



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea
Scienze Biologiche

Ruolo degli oli essenziali nel prevenire infezioni alimentari da ceppi enteropatogeni di Escherichia coli

The role of essential oils against pathogenic Escherichia coli in food products

Tesi di Laurea di:

Pizzuti Giulia

Docente Referente
Chiar.mo Prof.

Vignaroli Carla

Sessione Autunnale –Dicembre 2020

Anno Accademico 2019/2020

The role of essential oils against pathogenic *Escherichia coli* in food products

Paulo E.S. Munekata, Mirian Pateiro , David Rodríguez-Lázaro, Rubén Domínguez,

Jian Zhong and Jose M. Lorenzo

Microorganisms 2020, 8, 924; doi:10.3390/microorganisms8060924

RIASSUNTO

Le infezioni di origine alimentare rappresentano un'importante problema di salute pubblica e la principale preoccupazione delle industrie alimentari.

Infatti i grandi cambiamenti che hanno interessato negli anni il settore alimentare, caratterizzato non più da uno stretto rapporto tra produzione e consumo, ma nel quale gioca un ruolo fondamentale la conservazione degli alimenti, pongono oggi nuove sfide per garantire la sicurezza alimentare.

Nel corso della produzione, trasformazione, trasporto e conservazione degli alimenti, i microrganismi che li contaminano, siano essi naturalmente presenti o provenienti dall'ambiente esterno, possono crescere, moltiplicarsi ed avere severe implicazioni per la salute pubblica.

La richiesta sempre maggiore di prodotti naturali ha portato allo studio dell'efficacia di olii essenziali come agenti antimicrobici usati come additivi naturali; in particolar modo molti di questi studi hanno rivelato l'efficacia contro la proliferazione e la produzione di tossine da parte di ceppi patogeni di *Escherichia coli*, in grado di contaminare diversi tipi di alimenti: ortaggi, carne, pesce, latte e prodotti da loro derivati.

Ad oggi le strategie maggiormente utilizzate dalle industrie alimentari, che hanno dato ottimi risultati nel ridurre la carica microbica (soprattutto di *E. coli*) nell'alimento, prevedono l'aggiunta diretta degli olii essenziali all'alimento, l'incorporazione degli olii alle pellicole di rivestimento ed alle soluzioni per la lavorazione di diversi prodotti alimentari.

Patogenicità di *Escherichia coli*

Escherichia coli appartiene all'ampia famiglia delle *Enterobacteriaceae*, batteri gram-negativi, anaerobi facoltativi; Il suo habitat naturale è l'intestino umano e animale dove è un comune commensale, ad eccezione di alcuni ceppi patogeni intestinali quali ad esempio: enteropatogeni (EPEC), produttori di tossine Shiga (STEC, conosciuti anche come enteremorragici EHEC), enteroinvasivi (EIEC) ed altri.

I sintomi comuni associati all'ingestione di cibo contaminato da ceppi enteropatogeni di *Escherichia coli* variano dai più lievi quali: diarrea persistente, dolori addominali e vomito, ai più severi: sindrome emolitica uremica, malattie renali all'ultimo stadio e coliti emorragiche. Questi sintomi possono essere causati e talvolta aggravati da fattori di virulenza dell'enteropatogeno stesso, come:

- **adesine** specializzate, le quali permettono al batterio di permanere nel tratto gastroenterico o nelle vie urinarie es: intimina, piliP e fimbrie di adesione
- **esotossine** quali:
 - Tossine Shiga: Stx- I e Stx-2;
 - Tossine termostabili (STa e STb);
 - Tossine termolabili LT-I e LT-II;
 - Emolisina HlyA

