

Essentiële oliën: een alternatief voor antibiotica?

Door: Marit A.J. Nederlof¹, Ellen J. Weerman², Marleen M.P. Vrij³ en Olga L.M. Haenen²

1: Aquaculture and Fisheries Group, Wageningen UR, 2: HAS Hogeschool, 's-Hertogenbosch, 3: NGN Products, 's-Hertogenbosch

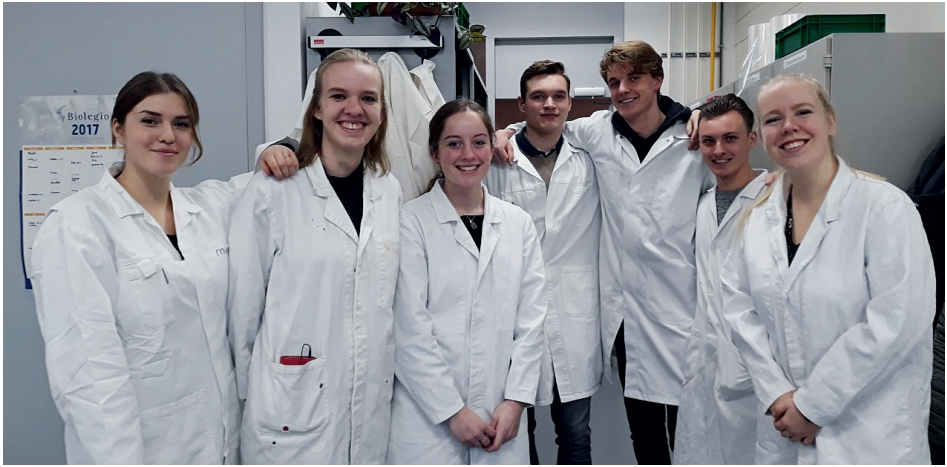
De toenemende bacterieresistentie tegen antibiotica bij de mens en in de aquacultuur vraagt om alternatieven. Op de HAS Hogeschool is, in samenwerking met de Wageningen Universiteit en NGN Products, via in vitro studies getest of essentiële oliën een remmend effect hebben op de groei van twee veelvoorkomende pathogenen in de garnalenteelt: *Vibrio harveyi* en *Vibrio alginolyticus*. De geteste essentiële oliën lieten een vergelijkbare, of significant hogere remming zien dan het antibiotica oxytetracycline. Vooral oregano en tijm lijken veelbelovend in de garnalenteelt en mogelijk ook in de productie van visvoerders.

De noodzaak van alternatieven voor antibiotica

De toenemende vraag naar (dierlijke) eiwitten heeft ertoe bijgedragen dat in de afgelopen decennia de aquacultuursector, met name in Azië, sterk gegroeid is. De verwachting is dat ook in de komende jaren deze sector zal blijven groeien (1). Intensivering heeft een belangrijke rol gespeeld om de sterke groei te kunnen realiseren, maar met een keerzijde. Zo heeft intensievere kweek geresulteerd in een toename van (infectie)ziekten bij vis en schaaldieren, onder andere door meer dier-tot-diercontact en verhoogde stress, beide inherent aan hoge kweekdichtheden (2). Deze (infectie)ziekten remmen de groei van de aquacultuursector en veroorzaken enorme economische verliezen: naar schatting enkele miljarden euro's per jaar (3). Net als in andere productiesectoren waarin met dieren wordt gewerkt, wordt ook in de aquacultuur gebruik gemaakt van antibiotica voor de bestrijding, en soms preventie, van bacteriële infecties (4). Het veelvuldig gebruik van

antibiotica is echter omstreden. Zo is ontwikkeling van antibioticumresistentie, gedreven door veelvuldig en onverantwoord antibioticumgebruik bij zowel mens als dier, een wereldwijd probleem voor de volksgezondheid. Resistentie kan onder andere leiden tot het niet meer kunnen behandelen van ernstige bacteriële infecties door resistente bacteriestammen, langere ziekenhuisverblijven en meer sterftegevallen onder mensen (5).

Cijfers over het daadwerkelijke gebruik van antibiotica in de internationale aquacultuursector zijn schaars, mede omdat slechts een beperkt aantal landen wereldwijd het gebruik reguleert en registreert (4). Het toedienen van antibiotica gebeurt veelal óf via het voer óf door directe toevoeging aan het water waar de vissen in zwemmen. Voor beide methodes geldt dat de behandeling van de gehele groep dieren automatisch resulteert in een verhoogd antibioticagebruik ten opzichte van het individueel behandelen van dieren (6). Daarnaast komt een deel van de antibiotica, zogenoemde residuen,



De studenten die de *in vitro* proeven hebben uitgevoerd, v.l.n.r. Lisa van de Biggelaar, Renske Boelens, Mayke Claessens, Pelle van Rossem, Rens Koper, Martijn Klaver en Aniek ter Heerdt.

