

of zwerfhonden uit voor *E. granulosus* endemische gebieden als Roemenië en de landen rond de Middellandse zee zoals Spanje, Italië, Griekenland en Marokko, waar *E. granulosus* ook endemisch voorkomt. Ook het meeneemen van honden naar deze vakantiegebieden levert mogelijk een *E. granulosus*-infectie op. Het is aan te bevelen om deze 'vakantiegangers' bij terugkomst te behandelen met een anthelminticum dat ook werkzaam is tegen *Echinococcus* zoals praziquantel (5 milligram per kilogram, oraal).

#### DANKBETUIGING

We danken Manoj Fonville, RIVM, voor het parasitologisch- en DNA-typeringsonderzoek van cystemateriaal en Herman Cremers voor het ter beschikking stellen van de historische parasitologische database. Medewerkers van het vwa Laboratorium Wageningen worden bedankt voor het microscopisch onderzoek.

#### LITERATUUR

- Bart JM, Morariu S, Knapp J, Ilie MS, Pitulescu M, Anghel A, Cosoroaba I and Piarroux R. Genetic typing of *Echinococcus granulosus* in Romania. *Parasitol Res* 2006; 98: 130-137.
- Bowles J, Blair D and McManus DP. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1992; 54: 165-174.
- Bowles J and McManus DP. NADH Dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the *Echinococcus*. *International Journal for Parasitology* 1993; 23: 969-972.
- Eckert J and Thompson RC. Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphasis on their infectivity to humans. *Acta Tropica* 1997; 64: 19-34.
- Iacobiciu I, Siko-Barabasi S, Olariu R, Stefanoiu V, Darabus G and Tirnea L. Investigations on the spread of hydatidosis in humans in Caras-Severin county. *J Rom Parasitol* 2003; 13: 27-30.
- Jaarverslag 1980 Veterinaire Dienst: veterinaire inspectie (1985).
- Jenkins DJ, Romig T and Thompson RC. Emergence/re-emergence of *Echinococcus* spp. - a global update. *Int J Parasitol* 2005; 35: 1205-1219.
- Junie M, Coroiu Z and Costache C. (2000) Epidemiological aspects on hydatidosis in Cluj-Napoca. *J Rom Parasitol* 2000; 10: 8-11.
- Lavikainen A, Lehtinen MJ, Laaksonen S, Agren E, Oksanen A and Meri S. Molecular characterization of *Echinococcus* isolates of cervid origin from Finland and Sweden. *Parasitology* 2006; 133: 565-570.
- McManus DP and Thompson RC. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology* 2003; 127 (Suppl): S37-S51.
- Romig T, Dinkel A and Mackenstedt U. The present situation of *Echinococcosis* in Europe. *Parasitology Intern* 2006; 55: S187-S191.
- Seres S, Avram E and Cozma V. Detection of *Echinococcus coproantigen* by ELISA in dogs from the North-West of Romania. *Bulletin USAMV-CN* 2006; 63: 395-398. ISSN 1454-2382.
- Seres S, Radoi LB, Gherman BI and Cozma V. Detection of *Echinococcus coproantigen* by ELISA in dogs from Cluj County. *Revista Romana de Parazitologie* 2007; Supliment XVII: 164.
- Tenhaeff C en Ferwerda S. (1937) De geschiedenis der *echinococcosis* en haar bestrijding in Friesland in het tijdvak 1916-1937. *Tijdschr Diergeneeskd* 1937; 64: 678-681.
- Titulinica A. Prevalence of *E. granulosus* infestation in animals slaughter in a slaughterhouse from Brasov County. Personal communication, 2007.
- Yildirim M, Erkan N and Vardar E. Hydatid cysts with unusual localizations: diagnostic and treatment dilemmas for surgeons. *Ann Trop Med Parasitol* 2006; 100: 137-142.

