



Azienda
Ospedaliero
Universitaria
Careggi

cerfit⁺
Centro di Riferimento Regionale in Fitoterapia | www.cerfit.org



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Le spezie



Salute, alimentazione e ricerca

Antibiotici naturali: il potere degli oli “speciali”

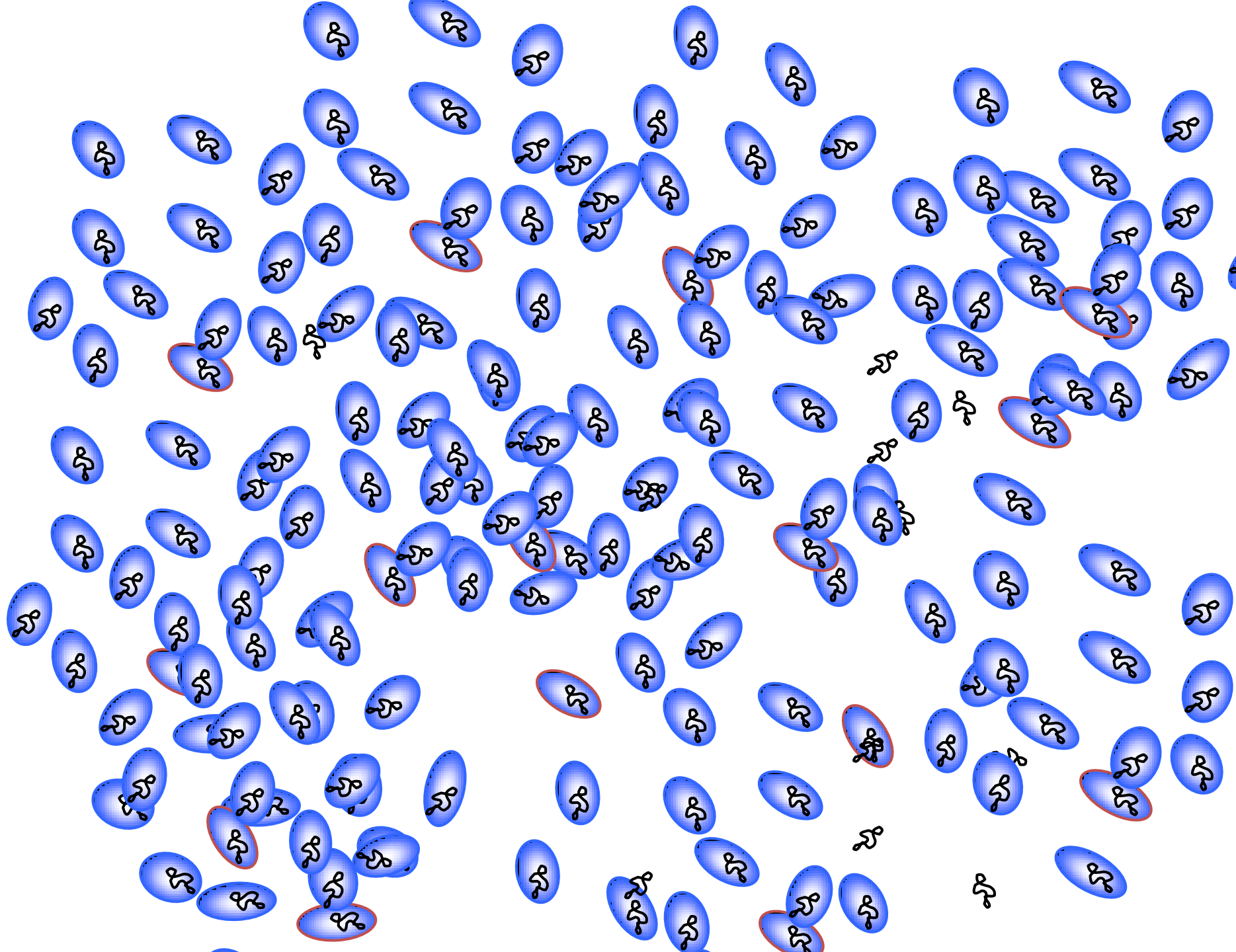
Renato Fani

Dip.to di Biologia

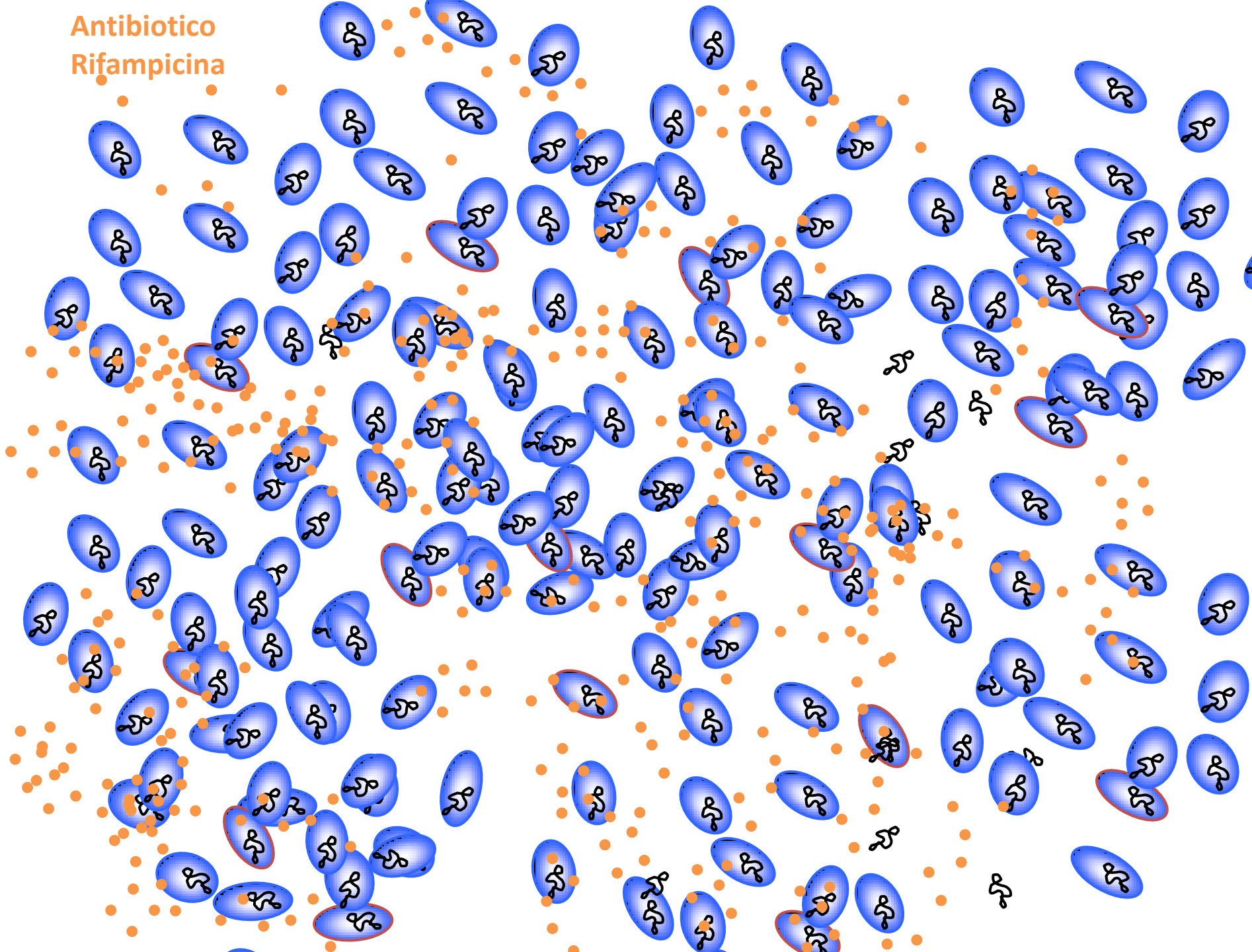
Laboratorio di Evoluzione Microbica e Molecolare

