

ATTIVITÀ ANTIMICROBICA DI ACIDI ORGANICI E COMPOSTI NATURALI IDENTICI PER IL CONTROLLO DI *SALMONELLA TYPHIMURIUM* NEL SUINO

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ORGANIC ACIDS AND NATURE IDENTICAL COMPOUNDS TO CONTROL *SALMONELLA TYPHIMURIUM* IN SWINE

GIOVAGNONI G.¹, TUGNOLI B.², PIVA A.^{1,2}, GRILLI E.^{1,3}

¹ DIMEVET, Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50, 40064, Ozzano dell'Emilia (BO), Italia;

² Vetagro S.p.A., via Porro 2, 42124, Reggio Emilia, Italia;

³ Vetagro Inc., 116 W. Jackson Blvd., Suite #320, 60604, Chicago, IL, USA

Parole chiave: *Salmonella typhimurium*, composti bioattivi, additivi per mangimi

Key Words: *Salmonella typhimurium*, bioactive compounds, feed additives

RIASSUNTO

L'obiettivo di questo studio è stato di indagare l'efficacia di composti bioattivi nell'inibizione e nel controllo di *Salmonella typhimurium* ATCC® 6994™ *in vitro*. L'attività antimicrobica di acidi organici (acido citrico, acido sorbico, acido benzoico, acido butirrico ed acido esanoico) e composti naturali identici (timolo, vanillina, carvacrolo ed eugenolo) è stata valutata attraverso un MIC test in microdiluizione. Tutti i composti naturali identici sono risultati efficaci nell'inibizione della crescita batterica ed in particolare timolo e carvacrolo hanno mostrato le MIC più basse tra tutte le sostanze analizzate (1.87 mM). Tra gli acidi organici, acido sorbico, benzoico ed esanoico presentavano una MIC di 100 mM. Timolo, carvacrolo ed acido sorbico sono stati selezionati per uno studio time-kill, da cui è emersa l'azione battericida dei due composti naturali identici e l'azione batteriostatica dell'acido sorbico. I risultati di questo studio indicano che questi composti bioattivi possono quindi essere utilizzati come additivi per mangimi nel controllo di *Salmonella typhimurium* nel suino.

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the efficacy of bioactive compounds in the inhibition and control of *Salmonella typhimurium* ATCC® 6994™ *in vitro*. The antimicrobial activity of organic acids (citric acid, sorbic acid, benzoic acid, butyric acid, and hexanoic acid) and nature identical compounds (thymol, vanillin, carvacrol, and eugenol) has been evaluated by a microdilution MIC test. All the nature identical compounds were effective in inhibiting bacterial growth and in particular thymol and carvacrol showed the lowest MIC compared to all the substances tested (1.87 mM). Among organic acids, sorbic acid, benzoic acid and hexanoic acid had a MIC of 100 mM. Thymol, carvacrol and sorbic acid were selected for a time-kill study, from which emerged the bactericidal action of the two nature identical compounds and the bacteriostatic action of sorbic acid. The results of this study indicate that these bioactive compounds can therefore be used as feed additives to control *Salmonella typhimurium* in pigs.

INTRODUZIONE

Salmonella typhimurium è riportata come la seconda causa più comune in Europa tra i casi di infezioni gastrointestinali nell'uomo (EFSA, 2018). Tra questi casi, il 27.3% dei ceppi isolati nell'uomo è risultata associata a matrici di origine suina, confermando che questa specie animale rappresenta una delle principali vie di trasmissione all'uomo (Barilli et al., 2018; EFSA, 2018).