## Antibacteriële activiteit van vluchtige oliën: toepassingen in voedingsmiddelen en diervoeders

S.A. Burt, S.B.A. Halkes en F. van Knapen

#### INLEIDING

Vluchtige oliën zijn aromatische oliën die verkregen zijn uit planten door middel van stoomdestillatie. Ze zijn al lange tijd in gebruik als geur- en smaakstoffen en als voederadditieven. Recentelijk is de interesse van wetenschappers voor de chemische samenstelling en de biologische effecten van vluchtige oliën toegenomen. Vooral de mogelijkheid om bacterieremmende stoffen uit deze oliën te isoleren, krijgt tegenwoordig veel aandacht. Een voorbeeld is het ontwikkelen van conserveringsmiddelen met een 'natuurlijk' karakter voor gebruik in voedingsmiddelen. Bovendien is er steeds meer aandacht voor het gebruik van plantenextracten in veevoeders en andere diervoeding. Mogelijk is hierdoor het aantal ziekteverwekkende bacteriën in de voedselproductieketen terug te dringen.

Het doel van het in dit artikel beschreven onderzoek was om de antibacteriële eigenschappen van vluchtige oliën afkomstig van kruiden nader te definiëren. In verschillende experimenten is nagegaan bij welke concentraties en onder welke omstandigheden vluchtige oliën en hun bestanddelen werkzaam zijn tegen bepaalde ziekteverwekkende bacteriën die in voedingsmiddelen kunnen voorkomen, met name *Escherichia coli* O157:H7 en *Salmonella enterica* serotype Enteritidis.

#### VLUCHTIGE OLIËN EN VOEDSELGERELATEERDE ZIEKTEVERWEKKENDE BACTERIËN

Diverse in de literatuur beschreven laboratoriumexperimenten hebben aangetoond dat vluchtige oliën actief zijn tegen verschillende zoönotische bacteriën, waaronder *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus cereus* en *Staphylococcus aureus*. Gramnegatieve organismen zijn in het algemeen iets minder gevoelig dan Grampositieve organismen. Van

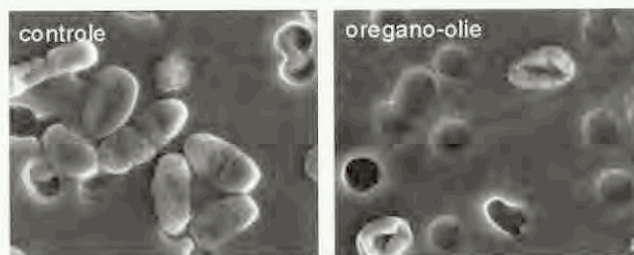


een aantal componenten van vluchtige oliën is de antibacteriële werking aangetoond – bijvoorbeeld van carvacrol, thymol, eugenol, perillaldehyde en cinnamaldehyde – met minimum inhiberende (remmende) concentraties (MIC's) van 0,05 tot 5 microliter per milliliter ( $\mu\text{l/ml}$ ) onder laboratoriumomstandigheden. Een twee tot honderd keer hogere concentratie is nodig om hetzelfde effect te bereiken in voedingsmiddelen. Onderzoek met vers vlees, vleesproducten, vis, melk, zuivelproducten, groenten, fruit en gekookte rijst heeft aangetoond dat de concentratie die nodig is om een significant antibacterieel effect te bereiken, in voedingsmiddelen ligt rond de 0,5 tot 20  $\mu\text{l}$  per gram en in oplossingen voor het schoonspelen van groente of fruit rond de 0,1 tot 10  $\mu\text{l/ml}$ . Vluchtige oliën bevatten een groot aantal bestanddelen met verschillende chemische eigenschappen. Het is daarom mogelijk dat het werkingsmechanisme van een bepaalde vluchtige olie berust op een effect op meerdere aangrijpingspunten in de bacterie. De hydrofobe eigenschappen van de oliën leiden er waarschijnlijk toe dat zij worden opgenomen in het vette gedeelte van het celmembraan. De membraan wordt daardoor permeabel en de celinhoud kan weglekken. Het is ook mogelijk dat de energievoorziening van de cel door de olie wordt aangetast. Enkele bestanddelen van vluchtige oliën zijn goedgekeurd als smaakstoffen in de Europese Unie en de Verenigde Staten. Bij gebruik voor antibacteriële doeleinden kunnen ongewenste sterke smaakafwijkingen worden beperkt door de vluchtige oliën zorgvuldig te selecteren, afhankelijk van het soort voedingsmiddel. We kunnen concluderen dat een aantal vluchtige oliën actief is tegen voedselgerelateerde ziekteverwekkende bacteriën maar dat een hogere concentratie nodig is in voedingsmiddelen om hetzelfde effect te bereiken in vergelijking met laboratoriumomstandigheden. De fenolachtige bestanddelen in vluchtige oliën, zoals carvacrol, thymol en eugenol, lijken het meest actief tegen bacteriën.

