

# Probiotici sporigeni per l'alimentazione animale



B. RIPAMONTI, S. STELLA

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare,  
Università degli Studi di Milano, via Celoria 10, 20133 Milano

## RIASSUNTO

I probiotici vengono impiegati in campo zootecnico allo scopo di migliorare le performances produttive, in termini di efficienza di utilizzo dei nutrienti, incremento ponderale medio, qualità delle produzioni e stato di salute degli animali. Fra i microrganismi potenzialmente utilizzabili per un'azione probiotica, i batteri sporigeni, appartenenti soprattutto al genere *Bacillus*, sono particolarmente interessanti. Gli effetti positivi della loro somministrazione sono noti, anche se il meccanismo d'azione, che dipende dal destino delle spore somministrate agli animali, rimane ad oggi non completamente chiarito. A questi microrganismi sono state attribuite diverse attività probiotiche quali produzione di acidi organici (SFLAB) o di batteriocine, adesione alla mucosa, immunostimolazione del GALT.

Questa review illustra l'utilizzo in allevamento dei batteri sporigeni come microrganismi probiotici. Oltre a presentare un quadro generale delle diverse specie impiegate, viene dedicata particolare attenzione a *Bacillus coagulans*. Questo microrganismo non è ad oggi commercializzato nell'Unione Europea come additivo alimentare per gli animali, ma viene utilizzato come probiotico ad uso umano ed ha fornito risultati sperimentali interessanti nei settori suino, avicolo e bovino, migliorando le performance zootecniche.

## PAROLE CHIAVE

Probiotici sporigeni, *Bacillus coagulans*, performance.

## INTRODUZIONE

I probiotici sono definiti come "microrganismi specifici, vitali [...] capaci di influenzare la microflora mediante impianto o colonizzazione in un distretto dell'ospite e di esercitare in tal modo un effetto benefico sulla salute"<sup>1</sup>. In campo zootecnico, i probiotici sono usati da diversi decenni allo scopo di migliorare le performances produttive degli animali; l'attenzione su questi microrganismi è aumentata negli ultimi anni anche per effetto del divieto di utilizzo di antibiotici a scopo auxinico nelle produzioni animali, introdotto dal Regolamento CE 1831/2003<sup>2</sup>. Gli effetti positivi noti riguardano l'efficienza di utilizzo dei nutrienti, l'incremento ponderale, la qualità delle produzioni ed il benessere animale<sup>3</sup>. I probiotici contribuiscono al mantenimento di una microflora enterica ottimale per l'assorbimento delle sostanze nutritive<sup>4</sup> ed esercitano un'azione antagonista nei confronti di microrganismi patogeni che possono influire negativamente sullo stato di salute intestinale degli animali. È noto infatti che un ottimale stato fisiologico della mucosa gastroenterica porta ad una migliore capacità di assimilazione dei nutrienti. Per spiegare queste attività sono stati suggeriti diversi meccanismi, quali la produzione di sostanze inibitrici, lo stimolo della risposta immunitaria, la competizione per il nutrimento e per i siti di adesione<sup>5,6,7</sup>.

La scelta di un probiotico deve tenere conto di diversi requisiti: il più importante è la sicurezza del prodotto nei confronti della salute umana ed animale<sup>8,9,10</sup>. L'EFSA ha propo-

sto un'armonizzazione dei requisiti necessari per qualificare i microrganismi utilizzabili nel campo dell'alimentazione umana ed animale (QPS, Quality Presumption of Safety), ponendo l'accento sulla loro possibile patogenicità e sul potenziale trasferimento di geni di antibiotico-resistenza<sup>11,12</sup>. Inoltre, per un suo utilizzo ottimale, è necessario che il probiotico sia in grado di resistere alle condizioni presenti nell'apparato gastroenterico dell'organismo ospite (acidità gastrica, lisozima, sali biliari, enzimi digestivi) ed all'azione dei principali antibiotici utilizzati nella specie considerata<sup>13</sup>. Diversi autori sostengono inoltre che la funzionalità di un probiotico sia massimizzata con la somministrazione di microrganismi isolati dal tratto gastroenterico di animali della medesima specie<sup>14,15,16,17,18,19</sup>. Va sottolineato che alcune proprietà probiotiche sono legate a specifici cloni microbici, in particolare per quanto riguarda la capacità di sopravvivenza dei microrganismi nel tratto gastrointestinale<sup>20,21</sup>.

I microrganismi maggiormente impiegati a scopo probiotico negli animali e nell'uomo sono i LAB (Lactic Acid Bacteria), appartenenti principalmente ai generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*; meno frequentemente vengono utilizzati batteri dei generi *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, batteri sporigeni (*Sporolactobacillus* spp., *Brevibacillus* spp., *Bacillus* spp.) e lieviti (*Saccharomyces* spp.)<sup>9,15,22</sup>.

## UTILIZZO DI PROBIOTICI SPORIGENI

Per realizzare una produzione di probiotici economicamente sostenibile è necessario che i microrganismi possiedano alcune caratteristiche fondamentali: facilità di coltivazione, resistenza ai processi di liofilizzazione, mantenimento della vi-

Autore per la corrispondenza:  
Barbara Ripamonti (barbara.ripamonti@unimi.it).

talità e stabilità nelle diverse condizioni tecnologiche e commerciali<sup>14</sup>. Per tale motivo, l'utilizzo di batteri sporigeni appare particolarmente vantaggioso; la notevole resistenza tipica delle spore può tradursi infatti in una maggiore conservabilità delle preparazioni commerciali ed in una maggiore resistenza ai processi tecnologici come la pellettizzazione<sup>13</sup>.