24 novembre 2017

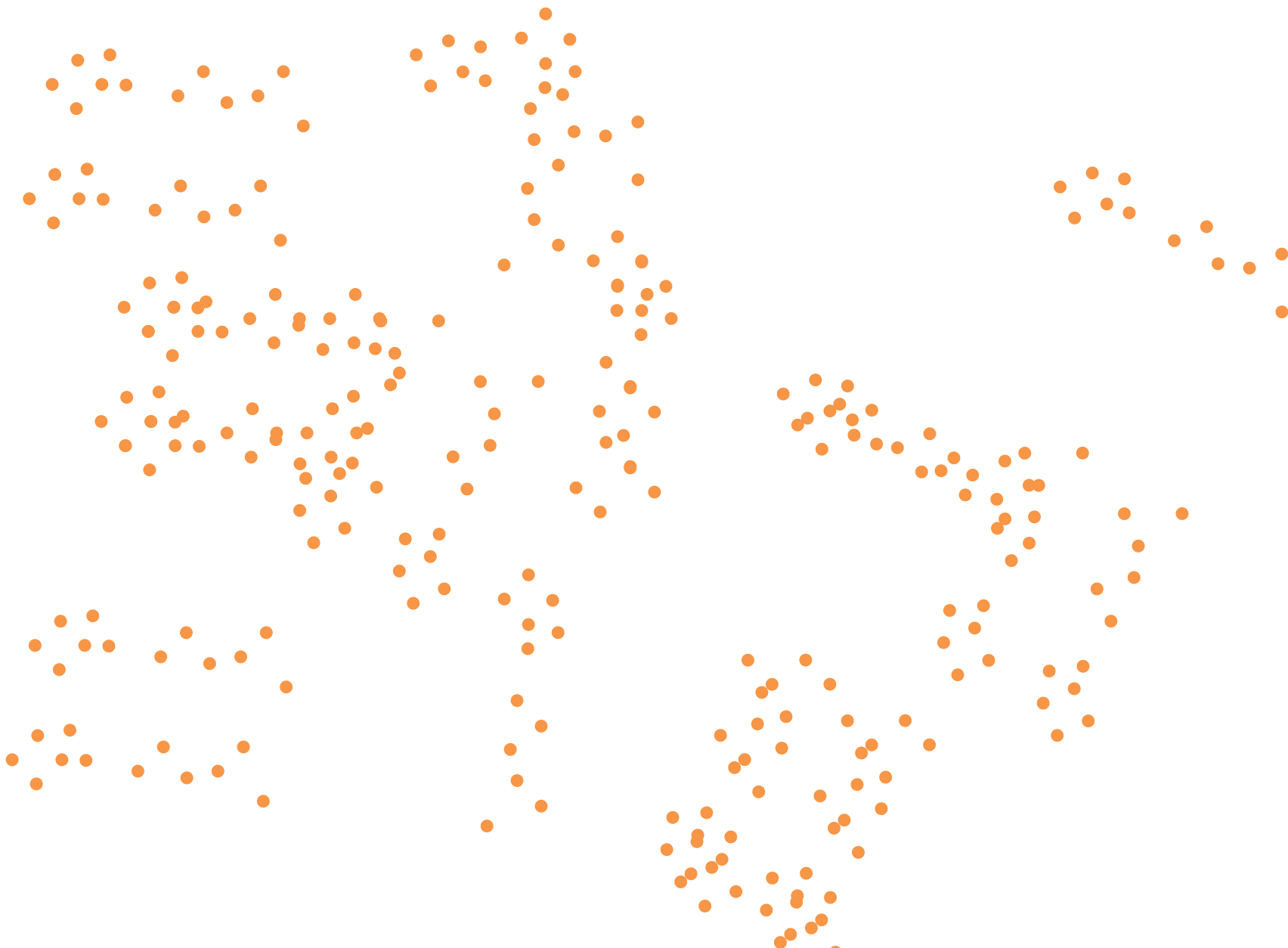
Auditorium CTO, Careggi, Firenze



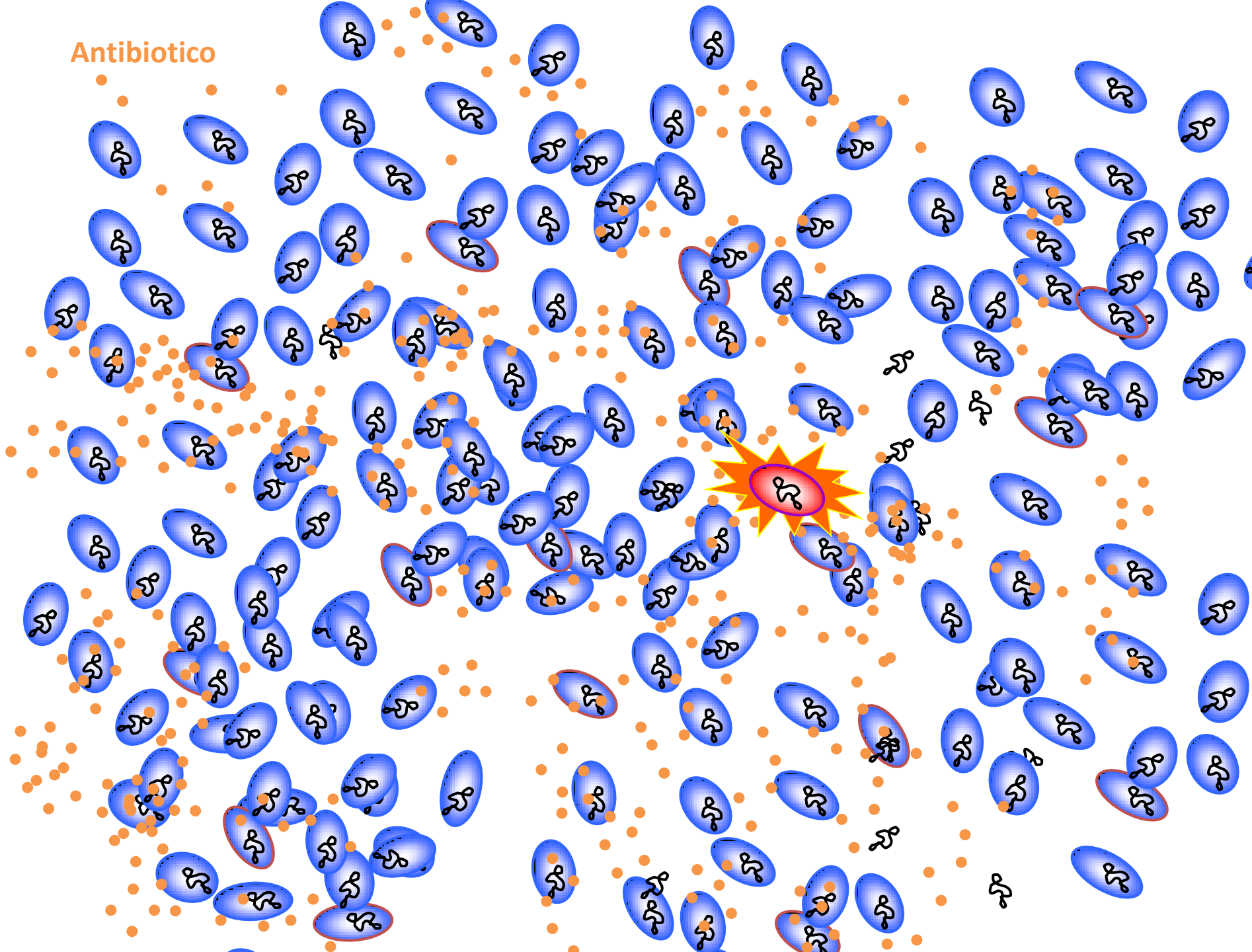
Antibiotico
Rifampicina



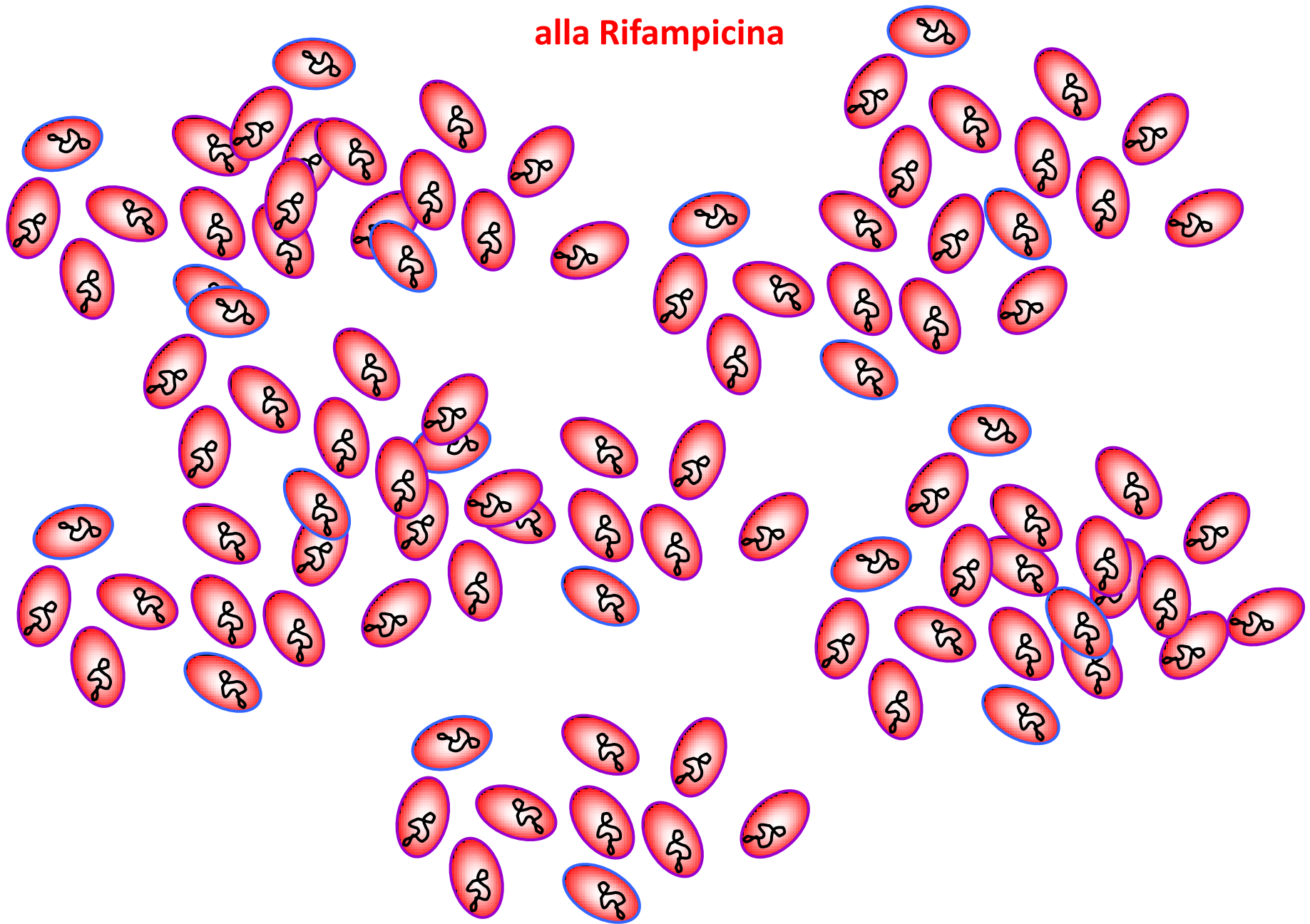
Antibiotico



Antibiotico



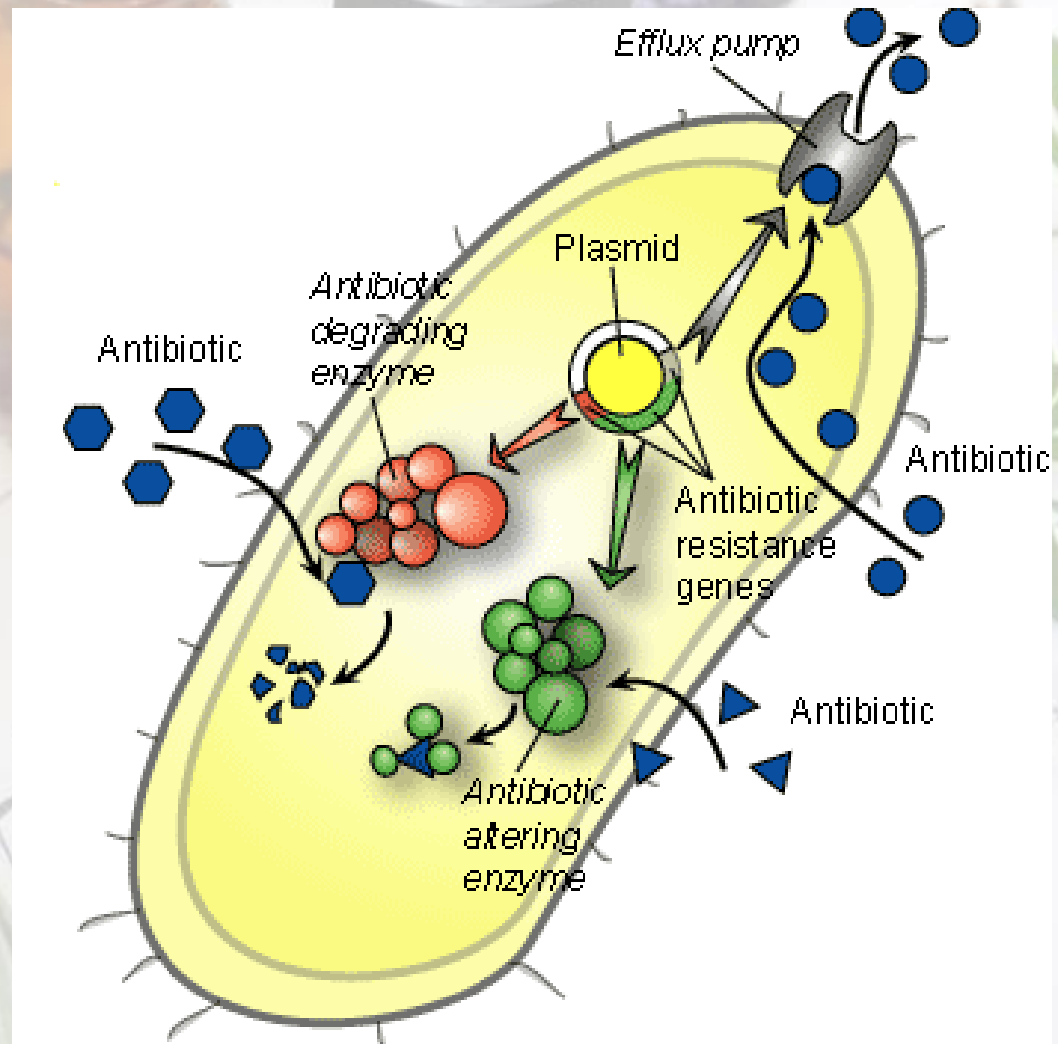
**Mutante resistente
alla Rifampicina**



Resistenza agli antibiotici

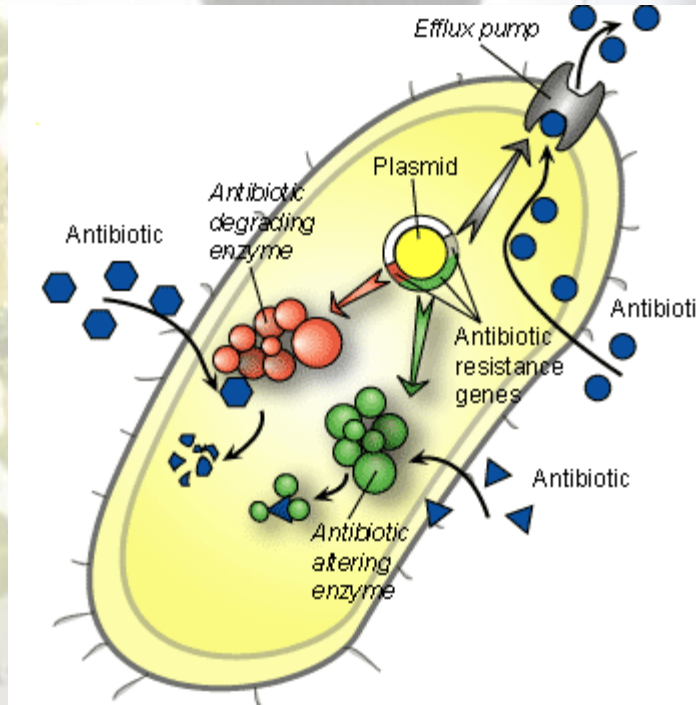
