

INFLUENZA DI OLI ESSENZIALI SULLA PRODUZIONE DI BIOFILM DI DIVERSI CEPPI DI *LISTERIA MONOCYTOGENES*

EFFECT OF ESSENTIAL OIL ON BIOFILM PRODUCTION BY DIFFERENT LISTERIA MONOCYTOGENES STRAINS

Iacumin L., Manzano M., Pustetto H., Giusto C., ¹Boscolo D., Comi G.

Dipartimento di Scienze degli Alimenti - Università degli Studi di Udine

(1) Dipartimento di Scienze Animali - Università degli Studi di Udine

SUMMARY

The effects of different essential oil (hexanal, 2-(*E*)-hexenal, carvacrol, citron, red orange, thymol and limonene) on biofilm production of some *Lmonocytogenes* strains are evaluated. The formation of biofilm on certain surfaces or on the food, seems to be related with cross-contamination during processing or with the contamination of the final product, with potential risk for the consumer. Many studies were done on the antimicrobial activity of essential oils and their components, but not too much is known about their capacity to influence and reduce the microbial production of biofilm. Our data showed that essential oils can inhibit or limit the biofilm production.

Key words

Essential oil, biofilm, *L. monocytogenes*.

INTRODUZIONE

L.monocytogenes è un importante microrganismo patogeno di origine alimentare (7) con la capacità di formare biofilm su diversi tipi di superfici oltre che sugli alimenti (4,6,8). Se molti sono gli studi sull'attività degli oli essenziali o dei loro componenti come agenti antimicrobici (3,5,8,9,10,11), poco è invece noto sull'efficacia di tali estratti nell'abbattere la capacità di produzione di biofilm da parte dei microrganismi (4).

A fronte di ciò, lo scopo della ricerca è stato quello di testare l'effetto di sette oli essenziali (di cui uno a due diverse concentrazioni) nell'inibire la produzione di biofilm da parte di alcuni ceppi di *L.monocytogenes* provenienti da diverse fonti, utilizzando l'analisi spettrofotometrica e la valutazione colorimetrica mediante acquisizione computerizzata dell'immagine.

MATERIALI E METODI

Sono stati usati sei oli essenziali in forma liquida (esaneale, 2-(*E*)-esenale, carvacrolo, limonene, cedro, arancia rossa) ed uno, il timolo, in forma di cristalli. Tutti gli oli sono stati ottenuti da estrazione in laboratorio dai rispettivi vegetali. Al momento dell'analisi, gli oli liquidi sono stati direttamente aggiunti ad un brodo di coltura (BHI) mentre il timolo è stato preventivamente sciolto in etanolo e poi addizionato. Ogni ceppo di *L. monocytogenes* (alimentare, umana/ospedaliera e di coltura di collezione/NCTC) testato è stato inoculato in micro piastre ad una concentrazione finale di 10² UFC/ml per ogni pozzetto. Nella prima fase della sperimentazione, l'attività inibente la formazione del biofilm, è stata valutata su 54 ceppi bersaglio utilizzando micropiastre a fondo piatto della capacità di 2 ml e applicando due metodi di rilevazione uno spettrofoto-