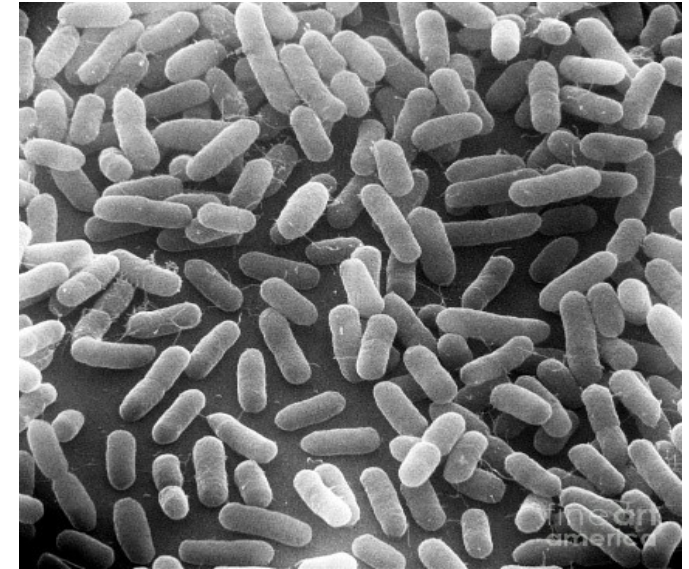


Immagine al microscopio elettronico a scansione (ingrandimento X 24.000).

Fonte: www.microbiologiaitalia.it

Composizione e attività antimicrobica degli oli essenziali

Al fine di migliorare la sicurezza microbiologica degli alimenti, le industrie alimentari usano composti antimicrobici; tuttavia restrizioni nell'uso di questi composti derivano dai potenziali rischi per la salute.

L'utilizzo di composti alternativi è il maggior argomento di ricerca e sviluppo nell'area alimentare.

Gli oli essenziali (EO) sono miscele complesse, le cui proprietà naturali derivano dalla presenza di metaboliti secondari, piccole molecole bioattive dotate di attività farmacologiche, antimicrobiche, antiossidanti e aromatizzanti ad ampio spettro d'azione. La comprovata efficacia di tali proprietà e la loro vasta portata applicativa conferiscono agli oli essenziali lo status privilegiato di Generally Recognized As Safe (GRAS); Essenzialmente essi sono composti da: terpeni, sesquiterpeni, fenoli, lattoni, esteri, alcoli ed altre molecole idrofile e lipofile, nonché solubili e volatili; queste specifiche caratteristiche sono importanti poiché determinano l'azione antimicrobica degli oli stessi.

Timo, origano, chiodi di garofano, cannella, carvacolo, zenzero ed eugenolo sono esempi di EO, i cui componenti principali sono considerati come GRAS.

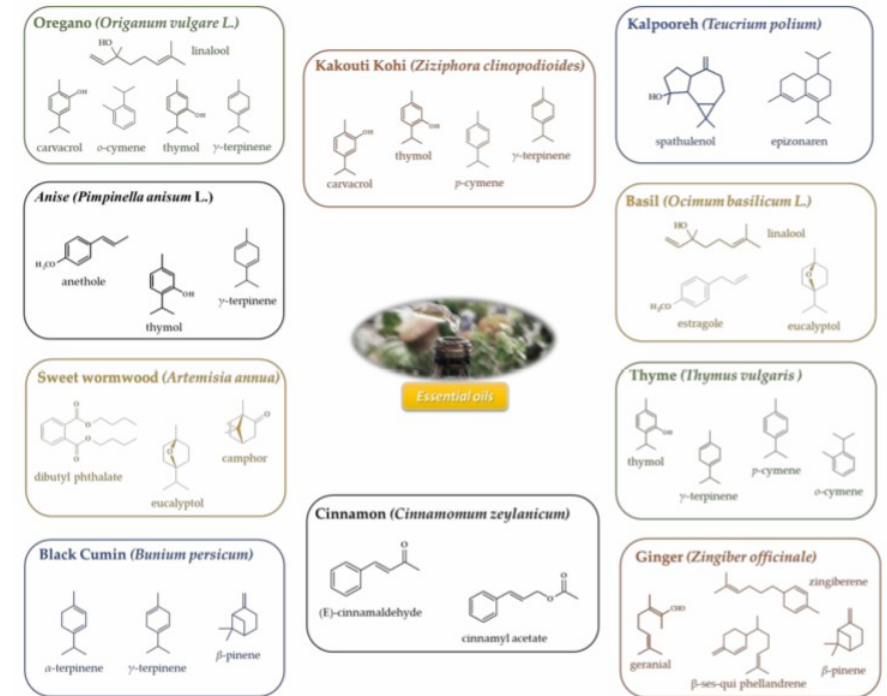


Figure 1. Selected essential oils (Eos) and their main components.