In campo zootecnico diverse specie di bacilli vengono utilizzate sperimentalmente a scopo probiotico: *Bacillus subtilis*, *B. cereus* var. *toyoi*, *B. licheniformis* e *B. coagulans* risultano le più studiate. I settori maggiormente interessati sono quello suino ed avicolo, e con minore frequenza quello bovino. Gli esiti positivi ottenuti sono quantificabili in un aumento dell'incremento ponderale degli animali, un migliore indice di conversione alimentare, una maggiore produzione zootecnica (latte, uova), un'azione antagonista nei confronti della flora microbica indesiderata (per esempio *Escherichia coli*) e di conseguenza un'azione protettiva nei confronti delle patologie a carattere diarroico (minore frequenza, gravità e mortalità)<sup>13,14,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34</sup>.

Le autorità di controllo dell'Unione Europea sono molto prudenti riguardo all'utilizzo di batteri sporigeni in campo zootecnico; le specie approvate dallo Scientific Committee on Animal Nutrition (SCAN) sono *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. cereus* var. *toyoi*<sup>12,35,36,37,38,39,40</sup> (Tabella 1).

Per risolvere le ulteriori problematiche relative alle preparazioni probiotiche in commercio, quali ad esempio l'imprecisa identificazione delle specie presenti nel prodotto o addirittura l'utilizzo di una errata nomenclatura<sup>16,41,42,43</sup>, sono state emesse delle linee guida per la commercializzazione di probiotici contenenti sporigeni, riportanti sia le informazioni da indicare in etichetta (identificazione del ceppo, nomenclatura, eventuali controindicazioni, ecc.) che le modalità relative alle prove preliminari da effettuare *in vitro* ed *in vivo*<sup>38,44,45</sup>.

## MECCANISMO D'AZIONE DEI PROBIOTICI SPORIGENI

Gli effetti benefici dell'ingestione di probiotici sporigeni sono documentati in letteratura, ma il meccanismo attraverso cui essi vengono ottenuti non è stato ancora completamente chiarito; potrebbero essere attribuiti alle spore come tali oppure alle forme vegetative<sup>46</sup>. La definizione dell'azione probiotica degli sporigeni dipende dalla conoscenza del loro comportamento all'interno dell'apparato digerente dell'ospite,

un campo ancora poco noto e di grande interesse<sup>15</sup>. Diversi autori, per spiegare l'efficacia di questi microrganismi, suggeriscono differenti meccanismi, non mutuamente esclusivi:

- Produzione di sostanze antimicrobiche, denominate batteriocine o BLIS (Bacteriocin-Like-Inhibitory-Substances): sono oggi conosciuti numerosi composti, prodotti da diverse specie di *Bacillus* spp<sup>47,48,49,50,51,52,53,54,55,56</sup>.
- Attività metabolica: diverse specie di batteri sporigeni, indicati come SFLAB (Spore Forming Lactic Acid Bacteria), sono in grado di produrre acido L(+) lattico, utile ai fini della regolazione della microflora intestinale<sup>13</sup>.
- Esclusione competitiva (CE) nei confronti dei patogeni per quanto riguarda i siti recettoriali di adesione e l'assunzione di sostanze nutritive<sup>26,57</sup>.
- Attività immunostimolante-immunomodulatrice sulla mucosa intestinale, operata dalle forme vegetative o dalle spore, grazie ad una interazione con il GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissue)<sup>58,59,60,61</sup>.

Gli autori concordano nell'affermare che gli sporigeni somministrati per via orale sono in grado di attraversare la barriera gastrica<sup>13,46</sup>; meno definito è invece il loro comportamento nell'ambiente intestinale.

Una parte della comunità scientifica ritiene che gli sporigeni non germinino a livello intestinale; a conferma di tale teoria è stata osservata, in animali alimentati con razioni contenenti probiotici sporigeni, la rapida scomparsa delle spore dalle feci dopo la fine della somministrazione<sup>59,62</sup>. L'azione probiotica in questo caso dipenderebbe esclusivamente da una stimolazione del sistema immunitario. Tale stimolazione è inoltre considerata particolarmente efficiente poiché è stata ipotizzata la possibile colonizzazione di organi linfatici (placche di Peyer, linfonodi mesenterici, milza) da parte di spore traslocate attraverso le cellule M (componenti del GALT). Nei tessuti linfoidi, le spore possono essere in grado di germinare grazie alla presenza di condizioni più adatte rispetto a quelle intestinali<sup>59,63</sup>.

Ipotesi più recenti indicano invece la possibilità di un rapporto endosimbiotico degli sporigeni con l'ospite, con una sopravvivenza e proliferazione delle forme vegetative nel tratto gastrointestinale<sup>16,46,63</sup>. Casula e Cutting<sup>6</sup> e Tam e coll.<sup>64</sup> hanno evidenziato forme vegetative di *B. subtilis* nel piccolo intestino (in particolare nel digiuno) dopo somministrazione di spore ai topi. Un comportamento simile è stato osservato da Jadamus e coll.<sup>65</sup> per *B. cereus* var. *toyoi* nei suinetti. Leser e coll.<sup>46</sup>, grazie all'utilizzo di membrane da dialisi, hanno rilevato la germinazione delle spore di *B. licheniformis* e *B.*

**Tabella 1** - Lista dei bacilli sporigeni approvati dall'Unione Europea (Scientific Committee on Animal Nutrition, SCAN) per l'utilizzo in campo zootecnico.

