

# PROPRIETA' ANTIBATTERICHE DELL'ESTRATTO DI SEMI DI POMPELMO NEI CONFRONTI DI *PAENIBACILLUS LARVAE* SUBSP. *LARVAE*

P. Semprini<sup>1</sup>, V. Langella<sup>1</sup>, B. Pasini<sup>2</sup>, M.T. Falda<sup>2</sup> & S. Calvarese<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e Molise «G. Caporale», Teramo - Italia

<sup>2</sup>Apicoltura Pasini Campagnatico, Grosseto - Italia

## RIASSUNTO

*Sono stati analizzati 21 campioni di estratti di semi di pompelmo (ESP), reperiti dal commercio e/o dagli apicoltori, per testarne la capacità di inibizione, in particolare nei confronti del Paenibacillus larvae subsp. larvae, responsabile della peste americana delle api. Il potere battericida degli ESP è stato misurato anche verso il Bacillus subtilis BGA, Bacillus cereus 11778, Bacillus cereus K250, Micrococcus luteus 9341.a, batteri utilizzati routinariamente in laboratorio per la ricerca degli inibenti negli alimenti. I risultati hanno messo in evidenza che non tutti gli estratti di semi di pompelmo hanno la stessa capacità di inibizione e che due di quelli testati non hanno nessun potere inibente nei confronti dei 5 batteri utilizzati. Considerato che 19 campioni hanno mostrato la capacità di inibire il bacillo della peste americana, si potrebbe ipotizzare, dopo opportuni accorgimenti, l'uso di un prodotto naturale, come gli ESP, nel trattamento di questa importante patologia apistica in sostituzione di prodotti chemioterapici.*

## PAROLE CHIAVE

Estratti di semi di pompelmi (ESP) - *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* - Peste americana

## Introduzione

L'albero del pompelmo (*Citrus maxima* L.; *C. paradisi*; *C. grandis*, *C. decumana*) può raggiungere un'altezza di 6-7 metri e si presenta con foglie lucide di colore verde intenso, fiori bianchissimi e profumati, isolati o a grappoli e grossi frutti di colore giallo. Il pompelmo è originario della Cina ma è da tempo coltivato in Giappone, America Centrale, Medio Oriente (in particolare Israele) e sulla costa mediterranea del Nord Africa. In Italia viene coltivato, soprattutto, in Liguria, Campania e Sicilia. Il nome pompelmo deriva dalla parola olandese "*pompoen*" che significa grosso e dalla parola giavanese "*limoes*" che significa limone. Esistono tre varietà diverse di pompelmo: la bianca, particolarmente adatta per i succhi; la rosa, molto più dolce e infine la rossa.

Spetta al dr. Jacob Harich, immunologo della Florida (USA),

la scoperta, nel 1979, che un estratto ottenuto da semi pestati di pompelmo mostrava una rapida e potente efficacia contro le infezioni da microrganismi. Egli, infatti, amante del giardinaggio, si accorse che, in un mucchio di materiale da compostaggio, i semi di pompelmo non si decomponivano.

L'estratto di pompelmo viene ricavato dai semi e dalla polpa disidratata. Per l'estrazione vengono impiegati glicerina o grasso di cocco, non si tratta di una semplice estrazione, ma di una serie di processi durante i quali si formano nuovi legami chimici. Per esempio i bioflavonoidi vengono trasformati in legami quaternari, questi legami esercitano una potente azione inibente verso batteri, funghi, parassiti e alcuni virus, mantenendo una biotossicità estremamente bassa nei confronti dell'uomo e degli animali. L'estratto contiene, inoltre, aminoacidi, proteine, vitamine A, B, e

## ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF GRAPEFRUIT SEED EXTRACT AGAINST *PAENIBACILLUS LARVAE* SUBSP. *LARVAE*