MECCANISMI DI RESISTENZA:

1. Alterazione dei target cellulari;
2. Espressione di enzimi capaci di modificare l'antibiotico;
3. Riduzione della permeabilità della membrana esterna;
4. Attività delle pompe di efflusso.



Resistenza agli antibiotici

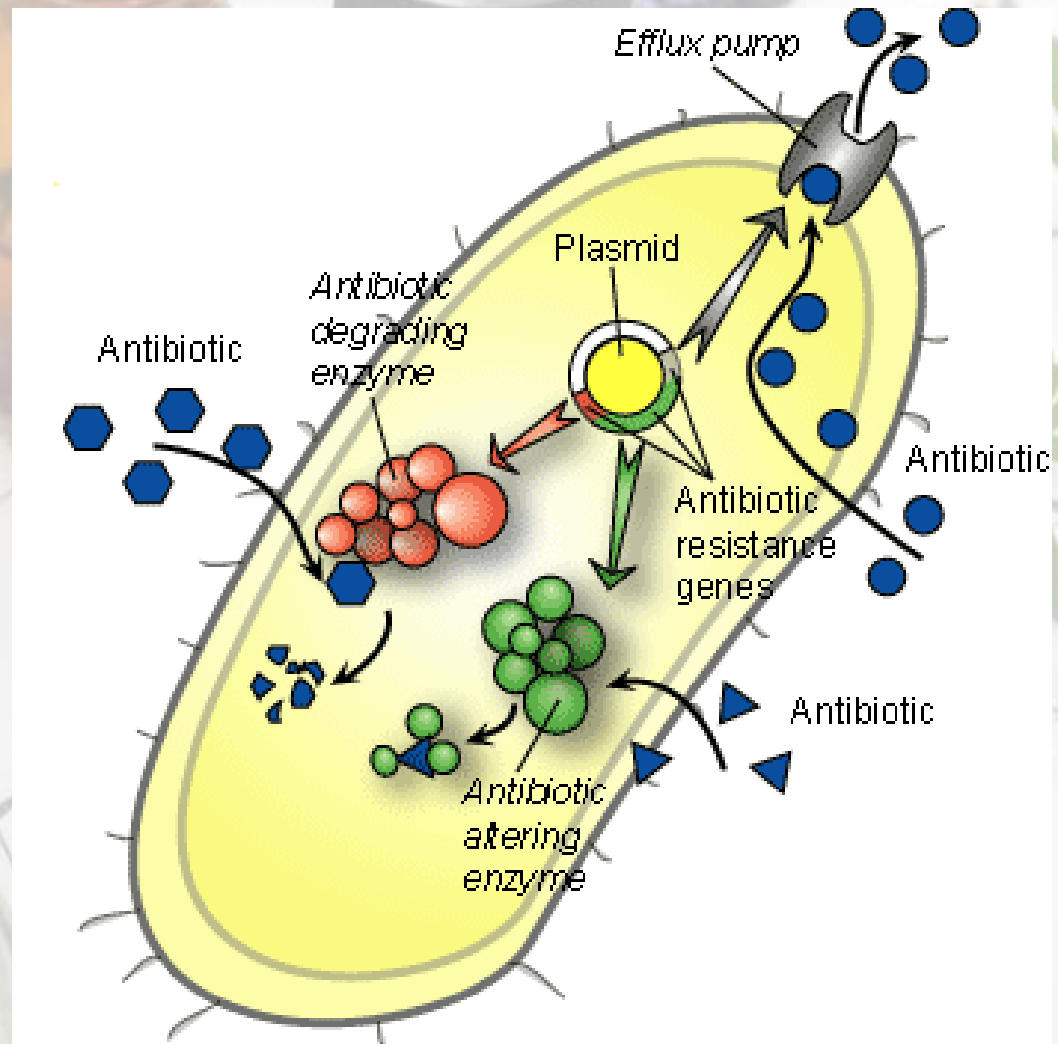
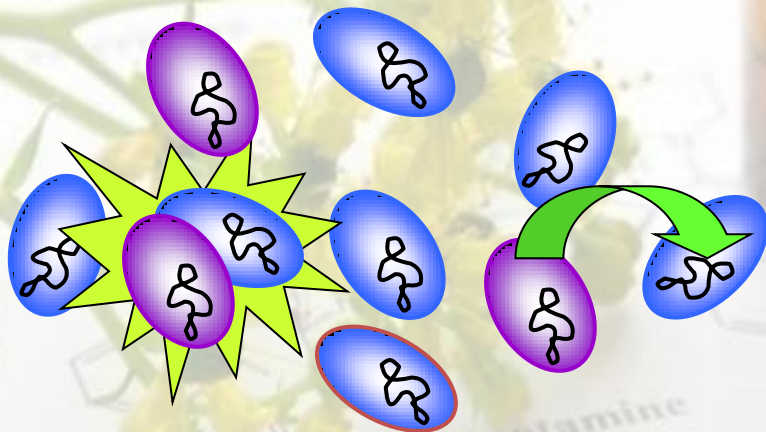
MECCANISMI DI RESISTENZA:



