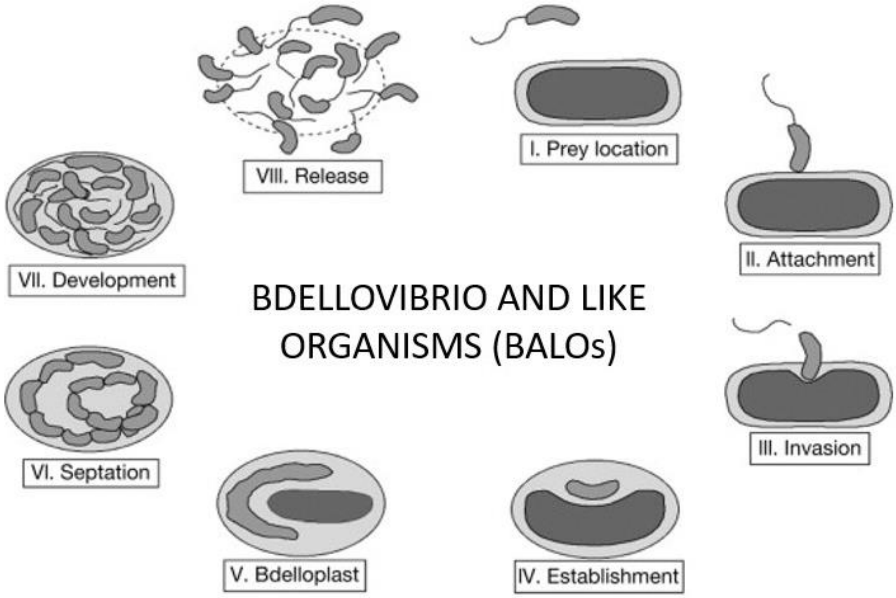
POTENZIALITÀ E APPLICAZIONI DEI BDELLOVIBRIO AND LIKE ORGANISMS (BALOs) NEL SETTORE BIOTECNOLOGICO E DELLA FILIERA ALIMENTARE

[versione 1.0]

Gabriele Angelico, Silvia Pieralisi, Cristina Canonico, Diego Maiolatesi, Giulia Talevi, Sara Nardi, Stefania Di Lullo, Elena Rocchegiani, Donatella Ottaviani

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche,
Laboratorio Controllo Alimenti di Ancona, Via Cupa di Posatora 3, 60126 Ancona, Italy.



Modified from Rendulic S, Jagtap P, Rosinus A, et al. (2004) A predator unmasked: Life cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a genomic perspective. Science 303(5658): 689–692.

Volume allegato al numero 131 di SPVet.it. Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati"

Editore Sanità Pubblica Veterinaria [https://spvet.it] [https://indice.spvet.it]:

Sede - Via G. Salvemini n.1 - 06126 Perugia (Pg); Telefoni: Direzione 075-343207 / email: redazione-spvet@izsum.it; editoria@izsum.it

Autorizzazione Tribunale di Perugia n. 45/2000 del 17 ottobre 2000

Iscrizione Registro Nazionale della Stampa n. 11651

International Standard Serial Number - ISSN 1592-1581

Stampatore - Server Web Spvet.it (https://spvet.it / https://indice.izsum.it/)

Direttore Responsabile: Raoul Ciappelloni / r.ciappelloni@izsum.it / raoul@ciappelloni.it

Autori:

Gabriele Angelico, Silvia Pieralisi, Cristina Canonico, Diego Maiolatesi, Giulia Talevi, Sara Nardi, Stefania Di Lullo, Elena Rocchegiani, Donatella Ottaviani

Editor:

Raoul Ciappelloni

DISCLAIMER

La proprietà intellettuale ed il Copyright del testo appartiene agli Autori.

Progettazione ed editing Redazione SPVet.it (http://spvet.it; http://indice.spvet.it): I QRCode sono stati generati da QRCode Monkey - https://www.qrcode-monkey.com. Il format e la metodologia sono stati elaborati dalla Biblioteca dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche.

L'opera: "Potenzialità e applicazioni dei Bdellovibrio And Like Organisms (BALOs) nel settore biotecnologico e della filiera alimentare", is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. Permissions beyond the scope of this license may be available at http://indice.spvet.it/adv.html.

ISBN 978-88-97069-32-4

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

Il logo e la denominazione citata:

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

Questo lavoro è stato realizzato nell'ambito delle Attività editoriali della Rivista Sanità Pubblica Veterinaria, nel Progetto Micro Epidemic One Health [IZS UM 04/20 RC] gestito e coordinato dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche con la collaborazione del Dipartimento di Medicina Veterrinaria dell'Università degli Studi di Perugia. Segreteria e marketing del progetto: Redazione SPVet.it

INDICE

Abstract 1

INTRODUZIONE: BDELLOVIBRIO AND LIKE ORGANISMS (BALOs) 2
Applicazioni biotecnologiche dei BALOs 5
I batteri predatori come agenti di controllo biologico 6
Bacteriovorus secretoma come fonte di nuovi strumenti biotecnologici 7
Le proteasi dei BALOs come nuovi strumenti di immuno-modulazione 9
I batteri predatori come strategia per combattere il trasferimento orizzontale di geni 10
Utilizzo potenziale dei BALOs come probiotici 11
Applicazione dei BALOs nella produzione di bio plastiche 12

APPLICAZIONI DEI BALOs NELLA FILIERA ALIMENTARE SPERIMENTATE IN IZSUM 13

Caso di studio in acquacoltura I 13
Risultati 15
Discussione 17

Caso di studio in acquacoltura II 18
Risultati 19
Discussione 21

Caso di studio in matrici alimentari 22
Risultati 25
Discussione 27

CONCLUSIONI 28

BIBLIOGRAFIA 30

Abstract. Thanks to their natural ability to eliminate Gram-negative bacteria, BALOs (*Bdellovibrio* and like organisms), predatory bacteria, have great potential as biological control agents towards different bacterial populations. Many practical applications of BALOs in various sectors of biotechnology have been extensively described and the studies conducted by Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche - Food Control Laboratory of Ancona confirm even more the value of these microorganisms: it has been shown that BALOs are naturally present in molluscs growth areas of the Adriatic sea, are bioaccumulated by the molluscs themselves and probably play the role of biological regulators in bacterial population dynamics, being predators of pathogenic vibrios. In another study by the same research team, *Bdellovibrio bacteriovorus* species was able to control and reduce *E. coli* concentrations in short-lived meat foods, usually less than ten days. In light of this evidence, BALOs could find application in post-harvest decontamination treatments for bivalves as well as extend the shelf life of fresh meat foods and improve their safety.

Riassunto. Grazie alla loro capacità naturale di eliminare i batteri Gram-negativi, i BALOs (*Bdellovibrio* and like organisms), batteri predatori, hanno un grande potenziale come agenti di controllo biologico verso diverse popolazioni batteriche. Sono state ampliamente descritte molte applicazioni pratiche dei BALOs in diversi settori delle biotecnologie e gli studi condotti presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche - Laboratorio Controllo Alimenti di Ancona confermano ancora di più il valore di questi microrganismi: in particolare è stato dimostrato che i BALOs sono naturalmente presenti nelle acque marine dell'Adriatico in aree di crescita per i molluschi, vengono bioaccumulati dai molluschi stessi e probabilmente ricoprono il ruolo di regolatori biologici in dinamiche di popolazione batteriche, essendo predatori di vibrioni patogeni. In un altro studio dello stesso team di ricerca, la specie *Bdellovibrio bacteriovorus* è stata capace di controllare e ridurre le concentrazioni di *E. coli* in alimenti a base di carne a scadenza breve, generalmente inferiore a dieci giorni. Alla luce di queste evidenze, i BALOs potrebbero trovare applicazione in trattamenti di decontaminazione post-raccolta per i bivalvi nonché prolungare la durata di conservazione di alimenti carnei freschi e migliorarne la sicurezza.

INTRODUZIONE: BDELLOVIBRIO AND LIKE ORGANISMS (BALOs)

Con *Bdellovibrio* and like organisms (BALOs) (Fig.1) ci riferiamo a batteri predatori obbligati che selettivamente agiscono su una vasta gamma di batteri Gram-negativi, tra cui batteri patogeni, e/o che hanno sviluppato resistenza a più trattamenti farmacologici (Williams et al. 2005). Proprio in relazione a questo aspetto si sono rilevati come potenziali agenti terapeutici e di bio-controllo.
Le ricerche sperimentali e l'interesse scientifico sui BALOs sono cresciuti rapidamente nel corso del recente decennio e sono state prodotte numerose pubblicazioni circa le proprietà molecolari dei batteri predatori e le loro eventuali applicazioni in medicina e biotecnologia.

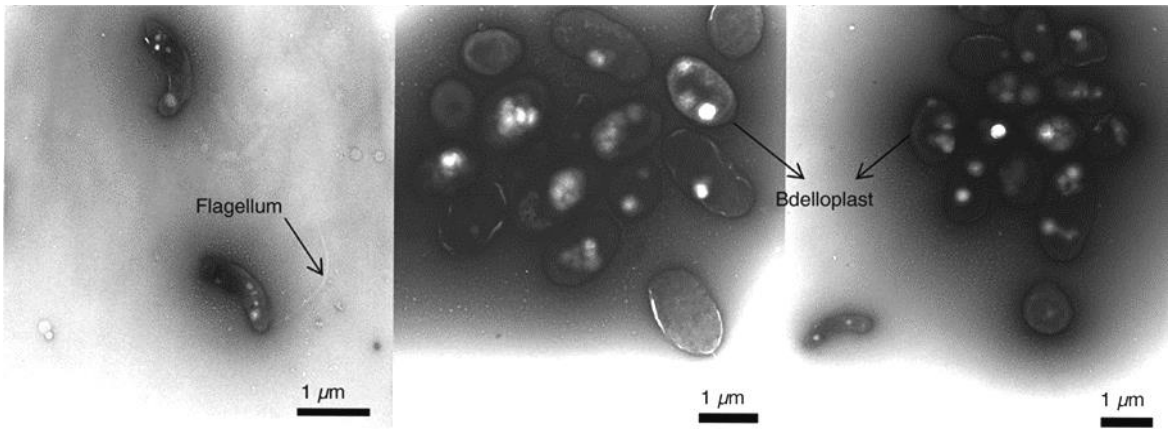


Fig. 1: Immagine di *Bdellovibrio* ottenuta con tecniche di microscopia elettronica (Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche).

La predazione è un comune meccanismo di interazione, caratteristico di tutti i livelli della catena alimentare, essenziale per il mantenimento dell'equilibrio all'interno dell'ecosistema (Johnke et al. 2019). Anche se comunemente quando parliamo di predazione facciamo riferimento alla caccia e all'approvvigionamento alimentare di animali grandi verso prede più piccole, lo stesso concetto è applicabile nel mondo dei microrganismi. I batteri predatori appartengono ad una vasta gamma di generi che comprendono sia i predatori facoltativi, che gli obbligati, classificati in base al proprio comportamento. I predatori obbligati sopravvivono soltanto in presenza della propria preda cellulare, mentre i facoltativi possono sopravvivere in assenza di preda attuando uno stile di vita saprofitico, basato sul consumo di altri substrati (Jurkevitch, 2007; Korp et al. 2016).
Ad oggi i batteri predatori obbligati comprendono gli α-proteobacteria (genere *Micavibrio*) e i δ-proteobacteria (famiglie: *Bdellovibrionaceae, Bacteriovoraceae, Peredibacteraceae, Halobacteriovoraceae e Pseudobacteriovoracaceae*) e organismi simili (BALOs) (Koval et al. 2015; McCauley et al. 2015; Paix et al. 2019; Rotem et al. 2014). L'attenzione verso i batteri predatori è stata notevolmente stimolata dalle notizie allarmanti sull'aumento del fenomeno della resistenza

antibiotica (AMR), e sulla crescente attenzione ambientale. Infatti numerose ricerche hanno proposto e dimostrato il potenziale impiego dei batteri predatori come antibiotici vivi, come depuratori di corsi acquatici, come agenti di controllo biologico e come nuovi strumenti biotecnologici per la ricerca (Pérez et al., 2016; Yair et al., 2009). Attualmente il *Bdellovibrio bacteriovorus* è il BALOs più studiato venendo così utilizzato come modello di predatore batterico. Esso fu identificato per la prima volta nel 1960 e viene descritto come un piccolo parassita predatore obbligato di batteri Gram-negativi (Stolp and Starr, 1963). *B. bacteriovorus* e' altamente mobile e appartiene alla famiglia dei *δ-proteobacterium,* che hanno la proprietà di invadere i batteri Gram negativi e di replicarsi nel loro periplasma (predazione endobiotica). È interessante sottolineare che le prede oggetto dei BALOs comprendono una varietà di patogeni umani, che hanno già sviluppato o sono ad elevato rischio di acquisire resistenza agli antibiotici, come l'*Escherichia coli* enteroemorrargico, *Helicobacter pylori, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas, e Salmonella* (Dashiff et al.,2011a; Dashiff et al.,2011b; Dwidar et al., 2012; Shatzkes et al., 2016; Sockett, 2009; Woodford et al., 2011). Altri BALOs, come *Bdellovibrio exovorus e Micavibrio aeruginosavorus* impiegano altre modalità di invasione della cellula preda, nota come predazione epibiotica: in questo caso il batterio predatore rimane ancorato esternamente alla cellula della preda e la distrugge prima che essa possa moltiplicarsi (Jurkevitch, 2007; Pasternak et al., 2014; Pérez et al., 2016).

Recenti ricerche scientifiche hanno messo a confronto il profilo genico dei predatori epibiotici ed endobiotici, evidenziando che il genoma codificante caratteristico del predatore epibiotico, conteneva molti meno geni codificanti per gli enzimi litici, limitando l'interesse per questo tipo di predatore a scopi terapeutici e/o applicazioni biotecnologiche (Pasternak et al., 2014). Inoltre, in aggiunta a tale limitazione, i predatori *B. exovorus e M. aeruginosavorus* hanno una varietà di prede piuttosto ristretta, rispetto alla varietà di prede del *B. bacteriovorus*, non sono in grado di sopravvivere senza la propria preda, ed hanno sviluppato resistenza a diversi antibiotici: ampicillina kenamicina, cloramfenicolo, carbapenemi e polimixine (Koval et al., 2013 ; Pasternak et al., 2014).

Il ciclo vitale di *B.bacteriovorus* è stato a lungo descritto come bifasico, diviso in una fase di attacco (AP) e un fase di crescita intraperiplasmatica (GP). Tuttavia, di recente, è stata introdotta una terza fase di transizione tra la fase AP e GP, caratterizzata dall'attivazione di un profilo di trascrizione specifico preda-derivato (Rotem et al., 2015). Nella fase AP il *B.bacteriovorus* attacca le cellule preda di un batterio Gram-negativo. L'invasione dell'ospite prevede la creazione di un poro nella membrana esterna, che gli permette di attraversare lo strato di peptidoglicano e raggiungere il periplasma della cellula preda, ove si stabilisce. La fase di attacco della cellula preda avviene in maniera casuale: infatti, il microrganismo predatore rimane ancorato alla cellula preda, dapprima in maniera reversibile, per un breve periodo di tempo, definito "di riconoscimento", per poi rimanere

irreversibilmente ancorato. (Burnham et al., 1968 Lambert et al., 2016; Rendulic et al., 2004;). Superato il periodo di "riconoscimento" si innesca la transizione verso una fase intermedia che facilita l'invasione della cellula ospite e favorisce la formazione di una nicchia osmoticamente stabile, chiamata bdelloplasto. Questo garantisce la protezione da eventuali attacchi da parte di batteriofagi, o cambiamenti delle condizioni ambientali, che comprendono foto-ossidazione ed inquinanti (Friedberg, 1977; Markelova, 2002; Yair et al. 2009). Si suppone che il *B.bacteriovorus* utilizzi il proprio pilo di tipo IV per attraversare la membrana, quindi perde il flagello e richiude il poro dopo essere entrato all'interno della cellula preda. Il rilevamento di un secondo segnale determina il passaggio alla fase successiva GP e promuove la crescita del filamento. La formazione della struttura nota come bdelloplasto comporta una netta modificazione strutturale della cellula batterica preda, dovuta all'alterazione organizzativa del peptidoglicano, che caratterizza la parete cellulare batterica. Questa modifica, di fatto, segnala l'invasione di quella cellula agli altri batteri predatori, evitando la competizione e favorendo il rapporto 1:1 predatore-preda. Quando la cellula preda è distrutta, il batterio predatore si divide più volte in diverse cellule figlie e promuove la lisi della cellula ospite, con conseguente rilascio della progenie batterica, che può dar vita ad un nuovo ciclo di predazione (Avidan et al., 2017; Evans et al., 2007., Karunker et al., 2013; Lambert et al., 2015; Rendulic et al., 2004).