### Summary

Twenty-one samples of grapefruit seed extract (GSE) either from marketed products or provided by an apiculturist were analysed to verify their inhibition activity, in particular against *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, responsible for American foulbrood. The bactericide capacity of GSE has been measured in *Bacillus subtilis* BGA, *Bacillus cereus* 11778, *Bacillus cereus* K250 and *Micrococcus luteus* 9341a; these bacteria are normally used in the laboratory to study inhibitors. The results showed that not all GSE have the same inhibitory activity and two of those analysed do not inhibit the five bacteria used. Considering that 19 samples inhibited American foulbrood bacillus, the authors

C, e tutta una serie di altre sostanze (naringina, isosakuranetina, neoesperidina, esperidina, diidrocandrolo, quercetina, canferolo, apigenina rutinoside) molto efficaci nei confronti di alcune infezioni (cutanee, auricolari ed orali). Studi sulle proprietà antibatteriche di questo estratto hanno dimostrato un'azione germicida ad ampio spettro ed hanno definito l'estratto di semi di pompelmo come «il più potente antibiotico naturale completamente privo di tossicità». Risulta attivo contro batteri (Streptococchi, Stafilococchi, Salmonella, *E. coli* ed *Helicobacter pylori*), lieviti e muffe (compresa la candida), protozoi (ameba e giardia), virus influenzali ed erpetici. L'estratto che si è ottenuto è stato denominato in inglese GSE (Grapefruit Seed Extract) e in italiano ESP (Estratto di Semi di Pompelmo) (7, 8).

A tutt'oggi i mezzi di lotta utilizzati contro la Peste Americana sono molteplici: da azioni radicali come distruzioni delle colonie di api, a mezzi chemioterapici come il trattamento con Sulfati azolo sodico e Ossitetraciclina che possono controllare il decorso della malattia agendo sulla forma vegetativa del batterio. Il trattamento con chemioterapici determina una serie di problematiche legate alla presenza di residui nel miele (9, 10).

Da quanto sopra scaturisce sempre più l'importanza dell'utilizzo di sostanze e/o prodotti alternativi naturali che riducano al minimo l'impatto con la salubrità degli alimenti e quindi che rispettino la tutela della salute pubblica. Le caratteristiche dell'estratto di semi di pompelmo come prodotto naturale, di bassa tossicità e di azione antibatterica, hanno suggerito l'utilizzo dell'estratto anche in apicoltura. Nel presente lavoro si è voluto provare se gli estratti di semi di pompelmo, che normalmente possono essere reperiti in commercio, hanno tutti la

**Tabella 1:** Esame dei campioni per forma fisica e provenienza.

**Table 1:** Form and origin of grapefruit extract samples examined.

Campione Sample	Forma fisica Form	Provenienza Origin
1	Liquido Fluid	Venezuela Venezuela
2	Polvere Powder	Bolzano Bolzano
3	Liquido Fluid	Bolzano Bolzano
4	Liquido Fluid	Francia France
5	Liquido Fluid	Bolzano Bolzano
6	Polvere Powder	Grosseto Grosseto
7	Liquido Fluid	Ravenna Ravenna
8	Polvere Powder	Ravenna Ravenna
9	Liquido Fluid	Mantova Mantova
10	Liquido Fluid	Spagna Spain
11	Polvere Powder	Grosseto Grosseto
12	Liquido Fluid	Teramo Teramo
13	Capsule Capsule	Teramo Teramo
14	Liquido Fluid	Teramo Teramo
15	Liquido Fluid	Teramo Teramo
16	Liquido Fluid	Grosseto Grosseto
17	Liquido Fluid	Grosseto Grosseto
18	Liquido Fluid	Grosseto Grosseto
19	Liquido Fluid	Arezzo Arezzo
20	Polvere Powder	Arezzo Arezzo
21	Liquido Fluid	Arezzo Arezzo

stessa capacità inibente *in vitro* nei confronti di alcuni batteri, in particolare verso il *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* responsabile della Peste Americana delle api (1, 3).

## Materiali e metodi

Gli estratti di semi di pompelmo analizzati sono stati forniti sia dalle ditte che commercializzano il prodotto in Italia sia da apicoltori, anche stranieri, che ne erano in possesso.

Per le prove di inibizione "*in vitro*" sono stati saggiati 21 campioni di estratto di semi di pompelmo,

conclude che l'uso di un prodotto naturale (come il GSE) per controllare questa importante malattia delle api, può essere utilizzato come sostituto per prodotti chemioterapici, dopo appropriate verifiche.