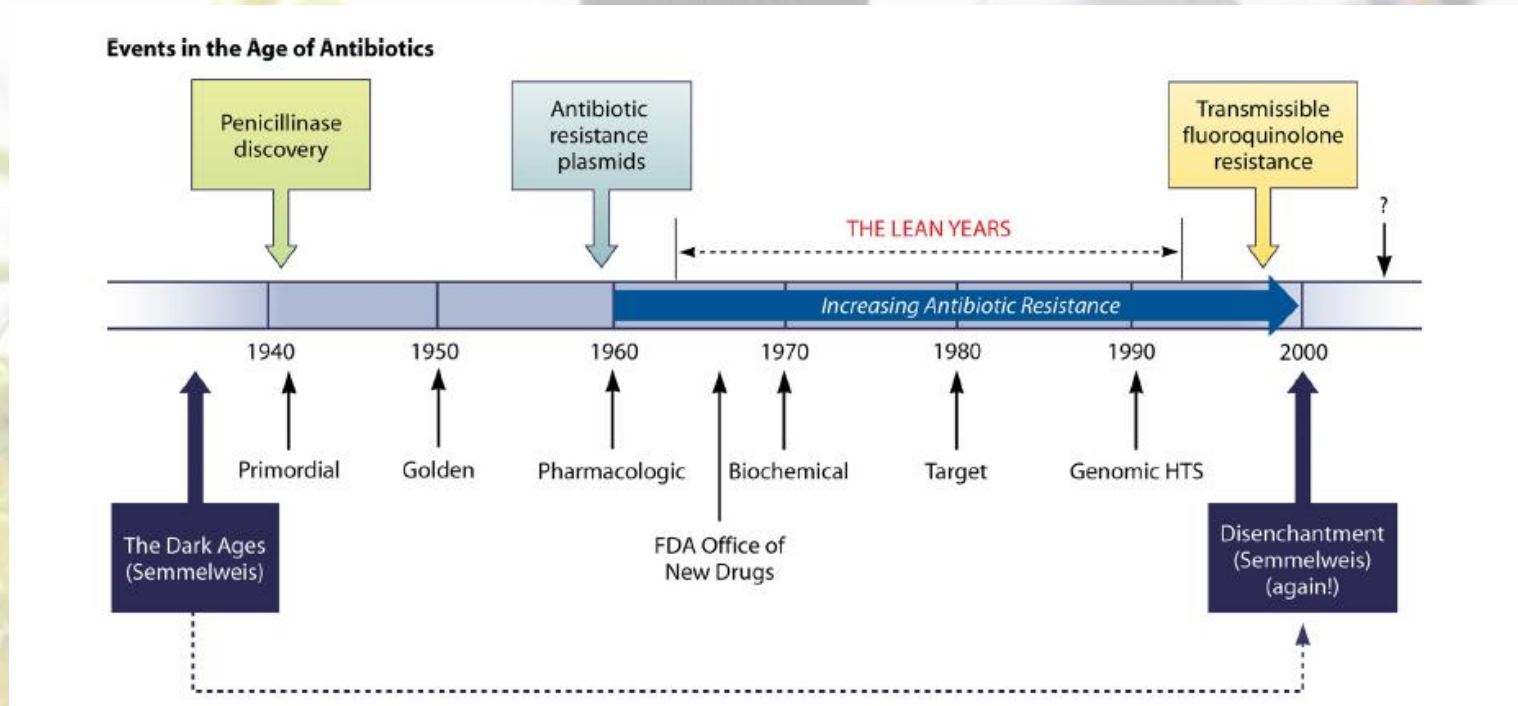
Generalmente vengono usate singole molecole antimicrobiche dirette contro singoli bersagli

Multi-Resistenza agli antibiotici (MDR)

Trasferimento genetico orizzontale



The antibiotics age



Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2010

Antibiotics Resistances

Dearth of New Classes of Antibiotics

Search for Novel and Efficient Antibacterial Molecules

Davies et al., 2010

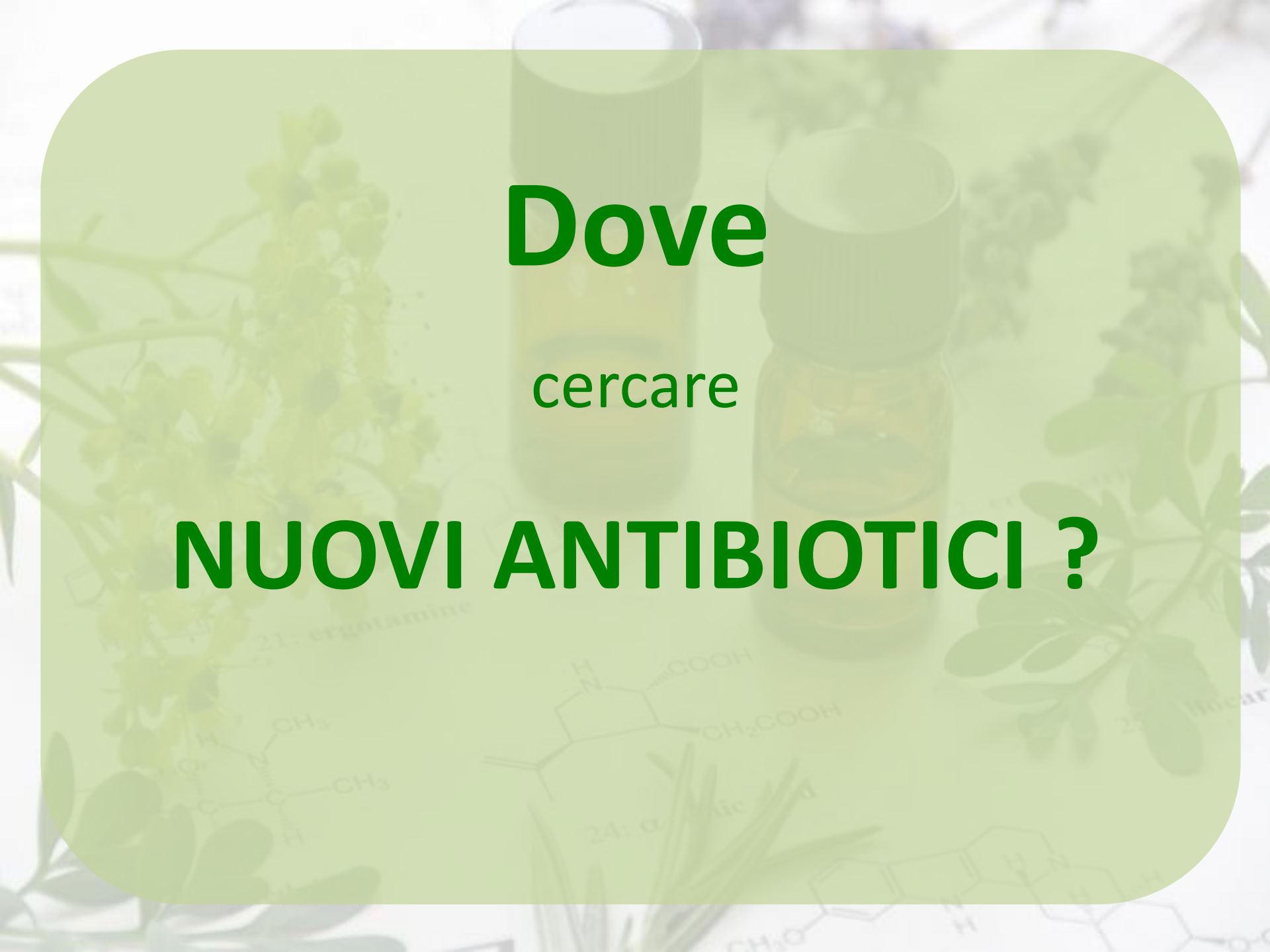
Bax et al., 2000

However, the use of a **single molecule** directed toward a **single molecular target** will result in the appearance of **bacterial mutants resistant to that molecule**

?

How can we bypass this problem?

Using a combination of molecules
directed toward **multiple molecular**
targets, which will strongly reduce the
probability of appearance of mutants
resistant to that molecular mix



Dove

cercare

NUOVI ANTIBIOTICI ?

Traditional Sources of Antibiotics



Terrestrial Bacteria



Fungi



Plants

New Possible Sources



Marine Enviroment



Extreme Enviroments
Microorganisms

Do these combinations exist?

Maybe yes.....

ESSENTIAL OILS from Medicinal Plants



Oli Essenziali

Miscele liquide di composti volatili, metaboliti secondari biosintetizzati da piante medicinali.

- Antimicrobiche
- Antivirali
- Antiparassitarie
- Anti-infiammatorie
- Immunostimolanti
- Antifungine



