

\*Anna Kędzia<sup>1</sup>, Aida Kusiak<sup>2</sup>, Marta Ziółkowska-Klinkosz<sup>1</sup>, Alina Gębska<sup>1</sup>, Anna Wojtaszek-Słomińska<sup>3</sup>, Maria Wierzbowska<sup>1</sup>

## Działanie na bakterie tlenowe olejku cytrynowego (*Ol. Citri*)

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej, Katedra Mikrobiologii, Gdański Uniwersytet Medyczny  
Kierownik Zakładu: dr hab. n. med. Anna Kędzia, prof. nadzw.

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Periodontologii i Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej,  
Gdański Uniwersytet Medyczny

Kierownik Katedry i Zakładu: dr hab. n. med. Aida Kusiak, prof. nadzw.

<sup>3</sup>Zakład Ortodoncji, Gdański Uniwersytet Medyczny

Kierownik Zakładu: dr hab. n. med. Anna Wojtaszek-Słomińska

### THE ACTIVITY OF CITRI OIL (*OL. CITRI*) ON AEROBIC BACTERIA

#### SUMMARY

*Citrus limon L. belongs to family Rutaceae. The essential oil from the Citri peel oil exhibited significant antimicrobial effect. More than 40 components have been identified in Citri oil. The major components in the oil is (+)-limonen. The aim of this study was to investigate the antimicrobial activity of Citri oil against aerobic bacteria isolated from patients with infections of oral cavity and respiratory tract. Materials and methods. A total 36 strains of aerobic bacteria isolated from patients and 5 reference strains were tested. The data obtained following genera of bacteria: Staphylococcus (8 strains), Enterococcus (7), Corynebacterium (3), Acinetobacter (4), Citrobacter (2), Escherichia (3), Klebsiella (2), Pseudomonas (5), Serratia (2) and 5 reference strains from genus: Staphylococcus aureus ATCC 25923, Enterococcus faecalis ATCC 29212, Acinetobacter baumannii ATCC 19606, Escherichia coli ATCC 25922 i Klebsiella pneumoniae ATCC 13883. Susceptibility (MIC) was determined the serial dilution method Citri oil in Mueller-Hinton agar. The inoculums contained 10<sup>5</sup> CFU per spot was seeded with Steers replicator upon the surface of agar with and without Citri oil (bacterial strains growth control). Incubation the plates was performed in aerobic conditions at 37°C for 24 hours. MIC's values were defined as the lowest concentrations of oil that inhibited visible growth of the tested aerobic bacteria. The results showed, that the more susceptible to Citri oil was Gram-positive cocci from genus Staphylococcus aureus (MIC 7.5-20.0 mg/ml). The tested other cocci and Gram-positive rods from genus Corynebacterium xerosis were less susceptible (MIC 7.5-20.0 mg/ml). The essential oil was less effective against Gram-negative rods. The growth of the strains were inhibited by concentrations from 7.5 to ≥ 20.0 mg/ml. The Citri oil was more active against Gram-positive strains than Gram-negative aerobic bacteria.*

**KEYWORDS:** AEROBIC BACTERIA – SUSCEPTIBILITY – ORAL CAVITY – RESPIRATORY TRACT – CITRI OIL

#### Wstęp

Olejek cytrynowy (*Ol. Citri*) otrzymywany jest metodą tłoczenia na zimno ze świeżych zewnętrznych

owocni cytryn (wydajność wynosi 0,3-0,7%) (1). Duże plantacje drzew cytryny zwyczajnej (*Citrus limon L.*, z rodziny *Rutaceae*) są obecne w Stanach Zjednoczonych, Brazylii, Argentynie, a także w Azji Południowo-Wschodniej. Olejek jest bezbarwny lub barwy żółtej. Ma silny, charakterystyczny cytrynowy zapach. Natomiast olejek otrzymywany metodą destylacji owocni cytryn jest znacznie gorszej jakości (niższa zawartość wielu ważnych składników).

Olejek cytrynowy zawiera ponad 40 różnych związków. Dominującym składnikiem jest (+)-limonen (30-50%) (2-5). Wśród związków występujących w mniejszych ilościach są m.in.: α-pinen, β-pinen, cytral, α-terpineol, γ-terpinen, p-cymen, octan linalolu, octan geranylu, β-myrcen, γ-pinen, kariofyllen, α-tujon, geraniol, a ponadto bioflawonoidy, kumaryny i pektyny (1-8).