metrico e l'altro colorimetrico. Per ogni olio essenziale testato, oltre ai pozzetti contenenti la miscela brodo-olio essenziale-microrganismo, sono stati preparati dei pozzetti contenenti: a) solo brodo; b) brodo-olio essenziale, allo scopo di valutare anche la produzione biofilm nel brodo tal quale. Nel caso del timolo, per valutare preventivamente l'eventuale effetto inibente sulla crescita dovuto all'alcool utilizzato per sciogliere i cristalli, ciascun ceppo è stato inoculato in BHI contenente 0.15% di etanolo al 70%, corrispondente alla massima concentrazione utilizzata durante la prova. Nessun ceppo ne è risultato inibito. Durante la prima fase, la crescita batterica è stata valutata considerando la torbidità del brodo, valutata contro un brodo non inoculato a 600 nm, dopo incubazione per 48 ore a 37°C. In seguito, dopo aver prelevato il brodo da ciascun pozzetto senza toccare il fondo, le piastre sono state lavate con acqua sterile, quindi capovolte e lasciate asciugare a temperatura ambiente prima di effettuare la colorazione aggiungendo in ogni pozzetto 100/200 µl di safranina (Merck, Milano, Italia) 0.1% (w/v); sono stati eseguiti controlli negativi e positivi. La seconda fase del lavoro è stata focalizzata su 7 dei 54 ceppi testati, scelti in base alla loro capacità di produrre biofilm, valutata nella fase precedente. Due ceppi sono risultati deboli produttori, tre medi e due fortemente produttori. Infine, su tali ceppi, è stata studiata nel tempo l'attività degli oli essenziali, utilizzando un sistema miniaturizzato in micropiastre con fondo ad U del volume di 200 µl, procedendo alla valutazione con rilevazione spettrofotometrica della produzione/abbattimento del biofilm ogni 24 ore per sette giorni.

RISULTATI

Per quanto riguarda la prima fase dello studio, dei 54 ceppi di *L. monocytogenes* analizzati, tutti tranne quattro (7.4%) sono risultati produttori di biofilm nel brodo tal quale (Tabella n.1). Inoltre, per i ceppi produttori è stata effettuata un'ulteriore divisione tra ceppi debolmente, mediamente e fortemente produttori, individuando dei valori limite di cromia (saturazione del colore) per queste classi come segue: deboli a $8,13 < C^* < 12,54$; medi a $12,58 < C^* < 17,34$; forti a $17,35 < C^* < 22,12$. Dall'osservazione dei dati si nota come tutti i tipi di oli abbiano influenzato, la formazione del biofilm. Solo il 2% dei ceppi testati non è stato inibito da alcun olio. Guardando i valori in dettaglio, il carvacrolo ed il cedro, unitamente all'esanale, sono stati gli oli con maggior effetto, in grado di abbattere del tutto la

formazione di biofilm nel 60% dei ceppi testati. L'olio d'arancia rossa, il 2-(*E*)-esenale (150ppm) ed il timolo hanno dimostrato un'azione di totale abbattimento della produzione in un numero di ceppi pari al 30%, mentre il 2-(*E*)-esenale (20ppm) ed il limonene sono stati i due oli con il minor effetto, sortendo una totale inibizione della produzione del biofilm solo per il 18% dei ceppi studiati. Inoltre, il 2-(*E*)-esenale (20ppm) ed il 2-(*E*)-esenale (150ppm), unitamente al timolo, hanno dimostrato di poter parzialmente abbattere la produzione di biofilm nel 52% dei casi. L'arancia cedro rossa ha dimostrato un effetto inibente sul 48% dei ceppi considerati, l'esanale sul 40%, il limonene sul 38%, il timolo sul 34% ed il carvacrolo sul 32%. Considerando invece gli incrementi nella produzione di biofilm, il limonene è risultato il più coinvolto, con una percentuale pari al 44% dei ceppi testati, seguito dal 2-(*E*)-esenale (20ppm) (26%), dall'arancia rossa (20%), dal timolo (18%), dal 2-(*E*)-esenale (150ppm) (14%), carvacrolo (8%) e cedro (6%). L'esanale è risultato essere l'unico olio a non determinare un incremento della produzione. Arancia rossa, carvacrolo, cedro e limonene, al contrario, hanno determinato una qualche modificazione nella capacità del ceppo di produrre biofilm, per tutti i ceppi testati.