TIMO



ORIGANO



ROSMARINO



TEA TREE



LAVANDA

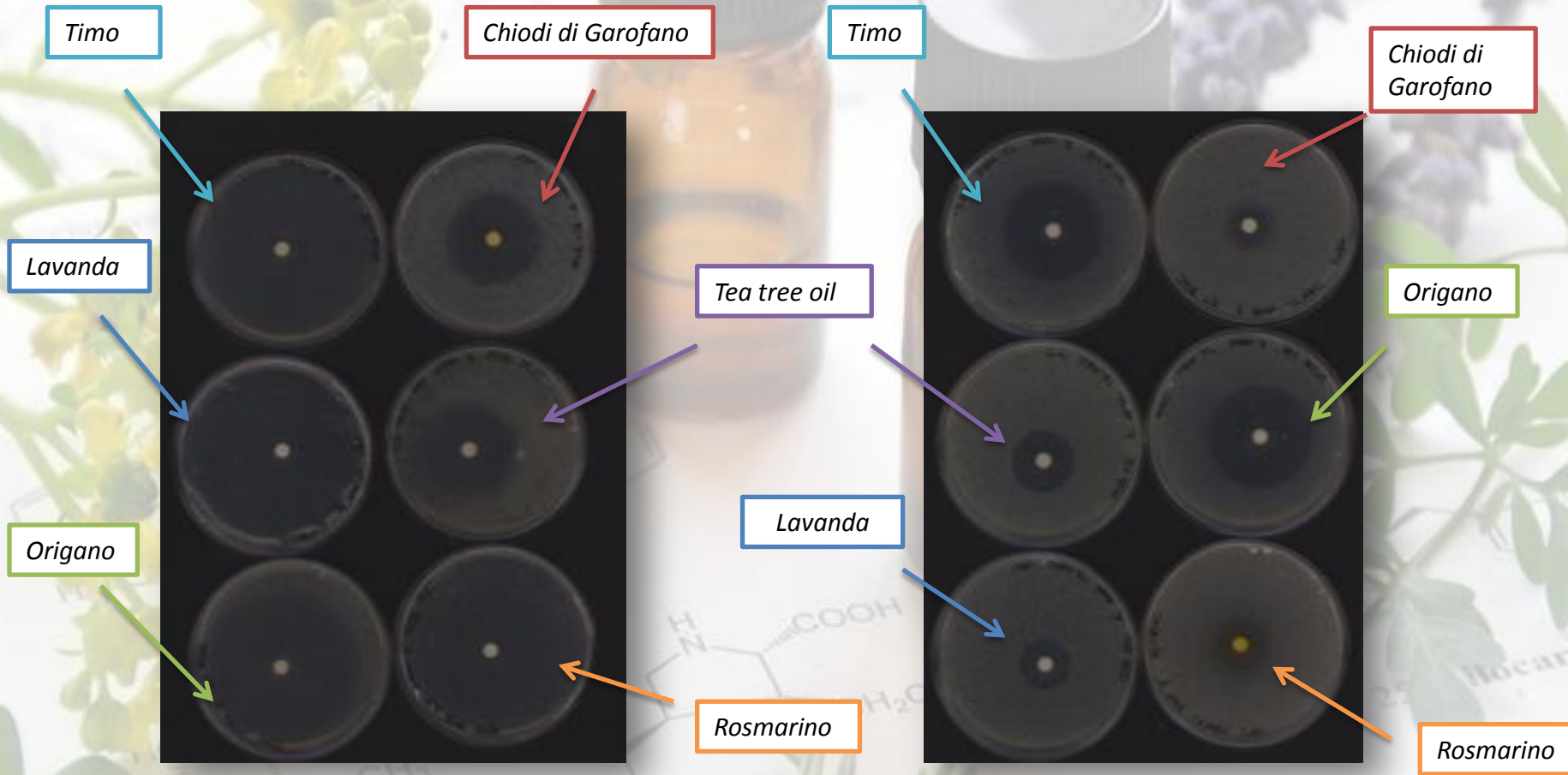


CHIODI DI GAROFANO



1	Constituents	l.r.i.	Lavandula hybrida	Eugenia caryophyll	Melaleuca alternifolia	Origanum vulgare	Rosmarinus officinalis	Thymus vulgaris
2	tricyclene	928					0,2	tr
3	α -thujene	933			0,6		tr	
4	α -pinene	941	0,4	0,2	3,8	1,7	11,5	4,3
5	camphene	955	0,3		tr	0,4	4,1	0,1
6	thuja-2,4(10)-diene	959					tr	
7	sabinene	977	0,1	tr	0,6			
8	β -pinene	982	0,6	0,1	2,1	0,4	3,8	1,2
9	myrcene	993	0,5		0,6	1,3	1,3	
10	α -phellandrene	1006			0,4	tr	0,2	
11	1-hexyl acetate	1010	0,1					
12	δ -3-carene	1013	tr	tr				tr
13	1,4-cineole	1018						0,1
14	α -terpinene	1020		tr	8,8	0,8	0,4	
15	<i>p</i> -cymene	1027	0,3	tr	3,7	11,6	1,9	47,9
16	limonene	1032	0,7	0,1	2,0	1,1	1,8	0,2
17	1,8-cineole	1034	6,9	tr	2,9	0,6	43,9	0,2
18	(<i>Z</i>)- β -ocimene	1042	0,3					
19	γ -terpinene	1063		tr	14,4	1,7	0,4	
20	<i>cis</i> -sabinene hydrate	1070	0,1		tr		tr	
21	<i>cis</i> -linalool oxide (furanoid)	1077	0,3					
22	terpinolene	1090			4,4	0,2	0,3	
23	<i>trans</i> -linalool oxide (furanoid)	1090	0,2					
24	1-pentyl butyrate	1094				tr		
25	<i>trans</i> -sabinene hydrate	1099			0,3			
26	linalool	1101	27,1			1,8	0,9	1,2
27	1-octenyl acetate	1112	0,4					
28	<i>exo</i> -fenchol	1118			tr		tr	tr
29	<i>cis-p</i> -menth-2-en-1-ol	1123			0,4			
30	terpinen-1-ol	1135			0,2			
31	<i>trans</i> -pinocarveol	1141					tr	
32	<i>trans-p</i> -menth-2-en-1-ol	1142			0,4			
33	camphor	1145	8,4			tr	11,3	
34	1-hexyl isobutyrate	1152	0,2					

Inhibition halos



B. cenocepacia

B. cenocepacia

Essential Oil from *Origanum vulgare* Completely Inhibits the Growth of Multidrug-Resistant Cystic Fibrosis Pathogens

Giovanna Pesavento^{a,§}, Valentina Maggini^{b,§}, Isabel Maida^c, Antonella Lo Nostro^a, Carmela Calónico^a, Chiara Sassoli^a, Elena Perrin^c, Marco Fondi^c, Alessio Mengoni^c, Carolina Chiellini^d, Alfredo Vannacci^b, Eugenia Gallo^b, Luigi Gori^b, Patrizia Bogani^c, Anna Rita Bilia^e, Silvia Campana^f, Novella Ravenni^f, Daniela Dolce^f, Fabio Firenzuoli^b, Renato Fani^{b,*}

Attività antibatterica dell'olio essenziale di *Origanum vulgare* testandolo su patogeni umani e in particolare su tre patogeni opportunisti, *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter xylosoxidans* isolati dai polmoni di pazienti di fibrosi cistica.

L'olio essenziale si è rivelato efficace contro tutti i ceppi batterici testati

Exploring the Effect of the Composition of Three Different Oregano Essential Oils on the Growth of Multidrug-Resistant Cystic Fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* Strains

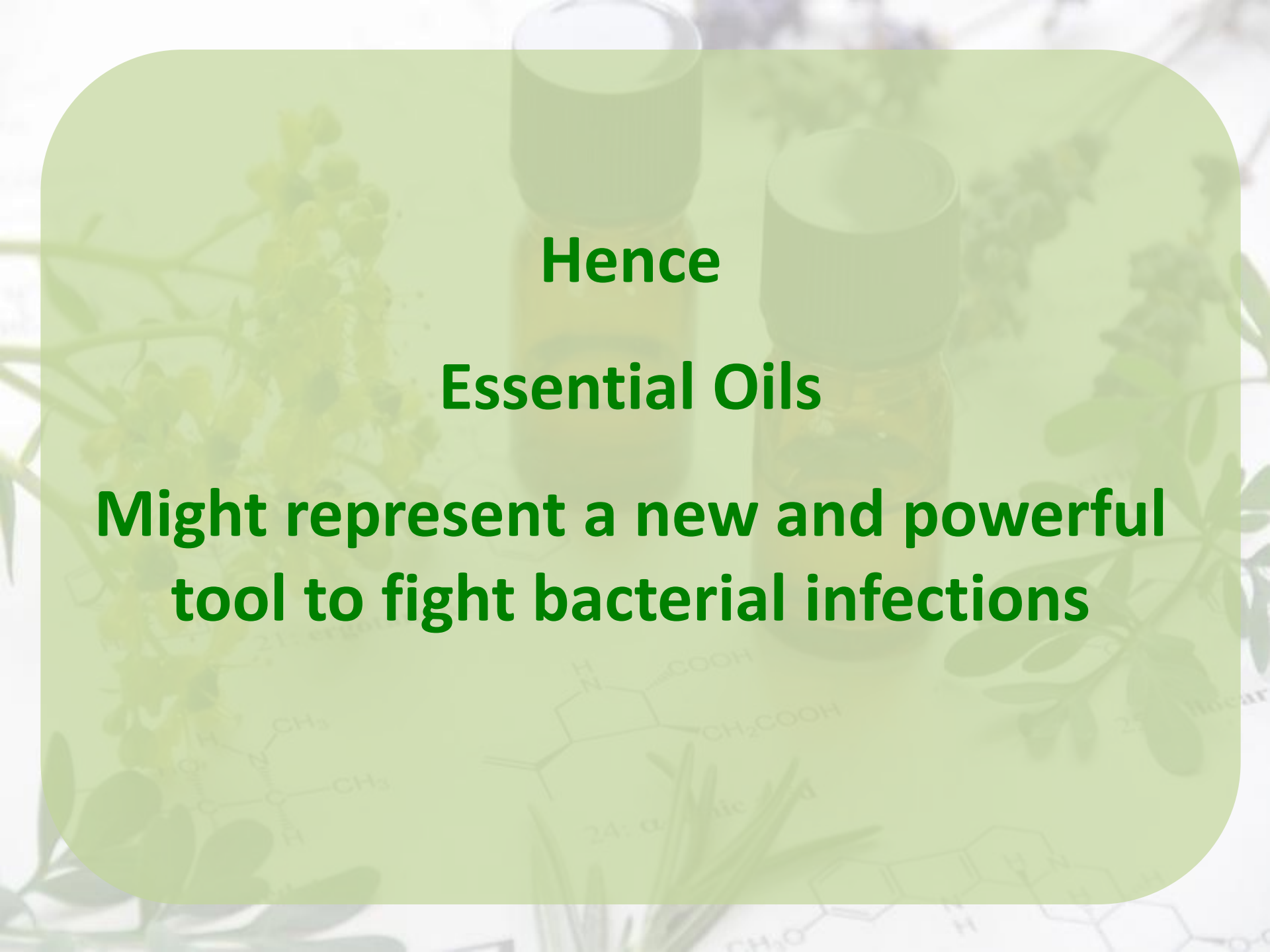
Valentina Maggini^{a,b,§}, Giovanna Pesavento^{c,§}, Isabel Maida^d, Antonella Lo Nostro^c, Carmela Calonico^c, Chiara Sassoli^c, Elena Perrin^b, Marco Fondi^b, Alessio Mengoni^b, Carolina Chiellini^b, Alfredo Vannacci^a, Eugenia Gallo^a, Luigi Gori^a, Patrizia Bogani^b, Anna Rita Bilia^d, Silvia Campana^e, Novella Ravenni^e, Daniela Dolce^e, Fabio Firenzuoli^a and Renato Fani^{b,†}

Composizione e attività di tre oli essenziali estratti rispettivamente da *Origanum compactum*, *Origanum vulgare* e *Origanum vulgare* var. *hirtum*. contro *Pseudomonas aeruginosa*

I tre oli hanno mostrato livelli simili di attività antimicrobica che potrebbero essere dovuti al fatto che la principale classe chimica (cioè carvacrolo / timolo) e il p-cymene sono rappresentati in percentuali abbastanza simili. Quindi, tali risultati potrebbero indicare, se confermati, che un EO ricco di carvacrolo e di timolo e una discreta presenza di idrocarburi monoterpeni sia un buon candidato come antibiotico.