B.bacteriovorus è principalmente riconosciuto come predatore obbligato, tuttavia può trasformarsi in un predatore facoltativo, ovvero indipendente dalla cellula ospite (HI), assumendo un comportamento saprofitico, per cui si nutre di materiale organico inerte, inclusi i componenti della cellula preda già decomposta, o crescendo in un ambiente anche addirittura privo di cellule preda. Gli eventi che promuovono il passaggio dallo status di predatore dipendente (HD) allo status di HI sono associati a mutazioni relative ai circuiti di controllo di crescita. I predatori HI mantengono le loro capacità predatorie se cresciuti regolarmente in presenza di cellule preda. Ricerche scientifiche hanno evidenziato le alterazioni nell'espressione genica tra i predatori HI e i predatori obbligati: in particolare si è osservata una *up* e *down-regulation* di geni specifici in entrambi i profili predatori (Chang et al., 2011; Cotter and Thomashow, 1992a; Dori-Bachash et al., 2008; Lambert et al., 2010; Roschanski et al., 2011).

I BALOs sono *ubiquitari*, ovvero si ritrovano in diversi ambienti naturali e artificiali: habitat acquatici come fiumi, laghi, mare, fognature e impianti di trattamento delle acque reflue (WWTPs) (Hobley et al., 2012b; Jurkevitch et al., 2000; Oyedara et al., 2016; Paix et al., 2019; Richardson, 1990; Sockett, 2009). In alcuni casi i *Bdellovibrio* sono stati recuperati dalle branchie dei granchi e dalle ostriche, e

più recentemente dal tratto gastrointestinale dei mammiferi (Kelley e Williams, 1992; Rotem et al., 2014; Schwudke et al., 2001).

È ovvio che il potenziale impiego dei batteri vivi ai fini terapeutici crea ad oggi notevoli preoccupazioni circa la sicurezza e l'efficacia dell'eventuale somministrazione dei BALOs. Infatti questo aspetto è ancora oggetto di indagine e continua ad essere studiato sia nelle cellule umane, sia nei modelli animali, utilizzando topi, ratti, conigli, porcellini d'India e pulcini. I risultati hanno messo alla luce che *B.bacteriovorus e M. aeruginosavorus* non sono in grado di invadere cellule di mammifero e non hanno apparentemente nessun effetto patologico o segno di citotossicità o compromissione della vitalità cellulare, confermando il presupposto che questi due BALOs sono intrinsecamente non patogeni verso i mammiferi (Atterbury et al., 2011; Dwidar et al., 2012; Gupta et al., 2016; Shatzkes et al., 2015, 2016, 2017; Westergaard e Kramer, 1977; Willis et al., 2016). Inoltre è stato suggerito che *B.bacteriovorus* potrebbe contribuire a mantenere lo stato di salute dell'uomo, in quanto è coinvolto nella composizione del microbiota (Iebba et al., 2013). Infine, nonostante vengano considerati come aerobi obbligati, recenti ricerche hanno dimostrato che i BALOs possono sopravvivere anche in condizioni di anossia totale, e certe famiglie batteriche, compreso *B.bacteriovorus*, sono in grado di crescere ed invadere la cellula preda anche in condizioni microaerobiche (Kadouri et al., 2013; Patini et al., 2019). Tali evidenze supportano ulteriormente il potenziale utilizzo di questi predatori ai fini terapeutici in condizioni ambientali estreme, come per il tratto gastrointestinale (Dwidar et al., 2012; Sockett e Lambert, 2003).

APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE DEI BALOs

Il crescente interesse riguardo i BALOs ed altri batteri predatori ha portato ad un rapido aumento delle informazioni e delle conoscenze da cui ad oggi possiamo attingere. In particolare, il rinnovato interesse verso i BALOs ha migliorato la comprensione delle caratteristiche delle diverse specie di predatori, come il genoma, il proteoma, le sostanze secrete e i meccanismi biochimici (Avidan et al., 2017; Bratanis et al., 2017; Bratanis and Lood, 2019; Dori-Bachash et al., 2008; Karunker et al., 2013; Pan et al., 2011; Rendulic et al., 2004; Schwudke et al., 2001).

Di seguito verranno descritti e analizzati i potenziali utilizzi dei **BALOs** come mezzi biotecnologici in diversi campi di impiego.

I batteri predatori come agenti di controllo biologico

L'esigenza di un eventuale agente di controllo biologico deriva dalla potenziale pericolosità e dal danno effettivo dovuto ai batteri patogeni. Infatti, sia nel caso di un habitat naturale, sia nell'habitat artificiale, i microrganismi possono esercitare effetti patogeni. Ad esempio, il batterio *Vibrio cholerae* che si ritrova nell'acqua dolce dei laghi rappresenta una delle principali cause di morbilità e mortalità in diverse regioni dell'Africa (Bwire et al., 2017). Qualora i metodi convenzionali per la rimozione di contaminanti e/o microrganismi patogeni falliscano o non siano efficienti, gli agenti di controllo biologico si sono rilevati essere una valida alternativa. Per controllo biologico si intende l'impiego di un qualsiasi organismo, al fine di eliminare una popolazione indesiderata e l'impiego dei batteri predatori a tale scopo è una tecnica particolarmente riconosciuta, in relazione al basso costo e ai limitati effetti negativi sull'ambiente, sulla fauna selvatica e sulla salute pubblica (Kergunteuil et al., 2016). Pertanto, anche questo utilizzo dei batteri predatori come agenti di controllo biologico sta suscitando grande interesse in diversi campi di applicazione. Per esempio, nell'allevamento avicolo, dove il pollame è riconosciuto come principale fonte di salmonellosi e dato che l'infezione da *Salmonella* ogni anno colpisce milioni di persone in tutto il mondo, l'impiego di un agente di bio-controllo può risultare un'ottima soluzione per il biocontrollo della zoonosi. Infatti, le strategie per prevenire la salmonellosi dettate dall' OIE- Organizzazione mondiale per la salute animale, 2019 prevedono il rispetto delle buone norme agricole, che si integrano ad una serie di misure preventive, che potrebbero potenzialmente coinvolgere l'utilizzo di batteri predatori, come agenti di controllo biologico. A supporto, recenti ricerche scientifiche hanno dimostrato l'attività inibitoria dell'infezione da *Salmonella* nei pulcini, dopo somministrazione orale di *B. bacteriovorus*, senza riscontrare effetti collaterali negativi per la salute degli stessi (Atterbury et al., 2011). Inoltre, i BALOs potrebbero essere impiegati nel settore dell'acquacoltura come agente di controllo biologico nei confronti di batteri patogeni, in particolare il *V. cholerae* (Cao et al., 2015) e il *V.parahaemolyticus* (Kongrueng et al., 2017). Lo stesso gruppo di ricerca ha mostrato la potenziale preparazione dei *Bdellovibrio* sotto forma di polvere incapsulata e conservabile a temperatura ambiente per diversi mesi, per un eventuale impiego successivo (Cao et al., 2019).

I BALOs hanno anche diverse potenziali applicazioni in agricoltura. Infatti, una vasta gamma di deformazioni indotte o spontanee possono interessare coltivazioni di piante su larga scala. L'impiego di batteri predatori come agenti di controllo biologico potrebbe essere utile al fine di eliminare i fitopatogeni, responsabili del danneggiamento della coltura (Jurkevitch et al., 2000; McNeely et al., 2017; Scherff, 1973; Youdkes et al., 2020). A questo proposito, Saxon e collaboratori (2014) hanno osservato che *B.bacteriovorus* è in grado di eliminare *Pseudomonas tolaasii*, patogeno di eradicazione difficoltosa, responsabile del deterioramento delle coltivazioni di funghi. Si è

evidenziato che la somministrazione di *B.bacteriovorus* porta alla riduzione delle macchie marroni, che si osservano sopra la superficie dei funghi, dalle quali dipende la durata di conservazione del prodotto (Saxon et al., 2014). Analogamente Ottaviani e collaboratori (2019) hanno dimostrato che *B.bacteriovorus* è in grado di controllare il deterioramento dei prodotti a base di carne ad opera di *E. coli* e altri batteri. Questo studio, che verrà descritto in seguito, inizialmente ha evidenziato la proprietà dei batteri predatori di interagire in combinazione con gli usuali metodi di conservazione e rappresentare allo stesso tempo una valida e naturale alternativa all'impiego di conservanti e antiossidanti di sintesi. Inoltre è stato anche proposto l'impiego dei batteri predatori nel processo di produzione alimentare come mezzo di decontaminazione delle superfici (Fratamico and Cooke, 1996).

L'emergente crisi energetica ha stimolato l'attenzione e focalizzato la ricerca sul biocarburante derivato da microalghe, che potrebbe divenire una alternativa promettente. Tuttavia, la coltivazione e la crescita delle microalghe in stagni aperti è spesso oggetto di contaminazione batterica; Li e suoi collaboratori (2018) hanno dimostrato che i *Bdellovibrio* presiedono al controllo ed alla limitazione dei batteri contaminanti, promuovendo la crescita di microalghe e la produzione di biocarburante. Un'altra emergenza ambientale ed economica è rappresentata dalla produzione di fanghi derivanti dal trattamento delle acque reflue o anche definiti "fanghi attivi" ed il loro monitoraggio. Essi consistono di microrganismi in eccesso, che devono essere necessariamente rimossi, al fine di mantenere l'omeostasi dell'ecosistema. Diversi studi hanno indicato che la predazione batterica, in associazione con fattori ambientali come la modifica di concentrazioni di ossigeno disciolto, siano elementi chiave nel controllo della popolazione batterica dei fanghi attivi di depurazione (Semblante et al., 2017). Il loro volume può essere ridotto persino del 70–80% dell'intera massa. È stato dimostrato che il trattamento di fanghi attivi con *B.bacteriovorus* ha effettivamente migliorato il grado di disidratazione in modo dose-dipendente (Yu et al., 2017). Infine, i BALOs potrebbero ridurre i turnover dei gasdotti in acciaio nelle principali città e aziende di tutto il mondo, riducendone la corrosione microbiologicamente indotta, in virtù dell'eliminazione dei batteri riduttori dei solfati (Qiu et al., 2016).

B.Bacteriovorus secretoma come fonte di nuovi strumenti biotecnologici

Il secretoma è l'insieme di proteine espresse da un microrganismo e secrete nell'ambiente extracellulare. Quando si considera *B.bacteriovorus* come predatore batterico, diventa importante la produzione e/o secrezione di una grande varietà di enzimi e trasportatori. Inoltre, *B.bacteriovorus* potrebbe non essere in grado di sintetizzarne alcuni degli aminoacidi necessari per la sintesi proteica

e ciò rende il batterio predatore, fortemente dipendente dai prodotti degradati della cellula ospite (Barabote et al. 2007; Rendulic et al., 2004;). La disponibilità dell'intera sequenza del genoma (circa 3,8 Mb) di *B.bacteriovorus* HD100 ha fornito la base per ulteriori analisi dello stesso genoma: si prevede che contenga > 3580 frame di lettura (ORFs), con molti di questi appartenenti al secretoma batterico (Rendulic et al., 2004). *B.bacteriovorus* HD100 presenta il più grande secretoma, circa 42,4% (1520 proteine), rispetto agli altri batteri Gram negativi coinvolti in uno studio comparativo. Lo studio originale di bioinformatica condotto da Rendulic e collaboratori nel 2004 dimostra che il genoma di *B.bacteriovorus* HD100 codifica per circa 293 proteine con proprietà litiche, tra cui 150 proteasi e peptidasi annotate, 10 glicanasi, 20 DNasi, 9 RNasi e 15 lipasi. Tuttavia, solo 15 di questi enzimi litici menzionati vengono secreti nell'ambiente extracellulare. Un ulteriore studio sul ceppo batterico HI *B.bacteriovorus HI-6* ha permesso di identificare 59 proteine secrete, di cui 50 contengono una sequenza peptidica segnale e quindi destinate alla secrezione extracellulare (Dori-Bachash et al. 2008). Di quest'ultime proteine, quattordici erano riconducibili ad enzimi, tra cui diverse serina-proteasi, molte delle quali sono state analizzate ed identificate come enzimi simili alla tripsina, una endopeptidasi simile all'endopeptidasi Glu-C V8 specifica, ed una carbossipeptidasi. Il genoma di *B.bacteriovorus HD100* codifica per un gran numero di sistemi proteici diversi che comprendono sia proteine citoplasmatiche, sia proteina di trasporto della membrana esterna (Rendulic et al., 2004).

L'analisi bioinformatica totale condotta da Barabote e collaboratori (2007), ha evidenziato la presenza di almeno quattro tipi di sistemi di secrezione, a livello della membrana interna, e cinque tipi nella membrana esterna. È interessante notare che negli studi sui sistemi di secrezione batterica, l'eliminazione del Sistema Tat (twin-arginine translocation), che si basa sul trasporto di proteine nella loro struttura terziaria, riconosciute dal segnale peptidico rappresentato da due arginine consecutive, ha rilevato una riduzione della crescita batterica di *B.bacteriovorus* sia HD sia HI (Chang et al., 2011). Oltre al Sistema di secrezione Tat, *B.bacteriovorus* utilizza sistemi di secrezione di tipo I e II (Sec), mentre il sistemi di secrezione di tipo III, IV e VI, associati al grado di patogenicità batterica, risultano assenti (Barabote et al., 2007; Rendulic et al., 2004; Rotem et al., 2014). Anche se le funzioni di molte proteine ad oggi sono chiare ed evidenti, gran parte del secretoma di *B.bacteriovorus* ha dimostrato di essere estremamente dinamico ed in evoluzione, rilevando il coinvolgimento di molte proteine nelle funzioni legate al ciclo cellulare. Pertanto, in relazione alla elevata quantità di enzimi idrolitici, *B.bacteriovorus* dovrebbe essere ritenuto una risorsa biologica interessante per l'identificazione di nuove proteine batteriche con potenziali applicazioni in diversi settori industriali.

1.3 Le proteasi dei BALOs come nuovi strumenti di immuno-modulazione

Il rapido sviluppo della biofarmaceutica ed in particolare delle terapie basate sull'impiego di anticorpi ha stimolato l'esigenza di strumenti biotecnologici e metodi innovativi per garantire l'efficienza della terapia e la salute. Gli anticorpi sono fisiologicamente prodotti e rappresentano un gruppo di molecole alquanto eterogenee, sia nella struttura proteica, sia nelle possibili modificazioni post-traduzionali, che comprendono la N e O-glicosilazione, la deaminazione e modificazioni strutturali della catena. Questa loro eterogeneità e suscettibilità intrinseca si ripercuote nella produzione di anticorpi monoclonali (mAb) che richiedono metodi riproducibili e affidabili per l'analisi ed il controllo di qualità. Generalmente le analisi sono eseguite da spettrometri di massa (MS), la cui sensibilità è aumentata dalla frammentazione delle proteine in peptidi sovrapposti, evidenziando la necessità di strumentazione biotecnologica sofisticata (Aebersold and Mann, 2003; Hansel et al., 2010). Ciò conduce all'esigenza di ricorrere ad enzimi idrolitici specifici e compatibili, da aggiungere agli enzimi già in uso per le analisi anticorpali.

In quest'ottica i BALOs ed i sistemi enzimatici da essi secreti rappresentano una risorsa potenziale per la loro ricerca. L'applicazione di enzimi batterici come strumenti biotecnologici per analizzare gli anticorpi umani è comunemente utilizzata da tempo: gli enzimi IdeS e Endos (Genovis AB) dello *streptoccoccus* utilizzati per l'idrolisi specifica di IgG umane ne rappresentano un esempio. Come già accennato il *B.bacteriovorus* si sta rivelando come potenziale risorsa per l'identificazione di nuovi enzimi impiegabili nel campo biotecnologico. Infatti le caratteristiche delle serino-proteasi BspK e BspE, secrete dai BALOs, hanno dimostrato possedere attività enzimatica specifica sugli anticorpi umani (Bratanis et al., 2017; Bratanis and Lood, 2019). In particolare BspK idrolizza in maniera selettiva le IgG, che rappresentano la maggior parte degli anticorpi utilizzati in terapia, abilitando l'analisi spettrometrica dell'anticorpo stesso. (Bratanis et al., 2017). Altri enzimi simili, come Ides e SpeB, sono attualmente impiegati allo stesso scopo nell'industria biofarmaceutica. Il Sistema enzimatico BspE idrolizza selettivamente il frammento Fc delle immunoglobuline di tipo A (IgA) (Bratanis and Lood, 2019).

Tuttavia, poiché le IgA non sono comunemente impiegate per lo sviluppo e la ricerca di anticorpi terapeutici, BspE rappresenta ad oggi uno strumento prezioso per la ricerca di base delle IgA, come le modalità di interazione con il frammento Fc, l'attivazione del complemento, i cui risultati potrebbero eventualmente portare alla creazione di specifici prodotti. Infatti, il rapido sviluppo e il crescente numero di mAb stimola ad oggi la necessità di identificare e caratterizzare nuovi anticorpi, individuabili attraverso la degradazione o la modificazione delle proteine.

