

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa olejku z drzewa herbacianego (*Tea Tree Oil*) w badaniach *in vitro*. Cz. II

Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Kierownik Katedry i Zakładu: prof. dr hab. n. med. Wojciech Król

THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF TEA TREE OIL IN THE RESEARCH IN VITRO

SUMMARY

Tea Tree Oil obtained from the Australian plant *Melaleuca alternifolia* (TTO – ang. *Tea Tree Oil*) is the one of the strongest antiseptic. The effects of treatment of infections with the use of TTO was confirmed with the clinical research. The pioneer of the research of the oil from *Melaleuca alternifolia* was Penfold, who in the twenties of XXth century and later carried out the first experiments confirming the antiseptic properties of TTO by the comparison of the bactericidal activity of TTO with the butyric acid activity used as the disinfectant at that time. In this article we presented the examples of outcomes of the research of TTO activity against the reference strains of microorganisms and against the microorganisms isolated from the most frequent biological materials of the patients from different medical centres. For tested Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeasts-like fungi, dermatophytes and filamentous fungi, the observed values of MIC TTO were low, also for drug-resistant strains. The antimicrobial activity of TTO is then high. The examples of the increase of the action of TTO combined with other antimicrobial substances were presented and this synergistic effect was then measured using the disc diffusion test. The increase of inhibition zones around the paper disks impregnated with TTO combined with other substances in view of inhibition zones of around the paper discs impregnated with TTO alone was observed. Furthermore in the dilution methods the reduction of MIC TTO values in combination with other substances was observed when compared with the values of MIC TTO alone, using the indicator FICI to the evaluation of their changes. The curves time kill were also used for analysis of the speed of the microbicidal processes of combined substances. Synergistic activities were stated in case of TTO in combination with the other essential oils against staphylococci, TTO with amphotericin B against *Candida* strains, TTO with tobramycin against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, TTO with copper lactate and TTO with copper lactobionate against *Candida albicans* and *Lactobacillus acidophilus*, TTO with chlorhexidine gluconate against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus plantarum*. In this article the cases of non-synergistic effect, or even the antagonism effect of TTO combined with other substances were also presented.

KEY WORDS: MELALEUCA ALTERNIFOLIA – TEA TREE OIL – ANTIMICROBIAL ACTIVITY

Wprowadzenie

Wobec rosnącej obecnie roli substancji pochodzenia roślinnego w leczeniu zakażeń o różnej etiologii, na

szczególną uwagę zasługują olejki eteryczne, zwłaszcza olejek z drzewa herbacianego pozyskiwany z australijskiej rośliny *Melaleuca alternifolia* (TTO – ang. *Tea Tree Oil*) należący do najsilniejszych antyseptyków. Pionierem badań naukowych olejku z *Melaleuca alternifolia* był Penfold, który w latach 20. XX wieku przeprowadził pierwsze eksperymenty potwierdzające antyseptyczne właściwości TTO i jego składników (1, 2). Jako metodę badawczą zastosował oznaczanie współczynnika Rideal-Walkera wyrażającego aktywność bakteriobójczą analizowanego antyseptyku w odniesieniu do aktywności standardowej substancji dezynfekcyjnej – fenolu (kwasu karbolowego), wobec wzorcowego szczepu bakterii *Bacillus typhosus* w zawiesinie (3). Oznaczone wartości współczynnika Rideal-Walkera świadczące o wyższej aktywności substancji w stosunku do fenolu, wyniosły: 11,0 dla TTO, 6,0 dla α -terpinenu, γ -terpinenu i cymenu oraz 13,5 dla terpinen-4-olu (2). Wzmianki o badaniach Penfolda pojawiły się w 1930 roku w *Medical Journal of Australia* (4) i w 1933 roku w *British Medical Journal* (5). W 1955 roku Atkinson opublikował wyniki badań aktywności olejku z *Melaleuca alternifolia* wobec szczepów bakterii: *Staphylococcus aureus* B313, *Salmonella typhi* S76, *Mycobacterium phlei* CSL. Uzyskane aktywne stężenia TTO wobec tych drobnoustrojów wyniosły odpowiednio w metodzie rozcieńczeniowej agarowej: 31, 63, 125 μ l olejku/10 ml pożywki, a w metodzie rozcieńczeniowej bulionowej: 10, 24, 31 μ l olejku/10 ml pożywki (6).

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa TTO wyznaczona ilościowymi metodami rozcieńczeniowymi

Przegląd metod badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej TTO stosowanych w ostatnich latach został przedstawiony w pierwszej części niniejszego artykułu (7). Obecnie dominującymi metodami badawczymi w mikrobiologii medycznej są wystandaryzowane techniki rozcieńczeniowe wyznaczające wartości MIC (ang. *Minimal Inhibitory Concentration*), które po dokonaniu modyfikacji mogą być wykorzystane do

oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej olejków eterycznych. Te właśnie metody pozwalają na porównywanie wyników uzyskiwanych w różnych ośrodkach naukowych. Z klinicznego punktu widzenia, oznaczone wartości MIC dla TTO stanowią cenną wskazówkę

dla lekarzy, odnośnie wyboru właściwej dawki olejku w przypadku konkretnego zakażenia.

Podsumowując dane z piśmiennictwa w tabelach 1 i 2 zestawiono wyniki badań aktywności TTO wobec referencyjnych i klinicznych szczepów bakterii

Tabela 1. Przykłady wartości MIC dla TTO działającego na bakterie.