in het milieu via niet-geconsumeerd voer en met antibiotica vervuuld water en mest(7). Zowel het veelvuldige gebruik, alsmede de residuen die in het milieu terecht komen, hebben geleid tot resistentieontwikkeling in verschillende aquacultuur-gerelateerde pathogenen (4). Hierdoor kunnen bepaalde infectieziekten, ook die van vis en garnalen, niet langer behandeld worden met antibiotica. In de siervissector in landen buiten Europa worden ook veel antibiotica gebruikt. Vaak preventief, toegevoegd aan het transportwater van de vissen (8). Alternatieve methoden en behandelingen om bacteriële infecties in aquacultuur te voorkomen en bestrijden zijn dus noodzakelijk. Niet alleen voor de sector, maar ook voor de volksgezondheid. In Nederland is de aquacultuursector zich overigens bewust van de risico's van antibioticumgebruik en wordt derhalve minimaal antibiotica gebruikt.

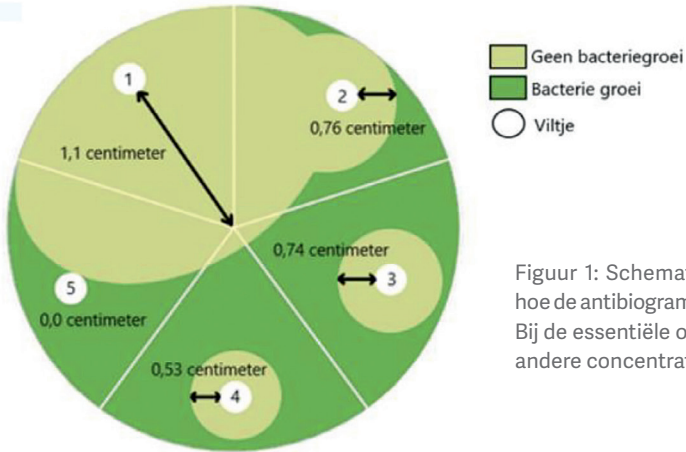
Essentiële oliën

In de zoektocht naar alternatieven voor antibiotica is interesse ontstaan naar medicinale planten, waaronder kruiden en essentiële oliën verkregen vanuit kruiden (9,10). Essentiële oliën (niet te verwarren met essentiële vetzu-

ren) worden ook wel etherische oliën genoemd en zijn aromatische, vluchtige, olieachtige vloeistoffen die worden gewonnen uit plantmateriaal. Het zijn de substanties die planten hun specifieke geur geven. Essentiële oliën zijn complexe mengsels en variëren zowel in chemische samenstelling als in concentratie van individuele bestanddelen. De antibacteriële werking wordt met name toegeschreven aan essentiële oliën met fenolische verbindingen (10). Studies hebben aangetoond dat essentiële oliën positieve effecten kunnen hebben op de groei en het immuunsysteem van verschillende vissoorten. Daarnaast kunnen ze verschillende infectieziekten voorkomen (10). Essentiële oliën lijken daarom een interessant alternatief voor antibiotica.

Op de HAS Hogeschool wordt al een aantal jaar

Essentiële oliën uit kruiden zijn een mogelijk alternatief voor antibiotica in de aquacultuur.



Figuur 1: Schematische weergave van hoe de antibiogramproef werd afgelezen. Bij de essentiële oliën had elk viltje een andere concentratie.

gewerkt aan het verduurzamen van garnalenvoeders door het gebruik van insecten als alternatief voor vismeel. NGN Products heeft hier een nieuw proces voor ontwikkeld. Daarnaast gebruikt NGN Products kruiden in andere diervoeders, waardoor de link met het onderzoek naar kruiden in garnalenvoer gauw gemaakt werd. In het algemeen heeft de garnalenteelt veel te kampen met problemen die gerelateerd zijn aan bacteriële infecties. Zo kunnen infecties door *Vibrio* spp. vibriose veroorzaken. Bij verschillende *Vibrio* spp. is aangetoond dat ze resistent zijn voor veelgebruikte antibiotica (11). Het toevoegen van essentiële oliën aan garnalenvoeders zou mogelijk een positief effect kunnen hebben op de gezondheid van garnalen, waardoor het antibioticumgebruik verminderd kan worden. Als eerste stap hebben tweedejaars studenten Toegepaste Biologie (zie foto) in een *in vitro* studie gekeken naar het effect van acht verschillende essentiële oliën, verkregen uit kruiden, op een mogelijke remming van de bacteriën *Vibrio harveyi* en *Vibrio alginolyticus*.

