

Aktywność olejku pomarańczowego (*Oleum Aurantii*) wobec bakterii beztlenowych

¹Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej, Katedra Mikrobiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik Zakładu i Katedry: dr hab. Anna Kędzia, prof. ndzw.

²Katedra i Zakład Stomatologii Zachowawczej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik Zakładu i Katedry: dr hab. Barbara Kochońska, prof. ndzw

³Katedra i Zakład Periodontologii i Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik Zakładu i Katedry: dr hab. Aida Kusiak

⁴Klinika Diabetologii i Otyłości Wieku Rozwojowego, Katedra Auksologii Klinicznej i Pielęgniarstwa
Pediatricznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Kierownik Zakładu i Katedry: dr hab. Andrzej W. Kędzia

THE ACTIVITY OF ORANGE OIL (*OLEUM AURANTII*) AGAINST ANAEROBIC BACTERIA

SUMMARY

A total of 33 strains of anaerobic bacteria isolated from infections of oral cavity were tested. The susceptibility (MIC) of anaerobes to orange oil (Avicenna-Oil, Wrocław) was determined by means of plate dilution technique in Brucella agar with 5% defibrinated sheep blood. Inoculum containing 10⁵ CFU/spot was seeded with Steers replicator upon the surface of agar with and without oil (strain growth control). The inoculated plates were incubated at 37°C for 48 h in anaerobic jars. The MIC was defined as the lowest concentration of the oil inhibiting visible growth of anaerobic strains. The results indicated that the most susceptible to tested essential oil from tested anaerobes were the Gram-negative rods from genus *Bacteroides vulgatus*, Gram-positive cocci from genus *Peptostreptococcus anaerobius* and rods *Propionibacterium acnes* (MIC in ranges 5.0-7.5 mg/ml). The strains from the genera of *Prevotella intermedia* and *Propionibacterium granulosum* were the lowest sensitive to orange oil (MIC in ranges from 7.5 to 10.0 mg/ml). The MIC for 79% of all tested strains was in the concentration = 7.5 mg/ml.

KEY WORDS: ORANGE OIL – ANAEROBES
– SUSCEPTIBILITY – INFECTIONS – ORAL
CAVITY

Pomarańcze są wymieniane w chińskich rękopisach pochodzących sprzed 4 tysięcy lat (1). W XII wieku ówczesni żeglarze przywieźli je do Indii, a potem w XV wieku dotarły one do Europy (2). W XVIII w. powstały pierwsze plantacje pomarańczy w Hiszpanii, a w XIX w. we Włoszech, głównie na Sycylii i w Kalabrii (1). Obecnie są uprawiane w Izraelu, Brazylii i USA. Wiecznie zielone drzewo pomarańczy chińskiej (*Citrus sinensis* L. Osbeck, syn. *C. aurantium* L. var. *sinensis*) należy do rodziny *Rutaceae*. Osiąga wysokość 6-9 m. Wytwarza owalne lub eliptyczne