Badany drobnoustrój	Wartość MIC dla TTO
Tlenowe ziarenkowce Gram-dodatnie:	
<i>Staphylococcus aureus</i> (ref.): NCTC 8325, 6571, ATCC 6538 ATCC 25923 ATCC 29213 ATCC 6538 RN4220 mutS, RN4220 mutL	0,25% (8,9,10,11) 6,7 mg/ml (12); 0,25% (11) 0,5% (13) 0,04% (14) 0,25% (11)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,5 mg/ml (15,16); 0,25-1,0 mg/ml (17) 0,125-0,5% (18); 0,25% (11) 0,5% (19); MSSA: 0,5-2,0% (20)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ref.): ATCC 12228	0,5% (11)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,5 mg/ml (17); 0,5% (11); 0,45% (9)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0,5 mg/ml (17)
<i>Staphylococcus capitis</i>	0,35% (9)
<i>Staphylococcus</i> spp.	0,5% (11); CNS: 0,25-1,0% (20)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,75 mg/ml (15); 0,1-0,5 mg/ml (17)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2,5 mg/ml (15); <0,1-1,0 mg/ml (17)
<i>Streptococcus</i> spp.	2,5 mg/ml (15); 0,5-1,0 mg/ml (17)
<i>Streptococcus sanguinis</i>	0,5 mg/ml (15)
<i>Streptococcus salivarius</i>	0,5-0,75 mg/ml (15)
<i>Enterococcus faecalis</i> (ref.): ATCC 29212, NCTC 775	2% (11)
<i>Enterococcus faecalis</i>	5 mg/ml (16); 2% (11)
<i>Enterococcus faecium</i> (ref.): ATCC 6057	0,25% (9)
Tlenowe pałeczki Gram-ujemne:	
<i>Escherichia coli</i> (ref.): AG 100, ATCC 25922, 11229	0,25% (8, 9, 10, 13)
<i>Escherichia coli</i>	5,0 mg/ml (15); 1,0-2,5 mg/ml (17); 5,0 mg/ml (16); 0,5% (19)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ref.): NCTC 9633	6,0 mg/ml (12)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,5-5,0 mg/ml (15,16)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5,0 mg/ml (15)
<i>Proteus vulgaris</i>	0,3% (9)
<i>Enterobacter</i> spp. (<i>E. gergonae</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. galinarium</i>)	5,0 mg/ml (15,17)

Badany drobnoustrój	Wartość MIC dla TTO
<i>Salmonella</i> spp.	0,25% (19)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ref.): NCTC 6749 ATCC 9027 ATCC 15442	>8% (10) 0,1% (14) 1,0% (9)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,1% (14); 1,0-5,0 mg/ml (17) 7,5 mg/ml (16)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (<i>Xantomonas maltophilia</i>)	2,5 mg/ml (17)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,75 mg/ml (15)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	2,5 mg/ml (17)
<i>Legionella pneumophila</i>	0,125-0,5% (21) – szczepy z różnych serogrup
<i>Haemophilus</i> spp. (<i>H. influenzae</i> , <i>H. parainfluenzae</i>)	1,0 mg/ml (15,17)
Ziarenkowce Gram-ujemne:	
<i>Neisseria mucosa</i>	1,0-2,5 mg/ml (17)
<i>Neisseria polysaccharea</i>	0,1 mg/ml (17)
<i>Moraxella catarrhalis</i> (<i>Branhamella catarrhalis</i>)	1,0 mg/ml (17)
Palczki Gram-dodatnie (maczugowce):	
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	0,5-1,0 mg/ml (17)
<i>Corynebacterium</i> spp. (<i>C. diphtheriae</i> , <i>C. minutissimus</i>)	0,2% (9)
Tlenowe laseczki:	
<i>Bacillus subtilis</i> (ref.): ATCC 6633	0,3% (9)
Mykoplazmy:	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	0,003-0,006% (22)
Drobnoustroje beztlenowe (ziarenkowce i palczki):	
<i>Peptostreptococcus productus</i>	od ≤ 0,06 do ≥ 2,0 mg/ml (23)
<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	0,06 mg/ml (23)
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	0,06 mg/ml (23)
<i>Peptostreptococcus anareobius</i>	0,06 mg/ml (23)
<i>Veillonella parvula</i>	od ≤ 0,06 do ≥ 2,0 mg/ml (23)
<i>Veillonella</i> spp.	od ≤ 0,03 do >1,0 mg/ml (24)
<i>Prevotella</i> spp.	od ≤ 0,03 do >1,0 mg/ml (24)
<i>Prevotella intermedia</i>	od ≤ 0,03 do ≥ 2,0 mg/ml (23)
<i>Prevotella denticola</i>	od ≤ 0,06 do ≥ 2,0 mg/ml (23)
<i>Prevotella oris</i>	od ≤ 0,03 do ≥ 0,06 mg/ml (23)
<i>Prevotella oralis</i>	od ≤ 0,03 do ≥ 1,0 mg/ml (23)
<i>Propionibacterium acnes</i>	od ≤ 0,03 do ≥ 2,0 mg/ml (23)
<i>Propionibacterium</i> spp.	od ≤ 0,03 do >1,0 mg/ml (24)
<i>Micromonas micros</i>	od ≤ 0,03 do ≥ 2,0 mg/ml (23)

Badany drobnoustrój	Wartość MIC dla TTO
<i>Finegoldia magna</i>	od $\leq 0,03$ do $\geq 0,06$ mg/ml (23)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	od $\leq 0,03$ do $\geq 2,0$ mg/ml (23)
<i>Porphyromonas saccharolytica</i>	od $\leq 0,03$ do $\geq 2,0$ mg/ml (23)
<i>Porphyromonas</i> spp.	od $\leq 0,03$ do $>1,0$ mg/ml (24)
<i>Bacteroides forsythus</i>	od $0,05$ do $>1,0$ mg/ml (23)
<i>Bacteroides fragilis</i>	od $\leq 0,03$ do $1,0$ mg/ml (23)
<i>Bacteroides pneumosintes</i>	$1,0$ mg/ml (23)
<i>Bacteroides</i> spp.	od $\leq 0,03$ do $>1,0$ mg/ml (24)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	od $\leq 0,03$ do $\geq 2,0$ mg/ml (23)
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	$1,0$ mg/ml (23)
<i>Fusobacterium</i> spp.	od $\leq 0,03$ do $>1,0$ mg/ml (24)
<i>Eubacterium lentum</i>	$\geq 2,0$ mg/ml (23)
<i>Eubacterium</i> spp.	$0,06-0,5$ mg/ml (24)
<i>Actinomyces israeli</i>	od $\leq 0,03$ do $0,06$ mg/ml (23)
<i>Actinomyces</i> spp.	$\leq 0,03$ mg/ml (24)
(ref.) – szczep referencyjny, obok nazwy gatunku znajduje się symbol kolekcji i numer szczepu	

Tabela 2. Przykłady wartości MIC dla TTO działającego na grzyby.