#### ANTIBACTERIËLE ACTIVITEIT VAN ENKELE VLUCHTIGE OLIËN TEGEN *E. COLI* O157:H7

Besmetting van voedingsmiddelen met *E. coli* O157:H7 vormt wereldwijd een toenemend gezondheidsrisico. Deze *E. coli*-stam kan worden aangetroffen op vlees en vleesproducten, melk, yoghurt, water, salades en vruchten(sappen) en kan leiden tot (ernstige) diarree, met name bij jonge kinderen en ouderen, en nierbeschadigingen. Door voedsel goed te koken of te pasteuriseren, kan *E. coli* O157:H7 eenvoudig worden gedood. Een verhittingsstap tijdens de bereiding is echter niet voor alle voedingsmiddelen wenselijk en tevens kan kruisbesmetting optreden bij de voedselbereiding. Daarom blijft het terugdringen van besmettingen met *E. coli* O157:H7 of het reduceren van de groei van deze bacterie belangrijk binnen de voedselverwerkende industrie.

In een eerste serie experimenten zijn de effecten op *E. coli* O157:H7 onderzocht van vijf vluchtige oliën waarvan bekend was dat ze enige antibacteriële werking hebben. Deze experimenten zijn uitgevoerd bij drie verschillende temperaturen en ook is gekeken naar de invloed van de



Figuur 1. Het effect van oregano-olie op *E. coli* O157:H7. Onbehandelde bacteriën vertonen een enigszins langgerekte, cilindervormige celstructuur (links). Oregano-olie in een dosering van 625  $\mu\text{l/l}$  veroorzaakt duidelijke beschadigingen aan de bacteriecelwand (rechts). Foto's gemaakt met een elektronenmicroscop (12.000 maal vergroting).

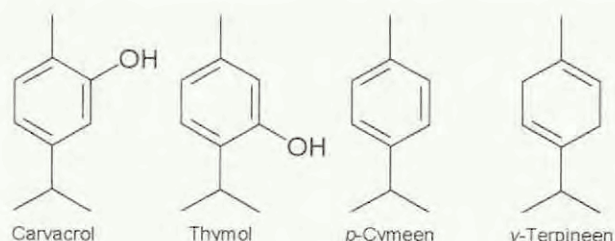
toevoeging van een verdikkingsmiddel (agar) en een emulgator (lecithine) op de antibacteriële eigenschappen.

Vluchtige oliën van oregano (*Origanum vulgare*) en tijm (*Thymus vulgaris*; zowel lichte en rode tijmolie) vertoonden de sterkste antimicrobiële werking, gevolgd door West-Indische laurier (*Pimenta racemosa*) en kruidnagel (*Syzygium aromaticum*). Oregano-olie was in staat *E. coli* O157:H7 te doden bij een concentratie van 625  $\mu\text{l/l}$  bij 10, 20 en 37 graden Celcius. Reeds na één minuut was deze concentratie in staat alle aanwezige bacteriën te doden. De toevoeging van 0,05 procent agar versterkte de antibacteriële eigenschappen, vooral bij 10 graden Celcius, terwijl 0,25 procent lecithine de antibacteriële activiteit juist verzwakte. Foto's gemaakt met behulp van een elektronenmicroscop lieten zien dat bacteriën die behandeld waren met oregano-olie, aanzienlijke beschadigingen vertoonden (figuur 1). De conclusie van dit onderzoek was dat oregano- en tijmolie onder laboratoriumomstandigheden goed in staat zijn de groei en levensvatbaarheid van *E. coli* O157:H7 tegen te gaan. Deze eigenschappen werden aangetoond bij verschillende temperaturen. Toevoeging van een verdikkingsmiddel versterkte de antibacteriële activiteit van de vluchtige oliën. Dit wordt mogelijk veroorzaakt doordat het verdikkingsmiddel de stabiliteit van het mengsel van vluchtige olie in water vergroot. Door de toevoeging van een emulgator werd de antibacteriële activiteit van de vluchtige oliën verzwakt. Dit zou het gevolg kunnen zijn van een fysieke verhindering van de interactie tussen de vluchtige olie en de bacteriële celwand (doordat de emulgator zich in oplossing positioneert op het grensvlak van de oliemicellen en de waterige fase). Ook is het mogelijk dat de antibacteriële activiteit van de vluchtige oliën berust op een interactie met de fosfolipiden in de bacteriecelwand en dat de emulgator als extra bron van fosfolipiden deze interactie negatief beïnvloedt.