1. **Bactericidal effect**
 2. **The bactericidal effect relies on the entire complex and not only on single components**
 3. **No mutant resistant to Essential Oils**
 4. **Unknown Multiple cellular targets**
- 

Perrin et al (Future Microbiology), in press



Hence

Essential Oils

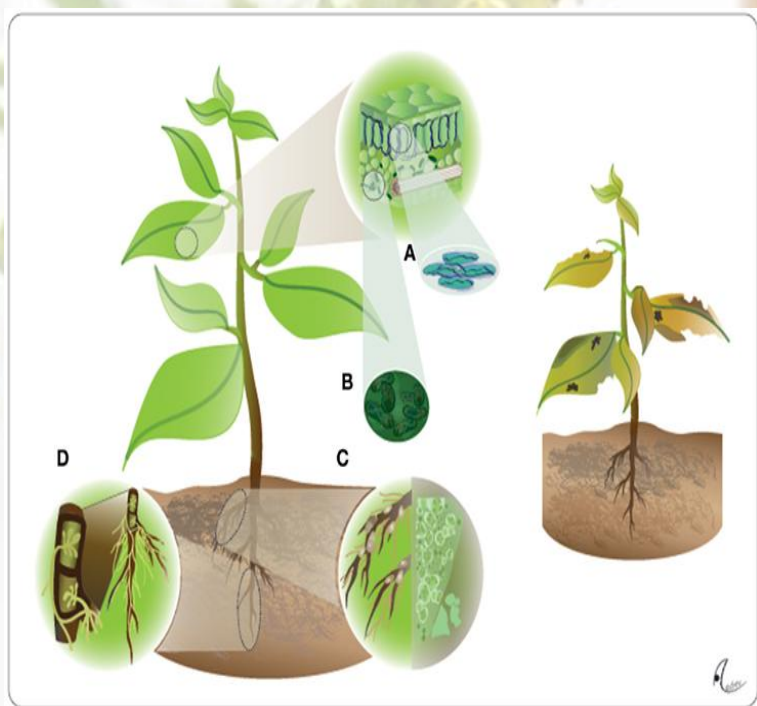
**Might represent a new and powerful
tool to fight bacterial infections**

The **new** and **intriguing** question is:

**WHO is responsible from the
biosynthesis of essential oil extracted
from medicinal plants??**

La pianta come *olobionte*

la pianta ospita comunità endofitiche diverse al suo interno e può quindi essere definita un *olobionte*, un organismo cioè che comprende la pianta ospite e il suo microbioma (insieme dei genomi del microbiota).



I microrganismi endofiti, abitano l'interno delle radici, dello stelo, delle foglie e di organi riproduttivi di piante terrestri e acquatiche.

La maggior parte di questi microrganismi, deriva dal suolo:

- Penetra all'interno delle radici cercando un punto di ingresso migliore
- Si adattano alle diverse condizioni ambientali (PH, pressione osmotica, risorse di carbonio, disponibilità di ossigeno) e a essudati con azione antimicrobica, rilasciati dalla pianta stessa
- Subiscono la transizione da batteri della rizosfera a veri e propri endofiti

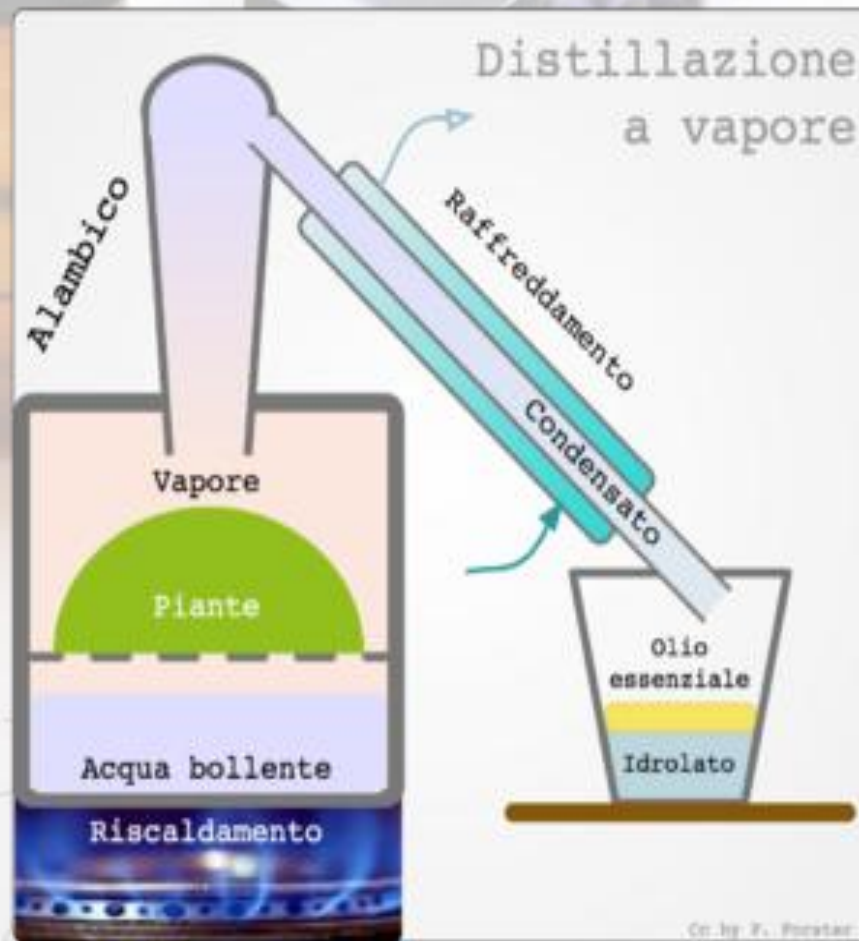




Pianta medicinale ➡

Oli essenziali

Miscele liquide di
composti volatili **usate in
fitoterapia** ottenute da
materiale vegetale
aromatico



Is it possible that endophytic bacteria living inside the medicinal plant might synthesize or may influence the synthesis of (some of) the molecules that are present in the essential oil?



SAMPLING SITE : "Il giardino delle erbe" - Casola Valsenio (RA)