Badany drobnoustrój	Wartość MIC dla TTO
Grzyby drożdżopodobne:	
<i>Candida albicans</i> (ref.): KEM H5 NRRL y-12983, NRRL y-869 NRRL y-22077 ATCC 10231 ATCC 90028, 90029, 24433, 76615 ATCC 14053	$0,125\%$ (8,10) $3,5$ mg/ml (25) $1,75$ mg/ml (25) $0,5\%$ (26); $0,25-0,5\%$ (27); $3,5$ mg/ml (25) 6 mg/ml (12); $0,3\%$ (9); $0,25\%$ (28) $0,25\%$ (26,28) $3,5$ mg/ml (25)
<i>Candida albicans</i>	$0,06-0,5\%$ (28,29); $0,03-0,62\%$ (30) $0,06-0,25\%$ (31); $0,03\%$ (14); $0,125-1,0\%$ (32) $0,125$ μ g/ml (33); $0,75-2,5$ mg/ml (15,16) $3,0$ mg/ml (34)
<i>Candida glabrata</i> (ref.): ATCC 90030 NRRL y-65	$0,125-0,5\%$ (32); $0,06$ (28) $1,75$ mg/ml (25)
<i>Candida glabrata</i>	$0,25-0,50\%$ (31); $0,125-1,0\%$ (32) $0,03-0,125\%$ (29); $0,15-0,31\%$ (30) $0,03-0,125$ μ g/ml (33)
<i>Candida tropicalis</i> (ref.): ATCC 750, NRRL y-404 ATCC 750	$3,5$ mg/ml (25) $0,06\%$ (28)
<i>Candida tropicalis</i>	$0,12-0,50\%$ (31); $0,25-1,0\%$ (32); $0,07\%$ (30)
<i>Candida parapsilosis</i> (ref.): ATCC 90018 ATCC 22019 NRRL y-22019	$0,25\%$ (26) $0,125\%$ (28) $3,5$ mg/ml (25)

Badany drobnoustrój	Wartość MIC dla TTO
<i>Candida parapsilosis</i>	0,06-0,25% (31); 0,25-0,5% (32) 0,03-0,125% (29) 0,03-0,07% (30); 0,06-0,125 µg/ml (33)
<i>Candida kefyr</i>	0,06-0,25% (31)
<i>Candida krusei</i> (ref.): NRRL y-7179 ATCC 6258	3,5 mg/ml (25) 0,25% (28)
<i>Candida krusei</i>	1,0 mg/ml (15,16); 0,125 µg/ml (33); 0,25-0,5% (32); 0,06-0,2% (29); 0,12-0,5% (31)
<i>Candida lipolytica</i>	0,06-0,125 µg/ml (33)
<i>Candida neoformans</i>	0,015% (29)
<i>Candida lusitanae</i>	0,125 µg/ml (33); 0,25-0,5% (32) 0,12-0,25% (31)
<i>Candida guilliermondii</i> (ref.): NRRL y-324	3,5 mg/ml (25)
<i>Candida guilliermondii</i>	0,125 µg/ml (33); 0,25-0,5% (32) 0,12-0,25% (31)
<i>Candida inconspiqua</i>	0,03 µg/ml (33)
<i>Candida famata</i>	0,25% (32)
<i>Candida dubliniensis</i>	0,125-1,0% (32); 0,03% (30)
<i>Candida</i> spp.	0,03% (14)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ref.): ATCC 10716	0,25% (26)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,125-1,0% (32)
<i>Trichosporon</i> spp.	0,12% (26)
<i>Cryptococcus neoformans</i> (ref.): ATCC 90112	0,03 (28)
<i>Geotrichum candidum</i>	5,0 mg/ml (16)
<i>Rhodotorula rubra</i>	0,06% (26)
<i>Blastoschizomyces capitatus</i>	0,125-0,25 µg/ml (33)
<i>Malassezia furfur</i>	0,03-0,12% (35)
<i>Malassezia sympodialis</i>	0,016-0,12% (35)
Dermatofity:	
<i>Epidermophyton floccosum</i>	0,008-0,03% (36); 0,03% (26); 0,7% (9)
<i>Microsporum canis</i>	0,004-0,03% (36); 0,016% (26)
<i>Microsporum gypseum</i>	0,016-0,03% (36); 2,5 mg/ml (16)
<i>Trichophyton rubrum</i>	0,008-0,03% (36); 0,06% (26); 0,6% (9)
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0,008-0,06% (36); 0,016-0,03% (26)
<i>Trichophyton tonsurans</i>	0,004-0,016% (36)
Grzyby pleśniowe:	
<i>Aspergillus niger</i> (ref.): ATCC 16404	0,02% (14)