Specie animali	Specie batterica utilizzata	Miscela in uso	Riferimento Bibliografico
Polli (broiler), Suini, Tacchini, Vitelli	<i>B. licheniformis</i> (DSM 5749, NCTC 13123) <i>B. subtilis</i> (DSM 5750)	<i>B. licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i> (1:1) alla concentrazione di $1.6 \times 10^9$ UFC/g ogni microrganismo	16, 39 <a href="http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out49_en.pdf">http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out49_en.pdf</a>
Vitelli, Polli (broiler), Suini, Conigli	<i>B. cereus</i> var. <i>toyoi</i> (CNCM I-1012, NCIB 40112)	<i>B. cereus</i> var. <i>toyoi</i> alla concentrazione minima di $1 \times 10^{10}$ UFC/g miscelato con farina di mais (4% in peso) e carbonato di calcio (90% in peso)	16, 39 <a href="http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out72_en.pdf">http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out72_en.pdf</a>

*subtilis* nei diversi tratti dell'apparato gastrointestinale dei suini. A sostegno dell'ipotesi di germinazione vari autori segnalano, in alcuni soggetti, il recupero dalle feci di un numero di spore maggiore di quello somministrato; anche i tempi di comparsa delle spore nei campioni fecali e di scomparsa alla fine della somministrazione, rilevati in diverse specie animali, sarebbero comunque compatibili con l'ipotesi di germinazione intestinale<sup>6,57,63,65</sup>. È stata inoltre documentata la possibilità che specie di *Bacillus* spp., considerate strettamente aerobie, proliferino e producano batteriocine anche in condizioni di anaerobiosi<sup>64,66,67,68,69</sup>.

Alla luce di queste osservazioni, si è quindi ipotizzata la possibilità che le spore, eventualmente "attivate" dal pH gastrico<sup>60</sup>, germinino nello stomaco<sup>46</sup> e nel tenue (digiuno) e le forme vegetative vengano successivamente distrutte o sporifichino nei tratti inferiori dell'intestino, meno adatti alla sopravvivenza dei bacilli, forse per una condizione di maggiore anaerobiosi<sup>6,16,65</sup>.

Va precisato che l'eventuale germinazione intestinale delle spore non porta necessariamente ad una colonizzazione della mucosa. Alcuni autori hanno comunque ipotizzato la possibilità di una colonizzazione della mucosa del tenue, grazie alla costituzione dello strato esterno della parete batterica<sup>70</sup>, alla presenza di pili sulla superficie delle spore<sup>71</sup> e/o alle condizioni di idrofobicità dei batteri<sup>72</sup>. Inoltre, il clumping batterico e la capacità di formare un biofilm possono creare una nicchia temporanea protetta per la sopravvivenza dei microrganismi<sup>64,73</sup>.

In base a recenti studi, i bacilli già utilizzati a scopo probiotico in campo zootecnico (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* var. *toyoï*), anche se germinati nel tratto gastroenterico, rimarrebbero sotto forma di cellula vegetativa solo per brevi periodi, comportandosi così da microrganismi transienti. Questo fa supporre che la germinazione non sia un requisito essenziale perché si verifichi l'azione probiotica.<sup>46,74</sup>

## BACILLUS COAGULANS

*Bacillus coagulans* è stato descritto per la prima volta da Hammer<sup>75</sup>: è un bacillo facoltativamente anaerobio, mesofilo, in grado di adattarsi a molteplici condizioni ambientali. È infatti capace di crescere entro un ampio range di temperatura (30-57°C) e di pH (4-10.5), nonché di utilizzare molti substrati nutritivi<sup>75</sup>. La valutazione di numerosi ceppi di *B. coagulans*, effettuata con le moderne tecniche biomolecolari e biochimiche, ha evidenziato la presenza di una certa eterogeneità all'interno della specie, anche se non sufficiente a definire diverse sottospecie<sup>76</sup>.

*B. coagulans* viene oggi ampiamente studiato per un utilizzo come probiotico; le informazioni circa questo microrganismo risentono però di un problema di errata nomenclatura. Questa specie è stata infatti spesso indicata in modo scorretto come *Lactobacillus sporogenes*, una denominazione non valida ma ancor oggi talvolta utilizzata<sup>16,41,42,43</sup>. Diversi studi condotti su questa specie hanno fornito risultati incoraggianti, dimostrando l'assenza di tossicità nel corso delle prove effettuate *in vivo*, nonché la possibilità di ottenere a livello industriale biomasse elevate di prodotto probiotico<sup>15,16,77</sup>. In campo zootecnico, gli studi effettuati *in vivo* hanno fornito buoni risultati in diverse specie animali, in particolare nei soggetti giovani. Nei suinetti è stato osservato un effetto positivo

sull'incremento ponderale e sull'indice di conversione alimentare, sovrapponibile a quello ottenuto con l'utilizzo di antibiotici<sup>78</sup>, nonché una diminuzione della mortalità causata da forme diarroiche<sup>79,80</sup>. Nel settore avicolo, diversi studi hanno sottolineato i vantaggi ottenuti grazie alla somministrazione di *B. coagulans*, in termini di incremento ponderale, indice di conversione alimentare, indice di mortalità e tasso di ovodeposizione; risultati positivi sono stati ottenuti anche nei settori bovino, ovino e cunicolo<sup>81,82,83,84,85,86,87,88</sup>. Per ottenere miglioramenti significativi, è necessario iniziare molto precocemente la somministrazione di *B. coagulans* agli animali, ed utilizzare dosi elevate del microrganismo (10<sup>10</sup>-10<sup>11</sup> cfu/kg di alimento)<sup>80</sup>. I risultati ottenuti in diversi studi svolti sulle principali specie allevate nel nostro paese sono riportati in Tabella 2.