Fonte: *The Role of Essential Oils against Pathogenic Escherichia coli in Food Products*, Munekata et al. 2020; doi:10.3390/microorganisms8060924

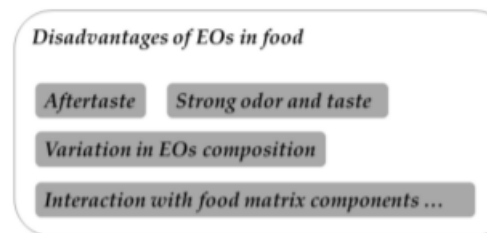


Figure 2. Disadvantages of Eos on food

Fonte: *The Role of Essential Oils against Pathogenic Escherichia coli in Food Products*, Munekata et al. 2020; doi:10.3390/microorganisms8060924

Attività antimicrobica degli olii essenziali

Gli olii essenziali agiscono su *Escherichia coli* influenzando:

L'espressione genica relativa alla patogenicità

Table 1. Influence of EOs on the expression of genes related to virulence (in vitro) on *E. coli*.

EO (Dosage)	Tested Genes	Effect	Ref.
Oregano and carvacrol, free form (both at 0.05 and 0.08 µL/mL)	<i>ler</i> , <i>stx2B</i> , and <i>luxS</i>	Down-regulation of all tested genes in a concentration-dependent manner for both oregano EO and carvacrol.	[33]
Cinnamon, free form (0.25, 0.50, 0.75 and 1 MIC) <i>Zataria multiflora</i> , free and nanoliposomes (25, 50 and 75 of MIC)	<i>hfq</i> , <i>luxS</i> , <i>qseB</i> , <i>qseC</i> , and <i>stx2</i> <i>stx2A</i>	Down-regulation of <i>hfq</i> , <i>luxS</i> , <i>qseB</i> , <i>qseC</i> , and <i>stx2</i> . Down-regulation of <i>stx2A</i> expression at 50 and 75% MIC.	[29] [30]
Clove and eugenol, free form (both at 0.005%)	<i>luxS</i> , <i>luxR</i> , <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>ler</i> , <i>espD</i> , <i>escJ</i> , <i>escR</i> , and <i>tir</i>	Down-regulation of genes related to AEL; no effect on <i>stx</i> and quorum-related genes expression. Increased the expression of <i>stx1A</i> and <i>stx2A</i> at 0.03%;	[31]
<i>Carum copticum</i> , free form (0.01–0.04%)	<i>stx1A</i> and <i>stx2A</i>	down-regulation of <i>stx1A</i> and <i>stx2A</i> on ground beef.	[32]

EO: essential oil; MIC: minimum inhibitory concentration; AEL: attaching and effacing lesions; *hfq*: associated with PNPase or PAP I (associated with *stx2* phage development); *luxS*, *luxR*, *qseB* and *qseC*: associated with quorum sensing/cell-to-cell communication for pathogenicity induction; and *ler*, *espD*, *escJ*, *escR*, and *tir*: associated with AEL.

Fonte: *The Role of Essential Oils against Pathogenic Escherichia coli in Food Products*, Munekata et al. 2020; doi:10.3390/microorganisms8060924

La stabilità delle componenti strutturali vitali

Allo scopo di caratterizzare l'effetto battericida degli EO, molti studi hanno riportato che le alterazioni morfologiche nella membrana sono il più importante effetto battericida su *Escherichia coli*.

Utilizzando gli olii essenziali alla concentrazione MIC (minima concentrazione inibente) si assiste a:

1. Alterazioni morfologiche della membrana, perdita della sua integrità e funzionalità
2. Efflusso di componenti intracellulari con conseguente perdita di omeostasi
3. Collasso della superficie e lisi cellulare

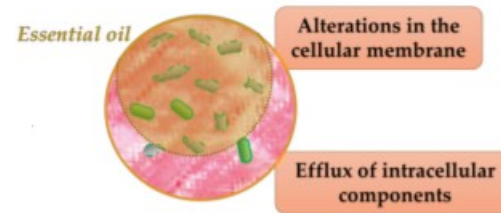


Figure 3. Influence of EOs on pathogenic *E. coli*
Fonte: *The Role of Essential Oils against Pathogenic Escherichia coli in Food Products*, Munekata et al. 2020; doi:10.3390/microorganisms8060924

Il metabolismo cellulare

La perdita di omeostasi dovuta alle alterazioni della membrana cellulare porta alla fuoriuscita dalla cellula di protoni e ioni potassio con un conseguente crollo del potenziale di membrana e l'inibizione della sintesi di ATP.