I batteri predatori come strategia per combattere il trasferimento orizzontale di geni

La resistenza batterica rappresenta una grave minaccia per la salute pubblica ed è considerata un importante problema sanitario a livello globale.

Fino ad oggi, l'approccio scientifico per limitare il fenomeno si è concentrato nel trovare nuovi strumenti o mezzi sperimentali che siano in grado di eliminare i batteri, come i batteriofagi (Fischetti, 2010; Lood et al, 2014, 2015; Thandar et al., 2016). Il potenziale impiego di batteri predatori al fine di limitare la diffusione della resistenza tra i batteri stessi, attraverso l'inibizione del fenomeno di trasferimento genico orizzontale (HGT) deve essere ancora indagato.

Negli ultimi anni sono stati identificati dei punti cruciali nelle fasi di trattamento delle acque reflue, che contribuiscono allo sviluppo di resistenza antimicrobica (AMR), attraverso pressione selettiva (impiego di elevate quantità di antibiotici) e HGT. Diversi studi hanno dimostrato che, rispetto alla maggioranza di batteri rimossi durante il processo di purificazione dell'acqua, una grande varietà di geni antibiotico-resistenti (ARGs) può essere riscontrata sia nei fanghi attivi, sia nell'acqua effluente (Barancheshme and Munir, 2018; Bengtsson-Palme et al. 2016; Calero-Cáceres et al., 2014; Zhang et al., 2019). Tali ARGs derivano da frammenti cellulari privi di DNA (dovute a morte delle cellule batteriche) e da frazioni di batteriofagi (Lood et al. 2017). Considerando l'impatto biologico della trasfezione e della trasduzione nel promuovere la diffusione della resistenza batterica, il destino dei frammenti cellulari e dei fagi associati ai ARGs, non può essere trascurato. Al riguardo, il fenomeno di eliminazione di DNA ricombinante dall'ambiente usando i batteri predatori è stato evidenziato da Monnappa e collaboratori (2014). Essi hanno dimostrato che *B.bacteriovorus HD100* è in grado di rimuovere efficacemente i frammenti batterici nella sospensione acquosa e nel terreno. Questo, a sua volta, porta una riduzione del plasmide ricombinante associato alla cellula preda, limitando le possibilità di HGT. I batteri predatori prosperano in ambienti con alta densità di prede, quindi si trovano naturalmente nei WWTP (El-Shanshoury et al., 2016; Feng et al., 2016; Yu et al., 2017). Essi non solo uccidono la cellula preda, ma degradano anche completamente il suo DNA (Matin e Rittenberg, 1972; Rosson and Rittenberg, 1979), riducendo, di conseguenza il pool di ARGs nell'ambiente in cui operano. Anche l'insieme delle proteine secrete dai batteri predatori contribuiscono alla riduzione dell'HGT: in particolare, colture di *B.bacteriovorus HD100* hanno evidenziato proprietà proteolitiche e attività nucleasica (Bratanis et al., 2017; Bratanis e Lood, 2019; Engelking and Seidler, 1974; Gloor et al., 1974; Monnappa et al., 2014).

Quindi, ipoteticamente, le nucleasi rilasciate nell'ambiente possono eliminare le AGRs *free-cell*, mentre le proteasi extracellulari possono inattivare i frammenti di fagi. Questa ulteriore possibilità di applicazione dei batteri predatori, per limitare il fenomeno di HGT nelle acque, dove vi è un elevata presenza microbica, prospetta una possibile integrazione dell'impiego di *B.bacteriovorus* con una

duplice funzione: da una parte rimuovono i frammenti batterici, limitando il fenomeno di HGT, dall'altra parte riducono la massa del fango attivo utilizzato per la depurazione dell'acqua reflua attraverso la bio lisi dello stesso (Yu et al., 2017). Nonostante i dati sperimentali esistenti, la possibilità di utilizzare i BALOs per controllare la diffusione del fenomeno di resistenza antibiotica necessità di ulteriori approfondimenti e test *in vivo.*

Utilizzo potenziale dei BALOs come probiotici

Il microbiota, in altre parole l'insieme di popolazioni di microorganismi abitanti l'intestino umano, è un Sistema complesso di convivenza tra miliardi di virus e batteri che formano un proprio ecosistema. Etichettato comunemente come flora batterica, svolge una serie di funzioni fondamentali per il benessere del corpo umano. Alterazioni di questo ecosistema possono portare patologie dell'intestino, anche croniche, come il morbo di Crohn, apparentemente correlato a un cambiamento nel microbiota, nel quale determinate popolazione batterica producesti l'enzima ureasi, aumentano vertiginosamente prendendo il posto di altri ceppi (Pascal et. al., 2017). Oltre al suo ruolo, comunemente conosciuto per l'equilibrio del Sistema digestivo e l'assorbimento corretto di nutrienti, l'equilibrio del microbiota è un fattore fondamentale anche per il Sistema immunitario, interagendo in un rapporto "cross-talk" con i componenti immunitari della mucosa intestinale (Purchiaroni et.al. , 2013).

Recentemente è divenuto di particolare interesse lo studio del rapporto tra microbiota e Sistema nervoso centrale, nel cosiddetto asse intestino-cervello. Esso è un Sistema d'interazione e scambio a livello nervoso, endocrino e immunitario, tra i due apparati. Addirittura sembra che la disbiosi, ossia una rottura dell'equilibrio nell'ecosistema del microbiota, possa correlarsi all'insorgere di stati d'animo negativi, con conseguenti condizioni psicologiche avverse come stress, ansia e depressione, fino a malattie neurologiche come Parkinson e Alzheimer (Zhu et. al., 2017).

Diventa quindi necessario l'approfondimento delle terapie e i metodi di guarigione nel caso d'infezioni o infiammazioni dell'intestino dovute a invasione della flora intestinale da parte di patogeni. L'utilizzo degli antibiotici per trattare le infezioni intestinali ha molti lati negativi sul microbiota, dalla possibilità che il patogeno bersaglio si adatti sviluppando antibiotico resistenza, al fatto che il farmaco in sé vada a distruggere diversi membri della flora batterica, oltre che il patogeno, impoverendo e danneggiando la flora intestinale.

I *Bdellovibrio* hanno una grande varietà di prede, ad esempio possono predare gli *P. aeruginosa* multi resistenti e provocanti la fibrosi cistica, al punto che si sta teorizzando di proporre l'impiego di BALOs in forma aerosol. E ancora, molti ceppi BALOs trovano una potenziale applicazione contro vari patogeni coinvolti nell'infezione dei tratti digestivi ed urinari, come ad esempio il ceppo LF82 di *Escherichia coli (AIEC).* Vari studi negli ultimi anni hanno condotto prove in vivo per analizzare

il comportamento dei BALOs nella flora batterica: inoculando i batteri predatori nell'intestino di ratti infetti da *Coli* ed altre tipiche prede dei *Bdellovibrio*, si è osservato come i predatori agissero efficacemente tanto quanto un antibiotico, senza però intaccare le altre popolazioni batteriche della flora del roditore.

L'utilizzo dei BALOs come probioti per l'uomo è quindi una prospettiva futura, molto interessante. Unico limite di questo metodo può essere dovuto dalle barriere fisiche del corpo, come l'acidità dello stomaco e la presenza di bile e peptidi antimicrobici, che potrebbero impedire l'arrivo dei BALOs all'intestino tramite ingestione (Bonfiglio et. al., 2020).

Applicazione dei BALOs nella produzione di bio plastiche

I poliidrossialcanoati (PHA) sono polimeri poliesteri prodotti da una gran varietà di batteri. Essi sono composti di grande interesse, giacché potrebbero diventare un'alternativa biosostenibile alla plastica derivata dal petrolio.

I batteri produttori di PHA possono arrivare a sintetizzare una quantità di polimeri corrispondente al 90% del loro peso. Uno dei grandi ostacoli per la produzione industriale di bio-plastiche, tuttavia, è dato dal fatto che è difficile l'estrazione dei polimeri dal batterio. Utilizzare *Bdellovibrio bacteriovorus*, eventualmente editato tramite ingegneria genetica, per abbattere i batteri permettendo dopo la loro lisi l'estrazione dei PHA, sarebbe un'ottima scelta all'utilizzo di sostanze tossiche impiegate per tale scopo. Un gruppo di ricerca di Madrid ha già testato questo nuovo metodo ottenendo risultati soddisfacenti: il *B. bacteriovorus* attacca efficacemente le cellule target, senza alterare il prodotto intracellulare delle bioplastiche. Inoltre, come assicurano i ricercatori del team, il batterio predatore non è in grado di invadere cellule mammifere ed eucariote, non essendo quindi dannoso per l'uomo (Plataforma SINC. 2016, November 30).

APPLICAZIONI DEI BALOs NELLA FILIERA ALIMENTARE SPERIMENTATE IN IZSUM

Caso di studio in acquacoltura I

In questo studio è stato scelto il genere *Halobacteriovorax*, la forma marina dei BALOs. In acquacoltura questi batteri predatori sono stati testati per ridurre la mortalità dovuta a infezioni da *Vibrio* spp e *Aeromonas* spp in crostacei e pesci (Cao et al. 2014; Wen et al. 2014). Le recenti scoperte in questo campo dimostrano le potenziali applicazioni di questi microrganismi nel ridurre in modo significativo *V. parahemolyticus* e *V.vulnificus*, sia in acqua di mare sia nelle ostriche, in condizioni di laboratorio (Chen et al. 2011; Li et al. 2011; Richards et al. 2012, 2016; William et al. 2015).
In Italia la contaminazione dei bivalvi da parte di vibrioni patogeni è un problema che va crescendo e in *Mytilus galloprovincialis*, una specie indigena, sono stati isolati ceppi tossigeni di *V. parahaemolyticus*, non-O1/O139 *V.cholerae* e *V. vulnificus* (Normanno et al. 2006; Ottaviani et al. 2009, 2010a, 2013; Beneduce et al. 2010). Inoltre negli ultimi anni sono stati segnalati episodi di infezioni intestinali ricollegabili a *V. parahaemolyticus* e non-O1/O139 *V.cholerae* con fonte dell'infezione molluschi o acqua di mare dell'Adriatico (Ottaviani et al. 2008, 2009, 2010b, 2011, 2012). L'impatto di *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* non-O1/O139 e *V. vulnificus* nei bivalvi ha una rilevanza sia economia che sulla salute, e ad oggi i processi di decontaminazione utilizzati non sono sempre efficaci (Croci et al. 2002; Andrews 2004). Per questo motivo un nuovo approccio biologico basato sull'utilizzo dei BALOs a questo problema rappresenta una strada promettente.
Per portare avanti la ricerca in questo campo è essenziale caratterizzare i BALOs marini nei confronti dei vibrioni patogeni e condurre uno studio di dinamica di popolazione fra preda e predatore.

Come caso di studio per dimostrare le potenzialità e applicazioni dei BALOs in acquacoltura, presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche - Laboratorio Controllo Alimenti di Ancona nel 2017 sono stati condotti due esperimenti di decontaminazione di cozze in un acquario sperimentale al 3% di salinità, mantenuto a 17 ° C e costantemente aerato (Fig.2). Sono state utilizzate le cozze (*Mytilus galloprovincialis*) provenienti da un'area di raccolta autorizzata del Mare Adriatico centrale (Italia). L'esperimento 1 è stato condotto utilizzando cozze prive di predatori o prede e contaminate sperimentalmente con *Halobacteriovorax* e *V.parahaemolyticus* in un rapporto di 10^3 UFP/ 10^5 UFC per ml. Le cozze sono state lasciate a bioaccumulare *V. parahaemolyticus* per 6 ore, il tempo di esposizione si basava su esperimenti precedenti (Croci et al., 2002). Dopodiché sono state equamente divise in due gruppi e distribuite in altre 2 vasche. Un gruppo è stato trattato come

microcosmo di controllo e HBXCO1 non è stato aggiunto, l'altro gruppo come microcosmo test, con aggiunta di HBXCO1 in quantità tale da raggiungere la concentrazione finale di circa 1×10^3 UFP/ml. L'esperimento 2 è stato eseguito utilizzando cozze naturalmente ospitanti *Halobacteriovorax* che sono state contaminate sperimentalmente con 10^5 UFC/ml di *V.parahaemolyticus*.

In parallelo entrambi esperimenti sono stati eseguiti anche in 2 vasche senza cozze, una come test, con l'aggiunta del predatore, e l'altra di controllo, senza aggiunta di predatore.

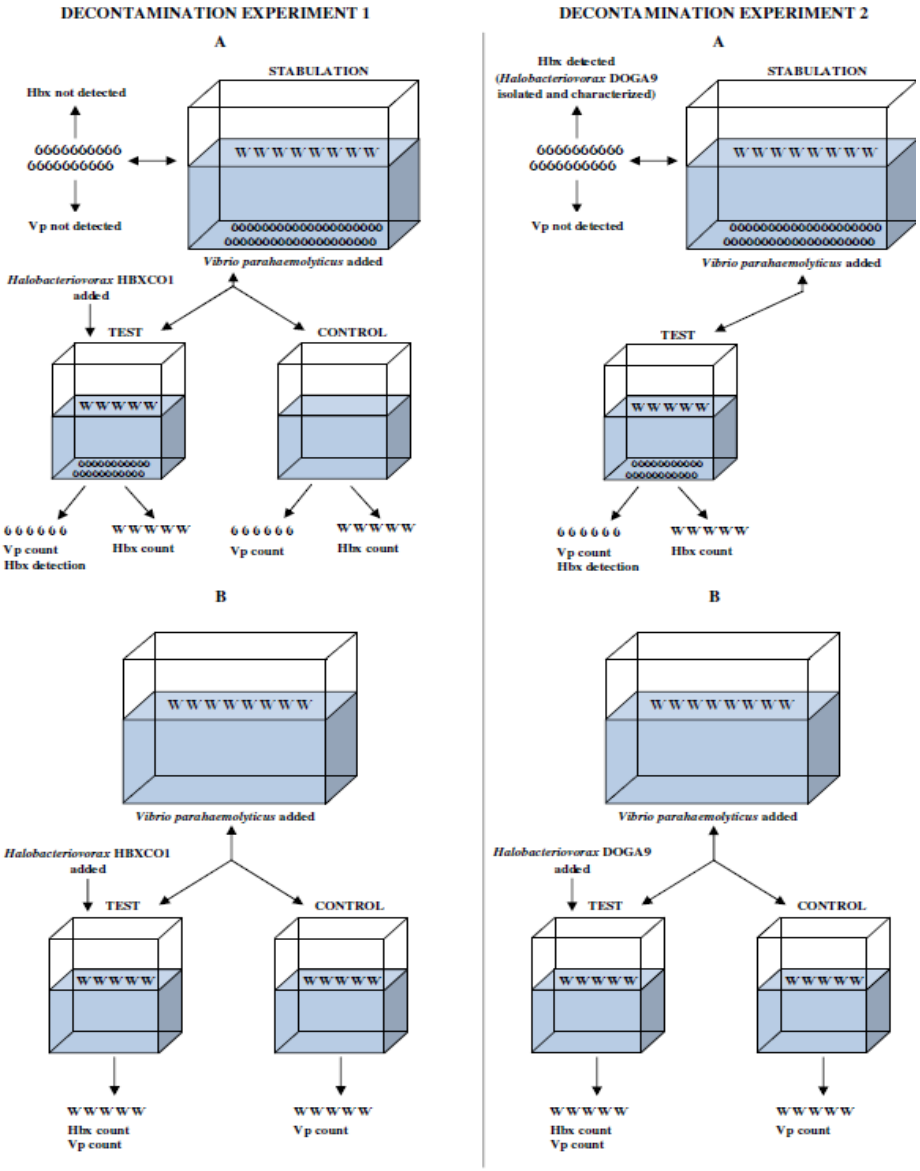


Fig. 2: Disegno sperimentale decontaminazione dei mitili
(Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche)

Risultati

I $BALO_S$ indigeni rilevati da cozze prima dell'esperimento 2 sono stati confermati dalla PCR come Halobacteriovorax. La sequenza 16SrRNA del nuovo isolato, chiamato DOGA9, è stata inviata a GenBank con il numero di accesso MN750624. Questa sequenza ha mostrato una corrispondenza del 100% alla sequenza 16SrRNA di ceppi OC71 isolati da Great Salt Lake (numero di accesso GenBank DQ536436) e una corrispondenza del 91,51% alla sequenza 16S rRNA del nostro ceppo HBXCO1 (numero di accesso GenBank MG770616).

Per l'Esperimento 1 i risultati della sperimentazione di decontaminazione sono mostrati nella figura 3.

