 rpm, oppure sia bollitura che centrifugazione con i medesimi tempi. Per questa prova sono stati inoculati 4 brodi di coltura con 0,5 McF di *P. alvei* e i brodi sono stati messi ad incubare in termostato a 37°C. Uno di questi brodi non è stato trattato in alcun modo dopo incubazione, in modo da costituire il controllo positivo. Gli altri tre brodi, invece, rispettivamente dopo 1 ora, 8 ore, 24 ore, 48 ore e 72 ore di incubazione a 37°C, sono stati poi centrifugati, bolliti, bolliti e centrifugati. In questa fase sono stati utilizzati solo due ceppi esemplificativi, ovvero *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente. Di questi ceppi è stata ottenuta una diluizione in soluzione salina a concentrazione di 0,5 McF che è stata poi seminata su agar sangue mediante tampone, a formare una patina unitaria. Immediatamente dopo la semina è stata deposta una goccia di 25 µL della soluzione di *P. alvei* non trattato sulla piastra. Con la stessa modalità sono state eseguite le prove per le varie condizioni di trattamento di *P. alvei*. Tutte le piastre così ottenute sono state messe in termostato a 37°C e lasciate incubare overnight; il giorno seguente sono stati misurati gli aloni di inibizione di ciascuna piastra - con calibro a corsoio - e poi trapiantati in terreno Chromagar per verificare se all'interno degli aloni si fossero sviluppati ceppi batterici.

Risultati

Il *Paenibacillus alvei* è risultato efficace in termini di azione antibatterica contro solo alcune delle specie considerate, in particolare: *Enterococcus faecium* (VRE), *Pseudomonas aeruginosa* (MDR), *Candida albicans* (MDR), *Burkholderia cepacia* (MDR), *Acinetobacter baumannii* (MDR), *Staphylococcus aureus* MRSA; invece non si è osservato nessun alone di inibizione nelle seguenti specie: *Klebsiella pneumoniae* (KPC), *Klebsiella pneumoniae* (ESBL), *Streptococcus pneumoniae* penicillino-resistente, *Escherichia coli* (ESBL), *Salmonella D* (MDR). Da questi risultati è possibile evincere come la capacità antibatterica di *P. alvei* funziona sia verso batteri Gram positivi che negativi, determinando un'inibizione della crescita del batterio testato. Questo è stato dimostrato misurando i diametri degli aloni di inibizione originatisi a seguito di incubazione overnight a 37°C per azione di *Paenibacillus alvei* sui ceppi testati. La misurazione è stata eseguita mediante un calibro a corsoio. I risultati ottenuti sono riportati di seguito (*Figura 2*), ordinando le misure dell'alone di inibizione dal diametro più piccolo a quello più grande.

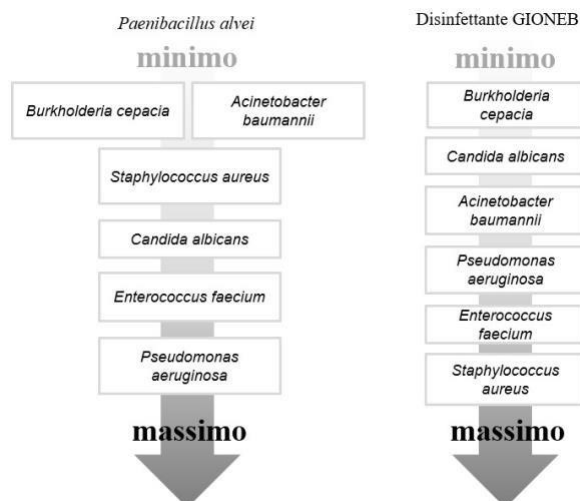


Figura 2: Aloni di inibizione di *P. alvei* e GIONE B a confronto

In particolare, il diametro dell'alone di inibizione risulta maggiore nei confronti di *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium* e *Candida albicans* e minore (ma sempre presente) contro lo *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia* e *Acinetobacter baumannii*. Confrontando gli aloni di inibizione ottenuti prima con *P. alvei* e poi con GIONE B (Figura 3), è possibile notare come per tutti i ceppi testati l'alone di inibizione ottenuto a seguito dell'impiego del disinfettante tradizionale è maggiore.