Lo scompenso nel bilanciamento dei livelli di ATP intra ed extracellulare nonché la riduzione dei livelli di ATP senza rilascio nel mezzo extracellulare, modificano il metabolismo della cellula tanto da provocarne la morte.

Tutto ciò è stato osservato utilizzando diverse strategie per verificare e caratterizzare l'azione specifica di diversi olii essenziali su prodotti quali: carne, pesce, latticini e derivati ed infine ortaggi.

Nei vari studi, sono state utilizzate principalmente tre metodologie che riguardano rispettivamente: l'aggiunta di EO come ingredienti del prodotto stesso o tramite utilizzo diretto su di esso, l'incorporazione di questi in pellicole di rivestimento ed infine l'aggiunta in soluzioni utilizzate per la marinatura della carne, il lavaggio/risciacquo degli ortaggi o direttamente spruzzate sul pesce fresco.

La sicurezza degli olii essenziali e la loro concreta azione inibente su *Escherichia coli* è stata dimostrata ed è di fatto rilevante negli studi citati nelle tabelle seguenti.

Aggiunta ed uso diretto

Food	EO (Dosage) and Strategy	Processing/Storage Conditions	Effect	Ref.
Fresh turkey sausages	<i>Mentha suaveolens</i> EO (2, 5 and 10 mg/g) as additive	48 h at 4 °C	Reduction of 1.2 log CFU/g after 48 h (10 mg/g).	[40]
Beef patties	Clove bud EO (0.3 and 0.5%) as additive	After cooking	Reduction of 0.3 log CFU/g.	[41]
Beef patties	<i>Ziziphora clinopodioides</i> (0.1 and 0.2%) as additive	9 days at 4 °C	Reduction of 5.6 log CFU/g after 7 days.	[42]
Fresh pork sausage	Garlic EO (125 and 250 ppm) and allyl isothiocyanate (125 and 250 ppm) mixture as additive	20 days at 6 °C	Reductions of 0.7 and 1.6 log CFU/g after 20 days.	[43]

Table 2. Influence of essential oils on *E. coli* strains in meat and meat products.

Fonte: *The Role of Essential Oils against Pathogenic Escherichia coli in Food Products*, Munekata et al. 2020; doi:10.3390/microorganisms8060924

Food	EO (Dosage) and Strategy	Processing/Storage Conditions	Effect	Ref.
Skim, 2% reduced-fat, and full fat milk	Thymol (1 and 4.5 g/L) in free and emulsion as additive	50 h at 21 °C	Reduction up to 6 log CFU/mL, effect was dependent of EO and fat milk contents.	[57]
Kishk	<i>Teucrium polium</i> (75 and 150 mg/L) as additive	20 days at 4 °C	Reduction of 0.8 and 1.3 log CFU/g after 20 days.	[58]
Doogh	<i>Ziziphora clinopodioides</i> (0.1 and 0.2%) as additive	9 days at 4 °C	Reduction up to 0.3 log CFU/mL after 3 days.	[59]
Iranian white cheese	<i>Bunium persicum</i> (1 and 2%) as additive	45 days at 4 °C	Reduction of 0.6 log CFU/g.	[60]
Kariesh cheese	Thyme and clove (0.5 and 1.0%) as additive	14 days at 6 °C	Reductions of 1.8 (1%, clove EO) and 6 (1%, thyme EO). log CFU/g after 14 days	[61]

Table 4. Influence of essential oils on pathogenic *E. coli* in milk and dairy products

Fonte: *The Role of Essential Oils against Pathogenic Escherichia coli in Food Products*, Munekata et al. 2020; doi:10.3390/microorganisms8060924

Barley soup	<i>Ziziphora clinopodioides</i> (0.1 and 0.2%) as additive	9 days at 4 °C	Reduction of 1 log CFU/mL after 5 days.	[70]
-------------	--	----------------	---	------

Table 5. Influence of essential oils on pathogenic *E. coli* in vegetables products.