L'infezione da *S. typhimurium* nell'animale infatti non è da sottovalutare, in quanto il suino, essendo un ospite asintomatico, rappresenta un importante reservoir del patogeno. *S. typhimurium* colonizza in maniera persistente e cronica il tratto gastrointestinale del suino e, durante i periodi di stress, spesso si verifica una riacutizzazione di questa colonizzazione asintomatica (Verbrugge et al., 2015). In primo luogo, il contesto più pericoloso per la riacutizzazione è il trasporto e l'arrivo al macello, dove la diffusione di questo patogeno è amplificata e diventa la principale via di trasmissione all'uomo (Verbrugge et al., 2011; Grilli et al., 2015). Essendo quindi la catena alimentare il fattore di rischio maggiore per l'uomo, altrettanto critico risulta il fenomeno di antibiotico resistenza che caratterizza *S. typhimurium*. Numerosi sono i ceppi di *S. typhimurium* risultati multiresistenti agli antibiotici (Graziani et al., 2008; Brunelle et al., 2017; Wang et al., 2019) and the Centers for Disease Control consider multidrug-resistant (MDR. In particolare, un recente studio di Wang et al. (2019) ha identificato nel suino la principale fonte di due pattern di tetra e penta-resistenza più frequentemente osservati in ceppi di *S. typhimurium* isolati da uomo, animali e prodotti di origine animale. Di fondamentale importanza in questo scenario globale è quindi cercare di ricorrere ad alternative gli antibiotici per il controllo di *S. typhimurium* nel suino (Grilli et al., 2015; V. T. Nair et al., 2018). Scopo di questo studio è stato quello di identificare possibili composti bioattivi utilizzati come additivi per mangimi, quali acidi organici e composti naturali identici, per il controllo di *S. typhimurium* nel suino.

MATERIALI E METODI

Composti testati

Acido citrico, acido sorbico, acido benzoico, acido butirrico, acido esanoico, timolo, vanillina, carvacrolo ed eugenolo rappresentano gli acidi organici e composti naturali identici oggetto dello studio. Gli stock degli acidi organici sono stati preparati in infuso cuore e cervello (BHI), mentre gli stock dei composti naturali identici in etanolo 70% v/v. Tutti gli stock sono stati portati a pH 6.5 e filtrati con filtri 0.2 µm.

MIC test

Acido citrico, acido sorbico, acido benzoico, acido butirrico ed acido esanoico sono stati testati in diluizioni scalari da 100 a 1.56 mM, mentre timolo, vanillina, carvacrolo ed eugenolo da 7.5 a 0.12 mM. *S. typhimurium* ATCC® 6994™ è stata coltivata in BHI a 37°C in aerobiosi ed è stato utilizzato un inoculo di 10⁶ CFU. Il valore di minima concentrazione inibente (MIC) di acidi organici e composti naturali identici è stato determinato con test di microdiluizione in BHI pH 6.5, attraverso la misurazione dell'assorbanza a 630 nm dopo 24 ore di incubazione con l'utilizzo di uno spettrofotometro. Per ogni sostanza, la MIC è stata definita come la concentrazione più bassa in grado di restituire un'assorbanza nulla dopo 24 ore di incubazione.

Time-kill test

Dopo uno screening iniziale, acido sorbico, timolo e carvacrolo sono stati selezionati per un esperimento di time-kill, ossia una valutazione nell'arco di 24 ore della riduzione della conta batterica di un determinato ceppo coltivato in presenza di un agente antimicrobico. I saggi sono stati allestiti in BHI pH 6.5, testando acido sorbico ad una concentrazione di 50 e 100 mM, mentre timolo e carvacrolo ad una concentrazione di 0.94 e 1.87 mM. Dopodiché, al fine di valutare l'inibizione della crescita batterica da parte delle sostanze, sono state effettuate conte su piastre BHI agar dal momento dell'inoculo con 10⁶ CFU di *S. typhimurium* (0 ore), ogni ora per le 8 ore successive e dopo 24 ore.

RISULTATI

MIC test

I risultati dell'attività antimicrobica di acidi organici e composti naturali identici sono riportati

rispettivamente nelle Figure 1 e 2. Acido citrico e acido butirrico non hanno avuto alcun effetto inibitorio sul ceppo di *S. typhimurium* alle dosi testate. Al contrario, acido sorbico, benzoico ed esanoico hanno presentato una MIC corrispondente a 100 mM. Per quanto riguarda i composti naturali identici, la MIC di timolo e carvacolo è stata definita a 1.87 mM, mentre per vanillina ed eugenolo la crescita batterica è stata completamente inibita rispettivamente a 7.5 mM e 3.75 mM.