Badany drobnoustrój	Wartość MIC dla TTO
<i>Aspergillus niger</i>	0,06-0,12% (36); 0,12% (26); 3,12 mg/ml (37) 0,4% (9)
<i>Aspergillus flavus</i>	0,06-0,12% (36); 0,06% (26) 3,12 mg/ml (37); 5 mg/ml (16)
<i>Aspergillus fumigates</i>	0,06-0,12% (36); MIC ₅₀ > 2,0% (31); 0,12% (26)
<i>Aspergillus nidulans</i>	MIC ₅₀ > 2,0% (31)
<i>Penicillium notatum</i>	0,3% (9)
<i>Penicillium</i> spp.	0,03-0,06% (36); 0,03% (26)
<i>Alternaria</i> spp.	0,016-0,12% (36)
<i>Cladosporium</i> spp.	0,008-0,12% (36)
<i>Fusarium</i> spp.	0,008-0,25% (36)
(ref.) – szczep referencyjny, obok nazwy gatunku znajduje się symbol kolekcji i numer szczepu MIC ₅₀ – najmniejsze stężenie TTO hamujące 50% wzrostu drobnoustrojów	

oraz grzybów. Analizując zawarte w tabelach dane, zwraca uwagę fakt uzyskiwania niskich wartości MIC dla TTO, co świadczy o wysokiej aktywności przeciwdrobnoustrojowej tej substancji. Obecnie brak jest jednak jednoznacznych kryteriów interpretacyjnych wartości MIC dla oleju z drzewa herbacianego. Nie ustalono bowiem wartości MIC, na podstawie których badane drobnoustroje mogłyby zostać zaliczone do klinicznej kategorii „wrażliwe”, „średnio wrażliwe” lub „oporne” na TTO. Do badań wykorzystywano gatunki drobnoustrojów odpowiedzialne najczęściej za zakażenia o charakterze miejscowym. Ocenie podlegały również szczepy referencyjne. Porównując profil wrażliwości na TTO przedstawionych w tabelach gatunków drobnoustrojów, można zauważyć wyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową oleju wobec

bakterii Gram-dodatnich w porównaniu z bakteriami Gram-ujemnymi, wyższą aktywność wobec bakterii beztlenowych w porównaniu do bakterii tlenowych oraz wyższą aktywność wobec dermatofitów w porównaniu z innymi grzybami. Natomiast w tabeli 3 przedstawiono przykłady wyników badań wrażliwości na TTO drobnoustrojów opornych na konwencjonalne leki. Wyhodowane szczepy bakterii i grzybów pochodziły najczęściej z próbek klinicznych z jamy ustnej, gardła, przełyku, od pacjentów zakażonych wirusem HIV (28-31), od pacjentów z zaawansowaną chorobą nowotworową (32), z przypadków powierzchownych chorób skóry (35), z próbek skóry od pacjentów po zabiegach chirurgicznych (20), czy też innych (9). Stwierdzono, że drożdżopodobne grzyby *Saccharomyces cerevisiae*, *Malassezia furfur* i grzyby z rodzaju *Can-*

Tabela 3. Wartości MIC dla TTO wobec wybranych drobnoustrojów opornych na leki powszechnie stosowane w terapii.

Badany kliniczny szczep drobnoustroju	Wartość MIC dla TTO (%)
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	0,35 (9); 0,25-2,0 (20)
<i>Candida albicans</i> szczepy oporne na azole	0,06-0,25 (31); 0,25-1,0 (32) 0,07-0,15 (30); 0,25-0,5 (28, 29)
<i>Candida glabrata</i> szczepy oporne na azole	0,25-0,50 (31); 0,125-1,0 (32) 0,15 (30)
<i>Candida tropicalis</i> szczep oporny na azole	0,25 (32)
<i>Candida parapsilosis</i> szczep oporny na azole	0,25 (32)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> szczep oporny na azole	0,5 (32)
<i>Malassezia furfur</i> szczep oporny na mikonazol, ekonazol	MIC ₉₀ = 0,12 (35)
MIC ₉₀ – najmniejsze stężenie TTO hamujące 90% wzrostu drobnoustrojów	

did), charakteryzujące się opornością na leki z grupy azoli oraz metycylinooporne szczepy *Staphylococcus aureus*, okazały się wrażliwe na działanie TTO.

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa TTO zastosowanego w połączeniu z innymi substancjami o działaniu przeciwdrobnoustrojowym

W nielicznych publikacjach ostatnich lat pojawiły się doniesienia o większej aktywności przeciwdrobnoustrojowej TTO użytego w połączeniu z lekami konwencjonalnymi lub innymi substancjami o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, w porównaniu z TTO lub jego preparatami użytymi osobno. Zwraça uwagę praca Klimmka i wsp. (38) nawiązująca do przeprowadzonych badań klinicznych, w której dokonano oceny efektów skojarzonego leczenia grzybic powierzchownych: paznokci stóp, paznokci rąk oraz grzybicy międzypalcowej stóp z użyciem TTO i jego preparatów. Pierwszą grupę chorych leczono doustnie flukonazolem (w przypadku zakażenia *Candida albicans*) lub terbinafiną (w przypadku zakażenia *Trichophyton rubrum*), natomiast wobec drugiej grupy zastosowano terapię skojarzoną polegającą na podawaniu doustnym flukonazolu lub terbinafiny oraz TTO lub jego preparatów o działaniu miejscowym. Terapia skojarzona poprawiła skuteczność leczenia w stosunku do monoterapii z 55,9 do 87,9 %, w tym skuteczność leczenia zakażenia wywołanego przez *Candida albicans* wzrosła z 50 do 100%.