#### IDENTIFICATIE VAN DE ANTIBACTERIËLE INHOUDSSTOFFEN IN OREGANO- EN TIJMOLIE

Door middel van verschillende chromatografische technieken (high-performance liquid chromatography met uv detectie en liquid chromatographic tandem massa spectrometrie) identificeerden we de belangrijkste componenten in oregano- en tijmolie. Carvacrol, thymol,  $p$ -cymeen en  $\gamma$ -terpineen werden als hoofdbestanddelen





Figuur 2. Carvacrol, thymol, *p*-cymeen en  $\gamma$ -terpineen werden geïdentificeerd als de hoofdbestanddelen in de vluchtige olie van oregano en tijm. Van deze verbindingen vertoonden carvacrol en thymol de hoogste antibacteriële activiteit.

aangetoond (figuur 2). De MIC-waarde en de minimum biocide (dodelijke) concentratie (MBC) van de bestanddelen carvacrol, thymol, *p*-cymeen en  $\gamma$ -terpineen werden bepaald voor een *E. coli* O157:H7-stam die was geïsoleerd uit rundermest. Voor de meest actieve stoffen – de twee fenolische componenten carvacrol en thymol – was de MIC 1,2 milliMolair (mM). *p*-Cymeen en  $\gamma$ -terpineen vertoonden geen antibacteriële werking tot en met een concentratie van 50 mM. Er werd geen interactie (synergie of antagonisme) tussen de verschillende stoffen vastgesteld.

Verder onderzochten we het effect van toevoeging van de verdikkingsmiddelen agar of carrageenan op toxische, maar niet dodelijke, concentraties van carvacrol. Beide verdikkingsmiddelen versterkten de werking van carvacrol, waarschijnlijk ten gevolge van de bovenbeschreven toegenomen stabiliteit die door de dikkere consistentie de ontmenging van de apolaire carvacrol-micellen uit de waterige bouillon vertraagde. Het verdikkingsmiddel verbeterde de werking van carvacrol niet indien carvacrol voorafgaand aan het experiment in alcohol werd opgelost.