Nel microcosmo test con le cozze sono stati contati 10^3 UFP/ml di HBXCO1 a 0 ore in ASW. La concentrazione di HBXCO1 in acqua è aumentata di circa 2 log, da 10^3 a 10^5 UFP/ ml entro 6 h. È diminuito di circa 2 log, da 10^5 a 10^3 UFP/ ml, tra 6 e 24 h, è aumentato di circa 0,5 log da 24 a 48 h, infine si è stabilizzato da 48 a 72 h.

Nel microcosmo test senza cozze la concentrazione di HBXCO1 in acqua è aumentata di circa 2 logaritmi entro 6 ore e si è stabilizzata da 6 a 72 ore. Confrontando le concentrazioni di HBXCO1 in acqua nei diversi punti temporali nel microcosmo test, con e senza cozze, queste erano significativamente più basse nel test con le cozze rispetto al test senza cozze a 24, 48, 72 h, con una differenza di circa 2 log. Questa significativa riduzione dell'HBXCO1, in acqua dopo 24 ore nel microcosmo test con le cozze, probabilmente riflette il passaggio del predatore dall'acqua al mollusco. A supporto di questa affermazione, il rilevamento dell'HBXCO1 dal liquido intravalvare ha dato risultati positivi a 24, 48 e 72 ore, ma non a 6 ore. Nel microcosmo controllo con e senza cozze, la conta dei BALOs nell'acqua era sempre <1 UFP/ml da 0 a 72 h. È ipotizzabile che l'*Halobacteriovorax* sospeso nell'acqua di mare possa andare a concentrarsi internamente alle cozze in modo simile ai patogeni. Nel microcosmo test con le cozze, la concentrazione di *V. parahaemolyticus* è rimasta costantemente intorno a 5 log per tutta la durata della sperimentazione. Nel microcosmo controllo con cozze la concentrazione di *V. parahaemolyticus* è rimasta costante tra 0 e 6 h, è aumentata di circa 2 log da 6 a 24 h, si è livellata da 24 a 48 h e infine è diminuita di circa 1 log da 48 a 48 72 h. Le concentrazioni di *V. parahaemolyticus* erano significativamente più basse nel test rispetto al controllo a 24, 48, 72 h, con la differenza massima di 2,2 log a 24 h. Nel test e controllo del microcosmo senza cozze, le quantità di *V. parahaemolyticus* erano paragonabili a quelle ottenute nel rispettivo microcosmo con le cozze.

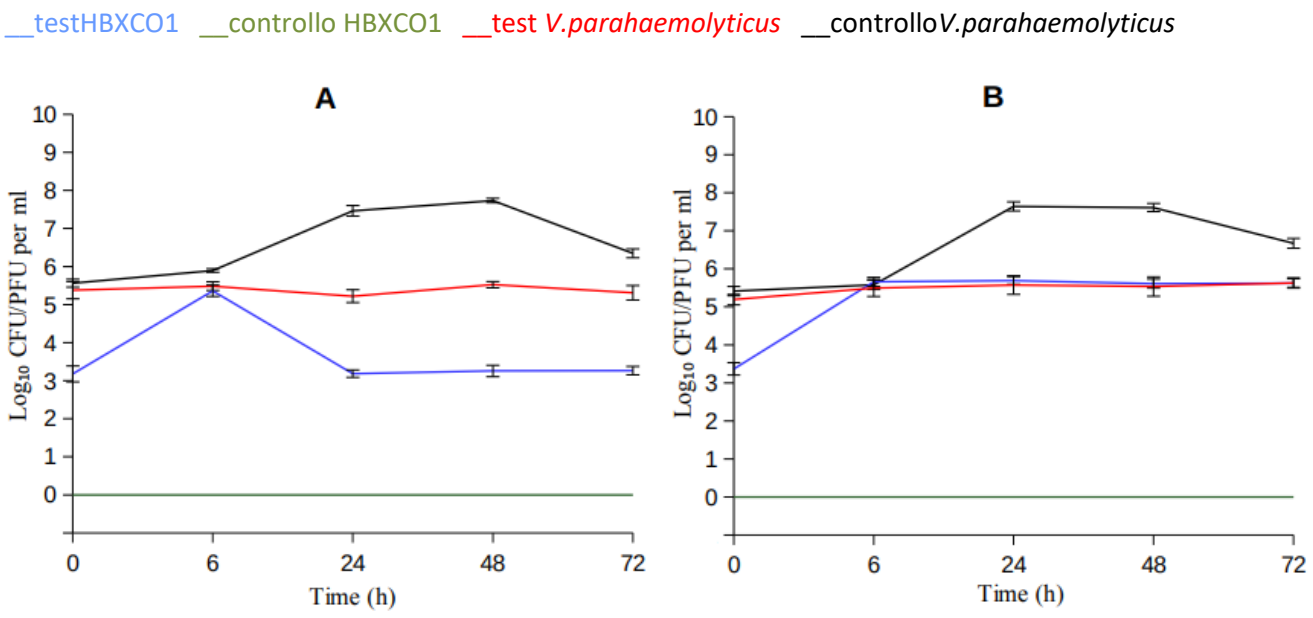


Fig. 3: Risultati esperimento di decontaminazione 1. A= microcosmo con le cozze; B= microcosmo senza cozze

Per quanto riguarda l'esperimento 2, i risultati sono mostrati in figura 4. L'*Halobacteriovorax* naturalmente presente all'interno delle cozze è stato rilasciato in acqua alla concentrazione di 10^3 UFP/ ml a 0 h. La concentrazione del predatore in acqua è aumentata di circa 2 logaritmi entro 6 ore. È diminuito di circa 2 log tra le 6 e le 24 ore e si è stabilizzato da 24 a 72 ore. La concentrazione di *V.parahaemolyticus* è rimasta costantemente intorno ai 5 log per l'intero periodo di prova. Nel microcosmo senza cozze, sia nel test sia nel controllo, le tendenze di *V. parahaemolyticus* e DOGA9 erano paragonabili a quelle ottenute nei rispettivi microcosmi dell'esperimento 1. Le tendenze predatorie di *Halobacteriovorax* indigeno ed esogeno nei confronti di *V.parahaemolyticus*, nel microcosmo test con cozze dell'esperimento 1 e 2, erano simili. Per entrambi gli esperimenti, la concentrazione della preda non è aumentata nelle cozze per l'intero periodo di prova. Anche la capacità predatoria di DOGA9 e HBXCO1 verso *V.parahaemolyticus* nel microcosmo test senza cozze degli esperimenti 1 e 2, rispettivamente, erano simili. Ciò può essere correlato al fatto che le concentrazioni iniziali di predatore e preda erano le stesse negli esperimenti 1 e 2 e all'elevata somiglianza tra DOGA9 e HBXCO1, come dimostrato dall'analisi del sequenziamento 16SrRNA.

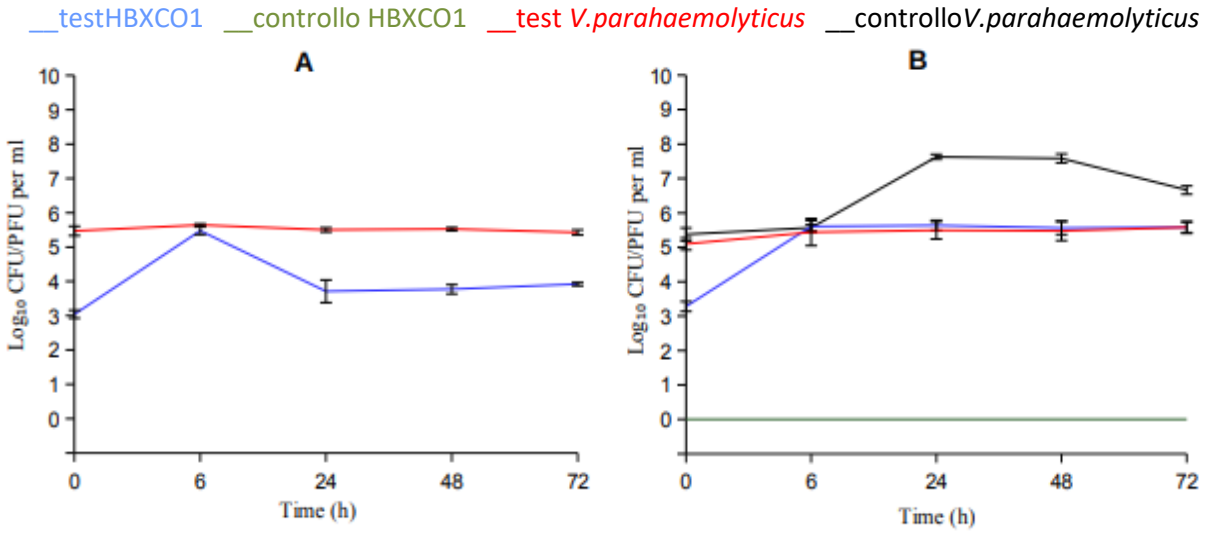


Fig. 4: Risultati esperimento di decontaminazione 2. A= microcosmo con le cozze; B= microcosmo senza cozze.

Discussione

I risultati dell'esperimento 1 suggeriscono che la matrice mollusco non riduce l'efficacia dell'HBXCO1 rispetto a all'acqua senza cozze. Ciò probabilmente è correlato al meccanismo di filtrazione delle cozze che crea un equilibrio dinamico tra la preda e la concentrazione di predatore nell'acqua e all'interno del mollusco. Per lo stesso motivo, l'aumento di *V. parahaemolyticus* all'interno delle cozze nel microcosmo controllo è probabilmente dovuto alla moltiplicazione del batterio in acqua e al suo passaggio nel mollusco. Ciò sembra essere confermato dall'analogo comportamento di *V. parahaemolyticus* nel microcosmo controllo senza cozze. Tuttavia, non si può escludere che *V.parahaemolyticus* possa anche moltiplicarsi all'interno delle cozze.

I risultati dell'esperimento 2 mostrano che l'*Halobacteriovorax* naturalmente presente all'interno delle cozze è stato in grado di contenere il livello di *V.parahaemolyticus* aggiunto sperimentalmente e ciò suggerisce indirettamente che *Halobacteriovorax* potrebbe esercitare un ruolo fisiologico nel controllo della crescita di *V.parahaemolyticus* e altri vibrioni tipici dell'ecosistema marino. Crediamo che l'*Halobacteriovorax* all'interno delle cozze continui a parassitare i vibrioni e altri potenziali agenti patogeni così come fa nell'acqua di mare. È noto che l'assorbimento e la persistenza dei batteri nelle cozze dipendano dalle condizioni fisiche dell'acqua, dalla disponibilità di nutrienti e dalla capacità della cozza di bioaccumulare ed eliminare i contaminanti microbici.

Da precisare che BALOs marini sono stati già utilizzati per eliminare *V.parahaemolyticus* nelle ostriche, in esperimenti a scala di laboratorio a 25 ° C, con una riduzione delle prede nei test rispetto al controllo di circa 3,5 log dopo 7 giorni (Li et al., 2011).

Tuttavia, l'andamento delle prede è stato valutato in condizioni non in linea con quelle degli impianti di depurazione che, almeno in Italia, lavorano di solito per cozze a 17 °C per 24-48 ore. Inoltre, Li et al. hanno usato una concentrazione di predatore/preda di 10^7 UFP / 10^8 UFC per ml. Nel presente studio, la temperatura di lavoro e i tempi di prova sono stati scelti in linea con quelli di un impianto di depurazione e la concentrazione del predatore è stata selezionata per essere simile a quella presente in natura nell'acqua di mare (Ottaviani et al., 2018). Nonostante la bassa temperatura, 10^3 UFP/mL di HBXCO1 sono stati in grado di impedire che 10^5 UFC/ml di preda aumentassero nel tempo e lo hanno mantenuto di circa 2 log inferiore a quello del controllo, da 24 a 48 h.
Abbiamo testato HBXCO1 con un ceppo *V.parahaemolyticus* non tossigeno.
Tuttavia, è stato dimostrato che i tassi di crescita di *V. parahaemolyticus* patogeni e non patogeni sono simili (US FDA, 2001) e HBXCO1 ha mostrato attività predatoria verso un gran numero di ceppi tossici di *V.parahaemolyticus* (Ottaviani et al., 2018). Il Center for Disease Control and Prevention ha dichiarato che la dose media infettiva di *V.parahaemolyticus* è di 10^5 UFC/ g. Dai nostri risultati è chiaro che HBXCO1 non ha eliminato *V. parahaemolyticus* dalle cozze. Tuttavia, nelle cozze contaminate con un livello di *V.parahaemolyticus* al limite della dose media infettiva, l'HBXCO1 è stato in grado di mantenere la concentrazione al di sotto di quella a rischio, per almeno 48 ore. Al contrario, nel controllo, la preda ha superato la dose infettiva dopo 6 ore ed è rimasta al di sopra di questo limite per l'intero periodo di prova.

Caso studio in acquacoltura II

Nel 2018 è stato condotto uno studio presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche-Laboratorio Controllo Alimenti di Ancona il cui scopo è stato quello di individuare dalle acque marine dell'Adriatico (Italia) BALOs potenzialmente capaci di predare ceppi di *Vibrio parahaemolyticus.* Un ulteriore scopo era testare la specificità e l'efficienza di predazione di un *Halobacterivorax* precedentemente isolato nello stesso ecosistema marino, denominato HBXCO1, verso 17 ceppi *Vibrio* e 7 ceppi non-*Vibrio* anch'essi autoctoni del mare Adriatico. L'impatto che hanno i ceppi patogeni in esame come *V. parahaemolyticus,* non-O1/O139 *V. cholerae* e *V. vulnificus* nei bivalvi è rilevante nel settore pubblico, sanitario ed economico ed i processi di decontaminazione dei molluschi attualmente in uso non sono sempre efficaci verso questi microrganismi. È perciò ipotizzabile un utilizzo di HBXCO1 nel costruire strategie di biocontrollo di vibrioni patogeni nei bivalvi, dalla raccolta fino al commercio.
Lo studio ha come presupposto le conoscenze già acquisite sui *Bdellovibrio* and like organisms (BALOs), batteri Gram-negativi, aerobi e predatori verso altri Gram-negativi. I BALOs sono presenti praticamente in ogni habitat, acqua dolce, marino e terrestre e si dividono in quattro generi:

Bdellovibrio, Bacteriolyticum, Peredibacter, e Bacteriovorax, recentemente rinominato *Halobacteriovorax* (Koval et al. 2015).

Nello studio trattato (Ottaviani et al., 2018), l'obiettivo era analizzare l'acqua di mare prelevata da aree di crescita dei molluschi dall'Adriatico Centrale, per la presenza di BALOs capaci di infettare *V. parahaemolyticus.* È stato inoltre utilizzato un ceppo di *Halobacteriovorax* precedentemente isolato in un altro studio, HBXCO1 (Ottaviani et al. 2015), per sperimentazioni verso *V. parahaemolyticus* come preda, monitorando le rispettive abbondanze a tempi differenti in un microcosmo marino artificialmente riprodotto. Infine è stata testata la specificità verso la preda e l'efficienza di predazione di HBXCO1 su 17 *Vibrio* spp., inclusi ceppi *V. parahaemolyticus,* non-O1/O139 *V. cholerae* e *V. vulnificus,* e su 7 batteri non-*vibrio,* tutti precedentemente isolati nel mare Adriatico (Ottaviani et al. 2018)

Risultati

Le conte dei BALOs nei test variano da un valore di 5.0 PFU per ml (a Marzo 2017) a un valore di 98.6 PFU per ml (ad Agosto 2016) (Fig. 5).

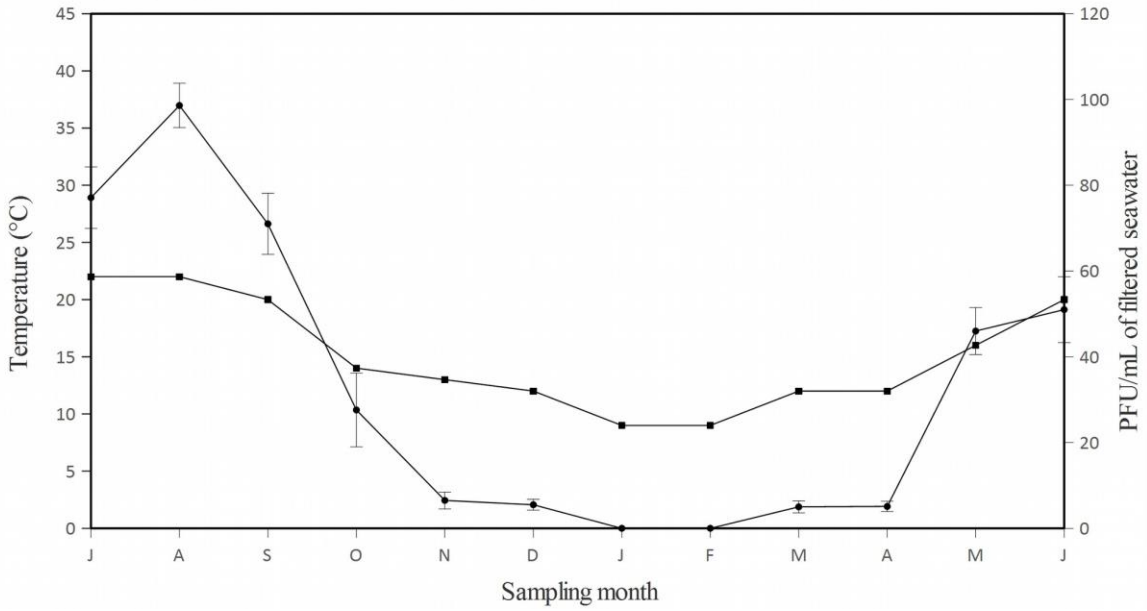


Fig. 5: Livelli di BALOs in relazione alla temperatura in aree di crescita dei molluschi, nell'Adriatico centrale. Temperature; PFU per ml.