ciemnozielone liście o długości 5-15 cm i szerokości 2-8 cm oraz białe kwiaty o przyjemnym zapachu, z których powstają owoce jagodowe (pomarańcze) (1, 2). Owoce składają się z trzech warstw, tzw. egzokarpu, mezokarpu i endokarpu. Egzokarp, zewnętrzna część skórki świeżego owocu, służy do otrzymywania olejku pomarańczowego metodą wytlaczania lub destylacji z parą wodną. Olejek pomarańczowy (*Oleum Aurantii*) jest barwy od żółtej do brunatnej, o aromatycznym zapachu i słodkawym smaku. Jego skład i właściwości różnią się zależnie od miejsca pochodzenia owoców i sposobu otrzymywania. Ma przyjemny zapach, za który odpowiada octan oktylu. Olejek zawiera m.in. (+) limonen (70-90%), linalol, α -pinen, β -myrcen, β -tujon, β -cymen, cytronellal, terpineol, aldehyd n-dodecyłowy, kumaryny, flawonoidy, taniny i saponiny (1-9). Olejek i skórka pomarańczowa często stosowane są do celów spożywczych (ciasta, napoje, soki, słodycze, desery, likiery). Olejek wykorzystywany jest także w przemyśle perfumeryjnym i kosmetycznym (szampony, mydła, kremy, balsamy, odżywki, płyny do kąpieli) i do produkcji środków czystości. Jest dodawany do leków, szczególnie przeznaczonych dla dzieci, jako środek poprawiający smak i zapach. Olejek wykazuje też różne właściwości lecznicze. Działa wykrztuśnie, żółciopędnie, rozkurczowo, pobudza wydzielanie soków trawiennych. Ponadto działa uspokajająco, przeciwdepresyjnie i ułatwia zasypianie. Może być stosowany do kąpieli relaksujących i w nawilżaczach powietrza. Jako antyseptyk znalazł zastosowanie w chorobach jamy ustnej i górnych dróg oddechowych (np. do inhalacji, w stężeniach wynoszących od 0,01 do 0,02%) i do łagodzenia nerwobólów. Może powodować fotouczulenia (promienie słoneczne i UV).

Z badań wynika, że pomarańcze zawierają flawonoidy, które mogą obniżać ryzyko chorób sercowo-naczyniowych, dzięki ich właściwościom przeciwutleniającym (2, 10-12, 14-18). W doświadczeniach przeprowadzonych na zwierzętach wykazano, że zawarty w olejku pomarańczowym d-limonen działa przeciwnowotworowo oraz zapobiega skutkom chemioterapii (19, 20). Wyniki wielu badań wskazują na przeciwdrobnoustrojowe działanie olejku (2, 5, 6, 8-10, 14, 17, 18, 21-35). Wykazano aktywność wobec różnych bakterii (2, 5, 6, 8, 10, 14, 17, 18, 21-25, 27, 28). Udowodniono też działanie na niektóre grzyby drożdżopodobne i pleśniowe (2, 6, 9, 10, 14, 22, 26, 30-32), działanie przeciwwirusowe (17, 35), przeciwpierwotniakowe (2, 33, 35) oraz przeciw niektórym insektom (2, 29, 34). Aktywność olejku pomarańczowego dotyczy różnych bakterii tlenowych i względnie beztlenowych. W wielu doświadczeniach wykazał on działanie wobec Gram-ujemnych pałeczek z gatunku *Escherichia coli*, w tym wysoce patogenego szczepu *E. coli* 0157:07, gatunków *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Arcanobacter butzleri* (6, 8, 10, 14, 17, 18, 22, 24, 26, 27) oraz bakterii Gram-dodatnich, tj. *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Listeria monocytogenes* i *Corynebacterium* spp. (5, 6, 10, 17, 18, 22, 24, 26-28). Prabuseenivasan i wsp. (18) wykazali działanie olejku pomarańczowego na następujące gatunki: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* (MIC = 6,4-12,8 mg/ml). W doświadczeniach Morisa i wsp. (22) stężenia hamujące wzrost szczepów *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Corynebacterium* spp. wynosiły od 500 do > 1000 µg/ml. W kolejnych badaniach Nannapaneni i wsp. (36) wykazali skuteczne działanie olejku i jego składnika limonenu wobec szczepów *Escherichia coli* ATCC 11775 oraz 12 szczepów *E. coli* 0157:H7. Celikel i wsp. (6) stosując metodę krążkowo-dyfuzyjną uzyskali zahamowanie wzrostu szczepów *E. coli*, *Listeria monocytogenes* i *S. aureus* przez stężenia wynoszące 10-20 µl/krążek. Natomiast pałeczki *Salmonella senftenberg* (775W), *E. coli*, *S. aureus* i *Pseudomonas* spp. były wrażliwe na stężenia olejku wynoszące 1000 µl/ml. Również Fisher i wsp. (27) metodą krążkowo-dyfuzyjną wykazali aktywność olejku pomarańczowego wobec szczepów *E. coli* 0157, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* i *Staphylococcus aureus*. Strefy zahamowania wzrostu tych bakterii wynosiły od 14 do 27 mm. Nannapaneni i wsp. (25) badali działanie olejku pomarańczowego na szczep *Campylobacter*