Efekt wzrostu aktywności TTO użytego w skojarzeniu z innymi substancjami o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych potwierdzono również badaniami przeprowadzonymi w warunkach *in vitro* (12, 25, 34, 39, 40, 41). Z uwagi na brak referencyjnych metod i norm dotyczących zasad przeprowadzania tego typu badań, użyte techniki laboratoryjne w poszczególnych ośrodkach naukowych były zróżnicowane. Zawsze jednak oceniano najpierw aktywność przeciwdrobnoustrojową tylko TTO, następnie aktywność TTO w kombinacji z inną badaną substancją, po czym analizowano zmienność uzyskanych wyników. W tych porównawczych eksperymentach stosowano jakościową metodę dyfuzyjno-krażkową oraz ilościową metodę rozcieńczeniową. W pierwszym przypadku wyznacznikiem wzrostu aktywności przeciwdrobnoustrojowej było zwiększenie strefy zahamowania wzrostu badanego szczepu wokół krążka nasączonego mieszaniną TTO z inną substancją, w porównaniu z analogiczną strefą zahamowania wzrostu wokół krążka nasączonego tylko TTO (25, 39). W ilościowej metodzie rozcieńczeniowej oznaczono najpierw wartości MIC dla TTO, następnie wartości

MIC dla TTO w kombinacji z inną substancją, które wykorzystano do oceny zmian tych wartości oraz do obliczenia tzw. FIC indeks, inaczej FICI (FIC – ang. *Fractional Inhibition Concentration*, FICI – ang. *Fractional Inhibition Concentration Index*) wymaganego do wykazania: wystąpienia synergizmu lub jego braku, addycji, czy też wystąpienia antagonizmu. Przyjęte w poszczególnych ośrodkach badawczych kryteria interpretacyjne wartości FICI były jednak zróżnicowane, z uwagi na brak jednoznacznych wytycznych (12, 13, 40, 41). Zjawisko synergizmu było stwierdzane, gdy wartość FICI była niższa niż 0,5 (13, 40, 41), lub niższa niż 1 (12), natomiast antagonizmu – gdy wartość FICI była wyższa niż 4 (13, 40, 41) lub wyższa niż 1 (12). Synergistyczne działanie skojarzonych substancji przeciwdrobnoustrojowych definiowano również jako zwiększenie stopnia redukcji badanego inokulum poddanego działaniu tych połączonych substancji, w porównaniu z wielkością redukcji inokulum poddanego działaniu każdej z substancji osobno. Zależności te przedstawiano na wykresach *time kill* (13, 14). Potwierdzeniem istnienia zjawiska synergizmu było również wydłużenie okresu PAEs (PAEs – ang. *Postantibiotic Effect*, inaczej – opóźnienie wzrostu drobnoustroju w następstwie krótkiej ekspozycji tego drobnoustroju na antybiotyki) oraz wydłużenie okresu PASMES (PASMES – ang. *Postantibiotic Sub-MIC Effect*, inaczej – opóźnienie wzrostu drobnoustroju jako efekt działania na komórki badanego szczepu podprogowych stężeń substancji, po wcześniejszej ekspozycji tego szczepu na stężenia wyższe niż podprogowe) w przypadku substancji przeciwdrobnoustrojowych użytych w skojarzeniu (13).

Stosując metodę dyfuzyjno-krażkową Edwards-Jones i wsp. (39) stwierdzili wystąpienie synergizmu TTO w połączeniu z innym olejkiem eterycznym, odpowiednio: paczulowym, lawendowym, cytrynowym i geraniowym, wobec badanych *Staphylococcus aureus* (szczególnie szczepu *Oxford*), obserwując zwiększenie stref zahamowania wzrostu wokół krążków nasączonych mieszaną TTO z innym olejkiem, w porównaniu ze strefą zahamowania wzrostu wokół krążka wysyconego tylko TTO. W eksperymencie Rosatio i wsp. (25) zaobserwowano synergizm TTO z amfoterycyną B, uzyskując dla 11 wzorcowych szczepów z rodzaju *Candida* większe strefy zahamowania wzrostu wokół krążków nasączonych tymi połączonymi substancjami (tj. w przedziale od 7,2 do 20 mm), aniżeli wokół krążków zawierających tylko TTO (strefy w przedziale od 2 do 17 mm).

D'Arrigo i wsp. (13) zaobserwowali spotęgowane działanie przeciwbakteryjne TTO w połączeniu z tobramycyną. Wartość uzyskanego współczynnika FIC wyniosła 0,37 dla *Escherichia coli* i odpowiednio 0,62

dla *Staphylococcus aureus*, co oznaczało uzyskanie większego efektu przeciwdrobnoustrojowego wobec *Escherichia coli*. Synergizm działania TTO i tobramycyny wobec tych szczepów wykazała również analiza wykresów *time kill*. Redukcja liczebności badanych szczepów bakterii wyrażona w \log_{10} oraz szybkość zabijania była zawsze wyższa w przypadku oddziaływania na komórki kombinacji TTO z tobramycyną, niż w przypadku użycia tych preparatów osobno, jednakże z zaznaczeniem, że pałeczki okazały się bardziej wrażliwe od gronkowców na zastosowaną kombinację substancji. Ponadto, w wyniku działania TTO łącznie z tobramycyną, uzyskano wobec *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* wydłużenie okresu PAEs oraz wydłużenie okresu PAsMEs w porównaniu z tymi wielkościami oznaczonymi osobno dla TTO i tobramycyny. Przykładowo – dla tobramycyny średni PAEs wyniósł 1,3 godziny wobec szczepu *Escherichia coli* oraz 1,7 godziny wobec szczepu *Staphylococcus aureus*, podczas gdy dla kombinacji tobramycyny z 0,05% TTO wyniósł 10,8 godziny wobec szczepu *Escherichia coli*, a dla tobramycyny z 0,25% TTO – 10,4 godziny wobec szczepu *Staphylococcus aureus*.