I dati mostrano una forte correlazione positiva tra temperatura dell'acqua e livelli di BALOs, *r*=0.96. I livelli di BALOs più elevati sono stati rilevati nei periodi di Luglio-Settembre 2016 e Maggio-Giugno 2017, quando l'acqua ha una temperatura tra 16 e 22˚C, mentre la temperatura più elevata si è registrata ad Agosto 2016 (poco superiore ai 22˚C). I livelli più bassi si sono registrati in Gennaio-Febbraio 2017 a causa della temperatura dell'acqua di circa 9˚C che ha inibito la proliferazione dei

BALOs**.** Ogni presunto BALOs è stato poi confermato con analisi molecolari di PCR sui frammenti da 700 bp dell'rRNA 16S.

Il sequenziamento del rRNA 16S di un ceppo isolato in un precedente studio e chiamato HBXCO1, mostrano un match del 100% di sequenza (625/625 bp), con l'rRNA 16S sequenziato dal ceppo M3S4-F *Bacteriovorax*, isolato nelle acque oceaniche di Chesepeake Bay (GeneBank codice di accesso JN934563). L'esperimento di Challenge in acqua di mare artificiale cui si andava a monitorare nel tempo le dinamiche di crescita di HBXCO1 e *V. parahaemolyticus* mostra che la concentrazione di HBXCO1 aumenta di circa 2 log (passa da 10^5 PFU a 10^7 PFU per ml) entro le prime 24 h, rimane stazionaria tra 24 e 72 h e raggiunge il picco tra 72 e 96 h, arrivando alla concentrazione di 10^8 PFU per ml (Fig. 6).

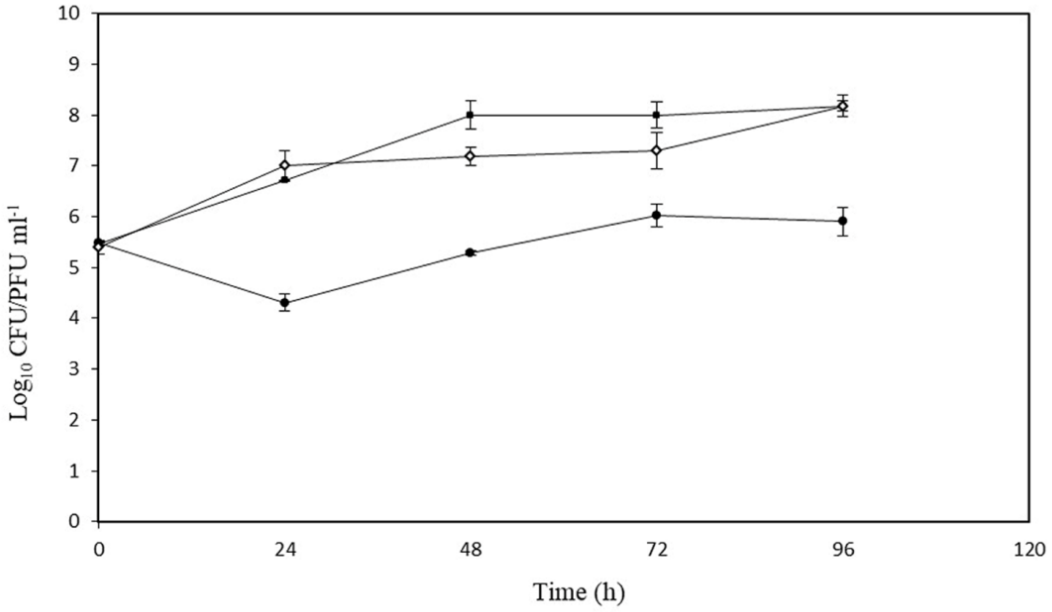


Fig. 6: Dinamica di popolazione di HBXCO1 e *Vibrio parahaemolyticus* NCTC 10885 in test (con HBXCO1) e in controllo (senza HBXCO1). ● Vp test; ■ Vp control; ◊ HBXCO1.

I risultati dimostrano che al tempo 0 h la concentrazione di *V. parahaemolyticus* ha un valore di 10^5 CFU per ml sia nel controllo che nel test, ma col tempo a 24, 48, 72, 96 h questi valori diminuiscono significativamente nel test ma non nel controllo, misurando una diminuzione di circa 2 log (P=0.03). La diminuzione più rilevante di concentrazione di *V. parahaemolyticus* nel test rispetto al controllo, si misura a 48 h ed è nell'ordine di 2.7 log. Per verificare la specificità verso la preda e l'efficienza di predazione di HBXCO1 questo è stato testato verso ceppi *Vibrio* e non-*Vibrio* direttamente o indirettamente legati al Mar Adriatico (Tab. 1). Tutti gli esperimenti condotti dimostrano che

HBXCO1 ha l'abilità di attaccare i ceppi *Vibrio* testati, indipendentemente dall'origine degli isolati, ma è incapace di attaccare il ceppo *V. alginolyticus*.

Prey strains Toxin genes *	Source, year of isolation	Origin	Susceptibility to HBXOC1
1.V.parahaemolyticus *tdh+**; ;trh -***; toxRS* + (pandemic strain)	feces, 2007	Adriatic, Italy	+
2.V.parahaemolyticus *tdh-;trh+; toxRS-*	feces, 2009	Adriatic, Italy	+
3.V.parahaemolyticus *tdh-/trh+;toxRS-*	marine water, 2011	Adriatic, Italy	+
4.V.parahaemolyticus *tdh+/trh-;toxRS-*	mussels, 2014	Mediterranean, Italy	+
5.V.parahaemolyticus *tdh-;trh-; toxRS-*	mussels, 2015	Adriatic, Italy	+
6.V.parahaemolyticus *tdh-;trh+; toxRS*	mussels 2016	Adriatic, Italy 2016	+
7. Non O1/O139 *V.cholerae* *hly*AClass-; *hly*ET+;*ctx*A-;*tcp*AClass+; *tcpA*ET-; *stn/sto-*	subcutaneous tissue, 2009	seawater of Adriatic, Italy as the most probable source of infection	+
8. Non O1/O139 *V.cholerae* *hly*AClass-; *hly*ET+;*ctx*A-;*tcp*AClass-; *tcpA*ET-; *stn/sto+*	marine water, 2011	Adriatic, Italy	+
9. Non O1/O139 *V.cholerae* *hly*AClass-; *hly*ET+;*ctx*A-;*tcp*AClass-; *tcpA*ET-; *stn/sto-*	subcutaneous tissue, 2012	seawater of Adriatic, Croazia as the most probable source of infection	+
10. Non O1/O139 *V.cholerae* *hly*AClass-; *hly*ET+;*ctx*A-;*tcp*AClass -; *tcpA*ET-; *stn/sto-*	feces, 2012	bivalves as the most probable source of infection	+
11. Non O1/O139 *V.cholerae* *hly*AClass-; *hly*ET+;*ctx*A-;*tcp*AClass-; *tcpA*ET-; *stn/sto-*	mussels, 2014	Adriatic, Italy	+
12 V.vulnificus	clams, 2013	Adriatic, Italy	+
13. V.alginolyticus	mussels, 2012	Adriatic, Italy	-
14.Salmonella napoli	mussels, 2015	Adriatic, Italy	-
15. E.coli	mussels, 2016	Adriatic, Italy	-
16. A.hydrophila	mussels, 2004	Adriatic, Italy	-
17. V.parahaemolyticus NCTC 10885			+
18. V.cholerae non O1/O139 NCTC 4711			+
19. V.alginolyticus NCTC 10675			-
20. V.vulnificus NCTC 11067			+
21. Salmonella typhimurium ATCC 14028			-
22. E.coli ATCC 25922			-
23. A. hydrophila ATCC 35654			-
24. P. aeruginosa ATCC 27853			-

Tabella 1: Prede saggiate con il ceppo di *Halobacteriovorax* HBXCO1.

Discussione

I risultati ottenuti dimostrano che i BALOs indigeni, predatori di vibrioni patogeni, sono naturalmente presenti nelle acque marine dell'Adriatico, in aree di crescita per i molluschi, dove probabilmente ricoprono il ruolo di regolatori biologici in dinamiche di popolazione batteriche. È stato dimostrato inoltre l'andamento stagionale dei BALOs presenti nell'Adriatico, in accordo con studi precedenti condotti nell'oceano Atlantico e nell'oceano Pacifico, nonostante si registrino livelli di BALOs più alti nell'Adriatico rispetto a quelli rilevati nell'Atlantico e nel Pacifico.

Un nuovo obiettivo futuro sarà quello di estendere l'area marina di studio e condurre analisi di sequenziamento su rRNA 16S per tutti i ceppi che verranno isolati, per studiare se esiste una

differenza tra i BALOs in base alle stagioni e se esistano ceppo che si siano stabilizzati in questa area marina.

Studi precedenti dimostrano che per ottenere una elevata efficienza predatoria, i BALOs, dovevano essere presenti in grandi concentrazioni (circa 10^8 CFU per ml), ma tali concentrazioni di predatore sono però distanti da quelle reali che si trovano in natura (circa 10^5 CFU per ml nel mare Adriatico). Nell'esperimento di challenge dello studio trattato sono stati utilizzate concentrazioni di BALOs che riflettevano l'abbondanza naturale dalle aree scelte per condurre la ricerca, dimostrando che, anche a livelli più bassi, il ceppo HBXCO1 è capace di ridurre la crescita dei vibrioni patogeni già nelle prime 24 h. Inoltre HBXCO1 mostra una specificità di predazione preferenzialmente verso i *Vibrio*, spesso presenti negli ambienti marini, ma non verso altri germi potenzialmente patogeni trasmessi con i molluschi bivalvi (*Salmonella* e *Aereomonas).* HBXCO1 si dimostra un efficiente predatore verso un ampio range di ceppi di *Vibrio*, molti dei quali patogeni, come *V. parahaemolyticus*, non-O1/O139, *V. cholerae* e *V. vulnificus*, ma non è predatore di *V. alginolyticucus*, specie che popola largamente l'ambiente marino e solo raramente è causa di infezioni per l'uomo.

Per concludere, il ceppo HBXCO1 rappresenta un buon candidato per sviluppare strategie biologiche atte a controllare e contenere la proliferazione di *V. parahaemolyticus*, non-O1/O130 *V. cholerae* e *V. vulnificus* nei bivalvi, ma più in generale in tutti i frutti di mare con una scadenza breve, dal momento della raccolta al momento della vendita.

Gli approcci tradizionali di purificazione dei bivalvi spesso falliscono nel ridurre i vibrioni patogeni e i trattamenti più innovativi sono piuttosto costosi e possono anche uccidere i bivalvi, non riuscendo quindi a soddisfare una porzione di consumatori che preferisce acquistare bivalvi ancora vivi. Per questi motivi, un nuovo approccio biologico alla decontaminazione sarebbe una valida soluzione. È stato poi ampliamente confermato che i BALOs non possono attaccare le cellule eucariotiche e per questo motivo non rappresentano un rischio diretto per la salute umana.

I BALOs riescono a sopravvivere nell'intestino dei bivalvi per un tempo sufficiente a esercitare la loro attività litica verso i batteri preda, sia nel breve termine (24 h) che nel medio termine (7 giorni). Infine i BALOs si dimostrano resistenti ai maggiori trattamenti di disinfezione utilizzati negli impianti di depurazione.

Alla luce di tutte queste evidenze, i BALOs possono trovare applicazione in trattamenti di decontaminazione post-raccolta per i bivalvi, integrando o addirittura sostituendo gli attuali approcci.

Caso di studio in matrici alimentari

Una possibile applicazione dei BALOs anche su una matrice come la carne, ad esempio carne di animali da allevamento diretta poi al consumatore, è stata dimostrata in uno studio del 2019

dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche presso il Laboratorio Controllo Alimenti di Ancona. Lo studio è stato condotto utilizzando la specie *Bdellovibrio bacteriovorus* per controllare la crescita di *E.coli* (preda) su matrice carnea fresca ed in scatola.

La specie *B. bacteriovorus* è un batterio predatore capace di attaccare molti microrganismi, ma mostra una specificità di predazione massima verso *E. coli,* compresi ceppi commensali e patogeni come il ceppo *Shiga* produttore di tossine (STEC) (Fratamico & Whiting 1995). Ceppi di *B. bacteriovorus* sono stati isolati dall'intestino dei vertebrati, incluso l'uomo (Dwidar et al. 2012; Iebba et al., 2013), rilevando una quantità maggiore di questi soltanto in soggetti sani, portando così a considerarli membri delle comunità microbiche che popolano l'intestino (microbiota) che giocano un ruolo cruciale nel mantenimento in salute dell'individuo (Iebba et al., 2013).

B. bacteriovorus è una famiglia di estremo interesse nella ricerca poiché, oltre alle sue abilità predatorie, non è in grado di trasportare geni per l'antibiotico-resistenza (Shemesh & jurkevitch, 2004; Dwidar et al. 2012), annullando il contributo che potrebbe apportare al diffondersi del fenomeno. Inoltre *B. bacteriovorus* non è predatore nei confronti di funghi o batteri Gram-positivi, come staphylococchi, lieviti e batteri acido lattici, essenziali per la produzione di alcuni alimenti (Dwidar et al., 2012).

B. bacteriovorus si dimostra efficace nel ridurre sia batteri responsabili del deterioramento sia batteri patogeni, presenti negli alimenti. Infine *B. bacteriovorus* è capace anche di infettare batteri che si organizzano a formare biofilm e batteri che in condizioni di stress risultano vitali ma non coltivabili (batteri VBCN) (Kadouri & O'Toole 2005; Markelova 2010; Dashiff et al., 2011b; Dwidar et al., 2012). Ciò rende i ceppi testati non suscettibili ai comuni meccanismi di competizione e difesa che i batteri patogeni, o batteri responsabili del deterioramento, mettono in atto nei cibi. Inoltre I biofilm che questi batteri formano a contatto con alcune superfici sono le principali cause di contaminazioni di cibo in fase di processazione post-produzione ed è stato dimostrato che tali formazioni possono persistere anche dopo aver praticato una accurata sanificazione delle superfici stesse (Wang et al., 2015; Al-Adawi et al. 2016), mostrando una ulteriore applicazione di *B. bacteriovorus* per ridurre le contaminazioni.

Comparati ad altri strumenti biologici capaci di attaccare e infettare ceppi batterici, come i batteriofagi (virus capaci di infettare specie batteriche), i *B. bacteriovorus* e i BALOs più in generale, mostrano una specificità di predazione più ridotta riuscendo a predare in un range molto più ampio di Gram-negativi appartenenti a differenti generi (Fratamico & Whiting, 1995; Dwidar et al. 2012). Le attuali tecnologie di conservazione degli alimenti si basano sostanzialmente sulla refrigerazione, atmosfere controllate nelle confezioni (MAP) e aggiunta di additivi chimici (Zhou et al., 2010; Castellano et al. 2017).

Altre metodiche più sofisticate utilizzano pressione idrostatica elevata, super-congelamento e tecniche di bio-preservazione (Zhou et al. 2010; Castellano et al. 2017). Ad oggi la messa appunto di tecniche di bio-conservazione con l'utilizzo dei BALOs è ancora poco esplorata (Fratamico & Cooke, 1996; Lu & Cai 2010). A tale riguardo, non è mai stato utilizzato *B. bacteriovorus* su una matrice di carne perciò lo studio trattato fa da pioniere in tal senso, con l'obiettivo finale di poter integrare o sostituire gli approcci convenzionali.