Plants were very close to each other in the same soil

The model systems

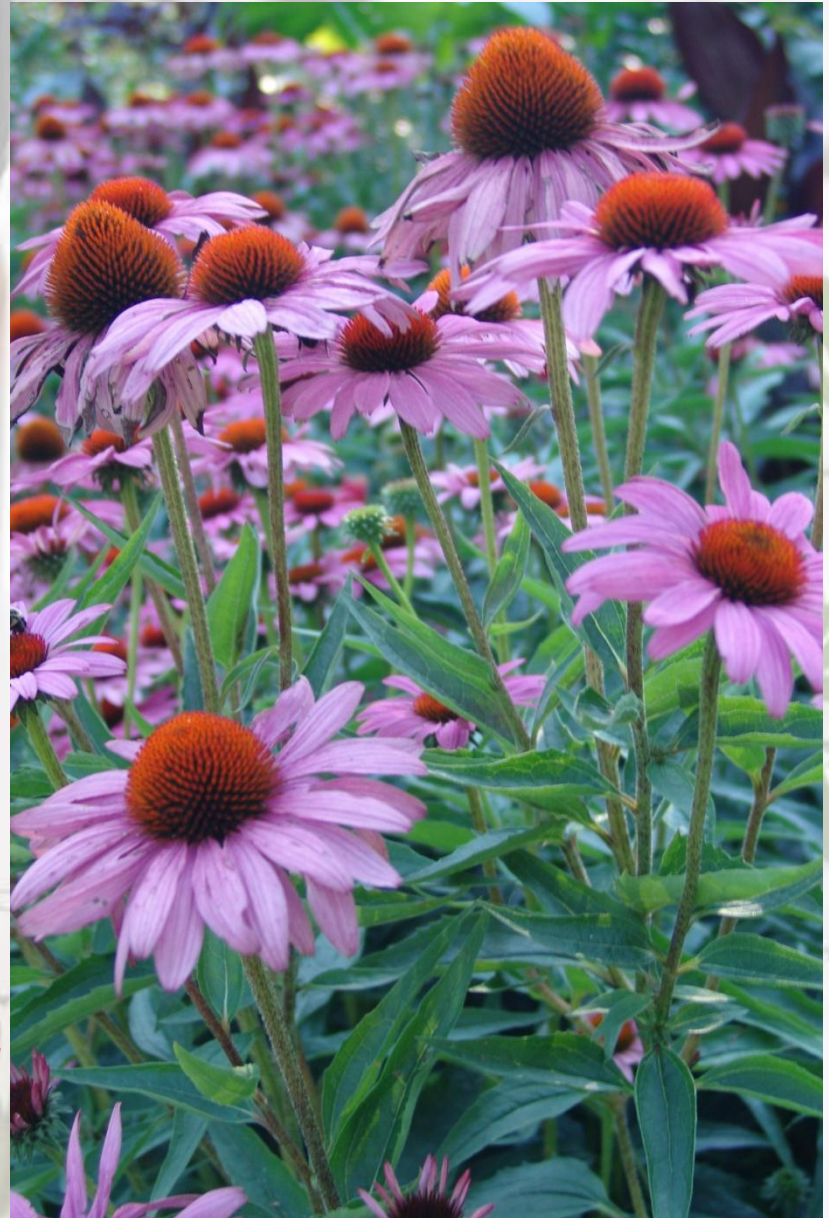
Lavandula officinalis



The model systems

Echinacea purpurea

Echinacea angustifolia



The model systems

Thymus vulgaris

Thymus citriodorus



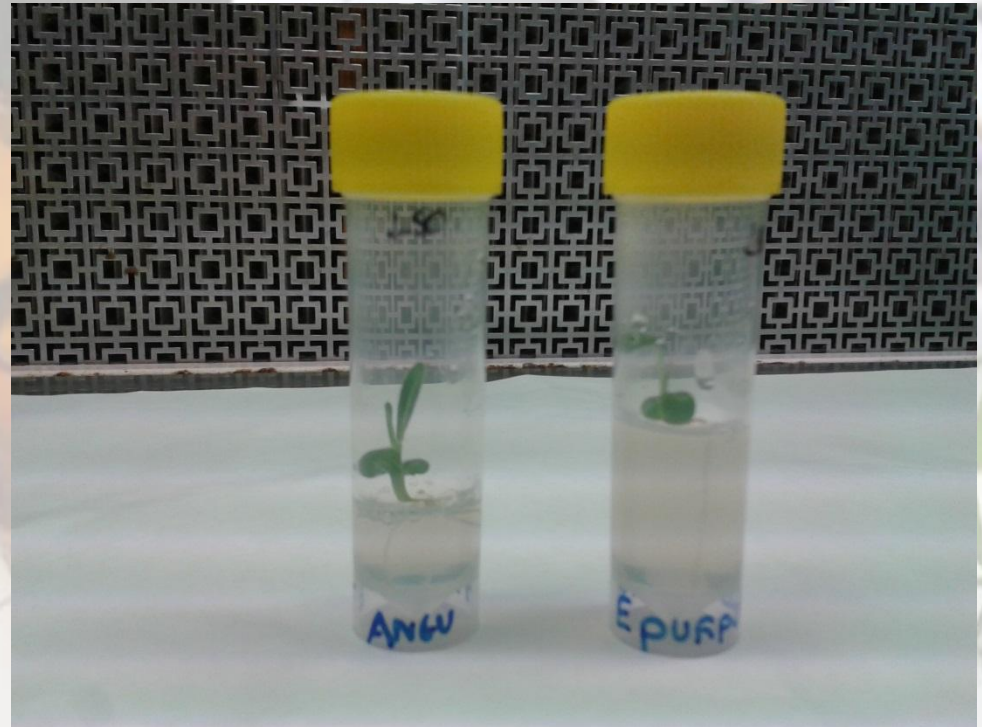
Comunità microbiche (centinaia di ceppi batterici)

- **Caratterizzazione fenotipica**
- **Caratterizzazione molecolare**
 - **Sequenziamento genomi**
 - **Attività antagonista**
 - **Attività antimicrobica**
- **Produzione di nuove molecole antibiotiche**

E. purpurea and *E. angustifolia* in vitro



**“Giardino delle Erbe”
Casola Valsenio, Italy**



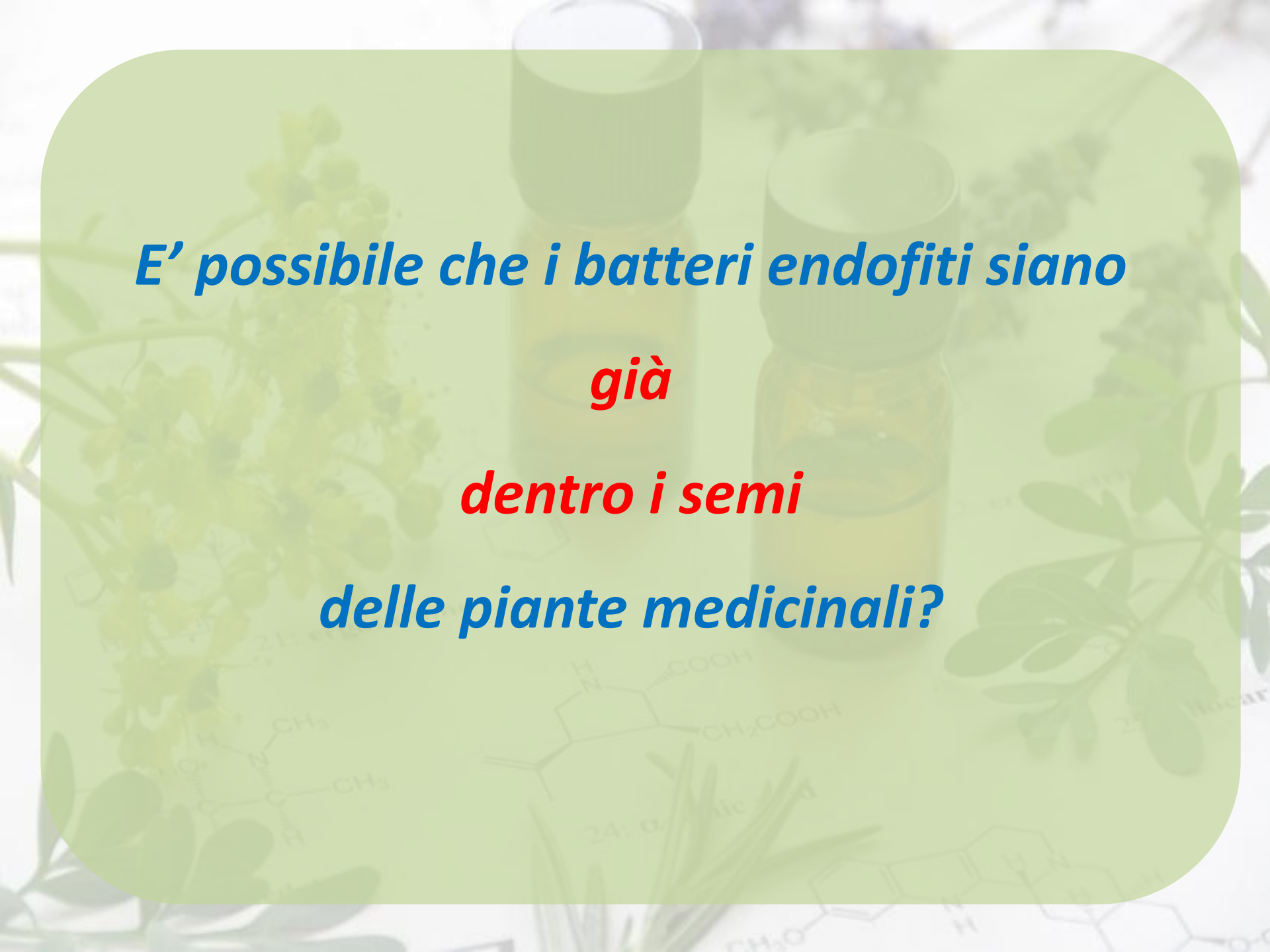
Seeds were surface disinfected prior to inoculation on the germination media. Aseptic seedlings were initiated on agar with solidified MS medium (Murashige and Skoog, 1962). Cultures were incubated at 24 $\pm$ 2 C, 16 h photoperiod under fluorescent light.

***Batteri endofiti influenzano il
metabolismo della pianta nella
produzione di molecole bioattive***

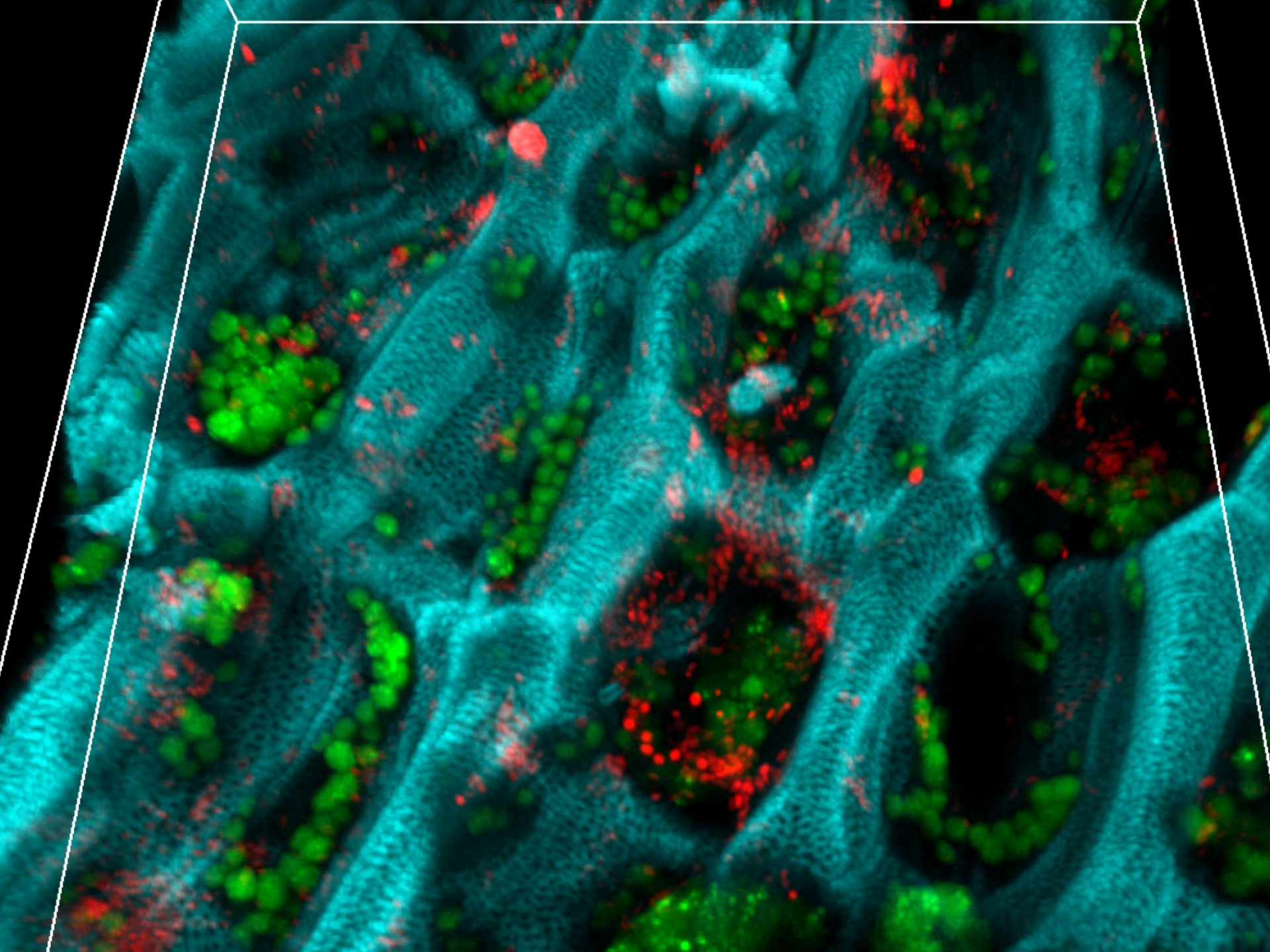
Maggini et al (Scientific reports) (in press)