Znacznie mniej zadowalające wyniki uzyskali Van Vuuren i wsp. (12) stosując w badaniach metodę mikrorozcieńczeniową do określenia przeciwdrobnoustrojowej aktywności kombinacji dziewięciu różnych stężeń TTO, odpowiednio – z amfoterycyną B wobec szczepu *Candida albicans* ATCC 10231 oraz z ciprofloksacyną wobec szczepów *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Klebsiella pneumoniae* NCTC 9633. Dla szczepu *Candida albicans* efekt synergizmu wystąpił tylko w przypadku dwóch kombinacji TTO z amfoterycyną, efekt addycji wystąpił w jednej kombinacji, natomiast antagonizm aż w sześciu kombinacjach. W przypadku badania szczepu *Klebsiella pneumoniae*, dla kombinacji TTO z ciprofloksacyną odnotowano efekt synergizmu w trzech przypadkach. Dla pozostałych sześciu kombinacji uzyskano efekt antagonizmu. Badając szczep *Staphylococcus aureus*, efekt antagonizmu stwierdzono dla wszystkich dziewięciu kombinacji TTO z ciprofloksacyną.

W badaniach LaPlante (42), oceniających aktywność przeciwbakteryjną kombinacji TTO z lizostafiną, mupirocyną, gentamycyną i wankomycyną wobec metycylooopornych szczepów *Staphylococcus aureus*, nie stwierdzono efektu synergizmu. Wartość uzyskanego wskaźnika FICI dla połączenia TTO z wankomycyną wskazała nawet na efekt antagonizmu (dla tej kombinacji odnotowano wzrost bakterii o 1,74 \log_{10} CFU/ml w porównaniu z wankomycyną użytą osobno), natomiast dla pozostałych połączeń uzyskano efekt neutralności.

Przykładem badań z użyciem TTO, w których zastosowano etap ekspozycji wstępnej i później oceniono wpływ tego etapu na uwrażliwienie komórki bakteryjnej na substancje przeciwdrobnoustrojowe, były badania McMahon i wsp. (19, 43). Dla szczepów wzorcowych: *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* i innych koagulazo-ujemnych gronkowców, oznaczono metodą E-test wrażliwość na następujące leki: gentamycynę, erytromycynę, streptomycynę, wankomycynę, chloramfenikol, tetracyklinę, trimetoprim, ampicylinę, kwas fusydowy, mupirocynę i linezolid, po czym uzyskane wyniki porównano z wynikami analogicznych oznaczeń, ale przeprowadzonych po 72-godzinnej ekspozycji wstępnej tych szczepów na podprogowe stężenia TTO. Etap ekspozycji wstępnej spowodował wzrost oporności wszystkich szczepów bakteryjnych na większość badanych leków, co uwidoczniło się wzrostem wartości MIC tych leków, czasem nawet 2-4-krotnym.

Z zastosowaniem metody mikrorozcieńczeniowej oceniano przeciwdrobnoustrojową aktywność TTO użytego osobno oraz w połączeniu z glukonianem chlorheksydyny wobec bakterii w zawiesinie (inaczej – w planktonie) i w biofilmie uformowanym na płytce mikrorozcieńczeniowej. Filoche i wsp. (41) uzyskali dla szczepów *Streptococcus mutans* i *Lactobacillus plantarum* w hodowli planktonowej i w biofilmie niższe wartości MIC dla TTO w kombinacji z chlorheksydyną w porównaniu z wartością MIC dla TTO użytego osobno. W hodowli planktonowej wartość MIC dla TTO użytego osobno wyniosła 10 mg/ml, a w biofilmie powyżej 20 mg/ml, jednakowo dla obydwu badanych szczepów, natomiast w mieszaninie z glukonianem chlorheksydyny wartości hamujące olejku obniżyły się odpowiednio do 2,5 mg/ml w hodowli planktonowej dla obydwu badanych szczepów oraz do 10 mg/ml dla tych szczepów w biofilmie.

Analogiczne badania przeprowadzone przez Karpanen i wsp. (40) z udziałem szczepu wzorcowego i klinicznego *Staphylococcus epidermidis* nie były już tak jednoznaczne. W przypadku obydwu szczepów w hodowli planktonowej oraz szczepu wzorcowego w biofilmie nie uzyskano zmniejszenia wartości MIC dla kombinacji TTO z chlorheksydyną w stosunku do wartości MIC dla TTO użytego osobno. Jedynie szczep wzorcowy *Staphylococcus epidermidis* w biofilmie był bardziej wrażliwy na kombinację TTO z chlorheksydyną w porównaniu do TTO użytego osobno, jednakże oznaczona wartość wskaźnika FICI dla tego przypadku nie została zinterpretowana jako zjawisko synergizmu.

W obszarze pozamedycznym, badania *in vitro* również potwierdziły wzrost aktywności TTO zastosowanego w połączeniu z innymi substancjami chemicznymi

o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, stosowanymi jako dodatki do preparatów kosmetycznych. Pietrzak i wsp. (34) oznaczyli metodą makrorozcieńczeniową aktywność TTO i laktobionianu oraz mleczanu miedzi (będących dodatkami do preparatów higieny intymnej kobiet) oraz połączeń tych związków miedzi z TTO, wobec powszechnie występujących w pochwie drobnoustrojów: *Candida albicans* i *Lactobacillus acidophilus*. Badane związki miedzi wywierały działanie przeciwdrobnoustrojowe, lecz dopiero w dość wysokich stężeniach. W przypadku *Candida albicans* wartość MIC dla laktobionianu miedzi wyniosła 15,0 mg/ml, MIC dla mleczanu miedzi – 7,5 mg/ml, a MIC dla TTO – 3,0 mg/ml. Związki miedzi wywarły synergistyczny wpływ na drobnoustroje, gdy działały w skojarzeniu z TTO. I tak wartość MIC dla TTO obniżyła się w mieszaninie TTO zarówno z laktobionianem, jak i mleczanem miedzi i wyniosła tylko 0,75 mg/ml w każdym z tych przypadków. Podobnie nastąpiła znaczna redukcja wartości MIC dla TTO wobec *Lactobacillus acidophilus* w przypadku połączenia olejku z badanymi związkami miedzi. Wartość MIC dla TTO w mieszaninie z laktobionianem miedzi wyniosła 0,1875 mg/ml, a dla TTO w mieszaninie z mleczanem miedzi tylko 0,04685 mg/ml.