Sono stati condotti diversi esperimenti di challenge negli ultimi dieci anni, dove *B. bacteriovorus* e la preda sono fatti interagire in un mezzo liquido e la crescita dei due rispettivamente monitorata a tempi diversi (Fratamico & Whiting 1995). Si dimostra che l'efficienza predatoria è influenzata da parametri quali pH, temperatura di incubazione e rapporto di concentrazione preda/predatore (Fratamico & Whiting 1995). Altri parametri, come le comunità microbiche residenti nel mezzo, le caratteristiche chimico-fisiche del mezzo, la temperatura di conservazione, la disponibilità di ossigeno e la presenza di acqua nella matrice possono influire sulla performance predatoria dei BALOs. Un ultimo parametro importante è rappresentato dalla modalità con cui la matrice di carne viene contaminata con il predatore, ossia se tale contaminazione avviene sulla superficie o nella massa dell'alimento. Lo studio trattato ha come scopo la valutazione dell'efficienza predatoria di *B. bacteriovorus* sulla preda *E. coli*, misurata su due matrici di carne diverse, contaminate con le due diverse modalità. In questo studio non sono invece stati considerati tutti gli altri parametri quali l'influenza della comunità microbica residente, le proprietà chimico-fisiche e la reale temperatura di conservazione dei prodotti testati (Ottaviani et al., 2019).

Nei test effettuati *B. bacteriovorus* e la preda *E. coli* sono stati distribuiti sulla superficie di fette di carne di pollo sterilizzate oppure inoculate all'interno della massa di carne in scatola. Successivamente la crescita preda/predatore viene monitorata dopo 0, 1, 3, 6, 24, h a una temperatura di 30 ˚C (variazione di ± 1). Per poter interpretare l'influenza che la matrice di carne come mezzo ha sulla dinamica di popolazione, sono stati condotti in parallelo esprimenti in mezzo liquido sotto le stesse condizioni di pH, temperatura e rapporto di concentrazione preda-predatore.

Risultati

I risultati degli esperimenti di challenge nei filetti di carne di pollo sono mostrati in Fig. 7.

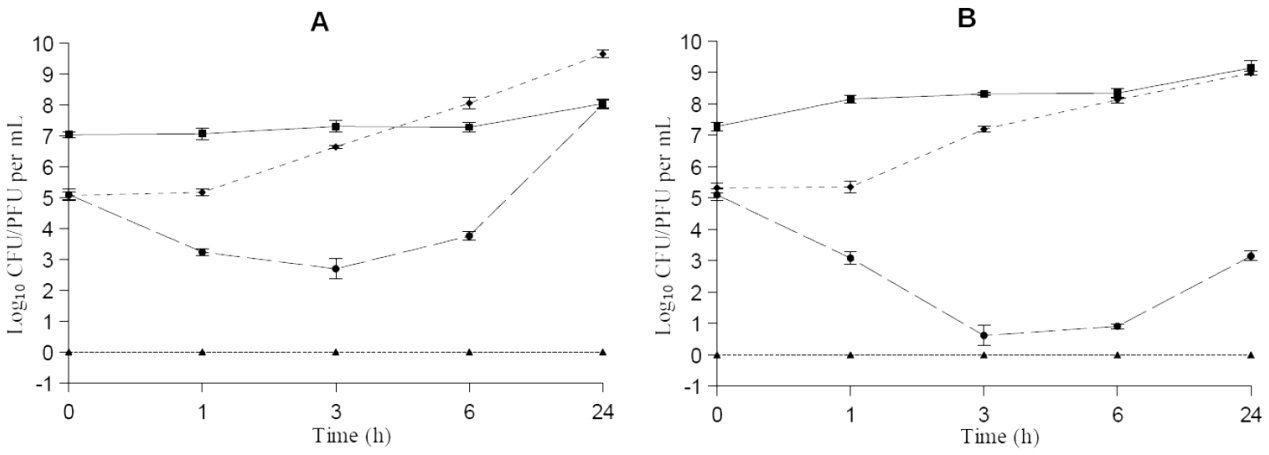


Fig. 7: Risultati esperimenti di challenge in filetti di pollo. Viene descritta la dinamica di popolazione di *Bdellovibrio bacteriovorus* (Bb) e *Escherichia coli* nel test e nel controllo, su matrice di carne (a) e in DNB (b). ♦ *E. coli* controllo; ● *E. coli* test; ▲ Bb controllo; ■ Bb test.

Nel test (con aggiunta di predatore e preda) su filetti di pollo la concentrazione di predatore rimane invariata nella misurazione fatta da 0 a 6 h, per poi aumentare di circa 1 log passando da 10^7 a 10^8 PFU per g. nell'arco di tempo che va da 6 a 24 h. Confrontando i livelli di concentrazione di *B. bacteriovorus* a tempi diversi, nei test carne e in test in mezzo liquido, si dimostra che per ogni tempo questi livelli sono più elevati nel mezzo liquido rispetto al test carne, rilevando la differenza più significativa (di circa 1.1 log) a 24 h. Confrontando i livelli di preda a tempi differenti, nel test di carne e nella carne controllo, si dimostrano significative riduzioni nei livelli di *E. coli* nel test rispetto al controllo, dove invece la riduzione è irrisoria. Nel test la differenza massima si misura a 6 h e si attesta una diminuzione di circa 4.3 log. Inoltre si rileva che nel test DNB rispetto al test su carne le diminuzioni della preda sono più elevate nel periodo di tempo che va da 3 a 24 h, con la massima differenza di circa 4.9 log di concentrazioni al tempo di 6 h .

I risultati ottenuti dagli esperimenti di challenge sui campioni di carne in scatola, la seconda matrice testata, sono riportati in Fig. 8.

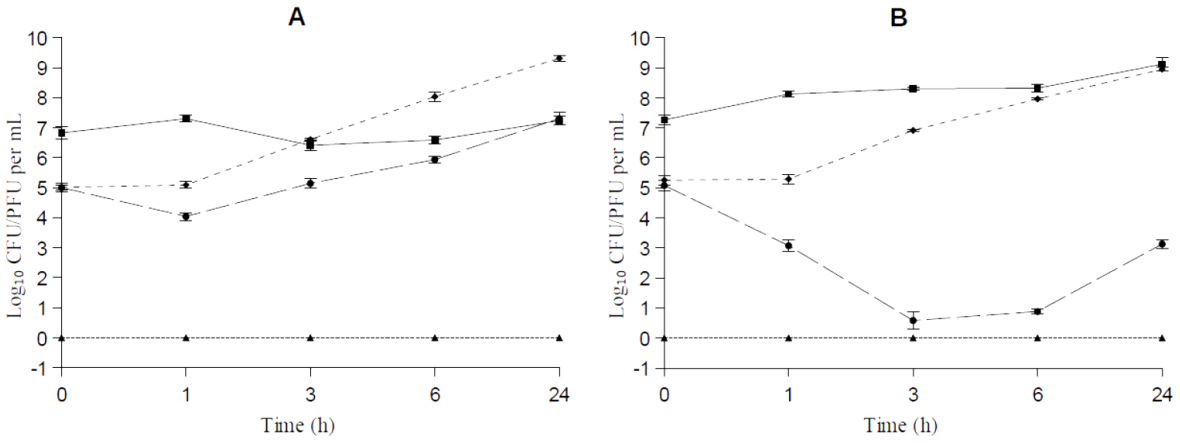


Fig. 8: Risultati esperimenti di challenge su carne in scatola. Viene descritta la dinamica di popolazione di *Bdellovibrio bacteriovorus* (Bb) e *Escherichia coli* nel test e nel controllo, su matrice di carne in scatola (a) e in DNB (b). ♦ *E. coli* controllo; ● *E. coli* test; ▲ Bb controlo; ■ Bb test.

I risultati mostrano che nel test carne la concentrazione di predatore aumenta, passando da 0 a 0.5 log nel giro di 1 h, per poi decrescere di nuovo di circa 1 log passando da 1 a 0 nel tempo che va da 1 a 3 h. I livelli si assestano nel tempo che va da 3 a 6 h e infine aumentano nuovamente di 0.5 log da 6 a 24 h. Nel test carne di controllo, per la durata di tutto l'esperimento, ovvero da 0 a 24 h, si misura una concentrazione di predatore troppo bassa per essere rilevata (<10 PFU per g.). Inoltre anche su questa matrice si osservano concentrazioni di preda, significativamente più alte in DNB rispetto alla carne a tutti i tempi misurati, attestando la differenza massima dopo un tempo di 3 h a un valore di 1.9 log. Andando poi a confrontare le concentrazioni di preda a tempi differenti, in test carne e nel controllo, si osservano significative diminuzioni nei livelli di *E. coli* nel test rispetto al controllo, e ciò vale per ogni tempo misurato; la massima differenza si misura dopo 6 h e vale 2.1 log. Per tutto l'arco di tempo considerato, da 3 a 6 h, le concentrazioni di preda risultano minori nel test DNB rispetto al test carne, e la massima differenza (pari a 5.1 log) si misura a 6 h.

In entrambi gli esperimenti si dimostra che, utilizzando un rapporto preda/predatore pari 10^7 PFU/10^5 CFU per g., *B. bacteriovorus* è capace di contenere e ridurre la crescita dei batteri preda in entrambe le matrici di carne testate rispetto al controllo, espletando la sua attività regolatoria già dopo 1 h. Ulteriore evidenza è che *B. bacteriovorus* preda *E. coli* con maggiore efficienza se interagisce in un mezzo liquido rispetto a una matrice solida di carne, a parità di condizioni sperimentali. Una possibile spiegazione di questo fenomeno è che la presenza di acqua giochi un ruolo chiave, in quanto la riduzione o la totale mancanza di questa nella matrice di carne rispetto al brodo, renda in qualche modo meno suscettibili i batteri alla predazione; tali ipotesi è rafforzata dai risultati ottenuti nelle

conte del predatore, che risulta sempre maggiore nel test in mezzo liquido rispetto al test carne, dimostrando una chiara preferenza verso il mezzo liquido. Un altro risultato importante è la differenza nell'efficienza di predazione che si rileva nelle due matrici: l'abilità di uccidere le prede risulta molto maggiore nei filetti di carne di pollo rispetto alla carne in scatola. Questa differenza potrebbe essere dovuta alla tecnica di contaminazione utilizzata. La contaminazione della carne per diffusione sulla superficie, permetterebbe ai batteri predatori di muoversi più liberamente e contestualmente si avrebbe una maggiore disponibilità di ossigeno per gli stessi, condizioni entrambe limitate da una contaminazione per inoculazione.

Discussione

Alla luce delle evidenze e dei risultati ottenuti, *B. bacteriovorus* si presenta come un valido candidato da usare su matrice carnea che possiedono una scadenza inferiore ai 10 giorni, come carne fresca e preparati a base di carne, inclusi alimenti RTE (prodotti alimentari destinati al consumo diretto senza che sia necessaria la cottura).

Una possibile applicazione di questi BALOs potrebbe essere quella di applicarli direttamente sulla carne destinata al consumo, durante la fase di preparazione. In questo modo i batteri predatori eserciterebbero la loro attività di controllo dei patogeni nell'arco di tempo che va dalla preparazione al confezionamento, esattamente il periodo in cui la proliferazione dei batteri preda è maggiormente favorita. Dal momento del confezionamento in poi la proliferazione batterica sarà tenuta sotto controllo dalle ridotte temperature di stoccaggio (4 ˚C) e dalle confezioni ad ambiente controllato (MAP) (Ottaviani et al., 2019). Lo studio sull'attività litica di *B. bacteriovorus* restituisce risultati importanti per tutti i ceppi di preda testati: *B. bacteriovorus* ha l'abilità di attaccare tutte le prede testate, formando un chiaro alone litico sulla placca già dopo le prime 24 h, per poi aumentare in dimensioni con il passare del tempo, raggiungendo diametro massimo dopo 3 giorni di incubazione a 30 ˚C ± 1 ˚C. Il diametro massimo misurato è compreso tra 7 e 9 mm (Fig. 9). Nello studio trattato, gli esperimenti di challenge, sono stati condotti testando *B. bacteriovorus* verso ceppi di *E. coli* non patogeni, tuttavia è stato dimostrato che il tasso di crescita di ceppi patogeni è molto simile a quello di ceppi non patogeni di *E. coli*. E' perciò plausibile l'utilizzo degli stessi batteri predatori per ridurre la proliferazione di ceppi patogeni, ben più pericolosi per l'uomo, come gli STEC.

Lo studio trattato si dimostra innovativo, in quanto rappresenta la prima applicazione di *B. bacteriovorus* sotto forma di coltura vitale, come agente protettivo verso ceppi di *E. coli* su matrici di carne (Ottaviani et al., 2019).

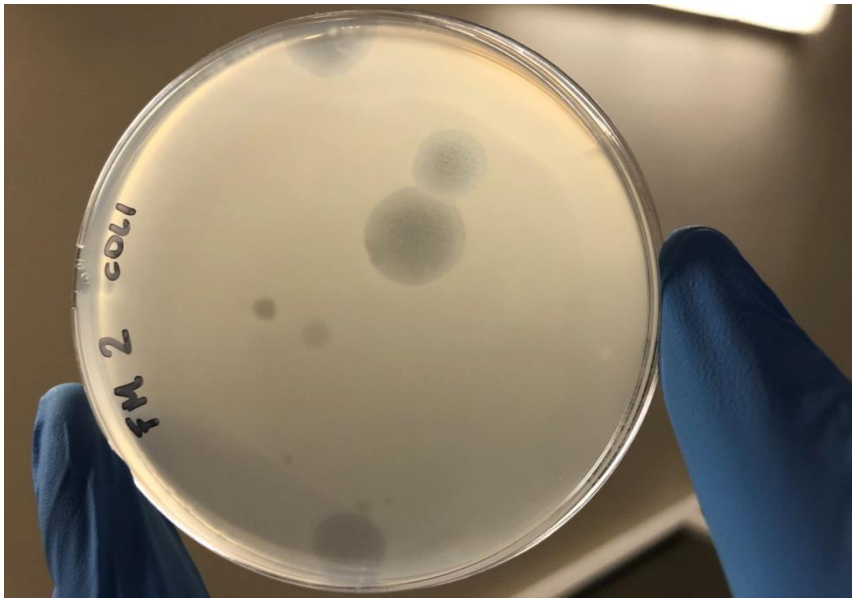


Fig. 9: Attività predatoria del *B. bacteriovorus* verso un ceppo di *E. coli* utilizzando la tecnica del Plaque Assay in doppio strato di agar (Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche).

CONCLUSIONI

I *Bdellovibrio* and like orgamisms (BALOs) costituiscono una famiglia di batteri Gram-negativi che presentano caratteristiche e abilità molto peculiari.

Le prime caratterizzazioni proposte per il BALOs risalgono alla seconda metà degli anni novanta, ma solo nell'ultimo decennio l'interesse verso questi è cresciuto, a tal punto che ogni anno vengono condotti numerosi studi che mirano ad aumentare progressivamente la conoscenza riguardo questi batteri. Entro il 2050 si stima che una delle principali cause di mortalità sarà dovuta a infezioni batteriche di ceppi resistenti agli antibiotici, con questa premessa si vedono necessari rapidi progressi nel campo della microbiologia e della farmacologia, sufficienti a rispondere in modo adeguato. Tuttavia la ricerca nel campo degli antibiotici, mirata a trovare farmaci efficaci e innovativi, non ha prodotto grandi risultati negli ultimi anni, andando ad aumentare gradualmente il divario tra velocità con cui i batteri acquisiscono resistenza agli antibiotici e velocità con cui si mettono a punto farmaci efficaci.

I BALOs, grazie alle loro abilità si presentano come dei potenziali candidati per mettere a punto strategie di controllo verso altri batteri, tra cui batteri che tendono ad acquisire resistenza agli antibiotici. Un grande traguardo della ricerca sarà quello di riuscire a creare trattamenti in cui i BALOs agiscano da antibiotici "vivi", andando a combattere le infezioni batteriche direttamente all'interno dell'organismo, sostituendo o riducendo drasticamente il consumo di antibiotici a livello

mondiale. Tale applicazione avrebbe una duplice efficacia nel combattere il fenomeno dell'antibiotico-resistenza: una diminuzione nell'utilizzo diretto di antibiotici da parte dell'uomo e in secondo luogo una diminuzione dell'assunzione indiretta di antibiotici, dovuta principalmente alla dieta, attraverso carne o pesce, da animali allevati con l'utilizzo di elevate dosi di antibiotici. Una futura applicazione diretta dei BALOs come antibiotici biologici è ancora lontana e necessita di ulteriori studi, che possano confermare un sicuro utilizzo di questi, dovendo agire all'interno di sistemi complessi dove le interazioni con popolazioni batteriche del microbiota, devono essere ancora studiate più approfonditamente.

Tuttavia, contentestualmente si è dimostrata l'efficacia di alcuni ceppi di BALOs nel controllare la proliferazione di batteri patogeni e non, in alimenti a base di carne o molluschi vivi. Un traguardo sicuramente molto più vicino è rappresentato dal riuscire a mettere a punto strategie e trattamenti di bio-controllo per aumentare la sicurezza di questi alimenti. Trattamenti efficaci permetterebbero di offrire al consumatore un prodotto alimentare più sicuro, ma anche di integrare o eliminare completamente gli additivi e i conservanti utilizzati per preservare gli alimenti, sostanze riconosciute in molti casi dannose per la salute umana.