Olejek eteryczny otrzymywany z cytryn ma szereg różnych zastosowań. Wykorzystywany jest w przemyśle spożywczym, kosmetycznym i farmaceutycznym. Jego właściwości lecznicze znane są od wieków. Często jest wykorzystywany jako środek poprawiający smak i zapach leków, a także jako środek konserwujący. Zarówno olejek cytrynowy, jak i otrzymywane z niego niektóre składniki są stosowane w preparatach pobudzających wydzielanie śluzówki oskrzeli, ale w większych dawkach olejek ten używany jest jako środek hamujący wydzielanie śluzu. Wykorzystywany jest w leczeniu przeziębień, nieżytych oskrzeli, grypie, anginie oraz stanach zapalnych skóry (trądziku, opryszczkach, łupieżu). Stwierdzono, że zapobiega on kamicy nerkowej (9, 10). Ponadto znalazł zastosowanie w zaburzeniach trawienia (niestrawność, zgaga). Udowodniono też, że olejek cytrynowy obniża ciśnienie krwi oraz działa uspokajająco. Stosowany jest też w reumatyzmie i artretyzmie. Badania

wykazały jego działanie przeciwtleniające i przeciwnowotworowe (5, 6, 11-15). Olejku cytrynowego nie powinno stosować się u dzieci, kobiet w ciąży i karmiących. Ze względu na zawartość w olejku związków kumarynowych, które powodują nadwrażliwość na promieniowanie słoneczne, po jego zastosowaniu nie powinno się przebywać na słońcu.

Poza wymienionymi wyżej właściwościami olejku cytrynowego, należy zwrócić uwagę na jego działanie przeciwdrobnoustrojowe, które obejmuje bakterie, grzyby i niektóre wirusy (3, 4, 6, 8, 13, 16-34). Przeprowadzone wcześniej badania dotyczą przede wszystkim drobnoustrojów chorobotwórczych, które często uczestniczą w zakażeniach szpitalnych i wykazują dużą oporność na szereg antybiotyków. Brakuje badań dotyczących bakterii tlenowych i względnie beztlenowych, które występują w jamie ustnej i często są przyczyną zakażeń zarówno w jej obrębie, jak i dróg oddechowych.

### Cel pracy

Celem badań była ocena aktywności olejku cytrynowego wobec bakterii tlenowych powodujących zakażenia jamy ustnej oraz w górnych drogach oddechowych.

### Materiał i metody

Wykorzystane do badań bakterie tlenowe zostały wyizolowane z materiałów pobranych od pacjentów z różnymi zakażeniami w obrębie jamy ustnej i górnych dróg oddechowych. Łącznie oceniono wrażliwość na olejek 36 szczepów wyizolowanych od pacjentów. Należały one do następujących rodzajów: *Staphylococcus* (8 szczepów), *Enterococcus* (7), *Corynebacterium* (3), *Acinetobacter* (4), *Citrobacter* (2), *Escherichia* (3), *Klebsiella* (2), *Pseudomonas* (5), *Serratia* (2). Badania objęły też 5 szczepów wzorcowych z gatunków: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Escherichia coli* ATCC 25922 i *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. Badanie wrażliwości (MIC) bakterii tlenowych na olejek cytrynowy (ETJA, Elbląg) przeprowadzono metodą seryjnych rozcieńczeń w agarze Muellera-Hintona (35). Użyty do doświadczeń olejek cytrynowy dodawano do podłoża w celu uzyskania następujących stężeń: 2,5, 5,0, 7,0, 10,0, 15,0 i 20,0 mg/ml.

Zawiesinę, zawierającą  $10^5$  drobnoustrojów (CFU) na kroplę, наносono aparatem Steersa na powierzchnię agaru zawierającego odpowiednie stężenia olejku i bez jego dodatku (kontrola wzrostu szczepów). Inkubację podłoża prowadzono w warunkach tlenowych, w temp. 37°C przez 24 godz. MIC określano

jako najmniejsze stężenie olejku eterycznego, które całkowicie hamowało wzrost testowanych bakterii tlenowych.