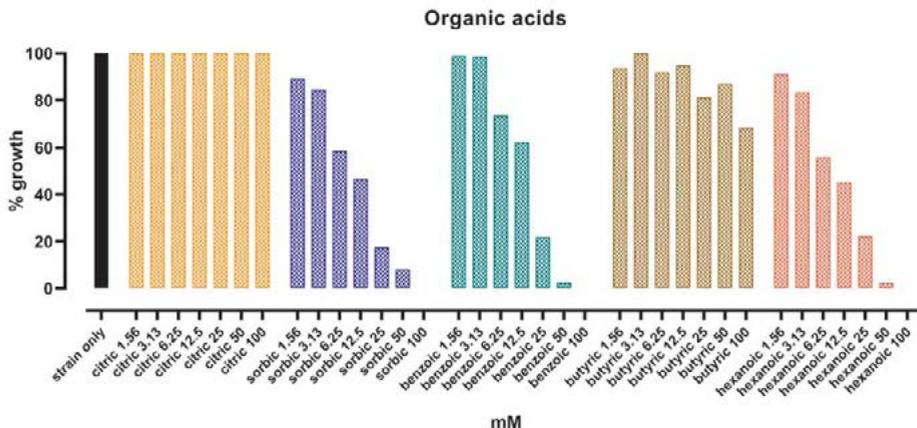


Figura 1 – Crescita di *S. typhimurium* dopo 24 ore in presenza di acido citrico, acido sorbico, acido benzoico, acido butirrico ed acido esanoico. La crescita batterica è espressa in percentuale rispetto al controllo (strain only).

Figure 1 - *S. typhimurium* growth after 24 hours in the presence of citric acid, sorbic acid, benzoic acid, butyric acid and hexanoic acid. Bacterial growth is expressed as a percentage relative to the control (strain only).

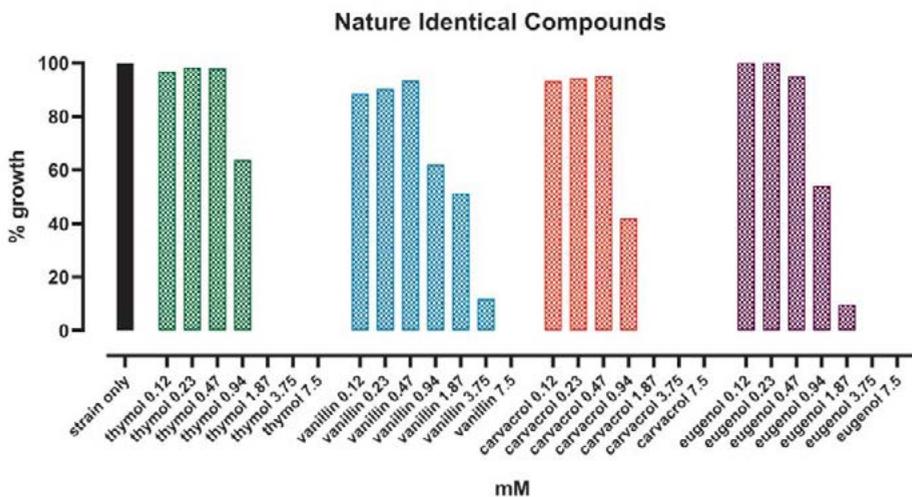


Figura 2 – Crescita di *S. typhimurium* dopo 24 ore in presenza di timolo, vanillina, carvacolo ed eugenolo. La crescita batterica è espressa in percentuale rispetto al controllo (strain only).

Figure 2 - *S. typhimurium* growth after 24 hours in the presence of thymol, vanillin, carvacrol and eugenol. Bacterial growth is expressed as a percentage relative to the control (strain only).

