

Évaluation *in vitro* des effets de différents acides organiques sur trois sérovars de *Salmonella enterica* d'origine porcine

Aurélia-Anne SÉON, Carlos SIMÕES NUNES

DSM NUTRITIONAL PRODUCTS FRANCE, Centre de Recherche en Nutrition et Santé Animale (C.R.N.A.),
BP 170, 68305 Saint Louis cedex, France

aurelia.seon@dsm.com

Avec la collaboration technique de Cathleen Lesmale, Angélique Gorlier et Stéphane Barba Duarte

In vitro evaluation of the effects of different organic acids on three serovars of *Salmonella enterica* from pig origin

The purpose of this study was to investigate comparatively the antibacterial activity of several organic acids against the serovars Typhimurium, Derby and Enteritidis of pig *Salmonella enterica subsp enterica*. The acids tested were: benzoic, sorbic, formic, butyric, acetic, succinic, lactic, citric, propionic and fumaric. A micro-broth dilution assay was used to evaluate the antimicrobial activity of the acids. With the exception of lactic acid, the minimal concentration inhibiting 99% of bacterial growth (MIC₉₉) of each of the *Salmonella* tested was the same for all the organic acids : 25 mmol/l. In this *in vitro* assay, MIC₉₉ could not distinguish the acids, while the antimicrobial activities were different. When using high concentrations of the acids it appeared that propionic, butyric, acetic and formic acids were notably less effective against the three serovars. The MIC₅₀ determination showed that, in general, sorbic, benzoic and citric acids were the most active compounds against *Salmonella enterica*. Lactic acid had a weak antimicrobial activity against *Salmonella* Enteritidis and was not active against the other two serovars. Fumaric and succinic acids had MIC₅₀ two-fold smaller than the strongest acid. Studies on growth retardation confirmed that benzoic acid had the most pronounced inhibitory effect. It was followed closely by sorbic and citric acids. Succinic, fumaric and butyric acids showed a weaker effect on growth retardation. The potential utilisation *in vivo* of some of these acids, and more specifically benzoic, sorbic and citric acids as one the ways to reduce the *Salmonella* load in the pig should be tested.

INTRODUCTION

L'incidence des salmonelloses et la contamination de la viande de porc par *Salmonella* spp sont devenues des préoccupations grandissantes. L'emploi des acides organiques en élevage porcin croit chaque année. Certains permettent des performances remarquables surtout chez le porcelet en post-sevrage (Guggenbuhl et al., 2007). Les effets de ces acides sur la population de *Salmonella* d'origine spécifiquement porcine sont cependant relativement peu connus. Afin de comparer l'efficacité de différents acides, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des acides propionique, butyrique, sorbique, acétique, succinique, benzoïque, lactique, formique, citrique et fumarique ont été évaluées *in vitro* pour les sérovars Typhimurium, Derby et Enteritidis de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* d'origine porcine. Ces sérovars sont souvent retrouvés dans les problèmes infectieux dans le circuit de la chaîne alimentaire. Ces déterminations ont été complétées par l'évaluation des retards de croissance bactérienne induits par les acides et leurs sels respectifs.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Des tests antibactériens liquides ont été réalisés sur des suspensions bactériennes en phase exponentielle de croissance diluées pour obtenir une concentration de l'ordre de 10⁵ UFC/ml. 150µl de chaque solution ont été dispersés dans les puits d'une plaque de micro-titration avec 150µL de suspension. La lecture de la plaque a été faite régulièrement à 595nm pendant l'incubation à 37°C. Cette lecture a permis de quantifier les CMI₅₀ et CMI₉₉ ainsi que le retard de croissance. Celui-ci correspond au temps d'incubation de la bactérie nécessaire pour visualiser une différence de la densité optique de 0,1. Toutes les évaluations ont eu une durée de 24 heures et ont été réalisées en double exemplaire.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Chaque acide n'a pas eu le même effet acidifiant. Les concentrations les plus élevées des acides citrique, fumarique et succinique ont davantage diminué le pH du milieu.