### Wyniki badań i ich omówienie

Uzyskane wyniki badań wrażliwości na olejek cytrynowy bakterii tlenowych wyhodowanych z zakażeń zamieszczono w tabeli 1, a szczepów wzorcowych w tabeli 2. Z doświadczeń wynika, że wśród Gram-dodatnich bakterii największą wrażliwość wykazały szczepy z gatunku *Staphylococcus aureus*. Wartości MIC dla 77% tych szczepów wynosiły od 7,5 do 10,0 mg/ml. Olejek eteryczny był mniej aktywny wobec pozostałych ocenianych ziarniaków, które należały do gatunku *Staphylococcus epidermidis* (MIC  $\geq$  20,0 mg/ml) oraz *Enterococcus faecalis* (MIC 7,5- $\geq$  20,0 mg/ml). Testowane Gram-dodatnie pałeczki z gatunku *Corynebacterium xerosis* były wrażliwe na olejek cytrynowy w zakresie stężeń 15,0-20,0 mg/ml.

Znacznie niższą aktywność wykazał oceniany olejek eteryczny wobec Gram-ujemnych bakterii. Tylko wśród gatunków *Acinetobacter baumannii* i *Klebsiella pneumoniae* były pojedyncze szczepy, które okazały się wrażliwe na testowane stężenia olejku. Dla dwóch szczepów z gatunku *Acinetobacter baumannii* wartości MIC wynosiły 10,0 i 20,0 mg/ml, a dla jednego szczepu z gatunku *Klebsiella pneumoniae* 15,0 mg/ml. Pozostałe oceniane Gram-ujemne pałeczki wymagały do zahamowania wzrostu użycia stężeń  $>$  20,0 mg/ml.

Podsumowując, można podkreślić, że badane Gram-dodatnie bakterie okazały się bardziej wrażliwe na oceniany olejek cytrynowy (MIC dla 83% szczepów wynosiło 7,5-20,0 mg/ml) niż Gram-ujemne pałeczki (MIC dla 17% szczepów było w zakresie 10,0-20,0 mg/ml). Potwierdzają to wyniki badań innych autorów.

Zbliżone do naszych wyniki uzyskali Yousef i Tawil (28) oraz Hammer i wsp. (29). W tych badaniach olejek cytrynowy był także bardziej aktywny wobec Gram-dodatnich bakterii tlenowych, szczególnie wobec szczepów z gatunku *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis* oraz laseczek z gatunku *Bacillus subtilis*, które okazały się wrażliwe w zakresie stężeń wynoszących od 3,1 do 20,0 mg/ml.

Podobnie jak w naszych badaniach, także wymienieni autorzy wykazali znacznie niższą wrażliwość Gram-ujemnych bakterii tlenowych, w tym szczepów z gatunku *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Serratia marcescens*, dla których wartości MIC wynosiły od 20,0 do 50,0 mg/ml. Również badania przeprowadzone metodą krążkowo-dyfuzyjną przez Fishera i Phillips (1) wskazują, że strefy zahamowania wzrostu szczepów Gram-dodatnich

**Tab. 1.** Wrażliwość na olejek cytrynowy 36 szczepów bakterii tlenowych

Drobnoustroje	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące (MIC w mg/ml)						
		≥ 20,0	20,0	15,0	10,0	7,5	5,0	2,5
Gram-dodatnie								
<i>Staphylococcus aureus</i>	6		2		2	2		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	1	1					
<i>Enterococcus faecalis</i>	7	2	4			1		
<i>Corynebacterium xerosis</i>	3		2	1				
Gram-ujemne								
<i>Acinetobacter baumannii</i>	4	2	1		1			
<i>Citrobacter freundii</i>	2	2						
<i>Escherichia coli</i>	3	3						
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	1		1				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	3						
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2	2						
<i>Serratia marcescens</i>	2	2						
Bakterie tlenowe ogółem	36	18	10	2	3	3		

**Tab. 2.** Wrażliwość na olejek cytrynowy 5 szczepów wzorcowych bakterii tlenowych

Drobnoustroje	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące (MIC w mg/ml)						
		≥ 20,0	20,0	15,0	10,0	7,5	5,0	2,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1				1			
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	1				1			
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	1				1			
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	1			1				
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1	1						

bakterii były znacznie większe niż dla bakterii Gram-ujemnych. Dla szczepów *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* i *Staphylococcus aureus* wynosiły one od 23 do 41 mm, a dla Gram-ujemnych pałeczek z gatunku *Escherichia coli* 0157 i *Campylobacter jejuni* od 18 do 21 mm.