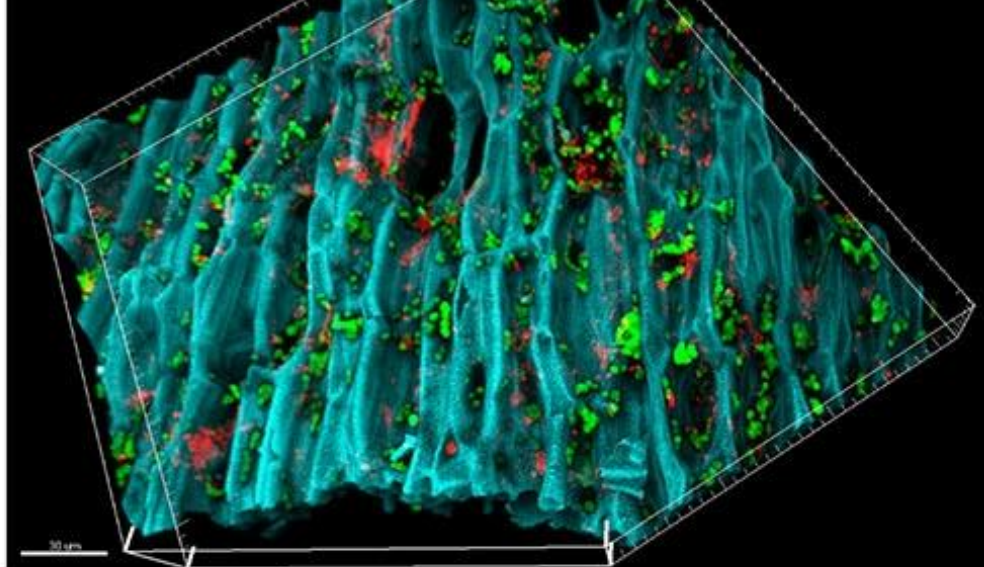
?



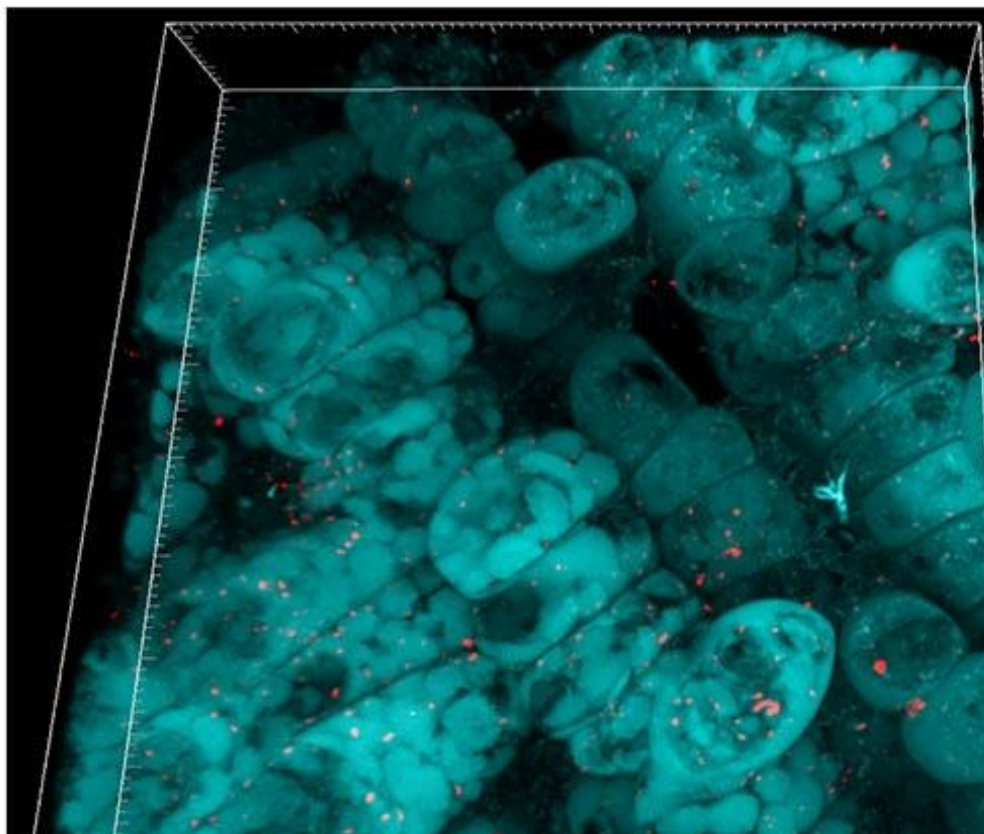
*E' possibile che i batteri endofiti siano
già
dentro i semi
delle piante medicinali?*



ESTERNO SEME



INTERNO SEME



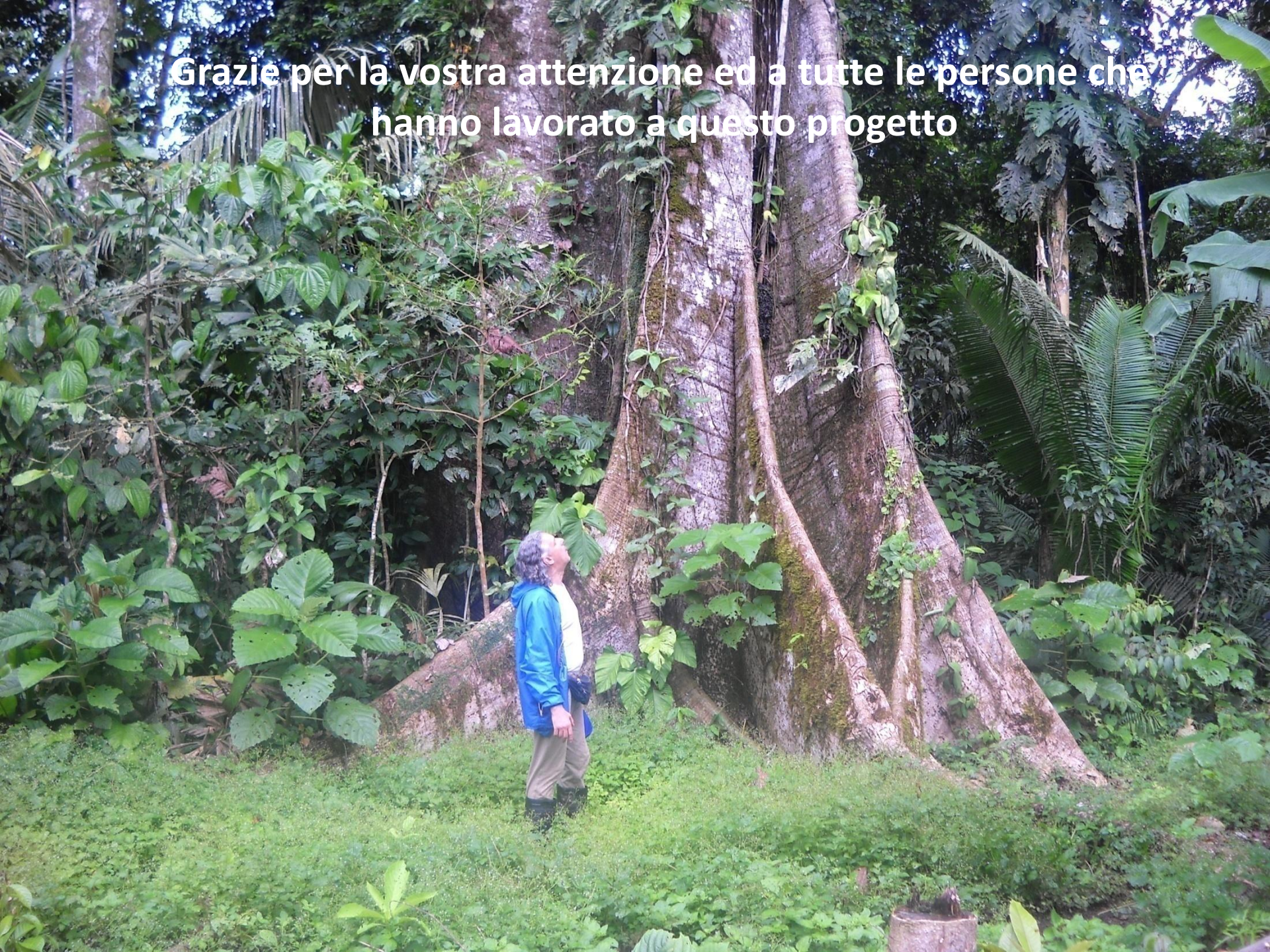


Un "tesoro
metabolico" da un
mondo invisibile



Un oceano
"infinito" di
molecole
potenzialmente
utili

Grazie per la vostra attenzione ed a tutte le persone che
hanno lavorato a questo progetto



Gruppi di ricerca

Dipartimento di Biologia:

Renato Fani, Alessio Mengoni, Patrizia Bogani, Isabel Maida, Elena Perrin, Marco Fondi, Valerio Orlandini, Emanuele Bosi, Elisangela Miceli, Alice Checcucci, Carolina Chiellini, Camilla Fagorzi, Luana Presta, Giovanni Bacci

Dipartimento di Sanità Pubblica:

Antonella Lo Nostro, Giovanna Pesavento,

Dipartimento di Chimica:

Annarita Bilia

Centro di Medicina Integrativa di Firenze:

Fabio Firenzuoli, Luigi Gori, Alfredo Vannacci, Eugenia Gallo, Valentina Maggini

Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura-- (CRA-ABP)

Stefano Mocali, Arturo Fabiani, Carolina Chiellini

CNR di Firenze:

Giovanni Emiliani

Giardino delle Erbe di Casola Valsenio:

Sauro Biffi