	Alone di inibizione prodotto da <i>Paenibacillus alvei</i>	Alone di inibizione prodotto dal disinfettante GIONE B
<i>Enterococcus faecium</i>	30mm	40 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35mm	36 mm
<i>Burkholderia cepacia</i>	21mm	25 mm
<i>Candida albicans</i>	29mm	27 mm
<i>Acinetobacter baumannii</i>	21mm	31 mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	18mm	40 mm

Figura 3: Misurazione diametri degli aloni di inibizione

In riferimento all'esperimento N.2, nelle piastre in cui era stato seminato il *P. alvei* bollito, l'alone di inibizione si è osservato su 9 ceppi testati, ad esclusione di due ceppi ovvero *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, risultato riscontrabile anche in letteratura (17). Nelle piastre in cui è stato testato il *P. alvei* sonicato, l'alone di inibizione è stato ottenuto per tutti i ceppi e in modo molto marcato; invece, con *P. alvei* filtrato non si è osservato alcun alone di inibizione, ad indicare che il filtro è stato in grado di bloccare interamente il batterio o le sostanze prodotte. Infine, nelle piastre in cui è stato testato il *P. alvei* sonicato e poi filtrato non si è formato alcun alone di inibizione, tranne per *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* *meticillino-resistente*.

A questo punto si è deciso di procedere con un esame microscopico al fine di osservare anche morfologicamente un'eventuale differenza nell'aspetto dal *P. alvei* a seguito di questi trattamenti.

Le provette con la diluizione di *P. alvei* sono state centrifugate e dal pellet risultante è stato preparato un vetrino, successivamente colorato mediante colorazione di Gram. Dall'osservazione al microscopio ottico è stato possibile notare che nel vetrino con *P. alvei* bollito e in quello con *P. alvei* sonicato il batterio ha assunto una conformazione allungata, mentre in quello con *P. alvei* filtrato e in quello con *P. alvei* sonicato e filtrato non si è osservata nulla (vedi Figura 4).

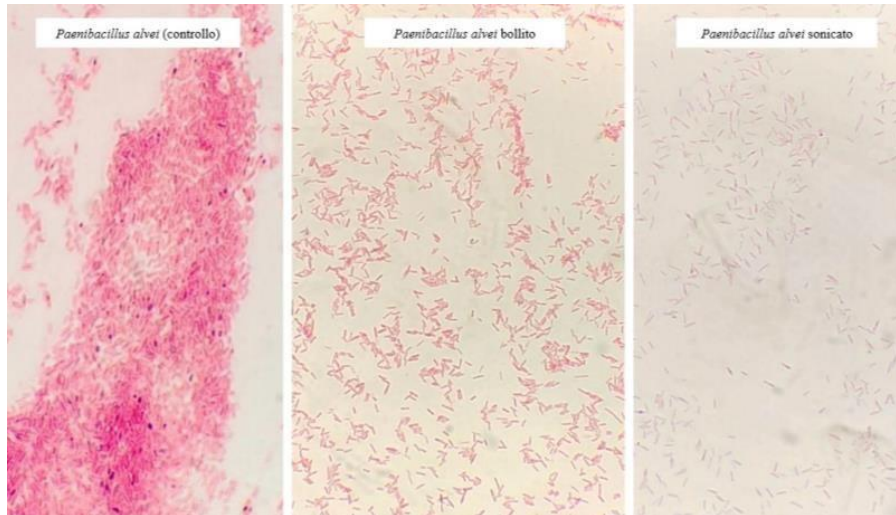


Figura 4: Esame microscopico di *P. alvei*

In riferimento all'esperimento N.3 i dati ottenuti dalla misurazione degli aloni di inibizione formati sono stati riportati in un grafico al fine di osservarne l'andamento complessivo. In particolare, l'effetto inibitorio di *Paenibacillus alvei* nei confronti di *Candida albicans* è maggiore dopo le 48 e le 72 ore di incubazione; invece, con *S. aureus* l'effetto inibitorio maggiore si evidenzia tra 1 e 8 ore di incubazione e decresce progressivamente sino alle 72 ore.