jejuni wrażliwe na ciprofloksacyne (MIC < 0,5 µg/ml) i na nią odporne (MIC = 16-32 µg/ml) i zaobserwowali taką samą wrażliwość i oporność szczepów na olejek. Spośród bakterii beztlenowych oceniono wrażliwość na olejek pałeczek z rodzaju *Propionibacterium* (5) i laseczek z rodzaju *Clostridium* (28). W piśmiennictwie nie ma danych dotyczących aktywności olejku pomarańczowego wobec bakterii beztlenowych jamy ustnej.

Cel pracy

Celem pracy jest ocena wrażliwości na olejek pomarańczowy bakterii beztlenowych wyizolowanych z zakażeń jamy ustnej.

Materiały i metody

Materiały zostały pobrane od pacjentów dorosłych i dzieci z różnymi zakażeniami w obrębie jamy ustnej. Każdy materiał posiano na powierzchni podłoża wzbogaconego i kilku podłoży wybiórczych dla beztlenowców (37, 38). Inkubację podłoży prowadzono w temp. 37°C przez 10 dni w anaerostatach, w atmosferze 10% CO₂, 10% H₂ i 80% N₂, w obecności katalizatora palladowego oraz wskaźnika warunków beztlenowych. Identyfikację wyhodowanych szczepów przeprowadzono na podstawie cech morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych, z uwzględnieniem systemu testów API 20A, zdolności kolonii do fluorescencji w promieniach UV, wytwarzania z glukozy niższych kwasów tłuszczowych (od C₁ do C₆) oraz kwasów mlekowego, fumarowego i bursztynowego (metodą chromatografii gazowej) (37-40). Badanie wrażliwości objęło 33 szczepy należące do gatunków: *Prevotella buccalis* (1 szczep), *P. bivia* (1), *P. intermedia* (3), *P. loeschei* (1), *Porphyromonas asaccharolytica* (2), *P. gingivalis* (2), *Fusobacterium nucleatum* (4), *F. necrophorum* (2), *Bacteroides ureolyticus* (2), *B. fragilis* (3), *B. vulgatus* (1), *Finegoldia magna* (2), *Micromonas micros* (1), *Peptostreptococcus anaerobius* (3), *Propionibacterium acnes* (3), *P. granulosum* (2) oraz 5 szczepów wzorcowych, w tym *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Finegoldia magna* ATCC 29328, *Peptostreptococcus anaerobius* ATCC 27337 i *Propionibacterium acnes* ATCC 11827.

Badania wrażliwości (MIC) bakterii beztlenowych na olejek pomarańczowy (Avicenna-Oil, Wrocław) przeprowadzono metodą seryjnych rozcieńczeń w agarze Brucella, który został wzbogacony dodatkiem 5% odwłóknionej krwi baraniej (41). Przed doświadczeniem olejek rozpuszczono w DMSO (Serva) uzyskując stężenie 100 µg/ml. Do dalszych rozcieńczeń użyto jałowej wody destylowanej. Badano następujące stężenia olejku: 20,0; 15,0; 10,0; 7,5; 5,0 i 2,5 mg/ml. Hodowlę zawierającą 10⁵

CFU/kroplę nanoszono na powierzchnię agaru Brucella aparatem Steersa. Podłoże, które nie zawierało olejku stanowiło kontrolę wzrostu szczepów. Inkubację podłoży prowadzono w warunkach beztlenowych w anaerostatach przez 48 godzin w temp. 37°C. Za MIC przyjęto takie najmniejsze rozcieńczenie olejku pomarańczowego, które całkowicie hamowało wzrost testowanych bakterii beztlenowych.