Studio time-kill

In Figura 3 sono rappresentate le curve del time-kill test. La concentrazione di *S. typhimurium* in presenza di acido sorbico 50 e 100 mM non è variata durante le 24 ore post-inoculazione. Al contrario, al termine dell'esperimento tutte le concentrazioni testate di timolo e carvacrolo sono risultate letali per la crescita di *S. typhimurium*. Timolo e carvacrolo 0.94 mM hanno consentito una graduale riduzione del numero di cellule vitali durante gli intervalli di tempo misurati, arrivando, come sopracitato, ad inibire completamente la crescita del patogeno a 24 ore. Le stesse sostanze alla concentrazione superiore (1.87 mM) hanno permesso la immediata soppressione della popolazione batterica inoculata al tempo 0.

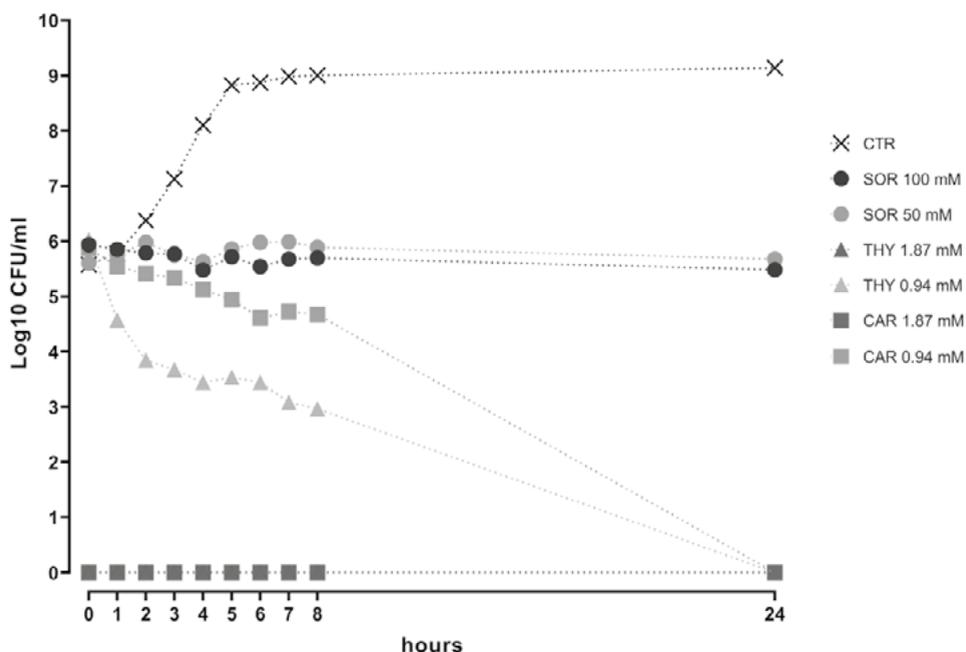


Figura 3 – Curve time-kill. Nel grafico è riportato il logaritmo in base 10 di CFU/ml di *S. typhimurium*, coltivata con nessuna sostanza (CTR) o in presenza di acido sorbico (SOR), timolo (THY) e carvacrolo (CAR) a diverse concentrazioni, in relazione agli intervalli di tempo misurati.
Figure 3 - Time-kill curves. The graph shows the based-10 logarithm of *S. typhimurium* CFU/ml, grown without substances (CTR), or in presence of thymol (THY), carvacrol (CAR), and sorbic acid (SOR) at different concentrations, in relation to the measured time points.

DISCUSSIONE

Nel presente studio è stata valutata l'azione antimicrobica di acidi organici e composti naturali identici nei confronti di *S. typhimurium* ATCC® 6994™.