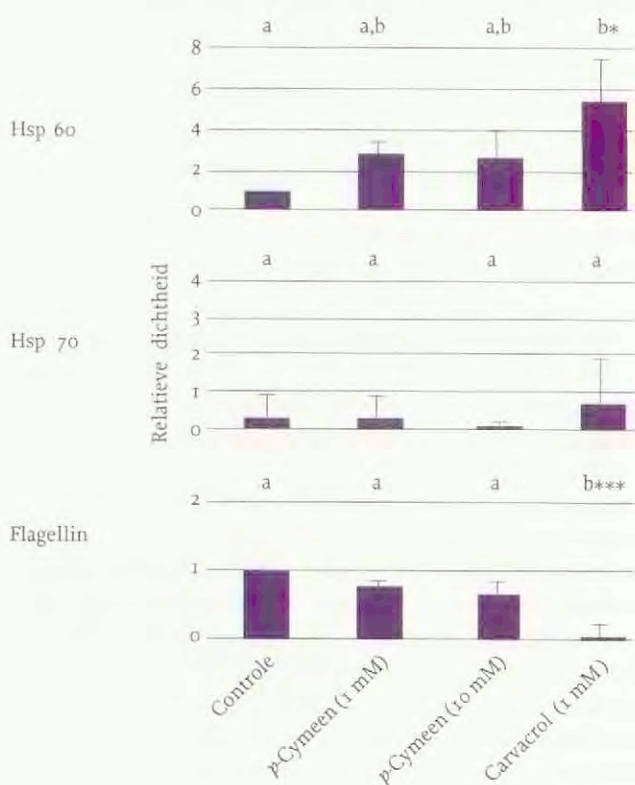
**EFFECT VAN CARVACROL OP DE BACTERIËLE EIWIIT-SYNTHESE**

In een volgende serie experimenten onderzochten we de invloed van carvacrol op de eiwitproductie van de bacterie. Na incubatie gedurende zestien uur met een toxische maar niet dodelijke concentratie carvacrol, werden bacteriën van een referentiestam van *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895) geoogst en onderzocht op de eiwitsamenstelling. Dit gebeurde door middel van polyacrylamide gelelectroforese en Western blotting. De aanwezigheid van carvacrol bleek bacteriën aan te sporen tot het maken van significante hoeveelheden van een bepaald stress eiwit (heat shock protein) HSP60 (figuur 3). Het was al bekend dat dit eiwit door de bacterie wordt aangemaakt bij blootstelling aan ongunstige omstandigheden, zoals onder meer hoge temperatuur. Dat carvacrol dit effect ook bewerkstelligt, was nog niet eerder bekend. Een andere opmerkelijke bevinding in dit onderzoek was dat door de aanwezigheid van carvacrol de aanmaak van het eiwit flagellin werd stopgezet (figuur 3 en 4). Dit had als resultaat dat de bacteriën geen flagella (zweephaartjes) ontwikkelden en dus niet langer beweeglijk waren. Bacteriën gebruiken flagella om zich voort te bewegen.

Van een aantal bacteriesoorten is bekend dat zij met functionele flagella makkelijker de darm kunnen koloniseren en ziekteverschijnselen kunnen veroorzaken. Wanneer een praktische manier kan worden gevonden om carvacrol zodanig in voedingsmiddelen toe te passen dat ziekteverwekkende bacteriën geen flagella kunnen ontwikkelen, zou de kans op infecties kunnen worden verkleind. Dit zou zowel bij de mens als bij landbouwhuisdieren van toepassing kunnen zijn. De niet antimicrobiële stof *p*-cymeen had geen significant effect op de aanmaak van stress eiwitten of flagellin, wat lijkt te suggereren dat deze effecten gerelateerd zijn aan de antibacteriële werking van carvacrol. Deze resultaten geven aan dat bacteriën die zijn behandeld met carvacrol, in een stresstoestand verkeren (verhoging van de HSP60-synthese), waarbij de aanmaak van flagellin en daardoor de ontwikkeling van flagella worden verhinderd.

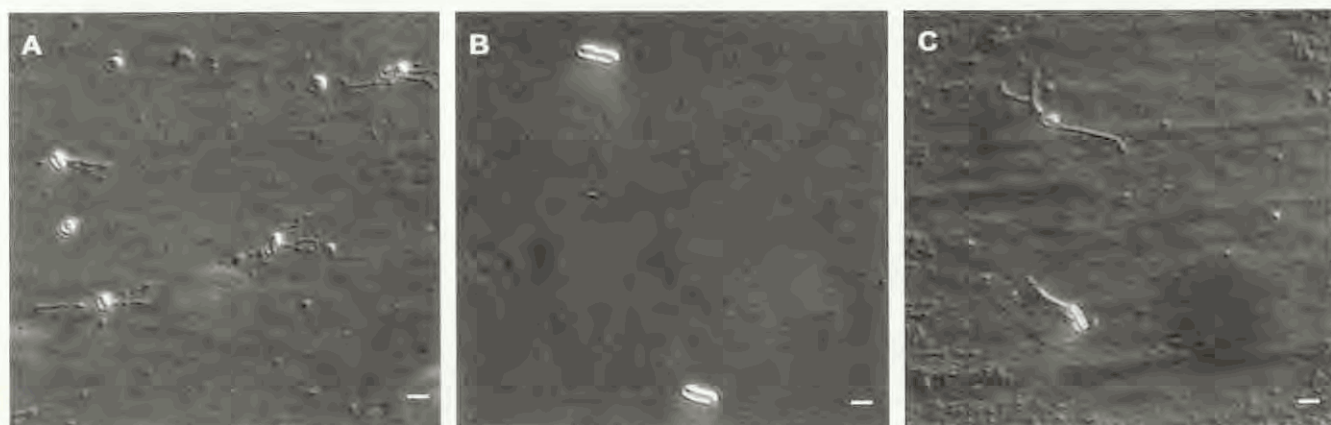
**CARVACROLDAMP ALS DECONTAMINATIEMIDDEL**

Een mogelijke toepassing van carvacrol kan zijn het oppervlak van vers vlees te ontdoen van bacteriën. Omdat carvacrol heel makkelijk verdampt, zou het mogelijk zijn deze stof in dampvorm toe te passen in plaats van in vloeibare vorm. Wellicht kan op deze wijze ook de geuren smaakoverdracht van carvacrol op het vlees worden verminderd. In een laatste serie experimenten is de



Figuur 3. Het effect van carvacrol en *p*-cymeen op de eiwitsynthese van *E. coli* O157:H7 (referentie-stam ATCC 43895). De balkjes geven de relatieve dichtheid weer van de betreffende eiwitbandjes uit de Western blot-analyse (gemiddelde  $\pm$  standaarddeviatie, drie onafhankelijke experimenten). Significante verschillen tussen de groepen worden weergegeven met verschillende letters (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).