Wyniki i omówienie

Uzyskane wyniki wrażliwości na olejek pomarańczowy 33 szczepów bakterii beztlenowych zebrano w tabeli 1, a szczepów wzorcowych w tabeli 2. Oceniane bakterie beztlenowe wykazały zbliżoną wrażliwość na olejek. Stężenia hamujące ich wzrost mieściły się w zakresie stężeń od 5,0 do 10,0 mg/ml. Aż 79% testowa-

nych szczepów było wrażliwych na stężenie wynoszące 7,5 mg/ml. Na stężenie niższe (5,0 mg/ml) wrażliwość wykazało 12% szczepów. Natomiast 9% szczepów wymagało do zahamowania wzrostu użycia wyższego stężenia olejku, wynoszącego 10,0 mg/ml. Wśród Gram-ujemnych bakterii beztlenowych największą wrażliwość wykazał szczep z gatunku *Bacteroides vulgatus* (MIC = 5,0 mg/ml), a najmniejszą szczep z gatunku *Prevotella intermedia* (MIC = 7,5-10,0 mg/ml). Spośród Gram-dodatnich bakterii pałeczki okazały się bardziej wrażliwe niż ziarniaki na stężenie wynoszące 5,0 mg/ml (odpowiednio 27 i 5% szczepów wrażliwych). Jednak wszystkie testowane Gram-dodatnie ziarniaki były wrażliwe w zakresie stężeń od 5,0 do 7,5 mg/ml. Natomiast wzrost Gram-dodatnich pałeczek był hamowany przez stężenia wynoszące 5,0-10,0 mg/ml.

Tabela 1. Wrażliwość bakterii beztlenowych na olejek pomarańczowy.

Drobnoustroje	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące MIC (mg/ml)					
		20,0	15,0	10,0	7,5	5,0	2,5
<i>Prevotella buccalis</i>	1				1		
<i>Prevotella bivia</i>	1				1		
<i>Prevotella intermedia</i>	3			2	1		
<i>Prevotella loescheii</i>	1				1		
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	2				2		
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	2				2		
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	4				4		
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	2				2		
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	2				2		
<i>Bacteroides fragilis</i>	3				3		
<i>Bacteroides vulgatus</i>	1					1	
Gram-ujemne bakterie beztlenowe ogółem	22			2	19	1	
<i>Fingoldia magna</i>	2				2		
<i>Micromonas micros</i>	1				1		
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	3				2	1	
Gram-dodatnie ziarniaki beztlenowe ogółem	6				5	1	
<i>Propionibacterium acnes</i>	3				1	2	
<i>Propionibacterium granulosum</i>	2			1	1		
Gram-dodatnie pałeczki beztlenowe ogółem	5			1	2	2	
Bakterie beztlenowe łącznie	33			3	26	4	

Tabela 2. Wrażliwość wzorcowych szczepów bakterii beztlenowych na olejek pomarańczowy.

Drobnoustroje	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące MIC (mg/ml)					
		20,0	15,0	10,0	7,5	5,0	2,5
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	1				1		
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	1				1		
<i>Fingoldia magna</i> ATCC 29328	1				1		
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC 27337	1				1		
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11827	1					1	

Największą aktywność wykazał olejek wobec ziarniaków z gatunku *Peptostreptococcus anaerobius* i pałeczek z gatunku *Propionibacterium acnes* (MIC = 5,0-7,5 mg/ml), a najniższą wobec szczepów z gatunku *Propionibacterium granulosum* (MIC = 7,5-10,0 mg/ml). Należy zaznaczyć, że olejek pomarańczowy był aktywny w stężeniach w zakresie 5,0-7,5 mg/ml wobec takiego samego odsetka szczepów Gram-dodatnich i Gram-ujemnych testowanych bakterii beztlenowych (po 91% szczepów wrażliwych). Podobnie szczepy wzorcowe wykazały wrażliwość na olejek w zakresie stężeń wynoszących od 5,0 do 7,5 mg/ml.