In generale, mentre tutti i composti naturali identici sono stati efficaci nell'inibizione della crescita del ceppo batterico, tra gli acidi organici testati è stata determinata la MIC solamente di acido sorbico, acido benzoico ed acido esanoico. Ciò può essere giustificato dal meccanismo d'azione antimicrobico di queste diverse sostanze: infatti, mentre i composti naturali identici espletano la loro principale azione sulla membrana dei microorganismi portando alla formazione di pori che provocano la morte cellulare, l'azione antimicrobica degli acidi organici dipende dalla loro costante di dissociazione (pKa) (Ricke, 2003; Burt,

2004). Si deduce quindi che, al variare del pH ambientale, gli acidi organici possano presentarsi o meno nella loro forma indissociata, la quale rappresenta l'unica forma grazie a cui queste molecole riescono ad attraversare la membrana batterica. Avendo allestito l'esperienza a pH 6.5, è quindi possibile che l'azione antimicrobica di alcuni acidi organici non fosse completamente massimizzata. A riprova di ciò, acido sorbico, benzoico ed esanoico presentano infatti le pKa che più si avvicinano al pH dell'esperienza (4.76, 4.19, 5.09, rispettivamente). Sebbene abbia una pKa modestamente alta (4.82), l'acido butirrico non ha invece un effetto antimicrobico diretto sul batterio, ma è stato utilizzato *in vivo* nelle infezioni da *S. typhimurium*, grazie alla capacità di diminuire l'espressione di geni di patogenicità e di rinforzare l'apparato gastrointestinale dell'animale (Gantois et al., 2006). Oltre al pH, l'azione degli acidi organici varia comunque anche a seconda della struttura del batterio (Sheu and Freese, 1973).

Dopo aver selezionato tre sostanze esemplificative (timolo, carvacrolo ed acido sorbico), un ulteriore studio di time-kill è stato eseguito per mettere in luce gli effetti antimicrobici di queste molecole in un intervallo di tempo di 24 ore. La stessa tecnica è stata utilizzata in molti studi per descrivere l'azione di sostanze alternative, da sole ed in combinazione con antibiotici (Singh et al., 2011; Petsong et al., 2018; Guimarães et al., 2019). Dalle curve time-kill è stata evidenziata un'azione battericida dose-dipendente di timolo e carvacrolo ed un'azione batteriostatica dell'acido sorbico. Timolo e carvacrolo alle dosi più alte testate (1.87 mM) confermano i dati ottenuti dal MIC test, andando a sopprimere *S. typhimurium* non appena dopo l'inoculazione. A differenza del primo esperimento, nella curva time-kill le stesse sostanze anche a dose dimezzata (0.94 mM) hanno permesso di inibire completamente la crescita del ceppo dopo 24 ore: probabilmente questa variabilità, seppur minima, è dettata dalla diversità dei due sistemi. In ogni caso, l'efficacia di timolo e carvacrolo contro *S. typhimurium* in questo studio è affermata da numerosi studi (Juven et al., 1994; Zhou et al., 2007; Chauhan and Kang, 2014). Per quanto riguarda l'acido sorbico, le conte batteriche non sono variate nell'arco di 24 ore, indicando un'azione batteriostatica che riconferma la teoria sopracitata riguardo l'azione antimicrobica degli acidi organici. Da questo risultato si evidenzia come la molecola sia comunque in grado di arginare un'infezione da *S. typhimurium*.

CONCLUSIONI

In conclusione, acidi organici e composti naturali identici possono essere potenziali sostanze alternative utilizzate per controllare *S. typhimurium* nel suino, in quanto la loro attività antimicrobica nei confronti di questo patogeno di origine alimentare è stata confermata dai risultati di questo studio.

BIBLIOGRAFIA

1. Barilli E., Bacci C., StellaVilla Z., Merialdi G., D'Incau M., Brindani F., Vismarra A. (2018) "Antimicrobial resistance, biofilm synthesis and virulence genes in Salmonella isolated from pigs bred on intensive farms." Ital J Food Saf. 7, 7223.
2. Brunelle B.W., Bearson B.L., Bearson S.M.D., Casey T.A. (2017) "Multidrug-Resistant Salmonella enterica Serovar Typhimurium Isolates Are Resistant to Antibiotics That Influence Their Swimming and Swarming Motility". mSphere. 2.
3. Burt S. (2004) "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review". Int J Food Microbiol. 94, 223–253.
4. Chauhan A.K., Kang S.C. (2014) "Thymol disrupts the membrane integrity of Salmonella ser. typhimurium in vitro and recovers infected macrophages from oxidative stress in an ex vivo model". Res Microbiol. 165, 559–565.
5. EFSA (2018) "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017". EFSA Journal. 16, e05500.