Kolejni autorzy (23), również wykorzystując metodę krążkowo-dyfuzyjną oraz MIC wykazali, że olejek cytrynowy był bardziej aktywny wobec szczepów *Staphylococcus aureus* (MIC 12,8 mg/ml) niż wobec szczepów Gram-ujemnych pałeczek z gatunku *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* (MIC > 6,4 mg/ml).

Jeszcze inni autorzy (8), oceniając aktywność olejku cytrynowego metodą krążkowo-dyfuzyjną, uzyskali zbliżone strefy zahamowania wzrostu dla Gram-do-

datnich i Gram-ujemnych bakterii, wśród których były szczepy z gatunków: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* i *Proteus vulgaris* (strefy wynosiły 12-14 mm), a dla pałeczek z gatunku *Pseudomonas aeruginosa* strefa ta wynosiła 10 mm.

## Wnioski

1. Olejek cytrynowy najwyższą aktywność wykazał wobec szczepów z gatunku *Staphylococcus aureus*, natomiast najniższą wrażliwością charakteryzowały się szczepy ocenianych Gram-ujemnych pałeczek.
2. Testowany olejek cytrynowy okazał się bardziej aktywny wobec Gram-dodatnich bakterii niż wobec szczepów Gram-ujemnych pałeczek.

## Piśmiennictwo

1. Fisher K, Phillips CA. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* 0157, *Listeria monocytogenes* in vitro in food systems. *J Appl Microbiol* 2006; 101:1232-40.
2. Belletti N, Ndagijimana M, Sisto C i wsp. Evaluation of the antimicrobial activity citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem* 2004; 52:6932-8.
3. Dimic GR, Kocic-Tanackov SD, Jovanov OO i wsp. Antibacterial activity of lemon, caraway and basil extracts on *Listeria* spp. *APTEFF* 2012; 43:239-46.
4. Zohra HF, Rachida A, Malika M i wsp. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of Algerian citrus. *Afr J Biotechnol* 2015; 14(12):1048-55.
5. Djenane D. Chemical profile, antibacterial and antioxidant activity of Algerian citrus essential oils and their application in *Sardina pilchardus*. *Foods* 2015; 4:208-28.
6. Baik JS, Kim S-S, Lee J-AL i wsp. Chemical composition and biological activities of essential oils extracted from Korean endemic *Citrus* species. *J Microbiol Biotechnol* 2008; 18(1):74-9.
7. Kochner KP. Dietary species in health and diseases (II). *Indien J Phys Pharmacol* 2008; 52(4):327-58.
8. Kirbaslar FG, Tavman A, Dulger B i wsp. Antimicrobial activity of Turkish citrus peel oils. *Pak J Bot* 2009; 41(6):3207-12.
9. Kang DE, Sur RL, Haleblan GE i wsp. Long-term lemonade based dietary manipulation in patients with hypocitraturic nephrolithiasis. *J Urol* 2007; 177(4):1358-62.
10. Saltzer MA, Low RK, McDonald M i wsp. Dietary manipulation with lemonade to treat hypocitraturic calcium nephrolithiasis. *J Urol* 1996; 156(3):907-11.
11. Campelo LM, Gocalves FC, Feitosa CM i wsp. Antioxidant activity of *Citrus limon* essential oil in mouse hippocampus. *Pharm Biol* 2011; 49(7):709-15.
12. Ghasemi K, Ghasemi Y, Ebrshimzadeh ML. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 *Citrus* species peels and tissues. *Pak J Pharm Sci* 2009; 22(3):277-81.
13. Bertuzzi G, Tirillini B, Angeloni P i wsp. Antioxidative action of *citrus limonum* essential oil on skin. *Eur J Med Plants* 2013; 3(1):1-9.
14. Yan HC, Hong P, Yu ZZ i wsp. Evaluation of antioxidant and antitumor activities of lemon essential oil. *J Med Plants Res* 2010; 4(18):1910-5.
15. Jomaa S, Rahmo A, Alnori AS i wsp. The cytotoxic effects of essential oil of Syrian *Citrus limon* peel on human colorectal carcinoma cell line (Lim 1863). *Middle East J Cancer* 2012; 3(1):15-21.