Fonte: *The Role of Essential Oils against Pathogenic Escherichia coli in Food Products*, Munekata et al. 2020; doi:10.3390/microorganisms8060924

Incorporazione degli oli essenziali in pellicole di rivestimento

Ad oggi la strategia di utilizzare oli essenziali incorporati nei materiali usati per avvolgere gli alimenti sembra essere la più efficace nelle varie tipologie di prodotti alimentari, infatti i risultati ottenuti sono notevoli; Tutto ciò è permesso da una caratteristica importante dei componenti degli oli essenziali ovvero l'idrofobicità, la quale permette loro di penetrare all'interno della membrana cellulare incrementandone la permeabilità.

Fresh pork meat	Ginger EO (10–80%, EO:protein in film) microencapsulated in a film	9 days at 4 °C	Reductions from 2 to 6 log CFU/g.	[49]
Fresh pork meat	Mexican oregano and basil EOs mixture (4:11; 1.2 mg mixture/cm ²) microencapsulated in a coating layer	28 days at 4 °C	Reduction of 5.7 log CFU/cm ² after 28 days.	[50]

Table 2. Influence of essential oils on E. coli strains in meat and meat products
Fonte: *The Role of Essential Oils against Pathogenic Escherichia coli in Food Products*, Munekata et al. 2020; doi:10.3390/microorganisms8060924

Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) fillet	<i>Zataria multiflora</i> and <i>Bunium persicum</i> (0.5 and 1%) in a coating layer	12 days at 4 °C	Reductions up to 1 log CFU/g	[54]
Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) fillet	<i>Zataria multiflora</i> Boiss (0.5 and 1%) in a coating layer	16 days at 4 °C	Reductions around 1.3 log CFU/g	[55]
Silver carp (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>) fillet	Clove (1 and 1.5 %) in a coating layer	16 days at 4 °C	Reduction between 3 (1%) and 5 log (1.5%) CFU/g	[56]

Table 3. Influence of essential oils on E. coli strains in fish.
Fonte: *The Role of Essential Oils against Pathogenic Escherichia coli in Food Products*, Munekata et al. 2020; doi:10.3390/microorganisms8060924

Cherry tomato	<i>Artemisia annua</i> in nanoliposomes coating layer and film (2 mg/mL)	10 days at 25 and 37 °C	Reduction between 3 and 4 log CFU/g.	[71]
Green beans	Carvacrol nanoemulsion (0.05%) in a coating layer	13 days at 4 °C	Count below detectable level after 11 days.	[72]

Table 5. Influence of essential oils on pathogenic E. coli in vegetables products.
Fonte: *The Role of Essential Oils against Pathogenic Escherichia coli in Food Products*, Munekata et al. 2020; doi:10.3390/microorganisms8060924

Kashar cheese	Thyme and clove (1.5%) in coating layer	60 days at 4 °C	Reduction up to 2 log CFU/g after 60 days of storage.	[62]
Kashar cheese	Ginger (1.5%) in coating layer	30 days at 4 °C	Reduction of 4.2 log CFU/g after 30 days of storage.	[63]

Table 4. Influence of essential oils on pathogenic E. coli in milk and dairy products
Fonte: *The Role of Essential Oils against Pathogenic Escherichia coli in Food Products*, Munekata et al. 2020; doi:10.3390/microorganisms8060924

Aggiunta in soluzioni per la marinatura, per il lavaggio/risciacquo e altri usi

L'utilizzo di questa strategia ha avuto, per il momento, risultati variabili, tuttavia in particolar modo per gli ortaggi è stato osservato che l'utilizzo di soluzioni di lavaggio/risciacquo contenenti oli essenziali permette di inibire la crescita di *Escherichia coli* durante tutto il periodo di conservazione.

In ogni caso la presenza di miscele di componenti di oli essenziali hanno mostrato una maggiore riduzione nella conta di *Escherichia coli* rispetto all'utilizzo di un unico componente.