Un recente studio ha rilevato la sopravvivenza delle spore di *B. coagulans* al transito attraverso il tratto gastroenterico<sup>88</sup> anche se, come per gli altri bacilli sporigeni, resta ancora da verificare il meccanismo d'azione esercitato a livello intestinale. L'effetto della somministrazione di *B. coagulans* sulla microflora enterica dell'ospite è legato principalmente ad un'azione antagonista nei confronti dei coliformi (*E. coli* in particolare) e degli enterococchi, come evidenziato sia *in vitro* che *in vivo* in diverse specie animali<sup>79,80,89,90,91,92</sup>.

Particolare attenzione va posta all'attività metabolica di *B. coagulans*: è stata dimostrata la sua capacità di produrre in condizioni di anaerobiosi acido acetico e acido lattico, composti che svolgono un'azione antagonista nei confronti dello sviluppo di diverse specie di batteri fecali potenzialmente patogeni<sup>7,93,94</sup>. *B. coagulans* fa parte infatti degli SFLAB, batteri particolarmente promettenti per l'uso probiotico<sup>13,90</sup>. Inoltre, è nota la produzione di due diverse batteriocine termostabili da parte di ceppi di *B. coagulans*. La prima, identificata da Hyronimus e coll.<sup>48</sup> e denominata "coagulina", ha mostrato un effetto battericida e batteriolitico nei confronti di diverse specie Gram positive (*Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes* e lo stesso *B. coagulans*) senza provocare effetti negativi sui lattobacilli. La seconda, isolata recentemente da Abada e coll.<sup>56</sup> e non ancora denominata, possiede uno spettro antimicrobico più ampio, inibendo lo sviluppo di batteri Gram positivi (*B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*), Gram negativi (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella Typhimurium*) e lieviti (*Candida albicans*).

Il numero di probiotici sporigeni disponibili per un utilizzo in campo zootecnico è, come detto sopra, molto limitato; in particolare nel settore bovino sembra promettente l'impiego di questi microrganismi nei vitelli a carne bianca. Il mantenimento dell'equilibrio, anche microbiologico, a livello intestinale è una problematica molto sentita nell'allevamento del vitello a causa dei regimi alimentari e delle modalità di gestione a cui sono sottoposti gli animali. I vitelli, durante le prime settimane di vita, sono soggetti a dismicrobismi intestinali che si ripercuotono negativamente sulla funzionalità digestiva, sulla produttività e sulla sicurezza sanitaria delle carni macellate<sup>17</sup>. Le cause delle disbiosi sono da ricercarsi nelle condizioni di allevamento, di alimentazione ma anche nell'utilizzo di antibiotici a scopo terapeutico nella comune pratica zootecnica.

La disponibilità di microrganismi probiotici, in questo settore, potrebbe essere particolarmente utile poiché una loro somministrazione agirebbe sull'ambiente intestinale apportando effetti benefici sia dal punto di vista sanitario che da quello zootecnico.

**Tabella 2** - Performance zootecniche ottenute mediante la somministrazione di *B. coagulans* nelle principali tipologie di allevamento.

Specie animale	Dose media somministrata	IPMG (g/giorno)	ICA	Peso vivo (kg)	Bilancio intestinale	Riferimento bibliografico
Suinetti 0-10 settimane	1.0 × 10 <sup>10</sup> UFC/capo/ giorno	+152.1*	- 0.21	//	Diminuzione di coliformi totali* e coliformi fecali*	79
Suinetti 0-10 settimane	1.0 × 10 <sup>10</sup> UFC/capo/ giorno	+23.9	-0.19	//	Diminuzione di coliformi totali* e coliformi fecali*	79
Suinetti 5-12 settimane	1.0 × 10 <sup>10</sup> UFC/capo/ giorno	+60*	-0.17*	//	//	78
Suinetti 4-10 settimane	1.0 × 10 <sup>10</sup> UFC/capo/ giorno	+25	-0.19	//	//	78
Suinetti 0-10 settimane	1.0 × 10 <sup>10</sup> UFC/capo/ giorno	//	//	//	Diminuzione di coliformi totali, coliformi fecali* ed enterococchi*	80
Polli (broiler) 0-7 settimane	1.6 × 10 <sup>10</sup> UFC/kg alimento (1-7 gg.) 4.0 × 10 <sup>9</sup> UFC/kg alimento (8-49 gg.)	+3.3* (gg. 35-49)	-0.12 (gg. 35-49)	+0.16* (49 gg.)	//	84
Polli (broiler) 0-7 settimane	1.6 × 10 <sup>10</sup> UFC/kg alimento (1-7 gg.) 4.0 × 10 <sup>9</sup> UFC/kg alimento (8-49 gg.)	+3.2* (gg. 33-49)	-0.01 (gg. 33-49)	+0.15* (49 gg.)	//	84
Vitelli 3-28 settimane	1.4 × 10 <sup>10</sup> UFC/capo/ giorno	+200*	-0.44*	+38.62*	Diminuzione di <i>Escherichia coli</i> *	88

IPMG = Incremento ponderale medio giornaliero; ICA = Indice di conversione alimentare.  
UFC = Unità Formanti Colonie; \*Differenza statisticamente significativa rispetto al controllo

Esistono ad oggi poche informazioni sul possibile utilizzo di *B. coagulans* come supplemento probiotico nei vitelli a carne bianca; interessante è però il suo isolamento, al pari di altre specie di bacilli, dal contenuto intestinale dei bovini<sup>19</sup>.