## Keywords

American foulbrood – Grapefruit seed extract – *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*.

## Introduction

The grapefruit tree (*Citrus maxima* L., *C. paradisi*, *C. grandis*, *C. decumana*) can grow to a height of 6-7 m, has bright and deep green leaves, very white and sweet-smelling flowers (isolated or in clusters) and large yellow fruit. The grapefruit tree originated in China but has been grown successfully in Japan, Central America, the Middle East (in particular Israel) and along the Mediterranean coast of North Africa. In Italy, the tree is found mainly in Liguria, Campania and Sicily. The name «grapefruit» comes from the Dutch word *pompoen*, which means «big» and from the Javanese word *limoes* which means «lemon». There are three different types of grapefruit: the white, particularly suitable for juices; the pink, that is sweeter and the red variety.

The discovery, in 1979, by Jacob Harich an immunologist from Florida (USA), of an extract obtained by crushing grapefruit seeds showed rapid and effective anti-microbial properties against hundreds of bacteria and virus strains, fungus strains and a large number of single cell parasites.

Harich was a keen gardener and noticed that in a heap of compost, the grapefruit seeds did not rot.

Grapefruit extract comes from seeds and dehydrated pulp. Glycerine or coconut fat are used for extraction which is not a simple process but rather a sequence of processes where new chemical bonds are formed. For example the bioflavonoids are turned into quaternary bonds; these bonds exert strong inhibitory action against bacteria, fungus, parasites and some viruses, and have extremely low biotoxicity for man and animals.

**Tabella 2:** Capacità di inibizione dell'estratto di semi di pompelmo nei confronti di *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*.**Table 2:** Inhibition capacity of grapefruit seed extract against *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*.

Campioni/Samples	Diluizioni/Dilutions				
	tq	1:2	1:10	1:40	1:80
1	25	na	16	10	8
2s	16	na	12	8	2
3d	12	12	12	10	8
4	nr	nr	nr	nr	nr
5	nr	nr	nr	nr	nr
6s	6	9	8	6	4
7d	12	12	12	10	8
8s	6	7	8	6	5
9	9	9	9	6	4
10	6	6	4	nr	nr
11s	10	9	7	6	4
12d	10	10	9	6	4
13s	7	7	8	6	4
14d	8	9	6	4	1
15d	8	9	6	4	1
16d	12	12	10	10	6
17d	12	12	12	12	8
18d	12	12	13	12	8
19d	12	na	12	8	4
20sd	14	na	12	8	5
21d	12	na	12	8	4

Legenda:

tq: i campioni liquidi sono stati depositati «tal quale» mentre i campioni solidi sono stati risospesi in acqua sterile nel rapporto in peso 1:1/Liquid samples deposited without transformation; solid samples were diluted in sterile.

s: Prodotto solido/Solid product

d: Doppi aloni di inibizione/Double inhibition halos

nr: Assenza di inibizione/Absence of inhibition

na: Non analizzato/Not analysed

diversi tra loro sia per la forma fisica (15 liquidi e 6 in polvere) sia per la diversa provenienza geografica (Tabella 1) (2). I campioni n. 2 e n. 3 sono stati oggetto anche di una precedente sperimentazione per valutarne l'efficacia in campo nei confronti della peste americana (6).

La capacità inibente degli estratti è stata testata "in vitro", secondo la procedura IZSTE B3.1.2 SOP009 utilizzata presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise di Teramo, (5) nei confronti dei seguenti ceppi batterici:

- *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*
- *Bacillus subtilis* BGA
- *Micrococcus luteus* 9341.a
- *Bacillus cereus* K250
- *Bacillus cereus* 11778

I campioni in forma liquida sono stati depositati «tal quale» mentre quelli in polvere e le capsule sono stati risospesi in acqua distillata sterile in un rapporto 1:1 (peso/peso) e denominati «tal qua-

le». Dalle soluzioni «tal quale» sono state effettuate diluizioni scarsi (1:2; 1:10; 1:40 e 1:80) utilizzando come diluente acqua distillata sterile e seguendo la procedura IZSTE B3.1.2 SOP002 (4). La capacità di inibire uno specifico batterio, da parte di ciascun campione di estratto, è stata valutata in base alla misura della corona circolare dell'alone di inibizione espresso in millimetri (mm).