La seconda fase dello studio ha considerato 7 (due debolmente produttori, tre mediamente e due fortemente produttori) dei 54 ceppi originari, scelti in base alla loro capacità di produrre biofilm, valutata nella fase precedente (grafico n.1 e n.2). Ogni ceppo sembrerebbe essere inibito in modo diverso dagli oli essenziali testati (grafico n.3). Il timolo è risultato quello di minor efficacia nell'abbattimento ed addirittura, considerando due ceppi debolmente produttori (denominati 3S e 69) sembrerebbe aver sortito un effetto stimolante sulla produzione: infatti, dal terzo giorno la quantità di biofilm prodotta aumenta notevolmente in presenza del timolo, fino ad arrivare ad un aumento, rispettivamente per i due ceppi, del 188% e del 238% rispetto al controllo senza olio essenziale. L'olio essenziale di maggior efficacia nell'abbattimento, è stato invece il 2-(*E*)-esenale alla concentrazione di 150 ppm (ceppo 1140 a 6 giorni, 60% di abbattimento ottenuto). Anche nel caso del 2-(*E*)-esenale però, dobbiamo sottolineare che l'effetto di questo olio è stato diverso, sia in funzione dei diversi ceppi, sia del tempo che della concentrazione utilizzata. Confrontando infatti il ceppo LMV7 con il ceppo 1140, si è visto che per LMV7 ha avuto maggior effetto inibente il 2-(*E*)-esenale a 20 ppm, mentre per il ceppo 1140 è stato il 2-(*E*)-esenale a 150 ppm a sortire il miglior risultato. Ogni altro

ceppo ha dimostrato un andamento nuovamente diverso, rendendo impossibile stabilire una regola generale di effetto valida per tutti i ceppi analizzati. Cosa che è stata evidenziata anche osservando quanto successo durante i primi due giorni d'analisi a tre dei casi studiati (ceppo LMV7, ceppo 19S e 26S), per i quali si è registrato un aumento generale del biofilm in presenza di quasi tutti gli

oli. Solo il timolo, per il ceppo 26S, sembra aver sortito un effetto d'abbattimento del 2,4% e del 9,8% rispettivamente durante il primo ed il secondo giorno di studio, mentre per il ceppo 19S, l'olio essenziale di arancia rossa e il 2-(*E*)-esenale alla concentrazione di 20 ppm hanno determinato un abbattimento del 5,3% e del 3,9%, rispettivamente, ma solo durante il primo giorno di studio.

Tabella n. 1: Abbattimento % del biofilm dei ceppi considerati produttori, rilevato in presenza dei diversi oli testati mediante analisi spettrofotometrica, nella I fase del lavoro.

Ceppo	Sierotipo	%(abb) con A 300 ppm	%(abb) con C 0.1%	%(abb) con CE 300 ppm	%(abb) con (E)-2-E 20ppm	%(abb) con (E)-2-E 150ppm	%(abb) con E 150 ppm	%(abb) con L 0.01%
79	65,4*	72,2	19,0	15,2	55,1	74,1	39,9	65,4
NCTC 4b	74,3	73,6	45,5	36,5	66,7	87,2	54,5	53,8
L.MONO NCTC 3b	77,1	75,2	65,3	85,9	92,4	83,2	74,0	64,1
L.MONO 3b	4,2	63,1	28,9	24,3	59,3	-6,1	-20,2	74,9
L.MONO 4b	62,5	75,1	70,6	-1,3	75,1	68,3	75,7	87,7
8S	-62,3	-80,4	-50,4	-3,8	1,9	-5,0	-41,5	6,2
10S	65,0	50,4	52,9	42,1	66,4	51,4	36,8	62,5
26S	22,3	26,3	45,0	-34,2	61,5	20,9	-28,4	48,2
25S	7,8	57,8	24,0	31,8	57,0	82,2	14,3	6,2
24S	59,2	73,8	72,3	63,5	62,4	68,4	-0,4	58,2
22S	82,8	44,3	85,7	55,3	55,7	89,7	60,4	7,3
L.MONO SCOTT A	70,6	85,2	71,3	91,7	76,2	89,2	71,4	75,2
L.M. OHIO	61,5	83,7	85,3	76,7	74,0	85,3	87,0	84,4
L.SCOTT LAB	85,5	88,4	90,7	86,1	84,9	88,9	85,2	83,4
LMV 7	47,0	84,7	-6,8	18,7	43,3	56,0	-11,3	47,3
NCTC 1/2c	73,7	52,6	63,3	43,2	82,9	81,4	64,1	64,6
NCTC 1/2a	56,5	61,6	60,2	28,1	67,0	72,9	43,9	60,9
L.MONO SCOTT	15,0	53,1	66,7	62,1	2,8	65,3	16,4	1,7
60	80,9	79,8	88,0	86,0	86,2	85,3	88,3	68,1