Riguardo alla cinetica di transito di *B. coagulans* nel tratto intestinale, non sono stati finora condotti studi nel settore bovino, ma i dati disponibili per altre specie animali mostrano la scomparsa delle spore dalle feci una settimana dopo che ne è stata interrotta la somministrazione<sup>80</sup>. Questo fa supporre che, per un efficace utilizzo probiotico, sia fondamentale somministrare senza interruzione il prodotto almeno per i primi 3 mesi di vita dell'animale, in attesa della successiva stabilizzazione della flora intestinale. Buoni risultati in termini di incremento ponderale sono stati ottenuti utilizzando un preparato contenente *B. coagulans* specie-specifico somministrato per l'intero periodo di allevamento (6 mesi) in dosi non inferiori a 10<sup>9</sup> spore vitali/capo<sup>88</sup>.

Per assicurare un'ottimale azione probiotica, si consiglia quindi la somministrazione protratta per tutto il ciclo produttivo; in questo modo, anche in assenza di una prolungata permanenza nel tratto gastroenterico, è possibile assicurare la salute intestinale degli animali.

## ■ Bacterial spore formers as probiotics for animal nutrition

### SUMMARY

Probiotics are used in animal feeding in order to increase zootechnical performances, such as average daily gain, feed conversion rate, quality of animal products, animal health. Bacterial spore formers, mostly of the genus *Bacillus*, are very promising for a use as probiotics in animal produc-

tion. Positive effects of *Bacillus* spp. administration have been observed, but at present their action is not completely understood. Various hypothesis have been made to explain what happens to ingested spores. Different probiotic mechanisms have been proposed: production of organic acids (SFLAB) or bacteriocins, mucosal adhesion, immunostimulation of GALT.

This review suggests the possible use of spore forming bacteria as probiotics in animal production.

General information about available spore forming probiotics is given; in particular our attention was focused on *B. coagulans*. This microorganism is not already commercialized in European Union as additive in animal feeding, but it is already used as human probiotic.

Several studies performed on poultry, pigs and calves have shown positive results, suggesting its use for the improvement of zootechnical performances.

### KEY WORDS

Spore forming probiotics, *Bacillus coagulans*, performance.

### Bibliografia

- Schrezenmeir J., de Vrese M. (2001) Probiotics, prebiotics and synbiotics—approaching a definition. American Journal of Clinical Nutrition, 73(suppl.): 361S-364S.
- Reg. (CE) 22-9-2003 n. 1831/2003. Regolamento del Parlamento europeo e del Consiglio sugli additivi destinati all'alimentazione animale. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea 18 ottobre 2003, n. L 268.
- SCAN (2000) Report of Scientific Committee on Animal Nutrition on the assessment under Directive 87/153/EEC of the efficacy of micro-organisms used as feed additives. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Animal Nutrition. Disponibile in [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out40\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out40_en.pdf).
- Guarner F., Malagelada J.R. (2003) Gut flora in health and disease. The Lancet, 360: 512-519.