BIBLIOGRAFIA

Aebersold R, Mann M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. Nature. 2003 Mar 13;422(6928):198-207. doi: 10.1038/nature01511. PMID: 12634793.

Al-Adawi, A.S., Gaylarde, C.C., Sunner, J. & Beech, I.B. (2016). Transfer of bacteria between stainless steel and chicken meat: a CLSM and DGGE study of biofilms. AIMS Microbiology, 2, 340–358.

Andrews, L.S. (2004) Strategies to control Vibrios in molluscan shellfish. Food Prot Trends 24, 70 –76.

Atterbury, R. J., Hobley, L., Till R., Lambert, C., Capeness, M. J., Lerner, T. R., et al. (2011). Effects of orally administered Bdellovibrio bacteriovorus on the wellbeing and Salmonella colonization of young chicks. Appl. Environ. Microbiol.77, 5794–5803.

Avidan, O., Petrenko, M., Becker, R., Beck, S., Linscheid, M., Pietrokovski, S., et al. (2017). Identification and characterization of differentially-regulated type Ivb pilin genes necessary for predation in obligate bacterial predators. Sci. Rep.7:1013.

Barabote, R. D., Rendulic, S., Schuster, S. C., and Saier, M. H. (2007). Comprehensive analysis of transport proteins encoded within the genome of Bdellovibrio bacteriovorus. Genomics 90, 424–446.

Barancheshme F, Munir M. Strategies to Combat Antibiotic Resistance in the Wastewater Treatment Plants. (2018). Front Microbiol. 2018 Jan 17;8:2603. doi: 10.3389/fmicb.2017.02603. PMID: 29387043; PMCID: PMC5776126.

Beneduce, L., Vernile, A., Spano, G., Massa, S., Aebersold Lamacchia, F. and Oliver, J.D. (2010) Occurrence of Vibrio vulnificus in mussel farms from the Varano lagoon environment. Lett Appl Microbiol 51, 443–449.

Bengtsson-Palme J, Hammarén R, Pal C, Östman M, Björlenius B, Flach CF, Fick J, Kristiansson E, Tysklind M, Larsson DGJ. (2016). Elucidating selection processes for antibiotic resistance in sewage treatment plants using metagenomics. Sci Total Environ. 2016 Dec 1;572:697-712. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.06.228. Epub 2016 Aug 17. PMID: 27542633.

Bonfiglio G, Neroni B, Radocchia G, Marazzato M, Pantanella F, Schippa S. (2020). Insight into the Possible Use of the Predator Bdellovibrio bacteriovorus as a Probiotic. Nutrients. 2020 Jul 28;12(8):2252. doi: 10.3390/nu12082252. PMID: 32731403; PMCID: PMC7468853.

Bratanis E, Molina H, Naegeli A, Collin M, Lood R. (2017). BspK, a Serine Protease from the Predatory Bacterium Bdellovibrio bacteriovorus with Utility for Analysis of Therapeutic Antibodies. Appl Environ Microbiol. 2017 Feb 1;83(4):e03037-16. doi: 10.1128/AEM.03037-16. PMID: 27940543; PMCID: PMC5288813.

Bratanis, E., and Lood, R. (2019). A novel broad-spectrum elastase-like serine protease from the predatory bacterium Bdellovibrio bacteriovorus facilitates elucidation of site-specific IgA glycosylation pattern. Front. Microbiol. 10:971.

Burnham, J. C., Hashimoto, T., and Conti, S. F. (1968). Electron microscopic observations on the penetration of Bdellovibrio bacteriovorus into Gramnegative bacterial hosts. J. Bacteriol. 96, 1366–1381.

Bwire, G., Munier, A., Ouedraogo, I., Heyerdahl, L., Komakech, H., Kagirita, A., et al. (2017). Epidemiology of cholera outbreaks and socio-economic characteristics of the communities in the fishing villages of Uganda: 2011-2015.

Calero-Cáceres W, Melgarejo A, Colomer-Lluch M, Stoll C, Lucena F, Jofre J, Muniesa M. (2014). Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions. Environ Sci Technol. 2014 Jul 1;48(13):7602-11. doi: 10.1021/es501851s. Epub 2014 Jun 10. PMID: 24873655.

Cao, H., Hou, S., He, S., Lu, L. and Yang, X. (2014) Identification of a Bacteriovorax sp. isolate as a potential biocontrol bacterium against snakehead fishpathogenic Aeromonas veronii. J Fish Dis 37, 283–289.

Cao, H., An, J., Zheng, W., and He, S. (2015). Vibrio cholerae pathogen from the freshwater-cultured whiteleg shrimp Penaeus vannamei and control with Bdellovibrio bacteriovorus. J. Invertebr. Pathol. 130, 13–20.

Cao H, Wang H, Yu J, An J, Chen J. (2019). Encapsulated Bdellovibrio Powder as a Potential Bio-Disinfectant against Whiteleg Shrimp-Pathogenic Vibrios. Microorganisms. 2019 Aug 7;7(8):244. doi: 10.3390/microorganisms7080244. PMID: 31394792; PMCID: PMC6722716.

Castellano, P., Pèrez Ibarreche, M., Blanco Massani, M., Fontana, C. & Vignolo, G.M. (2017). Strategies for pathogen biocontrol using lactic acid bacteria and their metabolites: a focus on meat ecosystems and industrial environments. Microorganisms, 5, 38.

Chang, C. Y., Hobley, L., Till, R., Capeness, M., Kanna, M., Burtt, W., et al. (2011). The Bdellovibrio bacteriovorus twin-arginine transport system has roles in predatory and prey-independent growth. Microbiology 157, 3079–3093.

Chen, H., Athar, R., Zheng, G. and Williams, H.N. (2011) Prey bacteria shape community structure of their predators. ISME J 5, 1314–1342.

Cotter, T. W., and Thomashow, M. F. (1992a). A conjugation procedure for Bdellovibrio bacteriovorus and its use to identify DNA sequences that enhance the plaque-forming ability of a spontaneous host-independent mutant. J. Bacteriol. 174, 6011–6017.

Croci, L., Suffredini, E., Cozzi, L. and Toti, L. (2002) Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with Escherichia coli, Vibrio cholerae O1 and Vibrio parahaemolyticus. J Appl Microbiol 92, 460–465.

Dashiff, A., & Kadouri, D. E. (2011a). Predation of oral pathogens by Bdellovibrio bacteriovorus 109J. Mol. Oral Microbiol. 26, 19–34.

Dashiff, A., Junka, R.A., Libera, M. & Kadouri, D.E. (2011b). Predation of human pathogens by the predatory bacteria Micavibrio aeruginosavorus and Bdellovibrio bacteriovorus. Journal of Applied Microbiology, 110, 431–444.

Dori-Bachash, M., Dassa, B., Pietrokovski, S., and Jurkevitch, E. (2008). Proteomebased comparative analyses of growth stages reveal new cell cycle-dependent functions in the predatory bacterium Bdellovibrio bacteriovorus. Appl. Environ. Microbiol. 74, 7152–7162.

Dwidar, M., Monnappa, A. K., and Mitchell, R. J. (2012). The dual probiotic and antibiotic nature of Bdellovibrio bacteriovorus. BMB Rep. 45, 71–78.

El-Shanshoury, A. E. R. R., Abo-Amer, A. E., and Alzahrani, O. M. (2016). Isolation of Bdellovibrio sp. from wastewater and their potential application in control of Salmonella paratyphi in water. Geomicrobiol. J. 33, 886–893.

Engelking, H. M., and Seidler, R. J. (1974). The involvement of extracellular enzymes in the metabolism of Bdellovibrio. Arch. Mikrobiol. 95, 293–304.

Evans, K. J., Lambert, C., and Sockett, R. E. (2007). Predation by Bdellovibrio bacteriovorus HD100 requires type IV pili. J. Bacteriol. 189, 4850–4859.

Feng, S., Tan, C. H., Cohen, Y., and Rice, S. A. (2016). Isolation of Bdellovibrio bacteriovorus from a tropical wastewater treatment plant and predation of mixed species biofilms assembled by the native community members. Environ. Microbiol. 18, 3923–3931.

Fischetti VA. Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. (2010). Int J Med Microbiol. 2010 Aug;300(6):357-62. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.04.002. Epub 2010 May 10. PMID: 20452280; PMCID: PMC3666336.

Fratamico, P.M. & Whiting, R.C. (1995). Ability of Bdellovibrio bacteriovorus 109J to lyses Gram-negative food-borne pathogenic and spoilage bacteria. Journal of Food Protection, 58, 160–164.

Fratamico, P. M., and Cooke, P. H. (1996). Isolation of Bdellovibrios that prey on Escherichia coli O157:H7 and Salmonella species and application for removal of prey from stainless steel surfaces. J. Food Saf. 16, 161–173.

Friedberg, D. (1977). Effect of light on Bdellovibrio bacteriovorus. J. Bacteriol. 131, 399–404.

Gloor, L., Klubek, B., and Seidler, R. J. (1974). Molecular heterogeneity of the Bdellovibrios: metallo and serine proteases unique to each species. Arch. Mikrobiol. 95, 45–56.

Gupta S, Tang C, Tran M, Kadouri DE. (2016). Effect of Predatory Bacteria on Human Cell Lines. PLoS One. 2016 Aug 31;11(8):e0161242. doi: 10.1371/journal.pone.0161242. PMID: 27579919; PMCID: PMC5006992.

Hansel TT, Kropshofer H, Singer T, Mitchell JA, George AJ. The safety and side effects of monoclonal antibodies. Nat Rev Drug Discov. 2010 Apr;9(4):325-38. doi: 10.1038/nrd3003. Epub 2010 Mar 22. PMID: 20305665.

Hobley, L., Lerner, T. R., Williams, L. E., Lambert, C., Till, R., Milner, D. S., et al. (2012b). Genome analysis of a simultaneously predatory and prey-independent, novel Bdellovibrio bacteriovorus from the River Tiber, supports in silico predictions of both ancient and recent lateral gene transfer from diverse bacteria. BMC Genomics 13:670.

Iebba, V., Santangelo, F., Totino, V., Nicoletti, M., Gagliardi, A., De Biase, R. V., et al. (2013). Higher prevalence and abundance of Bdellovibrio bacteriovorus in the human gut of healthy subjects. PLoS One 8:e61608.

Johnke, J., Fraune, S., Bosch, T. C. G., Hentschel, U., and Schulenburg, H. (2019). Bdellovibrio and like organisms are predictors of microbiome diversity in distinct host groups. Microb. Ecol. 79, 252–257.

Jurkevitch, E., Minz, D., Ramati, B., and Barel, G. (2000). Prey range characterization, ribotyping, and diversity of soil and rhizosphere Bdellovibrio spp. isolated on phytopathogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 66, 2365– 2371.

Jurkevitch, E. (2007). Predatory behaviors in bacteria — diversity and transitions. Microbe 2, 67–73.

Kadouri, D. & O'Toole, G.A. (2005). Susceptibility of biofilms to Bdellovibrio bacteriovorus attack. Applied Environmental Microbiology, 71, 4044–4051.

Kadouri, D.E., To, K., Shanks, R.M. & Doi, Y. (2013). Predatory bacteria: a potentially against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. PLoS ONE, 8, e63397.

Karunker, I., Rotem, O., Dori-Bachash, M., Jurkevitch, E., and Sorek, R. (2013). A global transcriptional switch between the attack and growth forms of Bdellovibrio bacteriovorus. PLoS One 8:e61850.

Kelley, J. I., and Williams, H. N. (1992). Bdellovibrios in Callinectus sapidus, the Blue Crab. Appl. Environ. Microbiol. 58, 1408–1410.

Kergunteuil A, Bakhtiari M, Formenti L, Xiao Z, Defossez E, Rasmann S. (2016). Biological Control beneath the Feet: A Review of Crop Protection against Insect Root Herbivores. Insects. 2016 Nov 29;7(4):70. doi: 10.3390/insects7040070. PMID: 27916820; PMCID: PMC5198218.

Kongrueng J, Mitraparp-Arthorn P, Bangpanwimon K, Robins W, Vuddhakul V, Mekalanos J. Isolation of Bdellovibrio and like organisms and potential to reduce acute hepatopancreatic necrosis disease caused by Vibrio parahaemolyticus. Dis Aquat Organ. 2017 May 11;124(3):223-232. doi: 10.3354/dao03120. PMID: 28492178.

Korp, J., Vela Gurovic, M. S., and Nett, M. (2016). Antibiotics from predatory bacteria. Beilstein J. Org. Chem. 12, 594–607.

Koval, S., Hynes, S., Flannagan, R., Pasternak, Z., Davidov, Y., and Jurkevitch, E. (2013). Bdellovibrio exovorus sp. nov., a novel predator of Caulobacter crescentus. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63:10.

Koval, S. F., Williams, H. N., and Stine, O. C. (2015). Reclassification of Bacteriovorax marinus as Halobacteriovorax marinus gen. nov., comb. nov. and Bacteriovorax litoralis as Halobacteriovorax litoralis comb. nov.; description of Halobacteriovoraceae fam. nov. in the class Deltaproteobacteria. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65, 593–597.

Lambert, C., Smith, M. C. M., and Sockett, R. E. (2003). A novel assay to monitor predator-prey interactions for Bdellovibrio bacteriovorus 109 J reveals a role for methyl-accepting chemotaxis proteins in predation. Environ. Microbiol. 5, 127–132.

Lambert, C., Chang, C. Y., Capeness, M. J., and Sockett, R. E. (2010). The first bite-profiling the predatosome in the bacterial pathogen Bdellovibrio. PLoS One 5:e8599.

Lambert, C., Cadby, I. T., Till, R., Bui, N. K., Lerner, T. R., Hughes, W. S., et al. (2015). Ankyrin-mediated self-protection during cell invasion by the bacterial predator Bdellovibrio bacteriovorus. Nat. Commun. 6:8884.

Lambert, C., Lerner, T. R., Bui, N. K., Somers, H., Aizawa, S.-I., Liddell, S., et al. (2016). Interrupting peptidoglycan deacetylation during Bdellovibrio predator-prey interaction prevents ultimate destruction of prey wall, liberating bacterial-ghosts. Sci. Rep. 6:26010.

Li, H., Liu, C., Chen, L., Zhang, X. and Cai, J. (2011) Biological characterization of two marine Bdellovibrio-and-like organisms isolated from Daya bay of Shenzhen, China and their application in the elimination of Vibrio parahaemolyticus in oyster. Int J Food Microbiol 151, 36 –43.

Li Y, Qiu F, Yan H, Wan X, Wang M, Ren K, Xu Q, Lv L, Yin C, Liu X, Zhang H, Mahmoud K. (2018). Increasing the autotrophic growth of Chlorella USTB-01 via the control of bacterial contamination by Bdellovibrio USTB-06. J Appl Microbiol. 2018 May;124(5):1131-1138. doi: 10.1111/jam.13682. Epub 2018 Feb 14. PMID: 29446192.

Lood R, Raz A, Molina H, Euler CW, Fischetti VA. (2014). A highly active and negatively charged Streptococcus pyogenes lysin with a rare D-alanyl-L-alanine endopeptidase activity protects mice against streptococcal bacteremia. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Jun;58(6):3073-84. doi: 10.1128/AAC.00115-14. Epub 2014 Mar 17. PMID: 24637688; PMCID: PMC4068442.

Lood R, Winer BY, Pelzek AJ, Diez-Martinez R, Thandar M, Euler CW, Schuch R, Fischetti VA. (2015). Novel phage lysin capable of killing the multidrug-resistant gram-negative bacterium Acinetobacter baumannii in a mouse bacteremia model. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Apr;59(4):1983-91. doi: 10.1128/AAC.04641-14. Epub 2015 Jan 20. PMID: 25605353; PMCID: PMC4356752.

Lood R, Ertürk G, Mattiasson B. (2017). Revisiting Antibiotic Resistance Spreading in Wastewater Treatment Plants - Bacteriophages as a Much Neglected Potential Transmission Vehicle. Front Microbiol. 2017 Nov 21;8:2298. doi: 10.3389/fmicb.2017.02298. PMID: 29209304; PMCID: PMC5702337.

Lu, F. & Cai, J. (2010). The protective effect of Bdellovibrio-andlike-organisms (BALO) on tilapia fish fillets against Salmonella enterica ssp. enterica serovar Typhimurium. Letters in Applied Microbiology, 51, 625–631.

Markelova, N. Y. (2002). Effect of toxic pollutants on Bdellovibrio. Process Biochem. 37, 1177–1181.

Markelova, N.Y. (2010). Predacious bacteria, Bdellovibrio with potential for biocontrol. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 213, 428–431.

Matin, A., and Rittenberg, S. C. (1972). Kinetics of deoxyribonucleic acid destruction and synthesis during growth of Bdellovibrio bacteriovorus strain 109D on Pseudomonas putida and Escherichia coli. J. Bacteriol. 111, 664–673.