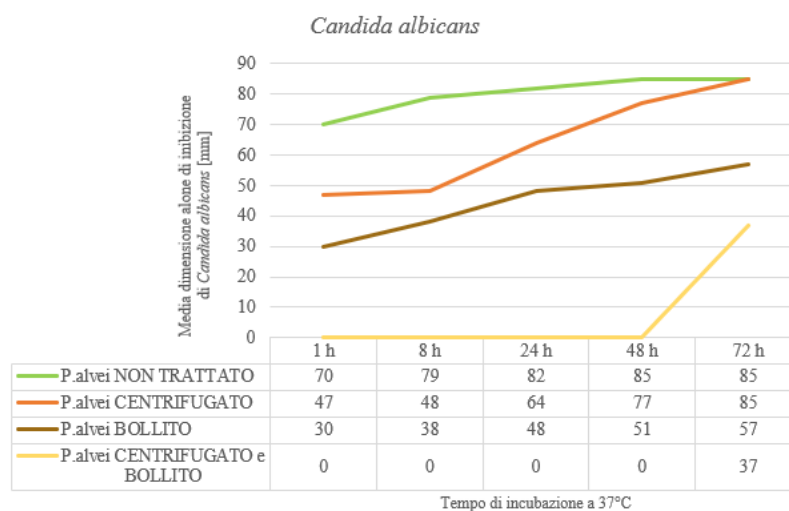


Figura 5

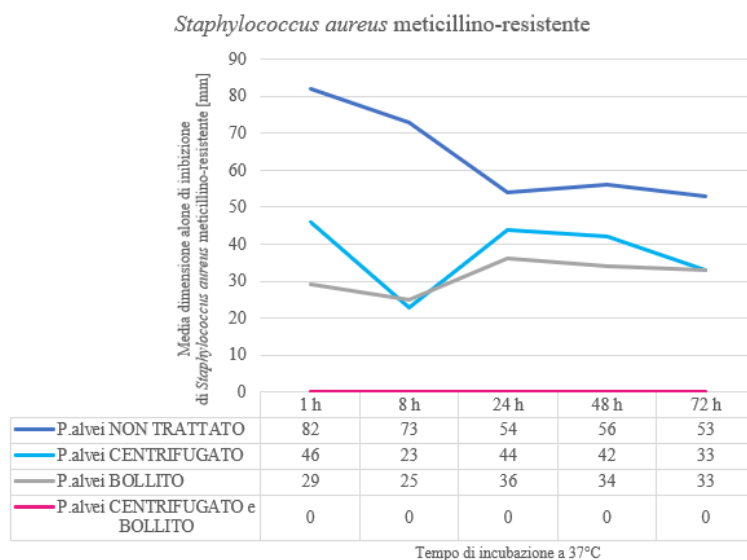


Figura 6

Entrambi *Candida albicans* e *S. aureus* risultano maggiormente inibiti da *P. alvei* non trattato. Per quanto riguarda invece l'azione antibatterica di *P. alvei* bollito e centrifugato, questa risulta minore rispetto agli altri tipi di trattamento tranne che nelle prime ore di incubazione (1 ora e 8 ore) in cui è effettivamente stato misurato un alone di inibizione maggiore. Per quanto concerne *S. aureus*, similmente alla condizione ottenuta con *Candida albicans*, il *P. alvei* centrifugato e bollito non ha determinato la formazione di alcun alone di inibizione, tanto che nei trapianti eseguiti su Chromagar cresceva esclusivamente *S. aureus* meticillino-resistente. Questa condizione, a differenza della *Candida albicans*, è stata mantenuta anche a distanza di 72 ore di incubazione.

Discussione

In questo studio sono state eseguite una serie di prove al fine di studiare la natura e la modalità d'azione della/e tossina/e del ceppo indagato. Il *P. alvei* testato presenta una chiara attività antibatterica contro alcuni dei microrganismi considerati, dimostrandosi efficace indistintamente verso Gram positivi e negativi. In un articolo riportato in letteratura (18) il *Paenibacillus* mostra effetto inibitorio nei confronti dei medesimi ceppi testati in questo studio. Altri germi patogeni dovrebbero comunque essere testati: ad esempio, secondo alcuni studi (5), *P. alvei* risulterebbe efficace anche nei confronti di *Listeria monocytogenes*.

Dal primo esperimento è stato possibile osservare come il disinfettante GIONEB risulta essere complessivamente più efficace rispetto a *P. alvei* in termini di azione antibatterica contro i ceppi testati, essendo il disinfettante un battericida, di *P. alvei*, invece, non si conosce ancora la natura dell'inibizione, battericida o batteriostatica. Nonostante questo, la/e tossina/e prodotta/e da *P. alvei* risulta/no più efficaci nei confronti delle specie *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium* e *Candida albicans*. Ulteriori indagini sarebbero necessarie in prospettiva di un suo possibile impiego come disinfettante naturale, a fianco del disinfettante tradizionale, nel controllo della diffusione dei principali patogeni MDR in ambiente ospedaliero.