Materiaal en Methode

Experimentele opzet

Om te onderzoeken of essentiële oliën van verschillende kruiden een remmend effect

kunnen hebben op de groei van de bacteriën *Vibrio harveyi* en *Vibrio alginolyticus* is per bacterie een antibiogramproef uitgevoerd volgens de Kirby-Bauer methode (12). De acht geteste essentiële oliën: tijm, rozemarijn, kaneel, knoflook, basilicum, lavendel, salie en oregano (De Tuinen, Essentiële Olie, Holland & Barrett, Nederland).

Voor de antibiogramproef is eerst een inoculum gemaakt, waarbij TCBS-agar (Thiosulfate-Citrate-Bile-Salts-Sucrose-agar) is beënt met afzonderlijk *V. harveyi* en *V. alginolyticus* (verkregen van het visziektelaboratorium van Wageningen Bioveterinary Research, Lelystad). Dit is vervolgens in petrischalen (Greiner bio-one, 94 mm x 16 mm) gegoten op basis van de gietplaatmethode (13). Op elke petrischaal zijn daarna 5 viltjes met verschillende concentraties van een essentiële olie van hetzelfde kruid geplaatst (Figuur 1). De gebruikte concentraties waren 0, 0,1, 0,25, 0,5 en 1 ml/ml, en werden verkregen door de essentiële olie te mengen (10 sec vortex) met fysiologisch zout (0,9% natriumchloride). Elk kruid is per bacterie en per concentratie in triplo getest (n=3). Per bacterie is ook een positieve en een negatieve controle getest. Het veelgebruikte antibioticum oxytetracycline (10) fungeerde als positieve controle (30 µgram per viltje). De negatieve controle be-

stond uit fysiologisch zout (0,9% natriumchloride), dat vergelijkbaar is met de leefomgeving van *V. harveyi* en *V. alginolyticus*, die beide zoutminnend zijn (14). Voor zowel de positieve als de negatieve controle zijn, voor elke bacterie, 3 petrischalen gebruikt elk met 5 viltjes. Na het opbrengen van de viltjes is elke petrischaal 3 dagen geïncubeerd bij een temperatuur van 25 °C.

Metingen

De mogelijke remming van de essentiële oliën op de groei van de twee bacteriën is bepaald door de zogenoemde remzone te meten na 3 dagen incubatie in de petrischalen. Daarvoor is de petrischaal verdeeld in vijf taartpunten van gelijke grootte: een voor elk viltje. De afstand van de rand van elk viltje tot de dichtstbijzijnde groei van de bacterie werd gemeten (Figuur 1). Hoe groter de afstand van het viltje tot de bacteriegroei, des te groter de remzone, en des te groter het remmende effect van de stof op de bacteriegroei. Wanneer er binnen een taartpunt geen groei waargenomen werd, is de maximale remming toegeschreven (1,1 cm zie Figuur 1).

Data-analyse

Statistische analyses zijn uitgevoerd met het programma *IBM Statistics SPSS 25*. Voor de positieve controle is eerst per petrischaal het gemiddelde van de 5 viltjes berekend ($n=3$). Omdat er bij de negatieve controle geen remming optrad, is deze niet meegenomen in de statistische test. Mogelijke statistische verschillen in remzone tussen de 8 kruiden en de positieve controle zijn getest met een *one-way ANOVA*, gevolgd door een *Tukey post-hoc* test. Verschillen worden significant beschouwd bij een *p*-waarde kleiner dan 0,05.

Resultaten en discussie

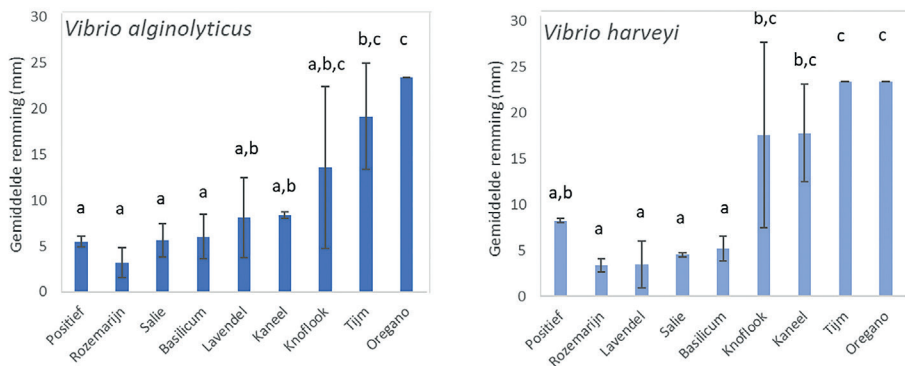
De resultaten van dit onderzoek laten zien dat al bij de laagst geteste concentratie (0,1 ml/ml) alle essentiële oliën een remmende werking hebben op beide bacteriën. Essentiële oliën van

tijm en oregano lieten zelfs een significant sterkere remming zien dan het antibioticum oxytetracycline (Figuur 2). In de negatieve controle werd geen enkele remming waargenomen, waardoor aangenomen kan worden dat het fysiologisch zout, gebruikt om de essentiële oliën te verdunnen, geen rol heeft gespeeld in de remming.