McCauley, E. P., Haltli, B., and Kerr, R. G. (2015). Description of Pseudobacteriovorax antillogorgiicola gen. nov., sp. nov., a bacterium isolated from the gorgonian octocoral Antillogorgia elisabethae, belonging to the family Pseudobacteriovoracaceae fam. nov., within the order Bdellovibrionales. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65, 522–530.

McNeely, D., Chanyi, R. M., Dooley, J. S., Moore, J. E., and Koval, S. F. (2017). Biocontrol of Burkholderia cepacia complex bacteria and bacterial phytopathogens by Bdellovibrio bacteriovorus. Can. J. Microbiol. 63, 350–358.

Monnappa, A. K., Dwidar, M., Seo, J. K., Hur, J.-H., and Mitchell, R. J. (2014). Bdellovibrio bacteriovorus inhibits Staphylococcus aureus biofilm formation and invasion into human epithelial cells. Sci. Rep. 4:3811.

Normanno, G., Parisi, A., Addante, N., Quaglia, N.C., Dambrosio, A., Montagna, C. and Chiocco, D. (2006) Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus and microorganisms of fecal origin in mussels (Mytilus galloprovincialis) sold in the Puglia region (Italy). Int J Food Microbiol 106, 219–222.

Ottaviani, D., Leoni, F., Rocchegiani, E., Santarelli, S., Canonico, C., Masini, L. and DiTrani, V. (2008) First clinical report of pandemic Vibrio parahaemolyticus O3:K6 infection in Italy. J Clin Microbiol 46, 2144–2145.

Ottaviani, D., Leoni, F., Rocchegiani, E., Santarelli, S., Masini, L., Di Trani, V., Canonico, C., Pianetti, A. et al. (2009) Prevalence and virulence properties of non-O1 nonO139 Vibrio cholerae strains from seafood and clinical samples collected in Italy. Int J Food Microbiol 132, 47 –53.

Ottaviani, D., Leoni, F., Rocchegiani, E., Canonico, C., Potenziani, S., Santarelli, S., Masini, L., Mioni, R. et al. (2010a) Prevalence, serotyping and molecular characterization of Vibrio parahaemolyticus in mussels from Italian growing areas, Adriatic Sea. Environ Microbiol Rep 2, 192–197.

Ottaviani, D., Leoni, F., Rocchegiani, E., Canonico, C., Potenziani, S., Santarelli, S., Masini, L., Scuota, S. et al. (2010b) Vibrio parahaemolyticus-associated gastroenteritis in Italy: persistent occurrence of O3:K6 pandemic clone and emergence of O1:KUT serotype. Diagn Microbiol Infect Dis 66, 452–455.

Ottaviani, D., Leoni, F., Rocchegiani, E., Canonico, C., Masini, L., Pianetti, A., Parlani, C., Luzzi, I. et al. (2011) Aunusual case of Vibrio cholerae O137 necrotizing fasciitis. J Clin Microbiol 49, 757–759.

Ottaviani, D., Leoni, F., Serra, R., Serracca, L., Decastelli, L., Rocchegiani, E., Masini, L., Canonico, C. et al. (2012) Nontoxigenic Vibrio parahaemolyticus strains causing acute gastroenteritis. J Clin Microbiol 50, 4141–4143.

Ottaviani, D., Leoni, F., Rocchegiani, E., Mioni, R., Costa, A., Virgilio, S., Serracca, L., Bove, D. et al. (2013) An extensive investigation into the prevalence and the genetic and serological diversity of toxigenic Vibrio parahaemolyticus in Italian marine coastal waters. Environ Microbiol 15, 1377–1386.

Ottaviani, D., Chierichetti, S. and Leoni, F. (2015) Biological approach to decontamination of bivalve molluscs from V. parahaemolyticus by Bdellovibrio and like-organisms (balos): collaboration between IZSUM and USDA-ARS. Sanita Pubblica Veterinaria: Numero 87, Dicembre Available at: http://www.spvet.it/ ISSN 1592-1581.

Ottaviani, D., Chierichetti, S., Angelico, G., Forte, C., Rocchegiani, E., Manuali, E., Leoni, F., (2018). Halobacteriovorax isolated from marine water of the Adriatic sea, Italy, as an effective predator of Vibrio parahaemolyticus, non-O1/O139 V. cholerae, V. vulnificus. Journal of Applied Microbiology. doi:10.1111/jam.14027

Ottaviani, D., Pieralisi, S., Angelico, G., Mosca, F., Tiscar, P. G., Rocchegiani, E., et al. (2019). Bdellovibrio bacteriovorus to control Escherichia coli on meat matrices.Int.J.FoodSci.Technol.55,988–994.doi:10.1111/ijfs.14355.

Oyedara, O. O., De Luna-Santillana, E., de, J., Olguin-Rodriguez, O., Guo, X., Mendoza-Villa, M. A., et al. (2016). Isolation of Bdellovibrio sp. from soil samples in Mexico and their potential applications in control of pathogens. Microbiologyopen 5, 992–1002.

Paix, B., Ezzedine, J. A., and Jacquet, S. (2019). Diversity, dynamics, and distribution of Bdellovibrio and like organisms in perialpine lakes. Appl. Environ. Microbiol. 85:e02494-18.

Pan A, Chanda I, Chakrabarti J. (2011) Analysis of the genome and proteome composition of Bdellovibrio bacteriovorus: indication for recent prey-derived horizontal gene transfer. Genomics. 2011 Sep;98(3):213-22. doi: 10.1016/j.ygeno.2011.06.007. Epub 2011 Jun 22. PMID: 21722725.

Pascal V, Pozuelo M, Borruel N, Casellas F, Campos D, Santiago A, Martinez X, Varela E, Sarrabayrouse G, Machiels K, Vermeire S, Sokol H, Guarner F, Manichanh C. A microbial signature for Crohn's disease. Gut. 2017 May;66(5):813-822. doi: 10.1136/gutjnl-2016-313235. Epub 2017 Feb 7. PMID: 28179361; PMCID: PMC5531220.

Patini, R., Cattani, P., Marchetti, S., Isola, G., Quaranta, G., and Gallenzi, P. (2019). Evaluation of predation capability of periodontopathogens bacteria by Bdellovibrio bacteriovorus HD100. An in vitro study. Materials 12:2008.

Pasternak Z, Njagi M, Shani Y, Chanyi R, Rotem O, Lurie-Weinberger MN, Koval S, Pietrokovski S, Gophna U, Jurkevitch E. (2014) In and out: an analysis of epibiotic vs periplasmic bacterial predators. ISME J. 2014 Mar;8(3):625-635. doi: 10.1038/ismej.2013.164.

Pérez, J., Moraleda-Muñoz, A.,Marcos-Torres, F. J., and Muñoz-Dorado, J. (2016). Bacterial predation: 75 years and counting! Environ. Microbiol. 18, 766–779.

Plataforma SINC. (2016, November 30). Predatory bacterium that kills to obtain bioplastic. ScienceDaily. Retrieved September 27, 2021 from www.sciencedaily.com/releases/2016/11/161130124150.htm.

Purchiaroni F, Tortora A, Gabrielli M, Bertucci F, Gigante G, Ianiro G, Ojetti V, Scarpellini E, Gasbarrini A. (2013). The role of intestinal microbiota and the immune system. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2013 Feb;17(3):323-33. PMID: 23426535.

Qiu, L., Mao, Y., Gong, A., Zhang, W., Cao, Y., and Tong, L. (2016). Inhibition effect of Bdellovibrio bacteriovorus on the corrosion of X70 pipeline steel induced by sulfate-reducing bacteria. Anti Corros. Meth Mater. 63, 269–274.

Rendulic, S., Jagtap, P., Rosinus, A., Eppinger, M., Baar, C., Lanz, C., et al. (2004). A predator unmasked: life cycle of Bdellovibrio bacteriovorus from a genomic perspective. Science 303, 689–692.

Richards, G.P., Fay, J.P., Dickens, K.A., Parent, M.A., Soroka, D.S. and Boyd, E.F. (2012) Predatory bacteria as natural modulators of Vibrio parahaemolyticusand Vibrio vulnificus in seawater and oysters. Appl Environ Microbiol 78, 7455 –7466.

Richards, G.P., Fay, J.P., Uknalis, J., Olanya, O.M. and Watson, M.A. (2016) Purification and host specificity of predatory Halobacteriovorax isolates from seawater. Appl Environ Microbiol 82, 922–927.

Richardson, I. R. (1990). The incidence of Bdellovibrio spp. in man-made water systems: coexistence with legionellas. J. Appl. Bacteriol. 69, 134–140.

Roschanski, N., Klages, S., Reinhardt, R., Linscheid, M., and Strauch, E. (2011). Identification of genes essential for prey-independent growth of Bdellovibrio bacteriovorus HD100. J. Bacteriol. 193, 1745–1756.

Rosson, R. A., and Rittenberg, S. C. (1979). Regulated breakdown of Escherichia coli deoxyribonucleic acid during intraperiplasmic growth of Bdellovibrio bacteriovorus 109J. J. Bacteriol. 140, 620–633.

Rotem, O., Pasternak, Z., and Jurkevitch, E. (2014). “Bdellovibrio and like organisms,” in The Prokaryotes, eds E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, and F. Thompson (Berlin: Springer), 3–17.

Rotem, O., Pasternak, Z., Shimoni, E., Belausov, E., Porat, Z., Pietrokovski, S., et al. (2015). Cell-cycle progress in obligate predatory bacteria is dependent upon sequential sensing of prey recognition and prey quality cues. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112, E6028–E6037.

Saxon, E. B., Jackson, R. W., Bhumbra, S., Smith, T., and Sockett, R. E. (2014). Bdellovibrio bacteriovorus HD100 guards against Pseudomonas tolaasii brownblotch lesions on the surface of post-harvest Agaricus bisporus supermarket mushrooms. BMC Microbiol. 14:163.

Scherff, R. H. (1973). Control of bacterial blight of soybean by Bdellovibrio bacteriovorus. Phytopathology 63:400.
Schwudke, D., Strauch, E., Krueger, M., and Appel, B. (2001). Taxonomic studies of predatory Bdellovibrios based on 16S rRNA analysis, ribotyping and the hit locus and characterization of isolates from the gut of animals. Syst. Appl. Microbiol. 24, 385–394.

Semblante GU, Phan HV, Hai FI, Xu ZQ, Price WE, Nghiem LD. (2017). The role of microbial diversity and composition in minimizing sludge production in the oxic-settling-anoxic process. Sci Total Environ. 2017 Dec 31;607-608:558-567. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.06.253. Epub 2017 Jul 27. PMID: 28704678.

Shatzkes, K., Chae, R., Tang, C., Ramirez, G. C., Mukherjee, S., Tsenova, L., et al. (2015). Examining the safety of respiratory and intravenous inoculation of Bdellovibrio bacteriovorus and Micavibrio aeruginosavorus in a mouse model. Sci. Rep. 5:12899.

Shatzkes, K., Singleton, E., Tang, C., Zuena, M., Shukla, S., Gupta, S., et al. (2016). Predatory bacteria attenuate Klebsiella pneumoniae burden in rat lungs. mBio 7:e01847-16.

Shatzkes, K., Connell, N. D., and Kadouri, D. E. (2017a). Predatory bacteria: a new therapeutic approach for a post-antibiotic era. Future Microbiol. 12, 469–472.

Shatzkes, K., Tang, C., Singleton, E., Shukla, S., Zuena, M., Gupta, S., et al. (2017b). Effect of predatory bacteria on the gut bacterial microbiota in rats. Sci. Rep. 7:43483.

Shemesh, Y., and Jurkevitch, E. (2004). Plastic phenotypic resistance to predation by Bdellovibrio and like organisms in bacterial prey. Environ. Microbiol. 6, 12–18.

Sockett, R., and Lambert, C. (2004). Bdellovibrio as therapeutic agents: a predatory renaissance? Nat. Rev. Microbiol. 2, 669–675.

Sockett, R. E. (2009). Predatory lifestyle of Bdellovibrio bacteriovorus. Annu. Rev. Microbiol. 63, 523–539.

Stolp, H., and Starr, M. P. (1963). Bdellovibrio bacteriovorus gen. et sp. n., a predatory, ectoparasitic, and bacteriolytic microorganism. Antonie Van Leeuwenhoek 29, 217–248.

Thandar M, Lood R, Winer BY, Deutsch DR, Euler CW, Fischetti VA. (2016). Novel Engineered Peptides of a Phage Lysin as Effective Antimicrobials against Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Apr 22;60(5):2671-9. doi: 10.1128/AAC.02972-15. PMID: 26856847; PMCID: PMC4862495.
US FDA, 2001. https://www.fda.gov/food/fda-food-code/food-code-2001.

Wang, H., Zhang, X., Zhang, Q., Ye, K., Xu, X. & Zhou, G. (2015). Comparison of microbial transfer rates from Salmonella spp. biofilm growth on stainless steel to selected processed and raw meat. Food Control, 50, 574–580.

Wen, C.Q., Xue, M., Liang, H.F. and Xhou, S.N. (2014) Evaluating the potential of marine Bacteriovorax sp. DA5 as a biocontrol agent against vibriosis in Litopenaeus vannamei larvae. Vet Microbiol 173, 84–91.

Westergaard, J. M., and Kramer, T. T. (1977). Bdellovibrio and the intestinal flora of vertebrates. Appl. Environ. Microbiol. 34, 506–511.

Williams, H.N., Baer, M.L. & Tudor, J.J. (2005). Bdellovibrio stolp and starr. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria, vol 2, Part C. (edited by G.M. Garrity, D.J. Brenner, N.R. Krieg & J.T. Staley). Pp. 1040–1053 New York, NY: Springer.

Williams, H.N., Turng, B.-F., and Kelley, J. I. (2009). Survival response of Bacteriovorax in surface biofilm versus suspension when stressed by extremes in environmental conditions. Microb. Ecol. 58, 474–484.

Williams, H.N., Lymperopoulou, D.S., Athar, R., Chauhan, A., Dickerson, T.L., Chen, H., Laws, E., Berhane, T.K. et al. (2015) Halobacteriovorax, an underestimated predator on bacteria: potential impact relative to viruses on bacterial mortality. ISME J 10, 491–499.

Willis, A. R., Moore, C., Mazon-Moya, M., Krokowski, S., Lambert, C., Till, R., et al. (2016). Injections of predatory bacteria work alongside host immune cells to treat Shigella infection in zebrafish larvae. Curr. Biol. 26, 3343–3351.

Woodford N, Turton JF, Livermore DM. (2011) Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev. 2011 Sep;35(5):736-55. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x.

Yair, S., Yaacov, D., Susan, K., and Jurkevitch, E. (2009). "Small eats big: ecology and diversity of Bdellovibrio and Like organisms, and their dynamics in predatorprey interactions," in Sustainable Agriculture, eds E. Lichtfouse, M. Navarrete, P. Debaeke, S. Véronique, and C. Alberola (Dordrecht: Springer), 275–284.

Youdkes, D., Helman, Y., Burdman, S., Matan, O., and Jurkevitch, E. (2020). Potential control of potato soft rot disease by the obligate predators Bdellovibrio and like organisms. Appl. Environ. Microbiol. 86:e02543-19.

Yu, R., Zhang, S., Chen, Z., and Li, C. (2017). Isolation and application of predatory Bdellovibrio and like organisms for municipal waste sludge biolysis and dewaterability enhancement. Front. Environ. Sci. Eng. 11:10.

Zhang S, Fan C, Xia Y, Li M, Wang Y, Cui X, Xiao W. (2019). Characterization of a novel bacteriophage specific to Exiguobacterium indicum isolated from a plateau eutrophic lake. J Basic Microbiol. 2019 Feb;59(2):206-214. doi: 10.1002/jobm.201800184. Epub 2018 Oct 3. PMID: 30284309.

Zhou, G.H., Xu, X.L. & Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat A review. Meat Science, 86, 119–128.

Zhu X, Han Y, Du J, Liu R, Jin K, Yi W. (2017). Microbiota-gut-brain axis and the central nervous system. Oncotarget. 2017 May 10;8(32):53829-53838. doi: 10.18632/oncotarget.17754. PMID: 28881854; PMCID: PMC5581153.

	Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Via G. Salvemini 1. 06126, Perugia - Italy	
Centralino Istituto	Tel. +39 075 3431 - Fax. +39 075 35047	
Rivista SPVet.it ISSN 1592-1581	Tel. +39 075 343207 e-mail: editoria@izsum.it; redazione-spvet@izsum.it; http://spvet.it; http://indice.spvet.it	
U. R. P.	Tel. +39 075 343223; Fax: +39 075 343289 e-ail: URP@izsum.it	

Finito di stampare il 21 Luglio 2022, presso la Redazione dell'e-Journal Sanità Pubblica Veterinaria
Via G. Salvemini 1, 06126 Perugia