## Risultati

I risultati, per meglio visualizzare le differenze dovute alle capacità inibenti dei diversi estratti testati, sono stati sintetizzati nella Tabella 2 per *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, nella Tabella 3 per i *Bacillus subtilis* BGA e *Micrococcus luteus* 9341.a e nella tabella 4 per i *Bacillus cereus* K250 e *Bacillus cereus* 11778.

La Tabella 2 mostra che su 21 campioni analizzati, 19 inibiscono

Furthermore, the extract includes amino acids, proteins, vitamins A, B and C, and other very effective substances (naringin, isosacuranetin, neohesperidin, hesperidin, dihydrocampherol, quercetin, campherol, apigenin rutinoside) against some infections (skin, ear and mouth). Studies on the antibacterial properties of this extract have shown a wide range germicide action and have defined GSE as the most potent natural antibiotic without toxicity. Results are effective against bacteria (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*), yeast and mould (including the *Candida*), protozoa (amoeba and *Giardia*), influenza and herpesviruses. The extract obtained has been termed GSE in English (grapefruit seed extract) and ESP in Italian (*estratto di semi di pompelmo*) (7, 8).

Nowadays there are various means to control American foulbrood, including radical methods, varying from the destruction of colonies to the use of chemotherapeutic agents, such as treatment with sodium sulfathiazole and oxytetracycline. These methods can control the course of the disease, acting on the vegetative form of the bacterium. Treatment with chemotherapeutic agents causes concern regarding the presence of residues in honey (9, 10).

As mentioned above, it is important to use natural alternative substances and/or products that at least reduce any negative impact on food safety and consequently respect public health concerns.

The distinctive characteristics of GSE as a natural product, with low toxicity and antibacterial properties, have also encouraged its use in apiculture. In the present study, the authors analysed GSE that is readily available commercially, to determine whether these products possess the same inhibitory capacity in vitro against some bacteria, in particular the *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* responsible for American foulbrood (1, 3).

## Materials and methods

The GSE analysed were provided

*in vitro* il *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* mentre 2 campioni, il n. 4 ed il n. 5, entrambi liquidi, non presentano alcuna inibizione non solo nei confronti del bacillo responsabile della peste americana ma anche nei confronti degli altri 4 batteri che usualmente si utilizzano in laboratorio per la ricerca degli inibenti nelle matrici alimentari di origine animale. L'assenza di potere inibente può far ritenere i due prodotti non idonei allo scopo per cui vengono commercializzati. Il campione n.1 ha presentato la massima capacità inibente con un alone di inibizione di 25 mm quando è stato depositato tal quale e di 8 mm alla diluizione di 1:80.

Dall'osservazione delle altre tabelle si possono trarre considerazioni comuni perché trovano riscontro in tutti i prodotti analizzati.

Dei 15 campioni commercializzati in forma liquida, 11 hanno presentato un alone di inibizione «doppio»: il primo, vicino al pozzetto di deposito di colore più scuro, il secondo, esterno, dove palesemente si notava la completa assenza di crescita dei batteri, come mostra la Figura 1. In tutte le letture non si è mai notata una proporzionalità tra il primo e il secondo alone. Si può ritenere che il fenomeno del doppio alone possa essere attribuito ai diversi coformulati dei prodotti commercializzati (11,13).

Gli estratti presentano una capacità inibente diversa: dai valori riportati appare evidente che non c'è proporzionalità diretta tra il fattore di diluizione e l'alone di inibizione. La Tabella 2 mostra, infatti, come il campione n. 10, che tal quale presenta una inibizione di 6 mm, quando è diluito 80 volte perde il potere inibente (nr). Lo stesso campione, saggiato tal quale su tutti i ceppi, mostra un minimo di 2 mm di inibizione nei confronti del *Bacillus cereus* 11778 (Tabella 4), di 3 mm per il *Bacillus subtilis*



Figura 1: Prova di inibizione *in vitro* dell'estratto di semi di pompelmo con il doppio alone di inibizione  
Figure 1: In vitro inhibition test of grapefruit seed extract showing the double inhibition halo

BGA (Tabella 3) e 6 mm per gli altri ceppi compreso il *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*.