Dal secondo esperimento, invece, è stato possibile evincere come il trattamento con bollitura non altera la capacità antibatterica di *P. alvei*. Questo è stato evidenziato in letteratura (17) come dovuto

alla natura termoresistente della tossina la quale, secondo i dati riportati, viene rilasciata in maggiore quantità a seguito della distruzione delle cellule batteriche con calore. Similmente alla bollitura, anche il trattamento con la sonicazione non inficia l'efficacia dell'inibizione di *P. alvei* contro le specie testate: questo risultato è in linea con le nostre aspettative data l'azione più aggressiva di questo trattamento che determina il danneggiamento della parete della cellula batterica e probabilmente anche delle endospore, come riportato anche in recenti pubblicazioni (4). Al contrario, il processo di filtrazione annulla l'azione antibatterica di *P. alvei*, ad indicare che il filtro è stato in grado di bloccare interamente il batterio o le sostanze prodotte. È stato possibile dedurre, quindi, che la tossina è sia intracellulare - in quanto bloccata dal filtro - sia extracellulare - in quanto determina la formazione dell'alone di inibizione anche in caso di bollitura e sonicazione del batterio - entrambe vengono rilasciate in condizioni di stress ambientale. Ulteriori studi sono invece necessari al fine di dimostrare il ruolo delle spore nella crescita batterica, nella sua attività antibatterica e nella resistenza al calore. Infine, ulteriori studi di proteomica sarebbero necessari al fine di individuare i geni responsabili della produzione della/e tossina/e antibatterica/che da parte di questo microrganismo e di riuscire a caratterizzarla/e. Infatti, molteplici sostanze contribuiscono alla sua attività antibatterica.

Dai grafici ottenuti dal terzo esperimento (Figura 5 e 6) è possibile notare come vi sia un andamento unitario rispettivamente per ciascun ceppo considerato (*Candida albicans* e *S. aureus*) nella dimensione di tutti gli aloni di inibizione ottenuti, con qualsiasi forma di trattamento di *P. alvei*. In particolare, per *Candida albicans* possiamo osservare, al passare del tempo di incubazione, un andamento complessivamente maggiore (ovvero dimensioni degli aloni progressivamente più grandi); invece per *S. aureus*, al passare del tempo di incubazione, si ha un andamento complessivamente minore (ovvero dimensioni degli aloni progressivamente più piccoli). Questo a confermare l'efficacia dell'azione inibente di *P. alvei* nei confronti di *Candida albicans* e minore efficacia, seppur sempre presente, nei confronti di *S. aureus*. Interessante è la risposta di *Candida albicans* all'azione inibitoria di *P. alvei* dopo centrifugazione e bollitura: sulle piastre seminate con *Candida albicans* dopo incubazione non è presente alcun alone di inibizione sino alle 72 ore di incubazione, in corrispondenza delle quali compare per la prima volta l'alone di interesse. Da tutti i trapianti su terreno Chromagar risultava esserci esclusivamente *Candida albicans*, sino appunto all'ultimo tempo di incubazione considerato, nel cui trapianto è cresciuto esclusivamente *P. alvei*. La formazione tardiva dell'alone di inibizione è dovuta probabilmente, in questo caso, alla cinetica di crescita più lenta di *Candida albicans* rispetto a *P. alvei* nonostante la diluizione di quest'ultimo in soluzione. Per quanto concerne, invece, l'azione di *P. alvei* trattato su *S. aureus* è visibile un andamento complessivamente meno lineare nella dimensione degli aloni di inibizione rispetto a quelli ottenuti su *Candida albicans*, ma pur sempre unitario tra i diversi tipi di trattamento. Il *P. alvei* ha avuto un comportamento analogo in termini di inibizione nei confronti di entrambi i ceppi testati.

Da tenere in considerazione è che in questo studio sono stati testati ceppi clinici e non ATCC®, si tratta, pertanto, di ceppi multiresistenti che possono esprimere resistenze differenti in base allo stadio di crescita e alle differenti condizioni in cui si trovano.

Conclusioni

A causa dell'aumento del numero di batteri patogeni resistenti e degli effetti collaterali causati dagli antibiotici esistenti, la ricerca di nuovi composti antimicrobici con proprietà efficaci è quanto mai

necessaria. In questa ottica, le specie appartenenti al genere *Paenibacillus* hanno attirato particolare attenzione in quanto produttrici di un numero elevato di differenti sostanze con proprietà interessanti. In particolare, nel nostro studio abbiamo dimostrato che la/e tossina/e prodotta/e dal ceppo indagato di *P. alvei* ha un potenziale antibatterico contro un ampio numero di microrganismi, sia Gram positivi che negativi, tra quelli testati. Questa proprietà è stata sviluppata, probabilmente, a seguito di una pressione selettiva proveniente dall'ambiente competitivo in cui si ritrovava il batterio. Studi più dettagliati sono necessari al fine di comprendere l'ecologia molecolare di questo ceppo e di individuare i geni responsabili della produzione di questa/e sostanza/e antibatterica/e e di definirne le potenzialità e l'applicabilità reali in campo agroalimentare e biomedico.