Figuur 4. Het effect van carvacrol en *p*-cymeen op de eiwitsynthese van *E. coli* 0157:H7 (referentiestam ATCC 43895); normale bacteriën met flagella (foto A), bacteriën zonder flagella in medium dat 1mM carvacrol bevat (foto B) en bacteriën met flagella in medium dat 1mM *p*-cymeen bevat (foto C).

effectiviteit van carvacrol damp op bacteriën groeiend op petrischalen en op bacteriën die waren aangebracht op stukjes rauwe kipfilet getest. Hiervoor gebruikten we de bacterie *Salmonella enterica* serotype Enteritidis, omdat deze bacteriestam (vaker dan *E. coli* 0157:H7) is geassocieerd met voedselinfecties na het eten van kipgerechten.

In het experiment met bacteriën op petrischalen, nam de grootte van de remmingzone toe naarmate de blootstellingperiode, de temperatuur of de hoeveelheid carvacrol damp toenam. De aan- of afwezigheid van zuurstof had geen invloed op de remming. Carvacrol damp was ook op kipfilet effectief in het remmen van de uitgroei van *Salmonella* bacteriën bij 4 graden Celcius, wat aangeeft dat de techniek mogelijkheden biedt voor toepassing in de praktijk. Vlees wordt immers opgeslagen, vervoerd en verkocht bij lage temperaturen. Het was mogelijk om de behandeling zo uit te voeren dat op de kip geen levende bacteriën werden teruggevonden. Hiervoor was wel een dampbehandeling bij hogere temperaturen nodig, namelijk gedurende minimaal drie uur bij 37 graden Celcius. Op basis van deze resultaten kan worden geconcludeerd dat het afhankelijk van de geselecteerde temperatuur- en tijdcombinatie met behulp van carvacrol damp mogelijk is *Salmonella enterica* serotype Enteritidis op stukjes rauwe kip in de groei te remmen of volledig uit te schakelen.

#### CONCLUDEREND

Van de voor dit onderzoek geselecteerde vluchtige oliën bleek oregano-olie de meest effectieve antibacteriële olie en bleek carvacrol een van de belangrijkste antibacteriële

componenten van deze olie. Momenteel worden vervolgstudies uitgevoerd om meer te weten te komen over het precieze werkingsmechanisme waardoor carvacrol de groei van bacteriën verhindert. De manier waarop het molecuul de ontwikkeling van bacteriële flagella beïnvloedt, is eveneens onderwerp van verdere studie. Verder is het van belang na te gaan welke specifieke componenten binnen de bacterie door carvacrol worden beschadigd. Bovendien is het interessant te onderzoeken of carvacrol onder praktijkomstandigheden (bijvoorbeeld toegevoegd aan veevoeder) de vorming van flagella bij ziekteverwekkende bacteriën kan voorkomen. Wellicht leidt dit tot het ontwikkelen van middelen die de kolonisatie van *E. coli* 0157:H7, *Salmonella* en *Campylobacter* in de darm kunnen verminderen, zodat ontstekingsreacties in de darm en de kans op infecties met deze bacteriën bij landbouwhuisdieren en mensen kunnen worden verkleind.

Dr. Sara Burt (corresponderende auteur), Institute for Risk Assessment Sciences (IRAS), divisie Veterinaire Volksgezondheid, faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht. (s.a.burt@uu.nl). Dr. Bart Halkes, PhytoGeniX b.v., departement Farmaceutische Wetenschappen, faculteit Bètawetenschappen, Universiteit Utrecht. Prof. dr. Frans van Knapen, Institute for Risk Assessment Sciences (IRAS). Dit artikel is een samenvatting van het proefschrift 'Antibacterial activity of essential oils', waarop Sara Burt op 29 november 2007 is gepromoveerd.