W badaniach Kunickiej-Styczyńskiej (14) oceniono skuteczność hamowania wzrostu szczepów *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida* spp. i *Aspergillus niger* w mleczku kosmetycznym w przypadku stosowania dodatku do produktu różnych substancji konserwujących o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Do kosmetyku dodawano mieszaninę olejków: TTO i lawendowego w stężeniach 0,5% lub TTO i cytrynowego w stężeniach 0,5% – z/lub bez syntetycznej substancji konserwującej Glydant Plus Liquid w stężeniu 0,1 lub 0,2%. Następnie określono przeżywalność drobnoustrojów w odstępach czasowych, przedstawiając wyniki na wykresach *time kill*. Wprowadzenie Glydant Plus Liquid do powyższych kombinacji olejków wywarło synergistyczny efekt hamując wzrost drobnoustrojów już po dwóch dniach inkubacji. Tymczasem Glydant Plus Liquid i olejki dodane oddzielnie do mlecza kosmetycznego w tych samych stężeniach wywarły znacznie słabszy efekt inhibicyjny.

Podsumowanie

Przedstawione dane z aktualnego piśmiennictwa jednoznacznie wskazują, iż otwiera się szeroka perspektywa rozwoju badań ukierunkowanych na rozpoznawanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej substancji pochodzenia naturalnego, w tym TTO. Badania *in vitro* udowodniły bowiem wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową TTO wobec szerokiego spektrum drobnoustrojów: ziarenkowców i pałeczek

Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych, zarówno tlenowych, jak i beztlenowych, grzybów drożdżopodobnych, grzybów pleśniowych, czy dermatofitów. Niskie wartości MIC dla TTO uzyskiwane dla badanych szczepów, w tym nawet dla szczepów opornych na powszechnie stosowane leki przeciwdrobnoustrojowe oraz stwierdzone przypadki zwiększonego efektu działania TTO połączonego z konwencjonalnymi lekami, są bardzo istotne dla lekarzy i farmaceutów borykających się na co dzień z problemem lekooporności drobnoustrojów. TTO jako antyseptyk o silnym, miejscowym działaniu, bez względu na profil oporności drobnoustrojów wobec antybiotyków i chemioterapeutyków, może być z powodzeniem włączany jako uzupełnienie, bądź alternatywa, do schematów leczenia tradycyjnego, zwłaszcza skojarzonego. Główną korzyścią stosowania terapii skojarzonej w porównaniu z monoterapią jest spotęgowanie efektów działania substancji zastosowanych w połączeniu (inaczej zjawisko synergizmu). Synergizm może wystąpić między TTO a innym lekiem lub substancją o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, czy też między olejkami stosowanymi łącznie. Oczywiście jest, że z klinicznego punktu widzenia największe znaczenie przedstawia synergizm TTO z powszechnie stosowanymi antybiotykami, czy chemioterapeutykami, lecz niestety problem ten jest wciąż niedostatecznie analizowany eksperymentalnie. Ustalanie schematów terapii skojarzonej powinno być poprzedzone wiarygodnymi wynikami badań *in vitro* potwierdzającymi skuteczność przeciwdrobnoustrojową TTO zastosowanego w połączeniu, a następnie potwierdzone wynikami badań klinicznych. W obecnej, trudnej walce z narastającym problemem lekooporności drobnoustrojów, wykryte zależności powinny przyczynić się do dalszego rozwoju tego typu badań i zastosowania uzyskanej wiedzy w rutynowej terapii zakażeń.

Piśmiennictwo

1. Penfold AR, Grant R. The germicidal values of the principal commercial *Eucalyptus* oils and their pure constituents, with observations on the value of concentrated disinfectants. J R Soc New South Wales 1923; 57:80-9.
2. Penfold AR, Grant R. The germicidal values of some Australian essential oils and their pure constituents. Together with those for some essential oil isolates, and synthetics. Part III. J R Soc New South Wales 1925; 59:346-9.
3. Penfold AR, Grant R. The economic utilization of the residues from the steam rectification of the essential oil of *Eucalyptus cinerifolia* and the germicidal values of the crude oil and the pure active constituents. J R Soc New South Wales 1922; 56:219-26.
4. Humphery EM. A new Australian germicide. Med J Aust 1930; 1:417-8.
5. Anonymous. An Australian antiseptic oil. Br Med J 1933; i:966.
6. Atkinson N, Brice HE. Antibacterial substances produced by flowering plants. Aust J Exp Biol Med Sci 1955; 33:547-54.
7. Garbusińska A, Mertas A, Król W. Przegląd badań *in vitro* oceniających aktywność przeciwdrobnoustrojową olejku z drzewa herbacianego (*Tea Tree Oil*). Cz. I. Post Fitoter 2010; 2:85-96.
8. Cox SD, Mann CM, Markham JL i wsp. The mode of anti-