Wnioski

1. Największą wrażliwość olejek pomarańczowy wykazał wobec szczepów z gatunku *Bacteroides vulgatus*, *Peptostreptococcus anaerobius* i *Propionibacterium acnes*, a najniższą wobec pałeczek *Prevotella intermedia* i *Propionibacterium granulosum*.
2. Oceniane Gram-ujemne i Gram-dodatnie bakterie beztlenowe wykazały zbliżoną wrażliwość na oceniany olejek.

Piśmiennictwo

1. Karambela M. Pomarańcza. *Panacea* 2007; 1(18):26-7.
2. Arora GR, Kalidhar SB. Biological activities of *Citrus sinensis* varieties – A review. 2010; 31(4):267-78.
3. Fuselli SR, Garcia de la Rosa SB, Equaras MJ i wsp. Chemical composition and antimicrobial activity of *Citrus* essences on honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*, the cause agent of American foulbrood. *World J Microbiol Biotechnol* 2008; 24:2067-72.
4. Yan JL, Wang F, Yang LJ. Analysis of constituents of essential oils from fresh and dried pericarp of *Citrus sinensis* by GC-MS. *Zhonggong Zhong Yao Za Zhi* 2007; 32(6):506-8.
5. Seak BJ, Kim SS, Lee JA i wsp. Chemical composition and biological activities of essential oils extracted from Korean endemic *Citrus* species. *J Microbiol Biotechnol* 2008; 18(1):74-9.
6. Celikeli N, Kavas G. Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech J Food Sci* 2008; 26:174-81.
7. Belletti N, Ndaguimana M, Sisto C i wsp. Evaluation of the antimicrobial activity of *Citrus* essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem* 2004; 52:6932-38.
8. Nannapaneni R, Chalova VI, Crandall PG i wsp. *Campylobacter* and *Arcobacter* species sensitivity to commercial orange oil fractions. *Int J Food Microbiol* 2009; 129:43-9.
9. Okwu DE, Awurum AN, Okoronkwo JI. Phytochemical composition and *in vitro* antifungal activity screening of extracts from citrus plants against *Fusarium oxysporum* of Okra Plant (*Hibiscus esculentus*). *Afric Crop Sci Conf Proceedings* 2007; 8:1755-8.
10. Johann S, Lopes de Oliveira V, Pizzolatti MG i wsp. Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from *Citrus* spp. peels. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102(6): 681-85.
11. Tripoli E, Guardia MA, Giammanco S i wsp. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem* 2007; 104:466-79.
12. Di Majo D, Giammanco M, La Guardia M i wsp. Flavanones in Citrus fruit: Structure – antioxidant activity relationships. *Food Res Intern* 2005; 38:1161-6.
13. Ghasemi K, Ghasemi Y, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 *Citrus* species peels and tissues. *Pak J Pharm Sci* 2009; 22(3):277-81.
14. Kirbaslar FG, Tavman A, Dulger B i wsp. Antimicrobial activity of Turkish Citrus peel oils. *Pak J Bot* 2009; 41(6): 3207-12.
15. Katiyar A, Singh D, Mishra BN. Essential oil: Production for health care in current scenario. *Ann Biol Res* 2010; 1(3):200-09.
16. Chalova VI, Crandall PG, Ricke SC. Microbial inhibitory and radical scavenging activities of cold-pressed terpeneless Valencia orange (*Citrus sinensis*) oil in different dispersing agents. *J Sci Food Agric* 2010; 90:870-6.
17. Dubey D, Balamurugan K, Agrawal RC i wsp. Evaluation of antibacterial and antioxidant activity of methanolic and hydromethanolic extract of sweet orange peels. *Rec Res Sci Technol* 2011; 3(11):22-5.
18. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Compl Altern Med* 2006; 6:39-47.
19. Crowell PL. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *J Nutr* 1999; 129(3):775S-8S.