Food	EO (Dosage) and Strategy	Processing/Storage Conditions	Effect	Ref.
Broccoli and radish seeds	Carvacrol emulsion (4000 or 8000 ppm) in washing solution	30 and 60 min at room temperature	Reduction up to 3.4 log CFU/g (8000 ppm, 60 min); no effect on broccoli seeds.	[64]
Basil leaves	Cinnamon bark and leaf in (0.25%) free and emulsion in washing solution	3 min at room temperature	Reduction of 2.7 log CFU/mL in concentration-dependent manner.	[65]
Lettuce leaves	Oregano (0.010, 0.014, 0.018, 0.022, and 0.025%) in washing solution with ultrasound	Washing on continuous (5 min) or pulsed (2 s on/8 s off for 25 min) mode for ultrasound	Reduction was concentration-dependent was intensified when combined with ultrasound.	[66]
Kale leaves	Cinnamon leaf (50 ppm) in washing solution	3 min at room temperature	Reduction of 0.6 log CFU/g.	[67]
Redbor kale, Chinese cabbage, and green mustard	Geranium (0.1%) in free and emulsion in washing solution	Washing for 3 min at room temperature and storage for 7 days at 4 °C	Reduction around 0.7 log CFU/g for all vegetables after washing; reduction of 1.8 log CFU/g after 7 days on emulsified geranium EO on redbor kale.	[68]

Table 5. Influence of essential oils on pathogenic *E. coli* in vegetables products.

Fonte: *The Role of Essential Oils against Pathogenic Escherichia coli in Food Products*, Munekata et al. 2020; doi:10.3390/microorganisms8060924

Food	EO (Dosage) and Strategy	Processing/Storage Conditions	Effect	Ref.
Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) fillet	Oregano and thyme (0.2%) sprayed in the surface	4 days at 4 °C	Reductions up to 1.2 log CFU/g	[51]
Carp (<i>Cyprinus carpio</i>) flesh fingers	Rosemary, cinnamon, fennel, and cardamom (10 mL/kg)	14 days at 4 °C	Reduction by up to 1 log CFU/g	[52]
Kachlan (<i>Trachinotus ovatus</i> , Linnaeus) fillet	<i>Pulicaria inuloides</i> (0.1–0.3 g/100 g) in dipping solution	12 days at 10 °C	Reductions up to 1 log CFU/g	[53]

Table 3. Influence of essential oils on *E. coli* strains in fish

Fonte: *The Role of Essential Oils against Pathogenic Escherichia coli in Food Products*, Munekata et al. 2020; doi:10.3390/microorganisms8060924

Food	EO (Dosage) and Strategy	Processing/Storage Conditions	Effect	Ref.
Chicken pâté	Oregano EO (0.6 and 12 g/kg) nanoemulsion as additive	8 days at 4 °C	Reduction up to 1.5 log CFU/g after 3 days.	[45]
Fresh chicken breast fillets	Thymol and carvacrol mixture (1:1; 0.4 and 0.8%) in marinating solution	21 days at 4 °C	Reduction up to 0.8 log CFU/g after 21 days.	[46]

Table 2. Influence of essential oils on *E. coli* strains in meat and meat products

Fonte: *The Role of Essential Oils against Pathogenic Escherichia coli in Food Products*, Munekata et al. 2020; doi:10.3390/microorganisms8060924

Conclusioni

L'uso di olii essenziali è una strategia interessante che può essere vista come un'ulteriore barriera contro la contaminazione del cibo da parte di organismi potenzialmente patogeni quali *Escherichia coli*; Il loro effetto antimicrobico permette non solo di abbassare drasticamente la carica batterica all'interno di alimenti quali: ortaggi, carne, pesce e derivati, ma di aumentare la sicurezza alimentare andando ad inibire la produzione di tossine e di altri fattori di virulenza responsabili della patogenicità dei microrganismi e degli effetti che questi hanno sulla salute pubblica.

La reperibilità e le strategie di utilizzo di questi composti sono semplici e con costi contenuti, tra le principali ricordiamo: l'uso diretto, l'incorporazione in strati di rivestimento e in soluzioni utili alla lavorazione del prodotto, ma permettono comunque di raggiungere risultati rilevanti nell'industria alimentare.

Tuttavia altri studi sono necessari per valutare sia gli aspetti regolatori riguardanti i limiti di utilizzo, sia l'efficacia e la sicurezza dell'impatto degli olii essenziali per l'uomo, gli animali e per l'ambiente, nonché le possibili integrazioni con le terapie convenzionali ai fini della tutela della Salute Pubblica.