Gli altri prodotti, che mediamente presentano aloni più grandi,

by firms that commercialised this product in Italy and also by a local apiculturist and apiculturists from abroad.

Twenty-one samples of GSE were

Tabella 3: Capacità di inibizione dell'estratto di semi di pompelmo nei confronti di: *Bacillus subtilis* BGA (BS) e *Micrococcus luteus* 9341.a (ML).

Table 3: Inhibition capacity of grapefruit seed extract against *Bacillus subtilis* BGA (BS) and *Micrococcus luteus* 9341a (ML).

Campioni/Samples	Diluizioni/Dilutions									
	tq		1:2		1:10		1:40		1:80	
	BS	ML	BS	ML	BS	ML	BS	ML	BS	ML
1	10	10	na	na	10	10	6	6	3	3
2s	8	8	na	na	6	6	6	6	2	2
3d	16	12	15	9	14	7	10	6	6	4
4	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
5	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
6s	12	8	11	4	8	4	9	4	4	5
7d	14	15	13	9	13	7	12	8	8	8
8s	12	10	9	4	9	4	9	5	8	2
9	20	11	15	7	12	3	12	nr	12	nr
10	3	6	3	2	1	2	1	nr	nr	nr
11s	14	15	11	4	9	3	9	2	6	nr
12d	12	12	12	5	10	4	9	7	6	6
13s	10	11	na	3	10	3	10	2	8	1
14d	12	9	10	4	8	4	4	4	1	1
15d	11	7	9	7	9	5	4	4	1	1
16d	15	16	12	11	12	11	14	9	9	7
17d	16	16	14	12	15	12	14	7	9	8
18d	16	16	14	12	15	10	14	7	9	7
19d	18	10	na	na	16	8	15	8	4	2
20sd	15	8	na	na	15	8	14	6	6	4
21d	17	10	na	na	15	8	12	6	5	2

Legenda:

tq: i campioni liquidi sono stati depositati «tal quale» mentre i campioni solidi sono stati risospesi in acqua sterile nel rapporto in peso 1:1/Liquid samples deposited without transformation; solid samples were diluted in sterile.

s: Prodotto solido/Solid product

d: Doppi aloni di inibizione/Double inhibition halos

nr: Assenza di inibizione/Absence of inhibition

na: Non analizzato/Not analysed

**Tabella 4:** Capacità di inibizione dell'estratto di semi di pompelmo nei confronti di: *Bacillus cereus* K250 (BCK) e *Bacillus cereus* 11778 (BC).

**Table 4:** Inhibition capacity of grapefruit seed extract against *Bacillus cereus* K250 (BCK) and *Bacillus cereus* 11778 (BC).

Campioni/Samples	Diluizioni/Dilutions									
	tq		1:2		1:10		1:40		1:80	
	BCK	BC	BCK	BC	BCK	BC	BCK	BC	BCK	BC
1	10	10	na	na	10	10	6	6	3	3
2s	8	8	na	na	6	6	6	6	2	2
3d	12	16	12	12	11	11	10	11	6	6
4	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
5	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
6s	8	12	6	11	6	6	6	6	4	4
7d	13	12	12	13	12	10	10	10	6	8
8s	6	12	6	12	5	7	4	6	4	6
9	9	6	4	6	6	6	6	4	4	2
10	6	2	2	3	2	1	nr	3	nr	nr
11s	10	10	6	8	6	6	8	6	6	6
12d	12	10	8	11	9	7	9	8	6	6
13s	6	6	8	7	6	8	7	7	5	6
14d	7	9	7	7	6	7	4	4	1	1
15d	9	10	9	9	9	8	4	4	1	1
16d	15	13	15	12	13	14	7	9	6	9
17d	16	16	15	12	12	14	8	10	8	9
18d	16	16	12	14	13	14	9	9	7	9
19d	16	14	na	na	14	12	12	12	3	3
20sd	14	12	na	na	14	12	10	12	4	4
21d	16	14	na	na	14	12	12	12	3	3