20. Gould MN. Cancer chemoprevention and therapy by monoterpenes. *Environ Health Perspect* 1997; 105(Suppl. 4):977-9.
21. Ekwenye UN, Edeha OV. The antibacterial activity of crude leaf extract of *Citrus sinensis* (Sweet orange). *Int J Pharm Bio Sci* 2010; 1(4):742-50.
22. Morris JA, Khettry A, Seitz EW. Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. *J Am Oil Chem Sci* 1979; 56:595-03.
23. Karlovic Z, Anic I, Miletic I i wsp. Antibacterial activity of halothane eucalyptol and orange oil. *Acta Stomat Croat* 2000; 307-09.
24. Dabbah R, Edwards VM, Moats WA. Antimicrobial action of some Citrus fruit oils on selected food-borne bacteria. *Appl Microbiol* 1970; 19(1):27-31.
25. Nannapaneni R, Chalova VI, Story R i wsp. Ciprofloxacin-sensitive and ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* are equally susceptible to natural orange oil – based antimicrobials. *J Environ Sci Health, Part B: Pesticides, Food Contaminations and Agricultural Wastes* 2009; 44(6):571-7.
26. Yousef RT, Tawil G. Antimicrobial activity of volatile oils. *Pharmazie* 1980; 35H(11):698-701.
27. Fisher K, Phillips CA. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food system. *J Appl Microbiol* 2006; 101:1232-40.
28. Chaibi A, Ababouch LH, Belasri K i wsp. Inhibition of germination and vegetative growth of *Bacillus cereus* T and *Clostridium botulinum* 62A spores by essential oils. *Food Microbiol* 1997; 14:161-74.
29. Huamin H, Juntao F, Anliang C i wsp. Studies on the bioactivity of essential oils against insects. *Tianran Chanwu Yanjiu Ju Kaifa* 2002; 14:27-30.
30. Jasper C, Maruzzella C, Ligouri L. The *in vitro* antifungal activity of essential oils. *J Am Pharm Assoc* 1956; 47(4):250-4.
31. Stange RR, Midland SL, Eckert JW i wsp. An antifungal compound produced by grapefruit and Valencia orange after wounding of the peel. *J Nat Prod* 1993; 56:1627-29.
32. Singh G, Upadhyay RK, Narayanan CS i wsp. Chemical and fungitoxic investigations on the essential oil of *Citrus sinensis*. *Pers J Plant Dis Prot* 1993; 100:69-74.
33. Burfield T, Reekie SL. Mosquitoes, malaria and essential oils. *Int J Aromather* 2005; 15:30-41.
34. Ezonu CF, Chidume GJ, Udedi SC. Insecticidal properties of volatile extracts of orange peels. *Bioresour Technol* 2001; 76:273-4.
35. Morton J. Orange. [In:] *Fruits of warm climates*. Morton JF Ed. Miami, Floryda 1987; 134-42.
36. Nannapaneni R, Muthaiyan A, Crandall PG i wsp. Antimicrobial activity of commercial citrus-based natural extracts against *Escherichia coli* O257:H7 isolates and mutant strains. *Food Path Dis* 2008; 5(5):695-99.
37. Holdeman LV, Cato EP, Moore WEC. *Anaerobe Laboratory Manual* V.P.I 4 ed. Blacksburg, Baltimore 1977.

38. Kałowski M, Kędzia A. Nieprzetrwalnikujące bakterie beztlenowe. [W:] Diagnostyka mikrobiologiczna w medycynie (Kędzia W. red.) PZWL, Warszawa 1990. 39. Holt JG. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins ed. 9th ed. Baltimore 1993. 40. Forbes BA, Sahn DF, Weissfeld AS. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Mosby Elsevier. St. Louis 2007. 41. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria approved standard. 6th M11-Z6 PA NCCLS. Wayne 2003.

otrzymano/received: 27.06.2011
zaakceptowano/accepted: 08.07.2011

Adres/address:
*dr hab. Anna Kędzia prof. nadzw.
Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej, Katedra Mikrobiologii
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Do Studzienki 38, 80-227 Gdańsk
tel.: (58) 349-21-85
e-mail: zmju@amg.gda.pl