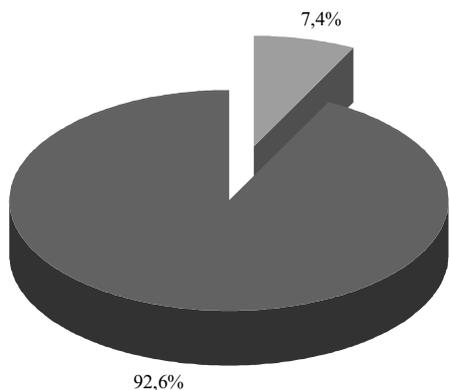


Grafico n.1: Suddivisione dei ceppi di *L. monocytogenes* in base alla capacità di produrre, o meno, biofilm in brodo tal quale. Ceppi non produttori di biofilm (7,4%); ceppi produttori di biofilm (92,6%). Le percentuali sono riferite al totale dei ceppi testati.

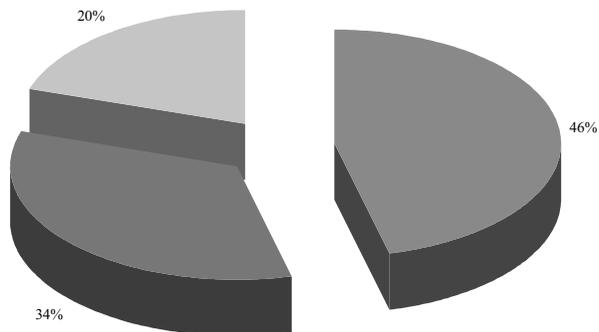


Grafico n.2: Ceppi produttori di biofilm suddivisi in base alla minor o maggior capacità di produzione: valori percentuali per ceppi debolmente produttori (46%), mediamente produttori (20%) e fortemente produttori (34%) di biofilm.