Legenda:

tq: i campioni liquidi sono stati depositati «tal quale» mentre i campioni solidi sono stati risospesi in acqua sterile nel rapporto in peso 1:1/Liquid samples deposited without transformation; solid samples were diluted in sterile.

s: Prodotto solido/Solid product

d: Doppi aloni di inibizione/Double inhibition halos

nr: Assenza di inibizione/Absence of inhibition

na: Non analizzato/Not analysed

come ad esempio il campione n. 16 della Tabella 2, si riducono a 6 mm quando sono depositati al massimo della diluizione da noi effettuata (1:80). L'opposto accade per il campione n. 2 della stessa tabella che pur presentando un alone di 16 mm come tal quale scende a 2 mm alla diluizione di 1:80.

Anche se i campioni solidi analizzati sono inferiori a quelli liquidi, e quindi il confronto potrebbe essere statisticamente non appropriato, dalle tabelle si evince che i prodotti solidi presentano inibizioni generalmente inferiori a quelli liquidi. Questo potrebbe essere attribuito alla minore solubilità del principio attivo responsabile dell'inibizione. E' da considerare, infatti, che tutti i prodotti solidi sono stati diluiti in rapporto in peso 1:1 con acqua distillata sterile per portarli allo stato liquido. Questo procedimento è stato necessario per consentire la

deposizione dei campioni solidi nei pozzetti di agar e quindi permettere l'esecuzione della prova.

Gli estratti hanno dimostrato generalmente la stessa sensibilità di inibizione nei confronti dei diversi ceppi. Ad esempio, i campioni 17 e 18 che presentano una inibizione di 16 mm verso un ceppo come il *Bacillus subtilis* (Tabella 3), generalmente hanno lo stesso ordine di grandezza anche nei confronti degli altri ceppi, come si nota nelle tabelle 3 e 4.

Le differenti capacità inibenti, riscontrate nei campioni analizzati, potrebbero essere attribuite alla diversa concentrazione di principio attivo piuttosto che ad una non corretta conservazione del prodotto in seguito ad esposizione ad insulti termici e/o alla luce oppure ad altri fattori che potrebbero aver alterato le caratteristiche originali del prodotto

analysed, 15 of which were in liquid form and the 6 remaining were in powder form (Table I) to determine the inhibitory activity *in vitro* (2).

Samples Nos 2 and 3 were examined in a previous test to evaluate their effectiveness against American foulbrood (6).

The inhibitory capacity of the extracts was tested *in vitro*, in accordance with IZSTE B3.1.2 SOP009 used by the Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise in Teramo (5) against the following bacterial strains:

- Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*;
- Bacillus subtilis* BGA;
- Micrococcus luteus* 9341a;
- Bacillus cereus* K250;
- Bacillus cereus* 11778.

Liquid samples were deposited exactly as they were "" while the powder samples and capsules were suspended in sterile distilled water at a ratio of 1:1 (weight/weight) and named «exactly as they were» Proportional dilutions (1:2; 1:10;

1:40 and 1:80) were used with the «exactly as they were» solutions, using sterile distilled water as a diluent and applying the procedure stated in IZSTE B3.1.2 SOP002 (4).

The capacity of every extract sample to inhibit a specific bacterium was evaluated in accordance with the measurement of the circular crown of the inhibitory halo expressed in mm.

## Results

Results are presented in Table II for *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, in Table III for *Bacillus subtilis* BGA and *Micrococcus luteus* 9341a and in Table IV for *Bacillus cereus* K250 and *Bacillus cereus* 11778, to illustrate the different inhibitory abilities of the extracts tested.

Table II shows that of the 21 samples analysed, 19 inhibited *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* *in vitro* while 2 samples (Nos 4 and 5), both in liquid form, did not inhibit either the bacillus responsible for American foulbrood or the other five bacteria, that are usually used in the laboratory to detect inhibitory agents in food matrices of animal origin. The

stesso e quindi la sua capacità antimicrobica.