5. Rolfe R.D. (2000) The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition*, 130 (Suppl.): 396S-402S.
6. Casula G., Cutting S.M. (2002) *Bacillus* probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5): 2344-2352.
7. Ouwehand A.C., Salminen S., Isolauri E. (2002) Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82: 279-289.
8. SCAN (2003) On a generic approach to the safety assessment of micro-organisms used in feed/food and feed/food production. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Animal Nutrition. Disponibile in: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out125\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out125_en.pdf).
9. Anadón A., Martínez - Larrañaga M.R.M., Martínez M.A. (2006) Probiotics for animal nutrition in the European Union Regulation and safety assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 45: 91-95.
10. Hong H.A., Huang J.M., Khaneja R., Hiep L.V., Urdaci M.C., Cutting S.M. (2008) The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 105: 510-520.
11. EFSA (2005) Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of micro-organisms used in feed/food and the production of feed/food additives. *EFSA Journal*, 226:1-12.
12. EFSA (2008) Technical Guidance - Microbial Studies prepared by the panel of additives and products or substances used in animal feed. *The EFSA Journal*, 836: 1-3.
13. Hyronimus B., Le Marrec C., Hadji Sassi A., Deschamps A. (2000) Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 61: 193-197.
14. Vanbelle M., Teller E., Focant M. (1990) Probiotics in animal nutrition: a review. *Archives of Animal Nutrition*, 40: 543-567.
15. Sanders M.E., Morelli L., Tompkins T.A. (2003) Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus* and *Brevibacillus*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2: 101-110.
16. Hong H.A., Duc L.H., Cutting S.M. (2005) The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 813-835.
17. Timmermann H.M., Mulder L., Everts H., van Espen D.C., van der Wal E., Klaassen G., Rouwers S.M.G., Hartemink R., Rombouts F.M., Beyen A.C. (2005) Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. *Journal of Dairy Science*, 88: 2154-2165.
18. Gavini F., Delcenserie V., Kopeinig K., Pollinger S., Beerens H., Bonaparte C., Upmann M. (2006) *Bifidobacterium* species isolated from animal feces from beef and pork meat. *Journal of Food Protection*, 69: 871-877.
19. Wu, X.Y., Walker, M., Vanselow, B., Chao, R.L., Chin, J. (2007) Characterization of mesophilic bacilli in faeces of feedlot cattle. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 872-879.
20. Goldin B.R. (1998) Health benefits of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 80: S203-S207.
21. Coeuret V., Gueguen M., Vernoux J.P. (2004) Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 97: 147-156.
22. Fuller R. (Ed.) (1992) *Probiotics: The scientific basis*. Chapman and Hall, London.
23. Jenny B.F., Vandijk H.J., Collins J.A. (1991) Performance and fecal flora of calves fed a *Bacillus subtilis* concentrate. *Journal of Dairy Science*, 74: 1968-1973.
24. Gedek B., Roth F.X., Wiehler S., Bott A., Eidelsburger U., Kirchgessner M. (1992) Nutritive effect of *Bacillus cereus* as a probiotic for veal calves. 2. Influence on cell count, composition and resistance properties of intestinal and faecal microorganisms. *Agrobiological Research*, 45: 311-320.
25. Roth F.X., Kirchgessner M., Eidelsburger U., Gedek B. (1992) Nutritive effect of *Bacillus cereus* as a probiotic for veal calves. 1. Influence on growth variables, slaughter performance and microbial metabolites in the small intestine. *Agrobiological Research*, 45: 294-302.
26. Mazza P. (1994) The use of *Bacillus subtilis* as an anti-diarrhoeal microorganism. *Bollettino Chimico Farmaceutico*, 133: 3-18.
27. Kovac G., Huska M., Seidel H., Mudron P., Link R. (1999) The effects of *Bacillus licheniformis* in prevention and therapy of diarrhoea in calves. *Folia Veterinaria*, 43: 109-112.
28. Kyriakis S.C., Tsioliyanis V.K., Vlemmas J., Sarris K., Tsinas A.C., Alexopoulos C., Jansegers L. (1999) The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhoea syndrome of piglets. *Research in Veterinary Science*, 67: 223-228.
29. Erhard M.H., Leuzinger K., Stangassinger M. (2000) Studies on the prophylactic effect of feeding probiotics, pathogen-specific colostrum antibodies or egg yolk antibodies in newborn calves. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 84: 85-94.
30. La Ragione R.M., Casula G., Cutting S.M., Woodward M.J. (2001) *Bacillus subtilis* spores competitively exclude *Escherichia coli* O78:K80 in poultry. *Veterinary Microbiology*, 79: 133-142.
31. Alexopoulos C., Georgoulakis I.E., Tzivara A., Kristas S.K., Siochu A., Kyriakis S.C. (2004) Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berl)*, 88: 381-392.
32. Hooge D.M., Ishimaru H., Sims M.D. (2004) Influence of dietary *Bacillus subtilis* C-3102 spores on live performance of broiler chickens in four controlled pen trials. *Journal of Applied Poultry Research*, 13: 222-228.
33. Taras D., Vahjen W., Macha M., Simon O. (2005) Response of performance characteristics and fecal consistency to long-lasting dietary supplementation with the probiotic strain *Bacillus cereus* var. *toyoi* to sows and piglets. *Archives of Animal Nutrition*, 59: 405-417.
34. Guo X., Li D., Lu W., Piao X., Chen X. (2006) Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90: 139-146.
35. SCAN (2000) Report of Scientific Committee on Animal Nutrition on product BioPlus 2Br for use as feed additive. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Animal Nutrition. Disponibile in: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out49\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out49_en.pdf).
36. SCAN (2000) Report of Scientific Committee on Animal Nutrition on the safety of use of *Bacillus* species in animal nutrition. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Animal Nutrition. Disponibile in: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out41\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out41_en.pdf).
37. SCAN (2001) Report of Scientific Committee on Animal Nutrition on product Toyocerin for use as feed additive. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Animal Nutrition. Disponibile in: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out72\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out72_en.pdf).
38. SCAN (2003) Opinion on the use of certain micro-organisms as additives in feedingstuffs. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Animal Nutrition. Disponibile in: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out93\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out93_en.pdf).
39. Gueimonde M., Frias R., Ouwehand A.C. (2006) Assuring the continued safety of lactic acid bacteria used as probiotics. *Biologia Bratislava*, 61: 755-760.
40. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, Directorate D - Animal Health and Welfare (2008) Community Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003. Disponibile in: [http://ec.europa.eu/comm/food/food/animalnutrition/feedadditives/registeradditives\\_en.htm](http://ec.europa.eu/comm/food/food/animalnutrition/feedadditives/registeradditives_en.htm)
41. Green D.H., Wakeley P.R., Page A., Barnes A., Baccigalupi L., Ricca E., Cutting M. (1999) Characterization of two *Bacillus* probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4288-4291.
42. Hoa N.T., Baccigalupi L., Huxham A., Smertenko A., Van P.H., Ammendola S., Ricca E., Cutting S.M. (2000) Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders. *Applied and Environmental Microbiology*, 6: 5241-5247.
43. De Vecchi E., Drago L. (2006) *Lactobacillus sporogenes* or *Bacillus coagulans*: misidentification or mislabelling? *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 1: 3-10.
44. FAO (2002) Joint FAO/WHO group - Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Disponibile in: <ftp://ftp.fao.org/esn/food/wgreport2.pdf>.
45. SCAN (2003) Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the criteria for assessing the safety of micro-organisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Animal Nutrition. Disponibile in: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out108\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out108_en.pdf).
46. Leser T.D., Knarreborg A., Worm J. (2008) Germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* spores in the gastrointestinal tract of pigs. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 1025-1033.
47. Jansen E.F., Hirschmann D.J. (1944) Subtilin, an antibacterial substance of *Bacillus subtilis*. Culturing condition and properties. *Archives of Biochemistry*, 4: 297-309.
48. Hyronimus B., Le Marrec C., Urdaci M.C. (1998) Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* 14. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 42-50.
49. Urdaci M.C., Pinchuk I. (2004) Antimicrobial activity of *Bacillus* probiotics. In: *Bacterial spore formers: probiotics and emerging applications*. Eds. Ricca E., Henriques A.O., Cutting S.M., 171-182, Horizon Bioscience, Wymondham, UK.
50. Stein T. (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56: 845-857.
51. Gray E.J., Lee K.D., Souleimanov A.M., Di Falco M.R., Zhou X., Ly A., Charles T.C., Driscoll B.T., Smith D.L. (2006) A novel bacteriocin, thu-

- ricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: isolation and classification. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 545-554.
52. He L., Chen W., Liu Y. (2006) Production and partial characterization of bacteriocin like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12. *Microbiological Research*, 161: 321-326.
  53. Lisboa M.P., Bonatto D., Bimani D., Henriques J.A., Brandelli A. (2006) Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from Brazilian Atlantic forest. *International Microbiology*, 9: 111-118.
  54. Sharma N., Kapoor G., Neopaney B. (2006) Characterization of a new bacteriocin produced from a novel isolated strain of *Bacillus lentus* NG121. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89: 337-343.
  55. Motta A.S., Cannavan F.S., Tsai S.-M., Brandelli A. (2007) Characterization of a broad range antibacterial substance from a new *Bacillus* species isolated from Amazon basin. *Archives of Microbiology*, 188: 367-375.
  56. Abada E.A.E. (2008) Isolation and characterization of an antimicrobial compound from *Bacillus coagulans*. *Animal Cell and System*, 12: 41-46.
  57. Hoa T.T., Duc L.H., Istitato R., Baccigalupi L., Ricca E., Van P.H., Cutting S.M. (2001) The fate and dissemination of *Bacillus subtilis* spores in a murine model. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 3819-3823.
  58. Muscettola M., Grasso G., Blach-Olszewska Z., Migliaccio P., Borghesi-Nicoletti C., Giarratana M., Gallo V.C. (1992) Effects of *Bacillus subtilis* spores on interferon production. *Pharmacological Research*, 26: 176-177.
  59. Spinosa M.R., Braccini T., Ricca E., De Felice M., Morelli L., Pozzi G., Oggioni M.R. (2000) On the fate of ingested *Bacillus* spores. *Research in Microbiology*, 151: 361-368.
  60. Duc H.L., Hong H.A., Barbosa T.M., Henriques O., Cutting S. (2004) Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 2161-2171.
  61. Huang J.M., La Ragione R.M., Nunez A., Cutting S.M. (2008) Immunostimulatory activity of *Bacillus* spores. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 53: 195-203.
  62. Turnbull P.C., Kramer J.M. (1985) Intestinal carriage of *Bacillus cereus*: faecal isolation studies in three population groups. *Journal of Hygiene (London)*, 95: 629-638.
  63. Duc H.L., Hong H.A., Fairweather N., Ricca E., Cutting S.M. (2003) Bacterial spores as vaccine vehicles. *Infection and Immunity*, 71: 2810-2818.
  64. Tam N.K.M., Uyen N.Q., Hong H.A., Duc L.H., Hoa T.T., Serra C.R., Henriques A.O., Cutting S.M. (2006) The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *Journal of Bacteriology*, 188: 2692-2700.
  65. Jadamus A., Vahjen W., Simon O. (2001) Growth behaviour of a spore forming probiotic strain in the gastrointestinal tract of broiler chicken and piglets. *Archives of Animal Nutrition*, 54: 1-17.
  66. Hoffman T., Troup B., Szabo A., Hungerer C., Jahn D. (1995) The anaerobic life of *Bacillus subtilis*: cloning of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system. *FEMS Microbiology Letters*, 131: 219-225.
  67. Salminen S., Isolauri E., Salminen E. (1996) Clinical use of probiotics for stabilising the gut mucosal barrier: successful strains and future challenger. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 347-358.
  68. Nakano M.M., Dailly Y.P., Zuber P., Clark D.P. (1997) Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *Journal of Bacteriology*, 179: 6749-6755.
  69. Nakano M.M., Zuber P. (1998) Anaerobic growth of a 'strict aerobe' (*Bacillus subtilis*). *Annual Reviews in Microbiology*, 52: 165-190.
  70. Kotiranta A., Lounatmaa K., Haapasalo M. (2000) Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection*, 2: 189-198.
  71. Hachisuka Y., Kozuka S., Tsujikawa M. (1984) Exosporia and appendages of spores of *Bacillus* species. *Microbiology and Immunology*, 28: 619-624.
  72. Ronner U., Husmark U., Henriksson A. (1990) Adhesion of *Bacillus* spores in relation to hydrophobicity. *Journal of Applied Bacteriology*, 69: 550-556.
  73. Probert H.M., Gibson G.R. (2002) Bacterial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 3: 23-27.
  74. Mauriello E.M.F., Cangiano G., Maurano F., Saggese V., De Felice M., Rossi M., Ricca E. (2007) Germination-independent induction of cellular immune response by *Bacillus subtilis* spores displaying the C fragment of the tetanus toxin. *Vaccine*, 25: 788-793.