Con questo studio abbiamo dimostrato la termoresistenza della sostanza prodotta da *P. alvei*, la sua natura intra ed extracellulare e la sua attività antibatterica contro alcuni dei ceppi patogeni maggiormente diffusi a livello nosocomiale. Futuri studi dovrebbero essere implementati al fine di testare la reale efficacia e modalità d'azione di questo batterio ambientale come disinfettante naturale su superfici ospedaliere che albergano ceppi MDR patogeni di più frequente riscontro in ambito ospedaliero.



Bibliografia e Sitografia

- 1- R. P. Spence et al.: *Surveillance of New Zealand apiaries for Paenibacillus alvei*. New Zealand Entomologist, 2013.
- 2- Stephen A. Cochrane and John C. Vederas: *Lipopeptides from Bacillus and Paenibacillus spp.: A Gold Mine of Antibiotic Candidates*. Wiley Online Library, 2014.
- 3- Elliot Nicholas Grady et al.: *Current knowledge and perspectives of Paenibacillus: a review*. Microb Cell Fact, 2016.
- 4- Lihua Fan et al.: *Thermosonication damages the inner membrane of Bacillus subtilis spores and impels their inactivation*. Elsevier, June 2019.
- 5- Magdalena Pajor et al.: *Paenibacillus alvei MPI as a Producer of the Proteinaceous Compound with Activity against Important Human Pathogens, Including Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes*. Pathogens, 2020.
- 6- Matthew E Falagas et al.: *Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies*. Critical Care, 2006.
- 7- Yan Luo et al.: *Draft Genome Sequences of Paenibacillus alvei A6-6i and TS-15*. Genome, 2013.
- 8- Marvin Djukic et al.: *Genome Sequence of Paenibacillus alvei DSM 29, a Secondary Invader during European Foulbrood Outbreaks*. JB, 2012.
- 9- Bing-Lan Liu, Yew-Min Tzeng: *Characterization Study of the Sporulation Kinetics of Bacillus thuringiensis*. John Wiley & Sons, Inc., 2000.
- 10- Dzung B. Diep and Ingolf F. Nes: *Ribosomally Synthesized Antibacterial Peptides in Gram Positive Bacteria*. Current Drug Targets, 2002.
- 11- Steven P. Djordjevic et al.: *Genetic and Biochemical Diversity among Isolates of Paenibacillus alvei Cultured from Australian Honeybee (Apis mellifera) Colonies*. Applied and environmental microbiology, Mar. 2000.
- 12- J. Comas-Riu and J. Vives-Rego: *Cytometric monitoring of growth, sporogenesis and spore cell sorting in Paenibacillus polymyxa (formerly Bacillus polymyxa)*. Journal of Applied Microbiology, 2002.
- 13- Balaiah Anandaraj et al.: *Co-production of two new peptide antibiotics by a bacterial isolate Paenibacillus alvei NP75*. Elsevier, December 2008.
- 14- Peter C Appelbaum et al.: *Recently approved and investigational antibiotics for treatment of severe infections caused by Gram-positive bacteria*. Elsevier, 2005.
- 15- Tzu-Wen Liang and San-Lang Wang: *Recent Advances in Exopolysaccharides from Paenibacillus spp.: Production, Isolation, Structure, and Bioactivities*. Mar. Drugs, 2015.
- 16- Eric Brown et al.: *Use of non-pathogenic bacteria, Paenibacillus alvei, as a natural biocontrol agent for elimination of food-borne pathogenic bacteria*. U.S. Food and Drug Administration, 2018.
- 17- Bassam Alkotaini et al.: *Detection of secreted antimicrobial peptides isolated from cell-free culture supernatant of Paenibacillus alvei AN5*. Springer, 2013.
- 18- Ahmed G. Abdelhamid et al.: *Efficient Production of Broad-Spectrum Antimicrobials by Paenibacillus polymyxa OSY-EC Using Acid Whey-Based Medium and Novel Antimicrobial Concentration Approach*. Frontiers, 2022.