## Conclusioni

Il presente lavoro ha avuto la finalità di verificare la capacità di inibizione *in vitro* di ESP. I dati bibliografici consultati, infatti, indicano le proprietà antibatteriche, antivirali e antiprotozoarie dell'estratto di semi di pompelmo nei confronti di varie infezioni cutanee, auricolari ed orali. Tutti i campioni testati, reperiti sul mercato o dagli stessi apicoltori, sono indicati commercialmente come prodotti con funzione antibatterica nei confronti di vari batteri. Tuttavia, le prove di laboratorio hanno evidenziato differenze sostanziali del potere battericida dei campioni testati, e per alcuni estratti (campioni n. 3 e n. 4) si è evidenziata una totale assenza di inibizione sia nei confronti di *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* sia degli altri batteri testati: *Bacillus subtilis* BGA, *Bacillus cereus* 11778, *Bacillus cereus* K250 e *Micrococcus luteus* 9341.a. Si può supporre che le differenze osservate nei test di laboratorio possano essere attribuite ai diversi procedimenti di estrazione e/o ai diversi eccipienti o solventi che possono essere stati utilizzati durante il processo di lavorazione. Allo stato attuale sono in corso analisi chimiche come cromatografia e spettrometria di massa, per meglio definire la natura del potere inibente dell'estratto. L'eventuale e ipotetico utilizzo in campo del prodotto non può prescindere dagli esami microbiologici che ne attestino la capacità inibente *in vitro* (12) e dalla valutazione di altre variabili quali la temperatura esterna, l'umidità relativa, il grado di infezione dell'alveare e la capacità igienica della famiglia.

## Bibliografia/References

1. Cremasco S., Mutinelli F. & Irsara A. (1994). – Attività degli oli essenziali nelle malat-

tie delle api. *Ape nostra amica*, **16** (2), 4-10.

2. Fiorentini L. & Castello M.C. (2002). – Proprietà antibatteriche di alcuni oli essenziali. *Large Anim. Rev.*, **8** (6), Dicembre 2002.

3. Hegggers J.P., Cottingham J., Gusman J., Reagor L., McCoy L., Carino E., Cox R., Zhao J.G. & Reagor L. (2002). – The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: II. Mechanism of action and *in vitro* toxicity. *J. Altern. Compl. Med.*, **8** (3), 333-340.

4. Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise in Teramo (IZS&AM) (2001). – B3.1.2SOP002: Guida generale per la preparazione delle diluizioni per l'esame microbiologico. IZSA&M, Teramo, pp. 4.

5. Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise in (IZSA&M) (2002). – B3.1.2SOP009: Ricerca di sostanze inibenti e chinolonici mediante screening microbiologico negli alimenti di origine animale destinati all'uomo e all'alimentazione animale. IZSA&M, Teramo, pp.10

6. Langella V., Semprini P., Di Fabio F., Calvarese S., Pasini B., Falda M.T. & Panella F. (2003). – Indagine preliminare sull'efficacia dell'estratto di semi di pompelmo nella lotta contro la peste americana. *Vet. Ital.*, **XXXIX** (47), Gennaio-Marzo 2003.

7. Lee Reagor B.S., Jean Gusman B.S., Lana McCoy M.T., Edith Carino M.T. & Hegggers J.P. (2002). – The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: I: An *in vitro* agar assay. *J. Altern. Compl. Med.*, **8** (3), 325-332.

8. Okayama A., Sadogawa T., Nakajima C. & Hayama T. (1996). – Biological properties and antibiotic susceptibility of *Bacillus larvae* originated from American foulbrood of honeybee in Japan. *Jpn. Vet. Med.*, **58** (5), 439-441.

9. Sharamon S. & Baginski B.J. (1998). – Le virtù terapeutiche dei semi di pompelmo, Tecniche Nuove, Milan, Edizione febbraio 2003.

10. Shimanuki H. & Knox D.A. (1997). – Bee health and international trade. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **16** (1), 172-176.