Eerdere studies hebben ook aangetoond dat oregano en tijm een remmende werking kunnen hebben op de groei van verschillende bacteriesoorten, waaronder *V. alginolyticus* en *V. harveyi* (15, 16). Deze kruiden behoren tot de familie van lipbloemigen en bevatten de stoffen carvacrol en thymol, die erom bekend staan een sterke antibacteriële werking te hebben. Toevoeging van carvacrol aan het voer verminderde bijvoorbeeld de sterfte aan een *V. alginolyticus*-infectie bij zeebaars (17). Een *in vitro* studie heeft aangetoond dat thymol een sterke remming kan hebben op verschillende vis-gerelateerde pathogenen, waaronder een aantal *Vibro* spp. (18). Daarnaast kunnen carvacrol en thymol een synergistisch effect hebben, waardoor aanwezigheid van beide stoffen zorgt voor een extra sterke remming van de bacteriegroei (19). Essentiële oliën kunnen op verschillende manieren bacteriële infecties tegengaan en hun werking is afhankelijk van de aanwezige bestanddelen en concentratie in een essentiële olie. Bestanddelen zoals carvacrol en thymol beschadigen het bacteriemembraan, hetgeen bacteriën doodt. Er zijn echter ook essentiële oliën die bij bepaalde concentraties niet direct de bacteriën doden, maar het communicatiemechanisme van de bacteriën ver-



Zelfs de kleinste verdunning van olie uit oregano en tijm was 3 tot 4 keer effectiever dan antibiotica.



Figuur 2: Gemiddelde remming met standaarddeviatie van oxytetracycline (positieve controle, n=3) en de 8 verschillende essentiële oliën (concentratie 0,1 ml/ml, n=3) op de groei van *V. alginolyticus* (linker grafiek) en *V. harveyi* (rechter grafiek). De negatieve controle (fysiologisch zout) gaf bij beide bacteriën geen remming. Gemiddelden waarbij de letters niet overeenkomen, verschillen significant van elkaar.

storen, waardoor ze minder schadelijk worden. In een recente studie is aangetoond dat oregano bijvoorbeeld het communicatiemechanisme van *V. harveyi* kan verstoren, terwijl dit niet het geval was voor tijm (11). Onze studie laat echter zien dat tijm wel een remmend effect kan hebben op bacteriegroei.

De resultaten van deze studie zijn een veelbelovende eerste stap in het onderzoek naar de mogelijkheid om, ter bevordering van de gezondheid, essentiële oliën te gebruiken als additief in garnalenvoeders. Er zullen echter nog verschillende aspecten onderzocht moeten worden. Oregano en tijm lijken vooralsnog de beste opties, omdat in deze proefopzet al bij de laagst geteste concentratie (0,1 ml/ml) de maximaal mogelijke remming werd waargenomen. Voor beide oliën is het daarom interessant om nog lagere concentraties te testen en de zogenaamde MIC-waarde (Minimale Inhiberende Concentratie) te bepalen. Daarnaast zou het goed zijn om een analyse te doen van de mogelijk werkzame stoffen in de geteste essentiële oliën. Daarnaast is nog weinig bekend over het mogelijke effect van de essentiële oliën op de overleving en het functioneren van goede bacteriën die noodzakelijk zijn voor de garnalen.

Het toevoegen van een essentiële olie verkregen uit oregano aan garnalenvoer resulteerde in verhoogde overleving bij de garnalensoort *Penaeus vannamei*. Dit suggereert dat oregano niet direct een nadelig effect heeft op de goede bacteriën in de garnaal (11). Onderzoek dient dit echter te bevestigen. Daarnaast zullen vervolgonderzoeken uit moeten wijzen of het toevoegen van essentiële oliën aan garnalen- en visvoerders het voergedrag van de garnalen en vissen niet negatief beïnvloedt. Ook de vraag in hoeverre de smaak van de gekweekte aquacultuurdieren wordt beïnvloed, staat nog open. Verder is het voor de praktijk belangrijk om te weten wat de extra kosten zijn van de toevoeging van essentiële oliën aan het voer.

Dankwoord: We willen de betrokken studenten (zie foto), die het onderzoek hebben uitgevoerd bedanken. Daarnaast hebben studenten veel hulp gehad van Angelique Epping, Judith van Eijk en Mark van Lokven van het Microbiologie laboratorium op de HAS Hogeschool. Deze studie is mede mogelijk gemaakt door NWO subsidie: ENPPS.KIEM.019.007.

Literatuur is op aanvraag beschikbaar.