Tableau 1- CMI des différents acides organiques contre la croissance de trois *Salmonella* spp

Salmonella		Typhimurium					Derby			Enteritidis		
		CMI ₉₉			CMI ₅₀		CMI ₉₉	CMI ₅₀		CMI ₉₉	CMI ₅₀	
		mM	mg/ml	pH	mM	pH		mM	mM		pH	mM
pKa												
Propionique	4,87	25	1,85	5,48	13<<25	5,48	25	13<<25	5,48	25	13<<25	5,48
Butyrique	4,78	25	2,20	5,49	13<<25	5,49	25	13<<25	5,49	25	13<<25	5,49
Sorbique	4,76	>11	>1,25	<6,4	3<<6	6,76	>11	3<<6	6,76	>11	3<<6	6,76
Acétique	4,74	25	1,50	5,48	13<<25	5,48	25	13<<25	5,48	25	13<<25	5,48
Succinique	4,21	25	2,95	4,84	13<<25	4,84	25	6<<13	5,24	25	3<<6	6,37
Benzoïque	4,19	25	3,05	5,30	6<<13	5,96	25	3<<6	6,77	25	3<<6	6,77
Lactique	3,86	25	2,25	5,15	13<<25	5,15	>25	13<<25	5,15	>25	3<<6	6,73
Formique	3,74	25	1,15	5,30	13<<25	5,30	25	13<<25	5,30	25	13<<25	5,30
Citrique	3,10	25	5,25	4,36	6<<13	4,75	25	3<<6	6,01	25	3<<6	6,01
Fumarique	3,04	25	2,90	4,31	13<<25	4,31	25	6<<13	4,80	25	6<<13	4,80

Dans ces expériences, les CMI₉₉ (25 mmol/l) n'ont pas permis de différencier les acides (Tableau 1). Toutefois, à cette concentration, les activités antimicrobiennes étaient différentes. Les acides benzoïque, citrique et fumarique ont montré une activité bactériolytique contre les trois souches de *Salmonella* tandis que les autres acides étaient bactériostatiques. Les CMI₅₀ des acides sorbique, succinique, benzoïque, lactique et citrique nécessaires pour inhiber la croissance du sérovar Enteritidis ont été équivalentes à celles des acides benzoïque, sorbique et citrique pour réduire celle du sérovar Derby. Ces concentrations ont dû être doublées pour obtenir les mêmes effets avec les acides succinique et fumarique sur le développement de *Salmonella* Derby et avec les acides benzoïque et citrique sur celui de *Salmonella* Typhimurium. Pour les autres acides, des concentrations supérieures à 13 mmol/l ont été nécessaires pour inhiber 50% de la croissance du sérovar Typhimurium. Il est apparu que, dans les conditions utilisées, *Salmonella* Typhimurium était le moins sensible des trois sérovats testés. Afin de différencier les activités antimicrobiennes de chacun des acides, celles-ci ont été évaluées après neutralisation de leur pouvoir acidifiant. Pour cela les activités antimicrobiennes des solutions de 11mM de chaque acide ont été comparées soit à la même solution neutralisée avec de la soude soit à celle préparée avec le sel de l'acide correspondant. Ces évaluations ont montré que l'activité antimicrobienne contre les trois sérovats de *Salmonella* n'était conservée qu'avec les acides benzoïque, sorbique et citrique (Tableau 2).

Tableau 2 - Retards de croissance (%) de *Salmonella* Typhimurium provoqués par trois préparations de 11mM des différents acides

	Acide		Acidité neutralisée		Sel	
	%	pH	%	pH	%	pH
Propionique	3	6,4	2	7,1	0	7,1
Butyrique	4	6,3	1	7,0	0	7,1
Sorbique	15	6,4	8	7,1		
Succinique	4	5,7	1	7,0	0	7,1
Benzoïque	32	6,5	9	7,1	8	7,1
Lactique	1	6,3	1	7,1	0	7,1
Formique	2	6,5	2	7,1	0	7,1
Citrique	14	5,2	2	7,1	4	5,8
Fumarique	6	5,4		7,1	0	7,0

CONCLUSION

Les mécanismes d'action des acides organiques sont divers (Cherrington et al., 1991). Il faut ajouter à l'effet acidifiant, l'activité antimicrobienne spécifique de l'acide utilisé. Les résultats obtenus avec certains acides le confirment et suggèrent que les acides benzoïque, sorbique et citrique sont de bons candidats pour une application *in vivo*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cherrington, C. A., Hinton, M., Mead, G. C. & Chopra, I., 1991. Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. Adv. Microb. Physiol., 32, 87-108.
- Guggenbuhl P., Séon A., Piñón Quintana A., Simões Nunes C., 2007 Effects of dietary supplementation with benzoic acid (VevoVital®) on the zootechnical performance, the gastrointestinal microflora and the ileal digestibility of the young pig. Livest. Sci., 108, 218-221.