16. Sharma R, Chandra S, Singh A. Essential oils against lipophilic yeast like fungus. *Int J Pharm Biol Arch* 2012; 3(1):63-8.
17. Nannapaneni R, Muthaiyan A, Grandall PG i wsp. Antimicrobial activity of commercial citrus-based natural extracts against *Escherichia coli* 0157:H7 isolates and mutant strains. *Foodborne Pathogens Dis* 2008; 5(5):695-9.
18. Verma RK, Chaurasia L, Kumar M. Antifungal activity of essential oils against oils selected building fungi. *Ind J Nat Prod Res* 2011; 2(4):448-51.
19. Guerra FQS, Mebdes JM, de Oliveira A i wsp. Antibacterial activity of the essential oil of *Citrus limon* against multidrug resistant *Acinetobacter* strains. *Rev Bras Form* 2013; 94(2):142-7.
20. AL-Marini A, Saour G, Hamound R. *In vitro* antibacterial effects of five extracts intramacrophage *Brucella abortus* 544. *Iran J Med Sci* 2012; 37(2):119-25.
21. Kędzia A, Ziółkowska-Klinkosz M, Włodarkiewicz A i wsp. Wrażliwość bakterii beztlenowych na olejek cytrynowy (*Oleum citri*). *Post Fitoter* 2013; 2:1-5.
22. Elumalai K, Krishnappa K, Neelakhadan T. Antibacterial activity of six essential oils against pathogenic bacteria. *Int J Rec Sci Res* 2010; 1:21-7.
23. Yadav N, Yadav B, Yadav S i wsp. Study of antimicrobial activity of natural plant oils against bacterial species isolated from hospital sample. *Int J Pharm Biol Arch* 2012; 3(4):789-9.
24. Kędzia B, Hołderna-Kędzia E. Badanie wpływu olejków eterycznych na bakterie, grzyby i dermatofity chorobotwórcze dla człowieka. *Post Fitoter* 2007; 2:71-7.
25. Pandey RR, Dubey RC, Saini S. Phytochemical and antimicrobial studies on essential oils of some aromatic plants. *Afr J Biotechnol* 2010; 9(28):4364-68.
26. 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.
27. Jeff-  
-Agboola YA, Onifade AK, Akinyele BJ i wsp. *In vitro* antifungal activities of essential oil from Nigerian medicinal plants against toxigenic *Aspergillus flavus*. *J Med Plants Res* 2012; 6(23):4048-56.
28. Yousef RT, Tawil GG. Antimicrobial activity of volatile oils. *Pharmazie* 1980; 35:698-701.
29. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* 1999; 86:985-90.
30. Chao S, Young G, Oberg C i wsp. Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by essential oils. *Flavour Fragr J* 2008; 23:444-9.
31. Dhanavade NJ, Jalkute CB, Ghosh JS. Study antimicrobial activity of lemon (*Citrus lemon* L.) peel extract. *Brit J Pharmacol Toxicol* 2011; 2(3):119-22.
32. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacinuthu S. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement Alt Med* 2006; 6:230-5.
33. Bort S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *Int J Food Microbiol* 2004; 94:223-53.
34. Caccioni DRL, Guizzardini M, Biondi D i wsp. Relationships between volatile components of *Citrus* fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Int J Food Microbiol* 1998; 43:73-9.
35. National Committee for Clinical Laboratory Standards NCCLS Methods for dilution antimicrobial testing for bacteria that grow aerobically. Approved standards 7<sup>th</sup> ed. CLSI document M7-A7. Wayne PA CLSI 2006.

## Konflikt interesów

## Conflict of interest

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 10.11.2015

zaakceptowano/accepted: 15.12.2015

Adres/address:

\*prof. dr hab. Anna Kędzia  
ul. Małachowskiego 5/5, 80-262 Gdańsk Wrzeszcz  
e-mail: anak@gumed.edu.pl