- microbial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). J Appl Microbiol 2000; 88:170-5. **9.** Christoph F, Kaulfers PM, Stahl-Biskup E. A comparative study of the *in vitro* antimicrobial activity of Tea Tree Oils s.l. with special reference to the activity of β -Triketones. Planta Med 2000; 66:556-60. **10.** Cox SD, Mann CM, Markham JL. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. J Appl Microbiol 2001; 91:492-7. **11.** Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Frequencies of resistance to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and rifampicin in *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis*. Int J Antimicrob Agents 2008; 32:170-3. **12.** Van Vuuren SF, Suliman S, Viljoen AM. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. Lett Appl Microbiol 2009; 48:440-6. **13.** D'Arrigo M, Ginestra G, Mandalari G i wsp. Synergism and postantibiotic effect of tobramycin and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Phytomedicine 2010; 17:317-22. **14.** Kunicka-Styczyńska A, Sikora M, Kalemba D. Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems. J Appl Microbiol 2009; 107:1903-11. **15.** Alkiewicz J, Kędzia B, Zawadzka D i wsp. Badania aktywności mikrobiologicznej olejku z drzewa herbacianego i próby jego zastosowania w terapii inhalacyjnej. Post Aerosoloter 1998; 6:115-23. **16.** Holderna-Kędzia E, Kędzia B, Ostrowski-Meissner H. Australijskie olejki eteryczne o działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwgrzybiczym. Post Fitoter 2006; 4:188-94. **17.** Alkiewicz J, Kędzia B, Holderna-Kędzia E i wsp. Badania nad działaniem olejku z drzewa herbacianego (*Melaleuca alternifolia*) na bakterie górnych dróg oddechowych. Post Aerosoloter 1995; 3:141-8. **18.** Kwieciński J, Eick S, Wójcik K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. Int J Antimicrob Agents 2009; 33:343-7. **19.** McMahon MA, Blair IS, Moore JE i wsp. Habituation to sub-lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) is associated with reduced susceptibility to antibiotics in human pathogens. J Antimicrob Chemother 2007; 59:125-7. **20.** Brady A, Loughlin R, Gilpin D i wsp. *In vitro* activity of tea-tree oil against clinical skin isolates of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci growing planktonically and as biofilms. J Med Microbiol 2006; 55:1375-80. **21.** Mondello F, Girolamo A, Scaturro M i wsp. Determination of *Legionella pneumophila* susceptibility to *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil by an improved broth micro-dilution method under vapour controlled conditions. J Microbiol Methods 2009; 77:243-8. **22.** Harkenthal M, Layh-Schmitt G, Reichling J. Effect of Australian tea tree oil on the viability of the wall-less bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. Pharmazie 2000; 55:380-4. **23.** Kędzia A, Ostrowski-Meissner H, Kędzia AW. Działanie olejku z drzewa herbacianego na bakterie beztlenowe wyhodowane z zakażeń dróg oddechowych. Post Fitoter 2004; 4:158-62. **24.** Kędzia A, Ostrowski-Meissner H. The effect of selected essential oils on anaerobic bacteria isolated from respiratory tract. Herba Pol 2003; 49:29-36. **25.** Rosato A, Vitali C, Gallo D i wsp. The inhibitor of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. Phytomedicine 2008; 15:635-8. **26.** Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. J Appl Microbiol 2003; 95: 853-60. **27.** Hammer KA, Carson CF, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits germ tube formation by *Candida albicans*. Med Mycol 2000; 38:355-62. **28.** Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A i wsp. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Chel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. BMC Infect Dis 2006; 6:158. **29.** Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A i wsp. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic yeasts. J Antimicrob Chemother 2003; 51:1223-9. **30.** Traboulsi RS, Mukherjee PK, Ghannoum MA. *In vitro* activity of inexpensive topical alternatives against *Candida* spp. isolated from the oral cavity of HIV-infected patients. Int J Antimicrob Agents 2008; 31:272-6. **31.** Vazquez JA, Arganoza MT, Boikov D i wsp. *In vitro* susceptibilities of *Candida* and *Aspergillus* species to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. Rev Iberoam Micol 2000; 17:60-3. **32.** Bagg J, Jackson MS, Sweeney MP i wsp. Susceptibility to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil of yeasts isolated from the mouths of patients with advanced cancer. Oral Oncol 2006; 42:487-92. **33.** Oliva B, Piccirilli E, Ceddia T i wsp. Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. Lett Appl Microbiol 2003; 37:185-7. **34.** Pietrzak A, Wysocki P, Szewczyk EM. Ocena skuteczności zastosowania laktobionianu i mleczanu miedzi w preparatach do higieny intymnej. Pol J Cosmetol 2006; 9:44-9. **35.** Hammer KA, Carson CF, Riley TV. *In vitro* activities of Ketoconazole, Econazole, Miconazole, and *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil against *Malassezia* species. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44:467-9. **36.** Hammer KA, Carson CF, Riley TV. *In vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. J Antimicrob Chemother 2002; 50:195-9. **37.** Shin S. Anti-*Aspergillus* activities of plant essential oils and their combination effects with ketoconazole or amphotericin B. Arch Pharm Res 2003; 26:389-93. **38.** Klimmek JK, Nowicki R, Szendzielorz K i wsp. Zastosowanie olejku drzewa herbacianego i jego preparatów w skojarzonym leczeniu grzybic powierzchniowych. Mikol Lek 2002; 9:93-6. **39.** Edwards-Jones V, Buck R, Shawcross SG i wsp. The effect of essential oils on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a dressing model. Burns 2004; 30:772-7. **40.** Karpanen TJ, Worthington T, Hendry ER i wsp. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. J Antimicrob Chemother 2008; 62:1031-6. **41.** Filoche SK, Soma K, Sissons CH. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. Oral Microbiol Immunol 2005; 20:221-5. **42.** LaPlante KL. *In vitro* activity of lysostaphin, mupirocin, and tea tree oil against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 57:413-8. **43.** McMahon MA, Tunney MM, Moore JE i wsp. Changes in antibiotic susceptibility in staphylococci habituated to sub-lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). Lett Appl Microbiol 2008; 47:263-8.

otrzymano/received: 30.06.2011
zaakceptowano/accepted: 20.07.2011

Adres/address:
*dr Anna Mertas
Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii SUM
ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze
tel./fax: (32) 272-25-54
e-mail: amertas@sum.edu.pl