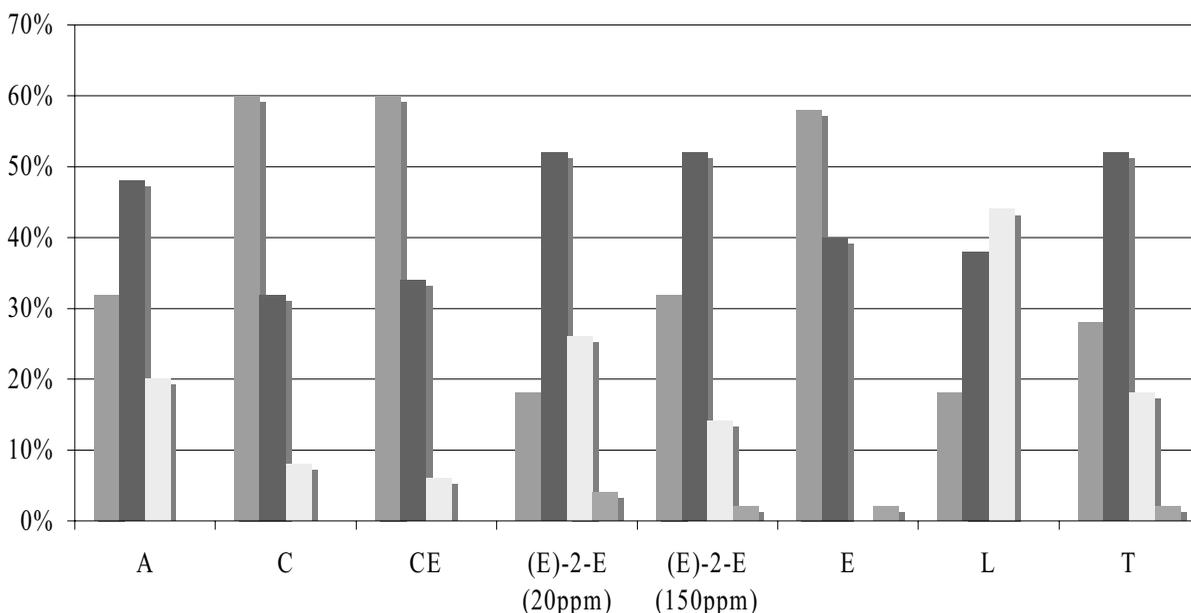


Grafico n.3: Visione d'insieme dell'azione dei diversi oli sui ceppi di *L. monocytogenes* ritenuti produttori di biofilm. A: olio essenziale d'arancia rossa (300 ppm); C: carvacolo (0,01%); CE: olio essenziale di cedro (300 ppm); (E)-2-E: (E)-2-esanale (20 e 150 ppm); E: esanale (150 ppm); L: limonene (0,01%); T: timolo (0,01%). In serie, da sinistra a destra: la prima colonna, indica la percentuale dei ceppi il cui biofilm è stato completamente abbattuto; la seconda colonna indica le percentuali dei ceppi il cui biofilm è stato abbattuto ma non completamente; la terza colonna indica le percentuali dei ceppi per i quali si è verificato un incremento della produzione del biofilm; la quarta colonna (quando presente) indica le percentuali dei ceppi la cui formazione di biofilm non è stata influenzata dalla presenza dell'olio.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti è emerso che tutti gli oli testati hanno in qualche modo avuto un effetto sull'inibizione o sul rallentamento della produzione del biofilm. Tale inibizione è però molto variabile ed influenzata da diversi fattori quali il ceppo testato, il metodo d'analisi utilizzato, l'olio essenziale e la sua concentrazione, oltre che il tempo di contatto, come confermato anche da altri studi (1). L'efficacia dell'olio essenziale è altamente variabile e strettamente legata all'età e al momento del contatto con i microrganismi o con il biofilm. Infatti, benché sia cosa assodata che la struttura dei biofilm aumenti la resistenza dei microrganismi agli agenti esterni, è riportato come la produzione di biofilm da parte di *Staphylococcus warneri*, possa essere inibita da concentrazioni di PT (PolytoxinolTM) 32 volte inferiori alla concentrazione richiesta per inibire la crescita delle sue stesse cellule planctoniche (1). Di conseguenza spesso l'efficacia degli oli essenziali non può essere standardizzata, né quantificata con precisione. Le variabili citate comportano che spesso esperimenti, ripetuti nelle medesime condizioni, possano giungere a risultati diversi. Inoltre, dai dati della letteratura emerge come ci sia un certo conflitto tra gli autori anche riguardo la determinazione delle concentrazioni minime inibenti o realmente efficaci degli oli essenziali. Non sembra, infatti, esistere una specifica concentrazione minima inibente (CMI) di un olio essenziale, per biofilm prodotti da ogni microrganismo; anzi, più spesso uno stesso autore indica diverse concentrazioni minime inibenti nei confronti di una singola specie o addirittura vengono riportate concentrazioni con valori molto distanti l'uno dall'altro (1,2,4). Alcuni autori affermano inoltre, come per impedire la produzione di biofilm da parte, per esempio, di stafilococchi coagulasi negativi occorra utilizzare concentrazioni di olio (miscela composta da estratti di *Eucalyptus globulus*, *Melaleuca alternifolia*, *Thymus sp.*, *Syzygium aromaticum* e specie diverse di agrumi) variabili e comprese tra 0,6 a 20.000 ppm. (1). Del resto anche nel nostro caso, abbiamo visto che le due concentrazioni di 2-(E)-esenale utilizzate (20 ppm e 150 ppm) hanno avuto un'efficacia variabile e strettamente dipendente dal ceppo testato, confermando la variabilità della resistenza, non solo delle diverse specie, ma addirittura dei differenti ceppi all'interno della stessa specie, come riportato anche in letteratura. Delle due diverse concentrazioni utilizzate, sicuramente è risultata più efficace quella a 150 ppm, determinando un'inibizione totale della produzione del biofilm nel 32% dei ceppi testati, contro il 18% dei

ceppi inibiti totalmente dalla concentrazione a 20 ppm. Al contrario, il numero di ceppi, il cui biofilm è stato inibito solo in parte, risulta uguale alle due diverse concentrazioni. Per quanto riguarda gli altri oli testati, è emerso come l'olio essenziale di cedro a 300 ppm, il carvacrolo allo 0,01% e l'esenale a 150 ppm sembrano aver sortito il maggior effetto; infatti, l'inibizione totale del biofilm è stata efficace sul 60% dei ceppi, con i primi due oli, e sul 58% dei ceppi con l'esenale.