  75. Hammer B.W. (1915) Bacteriological studies on the coagulation of evaporated milk. *Iowa Agricultural Experiment Station Research Bulletin*, 19: 119-131.
  76. De Clerk E., Rodriguez-Diaz M., Forsyth G., Lebbe L., Logan N.A., DeVos P. (2004) Polyphasic characterization of *Bacillus coagulans* strains, illustrating heterogeneity within the species, and emended description of the species. *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 50-60.
  77. Adami A., Cavazzoni V. (1993) Biomass production, preservation and characteristics of a strain of *Bacillus coagulans* usable as probiotic. *Microbiologia - Alimenti - Nutrizione*, 11: 93-100.
  78. Succi G., Sandrucci A., Tamburini A., Adami A., Cavazzoni V. (1995) Studio dell'effetto di un nuovo ceppo di *Bacillus coagulans* come probiotico sulle performance del suinetto. *Rivista di Suinicoltura*, 36: 59-63.
  79. Adami A., Sandrucci A., Cavazzoni V. (1997) Piglets fed from birth with the probiotic *Bacillus coagulans* as additive: zootechnical and microbiological aspects. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*, 47: 139-149.
  80. Adami A., Cavazzoni V. (1999) Occurrence of selected bacterial groups in the faeces of piglets fed with *Bacillus coagulans* as probiotic. *Journal of Basic Microbiology*, 39: 3-9.
  81. Mohan Kumar O.R., Christopher K.J. (1988) The role of *Lactobacillus* sporogenes (probiotic) as feed additive. *Poultry Guide*, 25: 37-40.
  82. Manickam R., Viswanathan K., Mohan M. (1994) Effect of probiotics in broiler performance. *Indian Veterinary Journal*, 71: 737-739.
  83. Joy A.D., Samuel J.J. (1997) Effect of probiotic supplementation on the performance of broilers. *Journal of Veterinary and Animal Science*, 28: 10-14.
  84. Cavazzoni V., Adami A., Castrovilli C. (1998) Performance of broiler chickens supplemented with *Bacillus coagulans* as probiotic. *British Poultry Science*, 39: 526-529.
  85. Singh S., Sharma V.P., Panwar V.S. (1999) Influence of the levels of probiotic and energy on mortality and economics of broilers in summer. *Indian Journal of Animal Sciences*, 69: 830-831.
  86. Panda A.K., Rao S.V.R., Raju M.V.L.N., Sharma S.R. (2006) Dietary supplementation of *Lactobacillus* sporogenes on performance and serum biochemical-lipid profile of broiler chickens. *Journal of Poultry Science*, 43: 235-240.
  87. Khan H.M., Bhat A.S., Mir M.S. (2003) Effect of probiotic supplementation on the performance of Corriedale lambs. *Indian Journal of Small Ruminants*, 9: 60-61.
  88. Cantoni C., Baldi A., Savoini G., Domeneghini C., Stella S., Agazzi A., Bersani C., Ripamonti B., Pirani S., Rebutti R., Invernizzi G., Vitari F. (2008) Identificazione dei biotipi di batteri lattici intestinali a finalità probiotica nei vitelli a carne bianca e verifica in vivo della loro efficacia. *Quaderni della Ricerca n° 88*, Ed. Regione Lombardia, pp. 59. Disponibile in [http://www.agricoltura.regione.lombardia.it/admin/rla\\_Documenti/1-3905/quaderno\\_88\\_luglio\\_2008.pdf](http://www.agricoltura.regione.lombardia.it/admin/rla_Documenti/1-3905/quaderno_88_luglio_2008.pdf)
  89. Singh S., Sharma V.P., Panwar V.S. (1999) Effect of different levels of probiotic and energy on microbial population in broiler chicks. *Indian Veterinary Journal*, 76: 1026-1028.
  90. Bondi M., Messi P., Marchioretto I.D. (2000) Caratteristiche di LABLYS98, un *Lactobacillus* sporogenes da impiegarsi in preparati probiotici. *Industrie Alimentari*, 39: 704-710, 715.
  91. Donskey C.J., Hoyer C.K., Das S.M., Farmer S., Dery M., Bonomo R.A. (2001) Effect of oral *Bacillus coagulans* administration on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized mice. *Letters in Applied Microbiology*, 33: 84-88.
  92. Lonkar P., Harne S.D., Kalorey D.R., Kurkure N.V. (2005) Isolation, in vitro antibacterial activity, bacterial sensitivity and plasmid profile of *Lactobacilli*. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 18: 1336-1342.
  93. Annuk H., Schepetova J., Kullisaar T., Songisepp E., Zilmer M., Mikkelsaar M. (2003) Characterization of intestinal *Lactobacilli* as putative probiotic candidates. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 403-412.
  94. Ripamonti B., Rebutti R., Stella S., Baldi A., Savoini G., Bersani C., Bertasi B., Panteghini C., Cantoni C. (2007) Screening and selection of lactic acid bacteria from calves for designing a species-specific probiotic supplement. *Italian Journal of Animal Science*, 6 (suppl. 1): 350-352.