11. Takeoka G., Dao L., Wong R.Y., Lundin R. & Mahoney N. (2001). – Identification of benzethonium chloride in commercial grapefruit seed extracts. *J. Agric. Food Chem.*, **49** (7), 3316-3320.

12. Tirillini B. (2000). – Grapefruit: the last decade acquisitions. *Fitoterapia*, **71** [Suppl 1] S29-37. review.

13. Von Woedtke T., Schlüter B., Pfliegel P., Lindequist U. & Julich W.D. (1999). – Aspects of the antimicrobial efficacy of grapefruit seed extract and its relation to preservative substances contained. *Pharmazie*, **54** (6), 452-456.

absence of inhibitory activity suggests that the two products are not suitable for use in the control of American foulbrood. Sample No. 1 showed maximum inhibitory activity with a inhibition halo of 25 mm when deposited as such and 8 mm at a dilution of 1:80.

Similar conclusions can be drawn after an examination of the other data.

Among the 15 liquid commercialised samples, 11 had a «double» inhibitory halo: the first, near the trap, was darker in colour; the second which was external, showed a complete absence of bacteria, as shown in Figure 1. In all readings, there was no relation between the first and second halo. The authors conclude that the halo can be attributed to the different composition of marketed products (11, 13).

As the extracts presented different inhibitory activity, it seems clear that there is no link between the dilution factor and the inhibition halo from the values reported. Table II, shows how Sample No. 10, (inhibition of 6 mm), loses its inhibitory power (nr) when diluted 80 times. The same sample, tested exactly as described above, shows 2 mm inhibition on every strain against *Bacillus cereus* 11778 (Table IV), 3 mm for *Bacillus subtilis* BGA (Table III) and 6 mm for the other strains, including *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*.

The larger halos detected in other products (Sample No. 16 in Table II, for example), reduced to 6 mm when deposited with the maximum dilution used (1:80). The opposite is true for Sample No. 2 in Table II, which showed a 16 mm halo that reduced to 2 mm when diluted at 1:80.

The Tables illustrate that the solid products generally present inferior inhibitory qualities compared to the liquid products, although the solid samples are lower in number compared to liquid samples, and therefore the comparison could statistically be not appropriated. This can be attributed to the lower solubility of the active principle responsible for inhibition. All the solid products were diluted in ratio to

weight 1:1 with sterile distilled water to bring them to a liquid state. This process was necessary to enable the deposit of solid samples in the agar sinks and therefore to complete the test. The extracts generally demonstrated the same inhibition sensitivity against the different strains. For example, Samples 17 and 18, that presented an inhibition of 16 mm to *Bacillus subtilis* (Table III), generally showed the same growth even in regard to the other strains (Tables III and IV). The different inhibitory capacities found in the samples analysed could be attributed to the different concentrations of active principle rather than to incorrect preservation of the product after exposure to temperature and/or to light or other factors that could have changed the original properties of the

products and therefore their antimicrobial activity.

### Conclusion

The aim of the present study was to verify the inhibitory ability of GSE *in vitro*. Available literature has proved the antibacterial, antiviral and antiprotozoan properties of the GSE against some infections of the skin, ear and mouth.

All the samples tested, either available commercially or provided by apiculturists, are marketed as products with antibacterial properties against certain bacteria. However, the laboratory tests showed substantial differences in the anti-bacterial qualities of the samples studied. For certain extracts (Samples 3 and 4), there was a total absence of inhibition against both *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*

and *Bacillus subtilis* BGA, *Bacillus cereus* 11778, *Bacillus cereus* K250 and *Micrococcus luteus* 9341a.

The differences observed in laboratory can be attributed to the different extraction processes and/or to the different excipient or solvent used during the tests. Presently, chemical analysis, such as chromatography and mass spectrometry, are being used to better define the nature of the inhibitory activity of the extract.

The possible use of GSE in the field must be preceded by microbiological tests that would confirm their inhibitory capacity *in vitro* (12) and would evaluate other factors, such as the outside temperature, relative humidity, degree of infection of the beehive and hygienic status of the family.