6. Gantois I., Ducatelle R., Pasmans F., Haesebrouck F., Hautefort I., Thompson A., Hinton J.C., Immerseel F.V. (2006) "Butyrate Specifically Down-Regulates Salmonella Pathogenicity Island 1 Gene Expression". *Appl Environ Microbiol.* 72, 946–949.
7. Graziani C., Busani L., Dionisi A.M., Lucarelli C., Owczarek S., Ricci A., Mancin M., Caprioli A., Luzzi I. (2008) "Antimicrobial resistance in Salmonella enterica serovar Typhimurium from human and animal sources in Italy". *Vet Microbiol.* 128, 414–418.
8. Grilli E., Foresti F., Tugnoli B., Fustini M., Zanoni M.G., Pasquali P., Callaway T.R., Piva A., Alborali G.L. (2015) "Microencapsulated sorbic acid and pure botanicals affect Salmonella Typhimurium shedding in pigs: a close-up look from weaning to slaughter in controlled and field conditions". *Foodborne Pathog Dis.* 12, 813–819.
9. Guimarães A.C., Meireles L.M., Lemos M.F., Guimarães M.C.C., Endringer D.C., Fronza M., Scherer R. (2019) "Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils". *Molecules.* 24.
10. Juven B., Kanner J., Schved F., Weisslowicz H. (1994) "Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents". *J Appl Bacteriol.* 76, 626–31.
11. Petsong K., Uddin M.J., Vongkamjan K., Ahn J. (2018) "Combined effect of bacteriophage and antibiotic on the inhibition of the development of antibiotic resistance in Salmonella typhimurium". *Food Sci Biotechnol.* 27, 1239–1244.
12. Ricke S.C. (2003) "Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials". *Poult Sci.* 82, 632–639.
13. Sheu C.W., Freese E. (1973) "Lipopolysaccharide layer protection of gram-negative bacteria against inhibition by long-chain fatty acids". *J Bacteriol.* 115, 869–875.
14. Singh A.P., Preet S., Rishi P. (2011) "Augmentation of antimicrobial activity of conventional antibiotics by cell-free extract of *L. plantarum*". *J Antibiot.* 64, 795–798.
15. V. T. Nair D., Venkitanarayanan K., Kollanoor Johny A. (2018) "Antibiotic-Resistant Salmonella in the Food Supply and the Potential Role of Antibiotic Alternatives for Control". *Foods.* 7.
16. Verbrugghe E., Boyen F., Van Parys A., Van Deun K., Croubels S., Thompson A., Shearer N., Leyman B., Haesebrouck F., Pasmans F. (2011) "Stress induced Salmonella Typhimurium recrudescence in pigs coincides with cortisol induced increased intracellular proliferation in macrophages". *Vet Res.* 42, 118.
17. Verbrugghe E., Van Parys A., Leyman B., Boyen F., Haesebrouck F., Pasmans F. (2015) "HtpG contributes to Salmonella Typhimurium intestinal persistence in pigs". *Vet Res.* 46, 118.
18. Wang X., Biswas S., Paudyal N., Pan H., Li X., Fang W., Yue M. (2019) "Antibiotic Resistance in Salmonella Typhimurium Isolates Recovered From the Food Chain Through National Antimicrobial Resistance Monitoring System Between 1996 and 2016". *Front Microbiol.* 10.
19. Zhou F., Ji B., Zhang H., Jiang H., Yang Z., Li J., Li J., Yan W. (2007) "The Antibacterial Effect of Cinnamaldehyde, Thymol, Carvacrol and Their Combinations Against the Foodborne Pathogen Salmonella Typhimurium". *J Food Saf.* 27, 124–133.