Infine, bisogna tenere presente che le concentrazioni di oli essenziali utilizzate nel presente studio, sono state scelte in modo da non influire sulle proprietà organolettiche dell'alimento potenzialmente trattato. Una dose eccessiva potrebbe infatti essere percepita dal consumatore come un *off-flavour* del prodotto o come un qualcosa che non gli appartiene. Del resto è stato già ampiamente dimostrato (2) come l'efficacia di numerosi sostanze nell'abbattimento del biofilm e/o dell'attività di *Listeria*, obbligasse all'impiego di concentrazioni e tipologie di oli essenziali tali da essere generalmente improponibili *in vivo*, proprio perché portavano all'adulterazione sensoriale del prodotto.

In conclusione, possiamo affermare che gli oli essenziali e loro componenti, possiedono sicuramente un'azione inibente la formazione del biofilm, ma non è possibile, alla luce dei dati ottenuti, stabilire una concentrazione di ogni olio valida, allo stesso modo, per tutti i ceppi testati. Questi, infatti, hanno mostrato resistenze diverse e non correlabili neanche al sierotipo. È presumibile che l'efficacia degli oli essenziali nell'alimento, sia influenzata da numerosi fattori ed in particolare, la solubilità degli oli nella frazione grassa, la maggior protezione dovuta all'ambiente più complesso, il tipo di confezionamento (che può influire sulla volatilità dell'olio) nonché la presenza di un ecosistema microbico e non di un'unica specie.

BIBLIOGRAFIA

- 1) AL-Shuneigat, J., Cox, S.D., Markham, J.L. (2005) Effects of a topical essential oil-containing formulation on biofilm-forming coagulase-negative staphylococci. *Letters in Applied Microbiology*, 41, 52-55.
- 2) Aureli, P., Costantini, A., Zolea, S. (1992) Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria*. *Journal of Food Protection*, 55, 344-348.
- 3) Beresford, M.R., Andrew, P.W., Shama, G. (2001) *Listeria monocytogenes* adheres to many material found in food-processing environments. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 1000-1005.
- 4) Borucki, M.K., Peppin, J.D., White, D., Lodge, F., Call, D.R. (2003) Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 7336-7342.
- 5) Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- 6) Chae, M.S., Schraft, H. (2000) Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 103-111.
- 7) Comi, G., Frigerio, R., Cantoni, C. (1992) *Listeria monocytogenes* serotypes in Italian meat products. *Letters in Applied Microbiology*, 15, 168-171.
- 8) Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Debeer, D., Caldwell, D., Korber, D., James, G. (1994) Biofilm, the customized microniche. *Journal of Bacteriology*, 176, 2137-2142.
- 9) Delaquis, P.J., Kareen, S., Girare, B., Mazza, G. (2002) Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 101-109.
- 10) Dorman, H.J.D., Deans, S.G. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308-316.
- 11) Elgayar, M., Draughon, F.A., Golden, D.A., Mount, J.R. (2001) Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection*, 64, 1019-1024.

Lavoro finanziato con fondi PRIN/2005 - Titolo del programma di ricerca - **IMPIEGO DI SOSTANZE DI AROMA DI ORIGINE VEGETALE PER IL MIGLIORAMENTO DELLA QUALITA' MICROBIOLOGICA DEI PRODOTTI ALIMENTARI** - Influenza di olii essenziali sulla crescita, capacità filmogena ed espressione dei geni coinvolti nel processo di formazione del biofilm microbico in *Listeria monocytogenes*.